



Lutte contre les micropolluants des eaux urbaines



AGENCE FRANÇAISE  
POUR LA BIODIVERSITÉ  
ÉTABLISSEMENT PUBLIC DE L'ÉTAT



## Module 3. Impact

Évaluation, sur organismes aquatiques et lignées cellulaires, de l'écotoxicité des effluents du Pôle de Santé d'Arcachon et intérêt d'un pilote par bioréacteur à membrane couplé au charbon actif pour le traitement des rejets.

Rapport Final

*Patrice Gonzalez (Equipe écotoxicologie aquatique – UMR 5805 EPOC)  
Caroline Gardia-Parège, Maximilien Delafoulhouse, Océane Hourtané,  
Hélène Budzinski (Equipe de physico- et toxicochimie de l'environnement –  
UMR 5805 EPOC)*

Décembre 2018

Porteurs du projet

Membres du réseau



## Contexte de programmation et de réalisation

Face à la problématique grandissante des micropolluants, le Ministère en charge de l'Écologie, l'Office national de l'eau et des milieux aquatiques (Onema, aujourd'hui Agence française pour la biodiversité) et les Agences de l'Eau, en partenariat avec le Ministère en charge de la santé, ont lancé en 2013 un appel à projets sur les moyens de lutter contre les micropolluants présents dans les eaux usées urbaines.

Les 13 projets retenus, dont le projet **REMPAR**, mobilisent sur 5 ans (2014 – 2018) des collectivités locales et leurs partenaires locaux privés (entreprises, PME/PMI) et/ou publics (universités, laboratoires de recherches) sur des initiatives innovantes allant des changements de pratiques des usagers et des professionnels jusqu'à la réalisation de nouvelles solutions techniques (aménagement urbains pour la gestion des eaux pluviales, méthodes de diagnostic des pollutions...) prenant en compte la notion de coût /efficacité.

Le SIBA (Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon) porte le projet **REMPAR** pour **RE**seau **Micro**Polluants du Bassin d'**AR**cachon.

Le Bassin d'Arcachon, zone de transition d'importance écologique (diversité des milieux, diversité des espèces, zone de reproduction, zone d'hivernage...) et économique (conchyliculture, tourisme, pêche...) constitue un territoire particulièrement sensible aux actions anthropiques. Les récentes « crises écologiques » à l'échelle du Bassin (présence de phycotoxines, mortalité des huîtres, forte variabilité du captage du naissain, recul des herbiers à zostères...) ont soulevé la question du niveau d'imprégnation du système par les micropolluants. **REMPAR** répond donc à la volonté des acteurs et des gestionnaires d'établir une veille active sur les micropolluants à l'échelle du Bassin, d'en identifier les origines et d'en réduire l'empreinte par des traitements adaptés ou des mesures de réduction à la source.

Les actions de **REMPAR** se coordonnent autour de cinq grandes thématiques.

**Identifier les rejets** : en cartographiant l'empreinte de plusieurs familles de micropolluants (métaux, HAP, filtres anti-UV, résidus médicamenteux, biocides...) sur le réseau d'eaux usées, les eaux douces et marines ainsi que les rejets d'eaux pluviales.

**Proposer des traitements adéquats** : évaluant l'efficacité, l'utilité et le coût de procédés adaptés : bassin d'infiltration pour les eaux pluviales et bioréacteur à membrane pour le traitement des effluents hospitaliers.

**Mesurer l'impact** : en évaluant la toxicité des rejets hospitaliers et l'efficacité des traitements proposés sur sa réduction, par des analyses écotoxicologiques développées sur les sites expérimentaux.

**Adapter nos comportements en conséquence** : en conduisant des enquêtes de pratiques dans le but d'identifier des leviers d'action pour la réduction à la source des micropolluants et d'impulser des modifications des pratiques.

**Partager et diffuser l'information** : **REMPAR** doit créer du lien entre les différents acteurs du territoire (collectivité, industriels, professionnels de santé, universitaires, acteurs économiques locaux et grand public) autour de la thématique des micropolluants dans les eaux (eaux naturelles, usées et pluviales). Il s'agit de partager une culture commune sur les sources et les rejets de micropolluants pour que chacun adapte ses pratiques au mieux ; et au-delà, de croiser les regards de chacun sur l'eau pour en comprendre les différents usages et sensibiliser l'ensemble du territoire à la préservation de cette ressource.

- **AUTEURS**

*Université de Bordeaux – UMR CNRS 5805 EPOC – LPTC*

Caroline GARDIA-PAREGE, post-doctorante, [caroline.gardia-parege@u-bordeaux.fr](mailto:caroline.gardia-parege@u-bordeaux.fr)

Maximilien DELAFOULHOUSE, post-doctorant

Océane HOURTANE, stagiaire

Hélène BUDZINSKI, directrice de recherches, responsable de l'équipe LPTC  
[helene.budzinski@u-bordeaux.fr](mailto:helene.budzinski@u-bordeaux.fr)

*Université de Bordeaux – UMR CNRS 5805 EPOC – équipe Ecotoxicologie Aquatique (EA)*

Patrice GONZALEZ, Chargé de recherches, responsable de l'équipe EA  
[patrice.gonzalez@u-bordeaux.fr](mailto:patrice.gonzalez@u-bordeaux.fr)

- **CORRESPONDANTS**

*Agence française pour la biodiversité (anciennement ONEMA)*: Estérelle  
VILLEMAGNE, chargée de mission innovation, [esterelle.villemagne@afbiodiversite.fr](mailto:esterelle.villemagne@afbiodiversite.fr)

*Agence de l'eau Adour-Garonne*: Jean-Pierre REBILLARD, chef de service  
Valorisation et Connaissance, [jean-pierre.rebillard@eau-adour-garonne.fr](mailto:jean-pierre.rebillard@eau-adour-garonne.fr)

## Référence du document

**Droits d'usage** : accès libre

**Niveau géographique** : national

**Couverture géographique** : Bassin d'Arcachon

**Niveau de lecture** : public professionnel

**Référence** : GONZALEZ P., GARDIA-PAREGE C., DELAFOULHOUSE M., HOURTANE O., BUDZINSKI H. 2018. REMPAP - Livrable 3. Évaluation, sur organismes aquatiques et lignées cellulaires, de l'écotoxicité des effluents du Pôle de Santé d'Arcachon et intérêt d'un pilote par bioréacteur à membrane couplé au charbon actif pour le traitement des rejets.

- **TITRE**

**Évaluation, sur organismes aquatiques et lignées cellulaires, de l'écotoxicité des effluents du Pôle de Santé d'Arcachon et intérêt d'un pilote par bioréacteur à membrane couplé au charbon actif pour le traitement des rejets**

- **RESUME**

Les hôpitaux de par leur spécificité sont un vecteur non négligeable de médicaments, anticancéreux, biocides et de détergents pour les stations de traitement des eaux usées. Les procédés de traitement biologiques dit « secondaire » utilisés actuellement ne permettent pas d'éliminer la totalité des micropolluants arrivant par les eaux usées et font des stations de traitement une source avérée en micropolluants pour le milieu aquatique. Parmi les composés susceptibles d'être rejetés dans l'eau, certains peuvent avoir des effets néfastes sur la faune et la flore. L'objectif de cette étude est double : évaluer l'impact potentiel de ces rejets hospitaliers sur les organismes aquatiques et évaluer l'efficacité de traitement tertiaire de type bioréacteur à membrane couplé au charbon actif sur ces rejets vis-à-vis des composés pouvant induire un effet biologique. Pour cela, des eaux brutes et traitées par bioréacteur à membrane seul puis associée à une colonne de charbon actif ont été testées chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) et deux bivalves ; l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et la corbicule (*Corbicula fluminea*), mais également lors de bioessais sur des lignées cellulaires permettant d'évaluer les activités biologiques liées à la présence de perturbateurs endocriniens (activité œstrogénique), de dioxines et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les analyses montrent que les rejets hospitaliers sont chargés en composés œstrogéno-mimétiques et *HAP-like*. Ces effluents montrent également des effets forts sur l'ensemble des organismes modèles utilisés. Le bioréacteur à membrane seul permet d'éliminer jusqu'à 99% l'activité œstrogénique et 98% l'activité *HAP-like* observée. Ce traitement permet également d'éliminer la quasi-totalité des effets chez les bivalves. Chez le poisson, une nette diminution des effets est observée après traitement au B&M, sans toutefois conduire à une disparition totale de ces derniers. L'association bioréacteur à membrane et charbon actif permet d'abaisser l'activité œstrogénique des eaux usées hospitalières en dessous des limites de détections du bio-essai employé. Il est par contre constaté qu'une légère activité *HAP-like* persiste malgré le traitement couplé. Chez le poisson, cette association B&M et charbon actif conduit à une diminution supplémentaire faible des effets transcriptomiques. Ces résultats montrent une bonne efficacité du traitement par B&M, mais que certains composés semblent encore passer ce crible. Ils démontrent également que les bivalves sont globalement moins sensibles aux effluents hospitaliers.

- **MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)**

LABORATOIRE MOBILE, EFFLUENTS HOSPITALIER, ECOTOXICOLOGIE, POISSON ZEBRE, CORBICULE, HUITRE CREUSE, IMPACTS, BIOESSAIS, PERTURBATEURS ENDOCRINIENS.

- **SYNTHESE POUR L'ACTION OPERATIONNELLE**

## 1. Contexte

Le Bassin d'Arcachon est constitué de 10 communes riveraines où la population dépasse 100 000 habitants et est marquée par une forte saisonnalité (la population y est multipliée par 5 en période estivale). Le Bassin a connu la plus forte augmentation de population de l'ensemble du littoral Aquitain au cours des 40 dernières années et concentre actuellement 25 % de la population « littorale » de la région. Il constitue ainsi une des zones à forte densité humaine en région Nouvelle Aquitaine renforcée par une forte attractivité touristique. Il en découle une importante augmentation du nombre de résidences principales. Sont également présents des sites industriels et hospitaliers. L'ensemble induit une accélération de l'urbanisation, qui génère ruissellement d'eaux pluviales et eaux usées à traiter contenant de nombreux micropolluants. Afin de gérer efficacement les eaux usées, le SIBA (Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon) a réalisé un réseau de collecte associé à 3 stations d'épuration. Cependant, une fraction non négligeable des micropolluants, notamment des résidus médicamenteux, est réfractaire aux procédés d'épuration par voie biologique classiques. La réduction de l'empreinte en micropolluants pour le Bassin d'Arcachon est aujourd'hui devenue une nécessité. De par la vulnérabilité environnementale du Bassin, les enjeux qu'implique la qualité de ses eaux et le risque qui pèse aujourd'hui sur la filière ostréicole, la préservation de ce site requiert une attention particulière et des actions d'envergure. Le Pôle de Santé d'Arcachon, a été mis en place en 2012 sur la commune de La Teste-de-Buch. Ce centre hospitalier, d'une capacité d'hébergement de 283 lits, a subi une forte croissance de ses activités ces dernières années avec un nombre de consultations ayant augmenté de 218%.

Les rejets hospitaliers contiennent des substances très variées. Parmi celles-ci sont retrouvées des médicaments, des désinfectants, des détergents, des biocides et des résidus issus des produits d'hygiène corporelle. La somme de ces composés peut atteindre plusieurs centaines de microgrammes par litre dans les eaux de surface. Même à faibles concentrations, une exposition chronique peut provoquer des effets néfastes sur les organismes. Cependant, les bases scientifiques font souvent défaut pour apprécier les risques écotoxicologiques et le comportement de ces substances dans les écosystèmes ou dans les systèmes d'évacuation.

Dans ce contexte, le module « impact » du projet REMPARG concerne l'étude écotoxicologique des rejets hospitaliers du pôle de santé d'Arcachon (PSA) afin d'identifier les effets biologiques de ces derniers sur des organismes modèles et sur modèles cellulaires mais également d'évaluer l'efficacité des traitements innovants mis en place (bioréacteur à membrane couplé à une colonne de charbon actif) sur la réduction de la toxicité des rejets.

**Les actions menées ont notamment concerné la mise en place d'un pilote de traitement des rejets hospitaliers et d'un laboratoire mobile. Ce dernier a permis la réalisation d'expérimentation afin de déterminer la stabilité des composés présents dans l'effluent hospitalier, mais également leurs impacts sur trois organismes modèles ; deux bivalves, la corbicule d'eau douce (*Corbicula fluminea*) et l'huître du Pacifique (*Magallana gigas*) mais aussi le poisson zèbre (*Danio rerio*). Parallèlement, une démarche d'évaluation des activités biologiques basée sur l'emploi de modèles cellulaires permettant la détection spécifique de composés ayant une activité de perturbateurs endocriniens a été menée. Ces expérimentations ont également permis de déterminer l'efficacité du traitement de ces effluents par un procédé innovant par Bioréacteur à Membrane (BàM), seul ou couplé à une colonne de charbon actif. En effet, le charbon actif est couramment utilisé comme complément des traitements de par ses capacités**

**d'élimination de certains composés métalliques et organiques, notamment les micropolluants tels que les pesticides. Le but était ici de voir si le couplage au charbon actif pouvait compléter le BâM lors du traitement des effluents hospitaliers du pôle de santé d'Arcachon.**

## 2. Méthodologie

Plusieurs modèles biologiques ont été utilisés lors de ces études afin de déterminer les effets toxiques potentiels des effluents du PSA, mais également envisager l'efficacité du traitement par BâM. Ces modèles ont été choisis en tenant compte de leur position dans la colonne d'eau, mais aussi de leur pertinence pour représenter les effets possibles dans l'environnement. Parmi eux, deux bivalves ont été étudiés : la corbicule (*Corbicula fluminea*) et l'huître creuse (*Magallana gigas*). *Corbicula fluminea* est un bivalve vivant en eau douce. La biologie de ces mollusques est bien connue, ils filtrent de grandes quantités d'eau à des fins respiratoires et nutritionnelles et de ce fait peuvent bioaccumuler les contaminants. De plus, cette espèce est décrite depuis de nombreuses années comme un organisme modèle de choix pour les écotoxicologues. L'huître *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), est originaire du Pacifique. Elle a été introduite en France à partir de la fin des années 1960 à des fins économiques. De nos jours, c'est l'espèce de bivalve la plus cultivée au monde. En Europe, elle est présente de l'Irlande jusque dans le bassin méditerranéen. La France est le 4<sup>ème</sup> producteur ostréicole mondial (source FAO). Bien que la production ostréicole du bassin d'Arcachon ne représente que 5,5% de la production nationale (source FAO), la production de naissain y est importante et représentait encore au début des années 2000 plus de 60% des 4,5 milliards de jeunes huîtres nécessaires à la production globale française.

Le troisième modèle biologique utilisé dans le cadre de ce projet REMPAP a été le poisson zèbre, *Danio rerio*. Ce poisson, d'origine d'Asie, est une espèce robuste faisant de lui le modèle biologique de poisson le plus utilisé au monde. Ce modèle a également été reconnu comme pertinent lors d'études évaluant la toxicité de composés chimiques : relation dose-réponse, seuil de mortalité (CL50), mécanismes d'actions des molécules nocives.

Au côté de ces modèles biologiques, des modèles cellulaires ont été employés au cours du projet REMPAP. Ces dernières renseignent sur la présence potentielle de différentes familles de contaminants, notamment de perturbateurs endocriniens.

L'ensemble de ces modèles a été exposé aux effluents issus du pôle de santé d'Arcachon bruts ou traités par le BâM couplé ou non à du charbon actif. Lors de ces expositions, la stabilité de certains composés médicamenteux, fréquemment détectés dans l'environnement, a été suivie (carbamazépine, diclofénac, oxazépam et sulfaméthoxazole). De plus, des analyses biologiques nous ont permis de suivre les effets de cette exposition sur la réponse des organismes notamment via l'étude du niveau d'expression de gènes impliqués dans de grandes fonctions telles que la production d'énergie, la lutte contre le stress oxydant, la défense contre les micropolluants ou les atteintes à l'ADN.

Afin d'être au plus près des effluents hospitaliers et du pilote de traitement BâM, une structure expérimentale de 15 m<sup>2</sup> a été installée en début de projet sur le site de la station d'épuration de La Teste de Buch, puis progressivement aménagée afin de pouvoir réaliser des études d'expositions aux effluents hospitaliers du pôle de santé d'Arcachon. Six expérimentations distinctes ont été réalisées au sein de cette structure entre février 2015 et décembre 2016. L'objectif général des expérimentations était d'évaluer l'efficacité du BâM, en comparant l'effet toxique des effluents traités et non traités sur les organismes et les cultures cellulaires.

### 3. Principaux résultats et discussion

Les analyses des 4 molécules dites traceurs (carbamazépine, oxazépam, diclofénac et sulfaméthoxazole) mettent en évidence des variations importantes de la composition de l'effluent brut tout au long des expérimentations. La consommation, l'utilisation et l'application de produits pharmaceutiques peut considérablement varier au cours du temps. La nature et la quantité de composés pharmaceutiques retrouvés dans les effluents hospitaliers sont le reflet du nombre de patients, de leur thérapie et du temps passé à l'hôpital.

Nos résultats montrent que l'efficacité des traitements des effluents hospitaliers par Bàm seul ou couplé à un module de charbon actif est différente en fonction du modèle biologique utilisé.

Le travail effectué par bioessais sur culture cellulaire a permis de montrer que les eaux usées hospitalières sont une source importante de composés pouvant avoir une activité de perturbateur endocrinien (œstrogéno-mimétiques et *HAP-like*). Il est donc primordial de traiter de façon adaptée ces effluents avant leur rejet dans le milieu naturel. Le traitement par bioréacteur à membrane représente une solution pertinente pour réduire de manière partielle les hormones, les xéno-hormones et les molécules *HAP-like* de la phase dissoute, et ce même lors de forts apports en composés actifs. Ce traitement possède des taux d'abattement en composés similaires à ceux des traitements classiques utilisés en station de traitement des effluents urbains. Ces travaux ont montré que l'ajout d'un traitement tertiaire (charbon actif) permet de diminuer l'activité œstrogénique des eaux usées hospitalières de sorte que sur l'ensemble des échantillons après traitement aucune activité œstrogénique n'a été détectée. Pour l'activité *HAP-like*, une activité résiduelle persiste dans les eaux traitées malgré l'utilisation du procédé par charbon actif mais cette activité est abaissée de plus d'un facteur 100.

Concernant les organismes modèles, les différents micropolluants et pathogènes contenus dans les rejets hospitaliers (désinfectants, détergents, résidus médicamenteux...), et leurs effets interactifs suscitent une toxicité élevée aussi bien chez *M. gigas* et *C. fluminea* que chez *D. rerio*. Ces résultats sont en accord avec les revues bibliographiques de Boillot et collaborateurs (2008) et Orias et Perrodin (2013), qui ont révélé la toxicité des eaux usées hospitalières, chez différents organismes. Les résultats obtenus lors d'une exposition au perméat du Bàm révèlent une diminution de l'activité des différentes fonctions métaboliques impliquées dans la défense et la neutralisation des composés toxiques. L'efficacité du Bàm sur la réduction de la toxicité des effluents hospitaliers au niveau génétique chez les deux espèces de bivalves semble donc être convaincante. En effet, la réponse à ce type de contamination est très faible, et les fonctions métaboliques impliquées sont peu ou pas stimulées. Ce type de réponse est observé sur les perméats issus du Bàm seul, mais aussi couplé au charbon actif. En revanche, dans le cas du poisson *D. rerio*, le perméat entraîne encore une toxicité. Cela peut être dû à l'ajout de la voie trophique en termes de contamination, mais aussi par la présence potentielle de pathogènes. En effet, bien que le Bàm soit efficace dans l'élimination d'organismes microbiens, l'encrassement des membranes peut influencer la capacité à assurer la norme microbiologique requise pour le perméat obtenu. La porosité des membranes étant de 0,2 micron, elles réalisent une microfiltration des bactéries les plus grosses. Cependant, les bactéries de plus petites tailles et les virus nécessitent eux une ultrafiltration, non réalisée par les membranes du bioréacteur mis en place sur la station d'épuration de La Teste. Une autre hypothèse, à ne pas écarter, repose sur l'activité métabolique de ces organismes capables de dégrader les composés présents dans l'effluent et ainsi générer des métabolites ayant une activité biologique. L'ajout du charbon actif ne se montre que peu efficace sur la diminution des effets observés, notamment au niveau du cerveau et du muscle, chez ce modèle.

Le couplage d'un traitement par bioréacteur à membrane et d'une colonne de charbon actif se relève être un dispositif efficace pour l'assainissement des effluents hospitaliers du PSA notamment concernant le risque environnemental lié aux composés œstrogénomimétiques et *HAP-like*. Ce constat est sûrement vrai pour d'autres molécules. En effet, nos expérimentations sur une espèce modèle de poisson, capable de métaboliser efficacement les composés, montrent une bonne diminution de l'impact des effluents au niveau du cerveau après traitement au Bàm suggérant une élimination efficace de composés potentiellement psychotropes. Au niveau des autres organes, le traitement par Bàm entraîne une diminution notable de l'effet de l'effluent sans toutefois conduire à une diminution totale de ce dernier. Ceci suggère que certaines molécules doivent continuer à échapper à ce type de traitement. Nos résultats montrent également que les bivalves tels que l'huître et la corbicule sont globalement moins sensibles au composés présents dans ces effluents et que le traitement par Bàm seul ou couplé à un charbon actif conduit à une disparition quasi complète de ces effets chez ces organismes.

#### 4. Pour en savoir plus

GONZALEZ P., GARDIA-PAREGE C., DELAFOULHOUSE M., Océane HOURTANE O., BUDZINSKI H. 2018. REMPAP - Livrable 3. Évaluation, sur organismes aquatiques et lignées cellulaires, de l'écotoxicité des effluents du Pôle de Santé d'Arcachon et intérêt d'un pilote par bioréacteur à membrane couplé au charbon actif pour le traitement des rejets.

Hélène Budzinski : [helene.budzinski@u-bordeaux.fr](mailto:helene.budzinski@u-bordeaux.fr)

Patrice Gonzalez : [patrice.gonzalez@u-bordeaux.fr](mailto:patrice.gonzalez@u-bordeaux.fr)

# Sommaire

Pages

<b><u>1. Contexte et objectifs</u></b>	<b>10</b>
<b><u>1.1 Problématiques environnementales liées à la présence de micropolluants</u></b>	<b>10</b>
<b><u>1.2 Contribution des rejets hospitaliers aux risques écologiques</u></b>	<b>10</b>
<b><u>1.3. Les bioessais <i>in vitro</i> : outils de détection des activités biologiques</u></b>	<b>11</b>
<b><u>1.4 Objectifs du livrable</u></b>	<b>12</b>
<b><u>2. Méthodologie</u></b>	<b>12</b>
<b><u>2.1. Approches sur organismes modèles</u></b>	<b>12</b>
<b><u>2.1.1 Modèles biologiques</u></b>	<b>12</b>
<b><u>a. Le poisson zèbre</u></b>	<b>12</b>
<b><u>b. La corbicule d'eau douce</u></b>	<b>13</b>
<b><u>c. L'huître creuse</u></b>	<b>13</b>
<b><u>2.1.2. Conditions expérimentales</u></b>	<b>13</b>
<b><u>2.1.3. Analyses chimiques</u></b>	<b>14</b>
<b><u>2.1.4. Analyses biologiques</u></b>	<b>14</b>
<b><u>2.1.5. Statistiques</u></b>	<b>15</b>
<b><u>2.2. Approches sur lignées cellulaires</u></b>	<b>15</b>
<b><u>2.2.1 La préparation des échantillons</u></b>	<b>15</b>
<b><u>a. L'échantillonnage</u></b>	<b>15</b>
<b><u>b. Traitement des échantillons</u></b>	<b>15</b>
<b><u>2.2.2 Tests cellulaires</u></b>	<b>15</b>
<b><u>a. Les lignées cellulaires</u></b>	<b>15</b>
<b><u>b. Exposition des cellules et analyse des échantillons</u></b>	<b>17</b>
<b><u>2.2.3. Assurance qualité</u></b>	<b>17</b>
<b><u>3. Mise en place du laboratoire mobile</u></b>	<b>18</b>
<b><u>4. Principaux résultats et discussion</u></b>	<b>18</b>
<b><u>4.1 Bioessais sur lignées cellulaires</u></b>	<b>18</b>
<b><u>4.1.1 Activités biologiques mesurées dans les effluents hospitaliers</u></b>	<b>18</b>
<b><u>4.1.2. Efficacité du traitement par Bàm seul</u></b>	<b>19</b>
<b><u>4.1.3. Efficacité du traitement par Bàm couplé à un module de charbon actif</u></b>	<b>20</b>
<b><u>4.2 Exposition d'organismes modèles</u></b>	<b>21</b>
<b><u>4.2.1. Efficacité du traitement par Bàm seul</u></b>	<b>21</b>
<b><u>4.2.1.1 – Paramètres physico-chimiques</u></b>	<b>21</b>
<b><u>a. Suivi</u></b>	<b>21</b>
<b><u>b. Conclusions</u></b>	<b>22</b>
<b><u>4.2.1.2 – Effets chez les bivalves</u></b>	<b>23</b>
<b><u>a - L'huître creuse <i>C. gigas</i></u></b>	<b>23</b>
<b><u>b – La corbicule <i>C. fluminea</i></u></b>	<b>24</b>
<b><u>C – Conclusions</u></b>	<b>24</b>
<b><u>4.2.1.3 – Effets chez le poisson <i>D. rerio</i></u></b>	<b>26</b>
<b><u>a. Résultats</u></b>	<b>26</b>
<b><u>b. Conclusions</u></b>	<b>26</b>
<b><u>4.2. 2. Efficacité du traitement par Bàm couplé à un module de charbon actif</u></b>	<b>28</b>
<b><u>4. 3 Conclusion générale sur l'efficacité du bioréacteur à membrane</u></b>	<b>30</b>
<b><u>5. Bibliographie</u></b>	<b>32</b>

## **1. Contexte et objectifs**

### **1.1 Problématiques environnementales liées à la présence de micropolluants**

Le Bassin d'Arcachon est constitué de 10 communes riveraines où la population dépasse 100 000 habitants et est marquée par une forte saisonnalité (la population y est multipliée par 5 en période estivale). Le Bassin a connu la plus forte augmentation de population de l'ensemble du littoral Aquitain au cours des 40 dernières années et concentre actuellement 25 % de la population « littorale » de la région. Il constitue ainsi une des zones à forte densité humaine en Région Nouvelle Aquitaine renforcée par une forte attractivité touristique. Il en découle une importante augmentation du nombre de résidences principales. Sont également présents des sites industriels et hospitaliers. L'ensemble induit une accélération de l'urbanisation, qui génère ruissellement d'eaux pluviales et eaux usées à traiter contenant de nombreux micropolluants. Afin de traiter efficacement les eaux usées, le SIBA (Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon) a réalisé un réseau de collecte associé à 3 stations d'épuration. Cependant, une fraction non négligeable des micropolluants, notamment des résidus médicamenteux, est réfractaire aux procédés d'épuration par voie biologique classiques. La réduction de l'empreinte en micropolluants pour le Bassin d'Arcachon est aujourd'hui devenue une nécessité. De par la vulnérabilité environnementale du Bassin, les enjeux qu'implique la qualité de ses eaux et le risque qui pèse aujourd'hui sur la filière ostréicole, la préservation de ce site requiert une attention particulière et des actions d'envergure. Le Pôle de Santé d'Arcachon, a été mis en place en 2012 sur la commune de La Teste-de-Buch. Ce centre hospitalier, d'une capacité d'hébergement de 283 lits, a subi une forte croissance de ses activités ces dernières années avec un nombre de consultations ayant augmenté de 218% depuis sa création.

Les rejets hospitaliers contiennent des substances très variées. Parmi celles-ci sont retrouvées des médicaments, des désinfectants, des détergents, des biocides et des résidus issus des produits d'hygiène corporelle (Boillot, 2008 ; Choubert *et al*, 2012 ; Kümmerer 2001). La somme de ces composés peut atteindre plusieurs centaines de microgrammes par litre dans les eaux de surface (Galli, 2009). Même à faibles concentrations, une exposition chronique peut provoquer des effets néfastes sur les biotopes (Halling-Sorensen, 1998). Cependant, les bases scientifiques font souvent défaut pour apprécier les risques écotoxicologiques et le comportement de ces substances dans les écosystèmes ou dans les systèmes d'évacuation (Galli, 2009). En effet, certains de ces micropolluants peuvent avoir des effets toxiques, génotoxiques et/ou mutagènes sur la faune. Leur liaison sur des récepteurs nucléaires comme les récepteurs de la dioxine (et des hydrocarbures aromatiques polycycliques) (AhR) peuvent être une des causes de ces effets néfastes. Certains contaminants peuvent agir en se substituant aux hormones naturelles présentes dans l'organisme et perturbent ainsi les processus de développement et/ou de reproduction. Leur mode d'action consiste à se lier aux récepteurs stéroïdiens, tel que le récepteur des œstrogènes (ER). Ainsi, il a été prouvé que l'éthinylestradiol, utilisé comme molécule contraceptive, pouvait impacter significativement le comportement de ponte chez le poisson (*Pimephales promelas*) à une concentration de 0,1 ng/L (Pawlowski *et al.*, 2004). Plus récemment, de fortes altérations de la reproduction (*i.e.* hypertrophie des gonades, induction de vitellogénine...) ont été observées chez des poissons (*Gobio Gobio*) pêchés en rivière (Sanchez *et al.*, 2011). Ces altérations du système reproductif ont pu être imputées à la présence de différents composés à usage pharmaceutique rejetés dans le milieu par des effluents industriels (Creusot *et al.*, 2014; Gardia-Parège, 2015). Ces études illustrent l'intérêt de traiter de manière adaptée les effluents qu'ils soient d'origine urbaine ou industrielle avant leur rejet dans l'environnement.

## 1.2 Contribution des rejets hospitaliers aux risques écologiques

De par leurs activités, les hôpitaux sont amenés à utiliser une importante quantité de composés à usage pharmaceutique mais également une quantité non négligeable de détergents afin d'aseptiser les locaux (Kümmerer 2001 ; Livrable 2.3. de REMPARG<sup>1</sup>). Les hôpitaux n'ayant pas de traitement spécifique de leurs eaux usées, cette utilisation conséquente de molécules et leur diversité font des rejets hospitaliers une source potentielle importante en composés pharmaceutiques et biocides pour les stations d'épuration.

En termes de risques environnementaux, il a été montré que les rejets hospitaliers représentaient une écotoxicité supérieure aux eaux usées urbaines liée à cet apport de molécules variées et pouvant atteindre des concentrations importantes (Ferrando-Climent et al., 2014).

Parmi les composés principalement administrés dans les hôpitaux, les anticancéreux représentent une famille de molécules à risque pour les organismes aquatiques (Besse et al., 2012 ; Ollala et al., 2018). Certains médicaments utilisés pour traiter les maladies hormono-dépendantes comme l'ostéoporose ou certains cancers, sont rapportées pour affecter la reproduction chez le poisson. A ce titre, le tamoxifène, molécule utilisée pour traiter le cancer du sein, entraîne une augmentation du taux de vitellogénine chez le poisson mâle (*Pimephales promelas*) à partir d'une exposition à 10 ng/L (Williams et al., 2007).

Aux composés à usage thérapeutique peuvent s'ajouter les détergents tels que les alkylphénols. Ces perturbateurs endocriniens sont reconnus pour entraîner des effets sur la reproduction du poisson à partir de 10 µg/L (Routledge et al., 1998). Dans les effluents hospitaliers, les concentrations en alkylphénols peuvent atteindre plusieurs centaines de µg/L suivant les journées et les services (Nagarnaik et al., 2010). Un traitement des eaux usées est donc nécessaire pour éviter le rejet de ces contaminants dans le milieu aquatique.

Outre les effets néfastes causés par les molécules individuelles, le risque environnemental peut également résulter du mélange de composés (Escher et al., 2011). Ainsi, il a récemment été démontré que des molécules en mélange pouvaient avoir des effets synergiques sur les récepteurs des xénobiotiques (Delfosse et al., 2015).

En parallèle aux risques chimiques liés à la présence de micropolluants, un danger biologique lié à la propagation de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques par les rejets hospitaliers peut être souligné (Kümmerer, 2009).

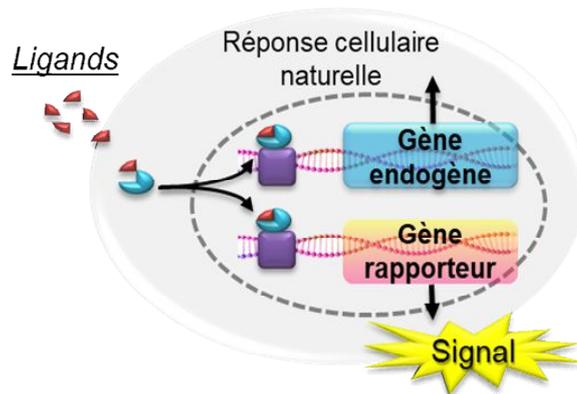
## 1.3. Les bioessais *in vitro* : outils de détection des activités biologiques

Pour détecter la présence de composés biologiquement actifs dans l'environnement, des modèles cellulaires permettant une détection par luminescence ou fluorescence des activités biologiques ont été développés (Balaguer et al., 1999; Hahn et al., 1993; Kinani et al., 2010).

Leur principe est basé sur l'expression de gènes rapporteurs ou endogènes contrôlés par des récepteurs nucléaires. Le récepteur est activé lorsqu'il s'associe à son ligand spécifique. L'association ligand- récepteur va entraîner l'expression du gène cible codant pour une enzyme, détectable par luminescence ou fluorescence (*e.g.* luciférase ; éthoxyrésorufin-O-dééthylase, EROD). L'intensité du signal mesuré est directement proportionnelle à la concentration en composés capables d'activer le récepteur (Figure 1). Ces bioessais permettent donc d'évaluer de façon sensible, spécifique et quantitative l'activité biologique globale d'un échantillon environnemental (Aït-Aïssa, 2009). La pertinence de ces modèles pour évaluer les activités biologiques des eaux usées a été démontrée dans de nombreuses études (Bellet et al., 2012; Fuster, 2017; Gardia-Parège, 2015).

---

<sup>1</sup> Le livrable 2.3. étudie le profil des rejets du Pôle de Santé d'Arcachon en termes qualitatifs et quantitatifs, et établit une comparaison avec les rejets urbains.



**Figure 1 : Principe simplifié du mécanisme d'action des récepteurs nucléaires**

### 1.4 Objectifs du livrable

Dans ce contexte, le module « impact » du projet REMPLAR concerne l'étude écotoxicologique des rejets hospitaliers du pôle de santé d'Arcachon (PSA) afin d'identifier les effets biologiques de ces derniers sur des organismes modèles et sur modèles cellulaires mais également d'évaluer l'efficacité des traitements innovants mis en place (bioréacteur à membrane couplé à une colonne de charbon actif) sur la réduction de la toxicité des rejets.

Les actions menées ont notamment concerné la mise en place d'un pilote de traitement des rejets hospitaliers et d'un laboratoire mobile. Ce dernier a permis la réalisation d'expérimentation afin de déterminer la stabilité dans les unités expérimentales des composés présents dans l'effluent hospitalier, mais également leurs impacts sur trois organismes modèles ; la corbicule d'eau douce (*Corbicula fluminea*), l'huître du Pacifique (*Crassostrea gigas*) et le poisson zèbre (*Danio rerio*). Parallèlement, une démarche d'évaluation des activités biologiques basée sur l'emploi de modèles cellulaires permettant la détection spécifique de composés œstrogéno-mimétiques et « dioxine-like » a été menée. Au cours des deux premières années du projet REMPLAR, ces expérimentations ont permis de déterminer les impacts potentiels de l'effluent brut, mais également l'efficacité du traitement par Bioréacteur à Membrane (BàM), seul ou couplé à une colonne de charbon actif. En effet, le charbon actif est couramment utilisé comme complément des traitements de par ses capacités d'élimination de certains composés métalliques et organiques, notamment les micropolluants tels que les pesticides. Le but était ici de voir si le couplage au charbon actif pouvait compléter le BàM lors du traitement des effluents hospitaliers du pôle de santé d'Arcachon.

## 2. Méthodologie

### 2.1. Approches sur organismes modèles

#### 2.1.1 Modèles biologiques

##### a. Le poisson zèbre

Le poisson zèbre, *Danio rerio*, est une espèce d'eau douce de la famille des Cyprinidés. Ce poisson, d'origine d'Asie du sud et du sud-est, est une espèce vivant dans des cours d'eau lents. Sa robustesse fait de lui un bon modèle biologique vertébré. En effet, *D. rerio* est facile à maintenir en aquarium car il tolère une large gamme de température (18°C à 25°C), de qualité d'eau et son espérance de vie est de 3 ans. Un autre atout à l'utilisation de ce poisson est que son génome est entièrement séquencé (<http://www.ensembl.org>) (Cambier, 2009). Ce modèle a également été reconnu comme pertinent lors d'études évaluant la toxicité de composés chimiques : relation dose-réponse, seuil de mortalité (CL50), mécanismes d'actions des molécules nocives, ... (Hill *et al.* 2005).

### **b. La corbicule d'eau douce**

*Corbicula fluminea* est un mollusque bivalve hétérodonte vivant en eau douce et saumâtre. Cette espèce a été détectée dans les années 1930 aux USA en provenance de l'Asie de l'est. Dès lors, *C. fluminea* n'a cessé de se reproduire et a été signalé dans les années 1970 en France (Vincent et al, 2000). La biologie de ces mollusques est bien connue, ils filtrent de grandes quantités d'eau à des fins respiratoires et nutritionnelles et de ce fait peuvent bioaccumuler les contaminants. De plus, cette espèce est décrite depuis de nombreuses années comme un organisme modèle de choix pour les écotoxicologues (Gramaglia et al, 2011). Son utilisation en conditions contrôlées de laboratoire est aisée et de nombreux paramètres biologiques, tels que la connaissance de nombreuses séquences géniques, sont connus. Les organismes utilisés ici proviennent d'un site indemne de pollution situé sur l'Isle.

### **c. L'huître creuse**

L'espèce *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), est originaire du Pacifique. Elle a été introduite en France à partir de la fin des années 1960 à des fins économiques (Renault, 2006). De nos jours, c'est l'espèce de bivalve la plus cultivée au monde. En Europe, elle est présente de l'Irlande jusque dans le bassin Méditerranéen. La France est le 4<sup>ème</sup> producteur ostréicole mondial (source FAO). Bien que la production ostréicole du bassin d'Arcachon ne représente que 5,5% de la production nationale (source FAO), la production de naissain y est importante et représentait encore au début des années 2000 plus de 60% des 4,5 milliards de jeunes huîtres nécessaires à la production globale française (Auby and Maurer 2004). Les organismes utilisés lors de nos études étaient des juvéniles de stade 4 (12 mois) obtenus chez un ostréiculteur en provenance du banc d'Arguin (site très peu pollué) et maintenus au laboratoire en circuit ouvert.

### **2.1.2. Conditions expérimentales**

L'objectif général des expérimentations était d'évaluer l'efficacité du B&M, en comparant l'effet toxique des effluents traités et non traités sur les organismes, via l'expression de gènes cibles. Des lots de 10 d'individus (huîtres, poissons zèbres ou corbicules) ont été exposés durant 7 jours à trois types d'effluents hospitaliers, à savoir

- (i) Soit de l'effluent brut non traité (effluent d'entrée),
- (ii) Soit de l'effluent traité (perméat récupéré à la sortie du B&M),
- (iii) Soit au « perméat » du B&M traité aussi par un passage sur charbon actif.

Les organismes ont été placés dans des aquariums expérimentaux contenant 20L d'effluent dilué au dixième dans de l'eau (eau de mer en provenance d'Arguin pour les huîtres ; eau douce du réseau déchlorée pour les poissons et les corbicules). Pour maintenir la pression de contamination constante sur toute la durée de l'expérimentation, un circuit continu est mis en place grâce à l'installation de pompes péristaltiques. Ces pompes assurent également un renouvellement quotidien du contenu des aquariums expérimentaux, correspondant à la moitié du volume total (10 litres). Ainsi deux circuits indépendants ont été mis en place :

- (i) Un premier circuit permettant de réaliser les dilutions au dixième des effluents dans deux bacs de rétention, avant l'arrivée dans les aquariums expérimentaux. Ce circuit est réalisé à partir de deux pompes péristaltiques de 4 canaux de débit 1 mL.min<sup>-1</sup> (pompe A) et de 9 mL.min<sup>-1</sup> (pompe B). Pour réduire au maximum la part de MES dans le système expérimental, l'effluent hospitalier brut a été laissé décanté 24h systématiquement avant d'être prélevé de manière continue dans un erlenmeyer.
- (ii) Un second circuit permettant d'approvisionner les unités expérimentales (ou UEs) à partir des bacs de rétention, et le renouvellement de leur contenu. Ce circuit est lui alimenté par une pompe péristaltique 8 canaux de débit 7 mL. min<sup>-1</sup>.

Parallèlement, un aquarium témoin a également été mis en place afin de mettre en évidence et évaluer l'impact des effluents. Dans cet aquarium, les organismes ne sont pas



### **2.1.5. Statistiques**

Les résultats ont été analysés sous R à l'aide d'ANOVAs (analyse de variance) lorsque les conditions d'applications étaient réunies (normalité et homoscédasticité, c'est-à-dire l'homogénéité des variances). Quand des différences significatives sont révélées, des tests post-hoc de comparaisons multiples (Tuckey) sont appliqués. Lorsqu'une des deux conditions d'applications de l'ANOVA n'est pas atteinte même après transformation, les données sont analysées grâce au test de Kruskal-Wallis (test non-paramétrique) suivi de tests de comparaisons multiples (Dunn).

## **2.2. Approches sur lignées cellulaires**

### **2.2.1 La préparation des échantillons**

#### **a. L'échantillonnage**

Pour évaluer l'activité biologique sur les eaux brutes et traitées par bioréacteur à membrane seul puis associé à une colonne de charbon actif, deux campagnes d'échantillonnage ont été réalisées au cours de l'année 2016 :

- La première campagne a été effectuée au printemps, durant les semaines 11, 14, 15 et 16. Cette campagne a consisté à prélever 1L d'eau moyenné sur une semaine en amont et en aval du traitement par bioréacteur à membrane.
- La seconde campagne a été effectuée en été, au cours des semaines 28, 29 et 30. Durant cette deuxième campagne, deux prélèvements par semaine ont été effectués. A chaque prélèvement, 1L d'eau moyenné sur 3 jours a été prélevé en amont et en aval du traitement par bioréacteur à membrane et en aval d'un traitement tertiaire par charbon actif.

Dès leur arrivée au laboratoire, les eaux, échantillonnées dans des flacons en polyéthylène haute densité, ont été conservées à -20°C.

#### **b. Traitement des échantillons**

Avant leur extraction, les eaux échantillonnées sont filtrées sur des filtres GFF (0,7 µm). Après filtration, les composés présents dans les eaux sont extraits sur phase solide en employant des cartouches Oasis<sup>®</sup> HLB constituées de copolymère de divinyl-benzène et de N-vinyl-pyrrolidone (6cc, 200 mg, Waters).

Les cartouches sont préalablement nettoyées au dichlorométhane (5 mL) puis au méthanol (5 mL) avant d'être conditionnées à l'eau ultra pure (5 mL). L'échantillon d'eau est ensuite percolé au goutte à goutte sur la cartouche. Après passage de l'échantillon, la phase est séchée pendant 45min sous vide. Les composés sont ensuite élués avec 10ml de méthanol, 10 mL d'un mélange méthanol/dichlorométhane (50/50, v/v) et 10 mL de dichlorométhane. L'éluât est pour finir évaporé, sans arriver à sec, avec un système d'évaporateur automatique sous vide (RapidVap<sup>®</sup>) puis manuellement sous flux d'azote 4.5. Les extraits sont repris dans du méthanol (1,5 mL lors de la 1<sup>ère</sup> campagne, 1 mL lors de la 2<sup>ème</sup> campagne). Pour la réalisation des tests *in vitro*, une aliquote de 200 µL de l'extrait est évaporée sous flux d'azote 4.5 et reprise dans du diméthylsulfoxyde. L'ensemble des extraits est conservé à -20°C.

### **2.2.2 Tests cellulaires**

#### **a. Les lignées cellulaires**

Les modèles cellulaires employés au cours du projet REMPARG sont détaillés dans le Tableau 1. Ces bioessais renseignent sur la présence potentielle de différentes familles de contaminants. L'activité œstrogénique a été suivie durant les deux campagnes. En raison d'un problème de maintenance de la lignée AhR, l'activité *dioxine-like* et *HAP-like* n'a pu être mesurée que lors de la seconde campagne.

**Tableau 1 : Liste des deux modèles cellulaires utilisés pour le projet REMPLAR**

Effet biologique	Lignée cellulaire	Source	Récepteur	Gène rapporteur	Méthodes	Ligand de Référence	Référence
Activité œstrogénique	MELN	Cellules humaines du cancer du sein, MCF-7	ER $\alpha$ endogène	ERE- $\beta$ Glob-LUC	Dosage de la luciférase	Agoniste : 17 $\beta$ -œstradiol Antagoniste : ICI	(Balaguer et al., 1999)
Activité <i>Dioxine-like</i> et <i>HAP-like</i>	PLHC-1	Cellules hépatiques cancéreuses de poisson ( <i>Poeciliopsis lucida</i> )	AhR endogène		Dosage de l'activité EROD (7-éthoxyrésorufine O-dééthylase)	Agoniste : TCDD	(Hahn et al., 1993; Kinani et al., 2010)

AhR : Récepteur aux hydrocarbures aromatiques, ER : récepteurs des œstrogènes, HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques, ICI : 7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-triène-3,17diol, TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine.

## **b. Exposition des cellules et analyse des échantillons**

Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits. L'extrait est dilué en gamme de concentrations, déposé en tripliquat, sur les cellules. La dilution est telle que la quantité de solvant dans le puit n'excède pas 0,5 %.

Après dépôt, les cellules sont incubées durant 16 h pour l'activité ER, 4h (*HAP-like*) et 24h (*dioxine-like*) pour l'activité AhR. A la suite de l'incubation, les plaques sont vidées et du milieu cellulaire contenant de la luciférine (ER) ou du 7-éthoxyrésorufine (AhR) est ajouté. Les activités respectives sont alors mesurées par l'utilisation d'un luminomètre (luciférase) ou d'un spectrofluorimètre (activité EROD).

Pour chaque mesure, luciférase ou EROD, une courbe dose-réponse est établie pour les extraits actifs. Les courbes sont modélisées selon le modèle de Hill à l'aide du logiciel Microsoft Excel™ en utilisant la macro RegTox (Vindimian et al., 1983).

Les courbes permettent de déterminer la concentration entraînant 20% de l'effet (*effective concentration*, EC20). L'activité de l'extrait est comparée à l'activité du ligand de référence du bioessai. Il en résulte une quantité d'équivalent hormone (*e.g.* équivalent œstradiol) ou d'équivalent toxique (*e.g.* équivalent dioxine, HAP) présent dans l'échantillon (Bio-TEQ, *Équation 1*).

La mesure de Bio-TEQ est directement comparable à la mesure d'équivalent-toxiques dérivée des analyses chimiques ciblées (Chim-TEQ, *Équation 2*). Le rapport Chim-TEQ sur Bio-TEQ permet d'évaluer la contribution des composés identifiés par les analyses chimiques à la réponse biologique mesurée dans l'échantillon analysé (Creusot et al., 2014; Kinani et al., 2010; Neale et al., 2017).

**Équation 1 :**

$$\text{Bio-TEQ} = \frac{\text{ECx composé de référence}}{\text{ECx Extrait}}$$

**Équation 2 :**

$$\text{Chim-TEQ} = \sum (C_i \times \text{TEF}_i)$$

avec

*Bio-TEQ* : quantité équivalente toxique déterminée biologiquement

*Chim-TEQ* : quantité équivalente toxique déterminée chimiquement

*CE* : Concentration entraînant x% de l'effet biologique maximal pour l'activité biologique considérée

*C<sub>i</sub>* : Concentration quantifiée en composé *i*

*TEF<sub>i</sub>* : Facteur d'équivalent toxique du composé *i* c'est-à-dire l'activité relative du composé *i* par rapport au composé de référence.

### **2.2.3. Assurance qualité**

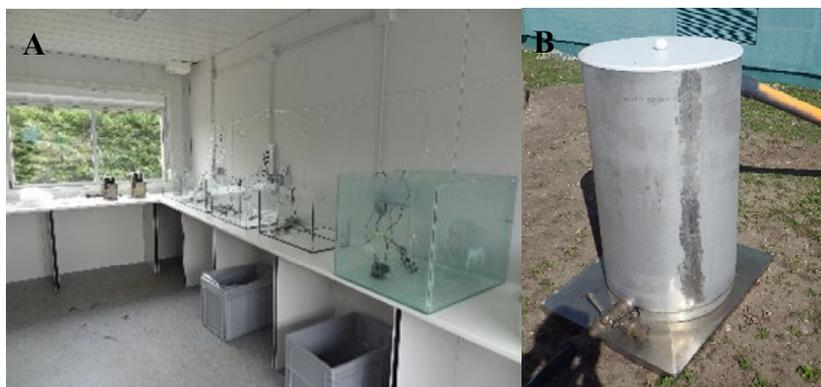
Dans le but d'éviter une contamination par les procédés de préparation de l'échantillon, toutes les bouteilles de solvant sont neuves et dédiées uniquement à l'expérience. De plus, la veille de l'expérience, la verrerie est lavée au détergent et à l'acide, rincée à l'eau ultra-pure et calcinée à 450°C pendant 6h.

Pour vérifier l'absence de contamination des échantillons pendant leur préparation, des blancs expérimentaux sont effectués selon la même procédure que pour les extraits d'eaux puis testés sur les lignées cellulaires utilisées.

Le fonctionnement correct des lignées cellulaires est évalué par le dépôt du ligand de référence selon une gamme de concentration. En parallèle, le niveau basal de la lignée est contrôlé, avec et sans solvant.

### 3. Mise en place du laboratoire mobile

Une structure expérimentale de 15 m<sup>2</sup> a été installée en février 2015 sur le site de la station d'épuration de La Teste de Buch, puis progressivement aménagée afin de pouvoir réaliser des études d'exposition aux effluents hospitaliers du pôle de santé d'Arcachon. Pour se faire, une cuve recevant ces effluents a été mise en place à proximité de la structure mobile (Figure 3).



**Figure 3. Laboratoire mobile (A) et cuve recevant les effluents hospitaliers (B)**

Six expérimentations distinctes ont été réalisées au sein de cette structure entre février 2015 et décembre 2016. Tout d'abord une expérimentation de faisabilité, dont les résultats ne seront pas détaillés dans ce rapport, nous a permis de définir les volumes nécessaires d'effluents hospitaliers, les dilutions pertinentes à utiliser mais également le taux de renouvellement journalier permettant la meilleure stabilité des composés présents dans cet effluent. Les deux expériences suivantes concernaient l'exposition aux effluents hospitaliers avant et après traitement par le bioréacteur à membrane (BàM) du bivalve marin, l'huître creuse *Crassostrea gigas* et du poisson zèbre *Danio rerio*. La quatrième expérimentation s'est intéressée aux effets sur le bivalve d'eau douce, *Corbicula fluminea*, et a été réalisée en mai 2016. L'objectif général des expérimentations était d'évaluer l'efficacité du BàM, en comparant l'effet toxique des effluents traités et non traités sur les organismes, via l'expression de gènes cibles. Les deux dernières expositions ont été faites sur *D. rerio* et *C. fluminea* afin d'évaluer les capacités de réduction des effets de l'effluent hospitalier après passage successif dans le BàM couplé à une cartouche de charbon actif.

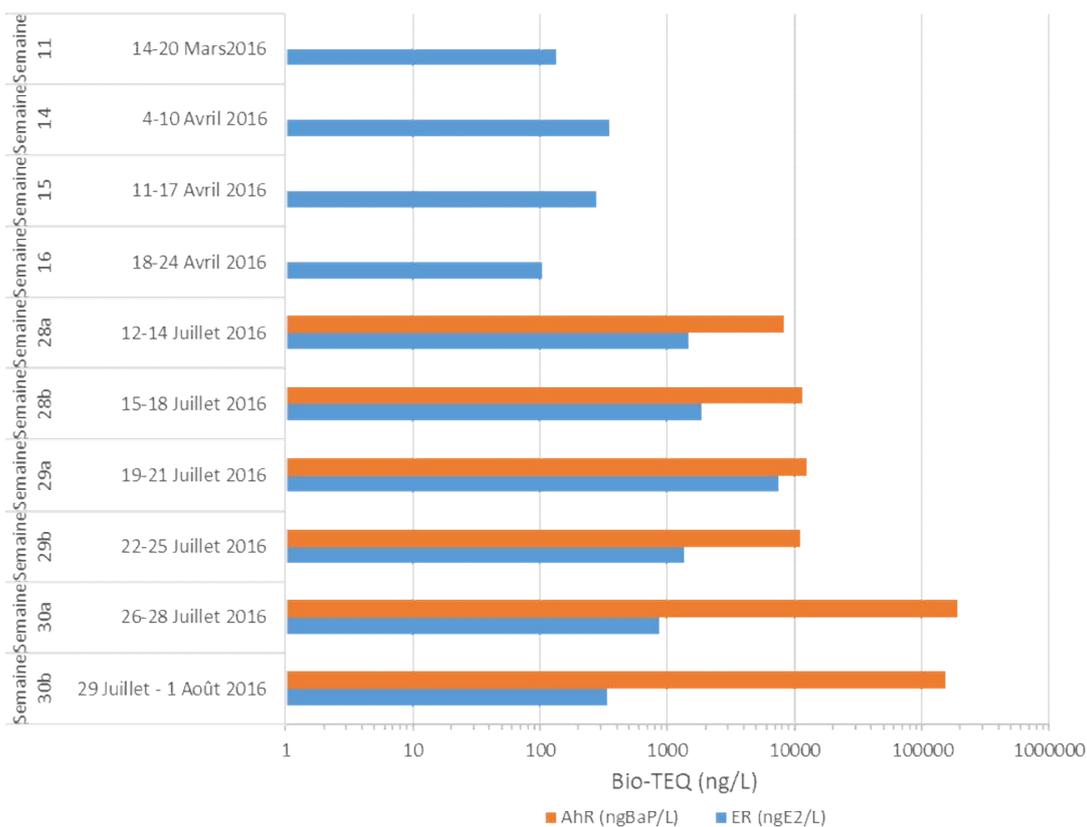
## 4. Principaux résultats et discussion

### 4.1 Bioessais sur lignées cellulaires

#### 4.1.1 Activités biologiques mesurées dans les effluents hospitaliers

Les bioessais sur cultures cellulaires ont permis de détecter la présence d'activités œstrogéniques et *HAP-like* dans les eaux usées d'origine hospitalière. Les activités mesurées varient de 105 ngE2-EQ/L à 7493 ngE2-EQ/L pour l'activité œstrogénique et de 8 µgBaP-EQ/L à 189 µgBaP-EQ/L (Figure 4).

Cette variabilité peut être inhérente à une fluctuation des activités du PSA mais également à une évolution des pratiques de préparation des échantillons au sein du laboratoire entre la première et seconde campagne. Ces adaptations de protocole ont permis d'extraire de manière plus optimale les composés actifs.



**Figure 4 : Activités œstrogéniques et *HAP-like* quantifiées dans les eaux usées du PSA.**

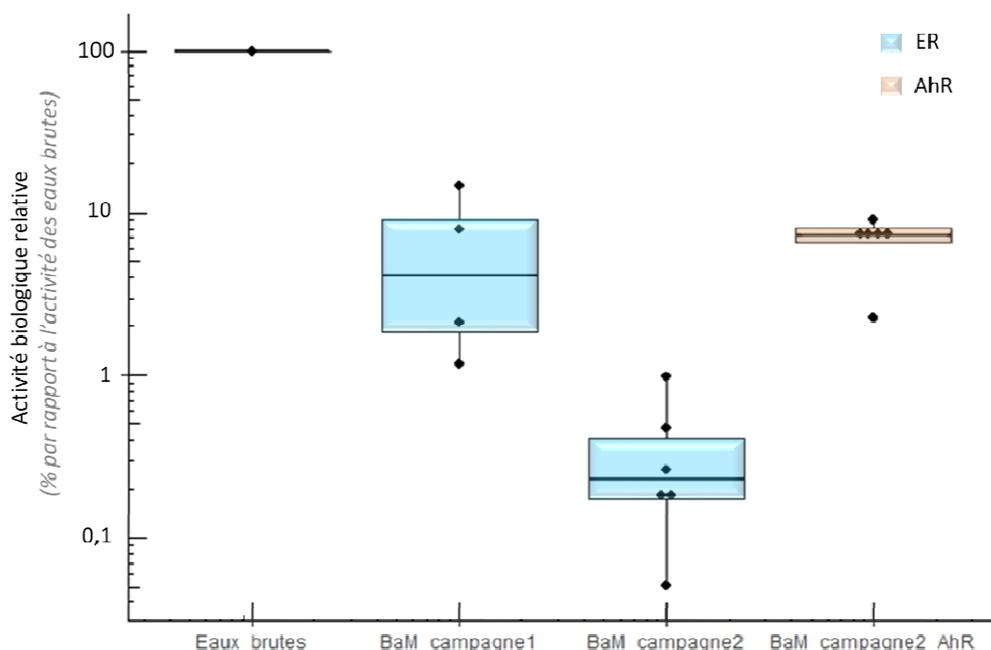
De façon générale, ces niveaux d'activités sont du même ordre de grandeur que ceux observés pour des eaux usées hospitalières provenant du CHU de Bordeaux (Aït-Aïssa et al., 2017). Les fortes activités œstrogéniques mesurées dans les eaux brutes provenant du PSA peuvent être imputées à la présence d'une maternité qui est une source avérée en (xéno)-œstrogènes. La présence d'alkylphénols peut également induire une activité œstrogénique. Dans certaines études, leurs concentrations peuvent expliquer jusqu'à 65% de l'activité œstrogénique observée dans des effluents hospitaliers (Nagarnaik et al., 2010). Concernant, l'activité *HAP-like*, les valeurs sont similaires à celles mesurées au sein du centre chirurgical bordelais (Aït-Aïssa et al., 2017). Il est noté qu'une très faible activité *dioxine-like*, non quantifiable, a également été détectée dans les échantillons d'eaux usées provenant du PSA. Une toxicité a également été remarquée sur les lignées cellulaires employées à la plus forte concentration. Cette toxicité cellulaire est classiquement rencontrée pour les eaux usées urbaines (Gardia-Parège, 2015).

#### **4.1.2. Efficacité du traitement par Bàm seul**

Au cours des deux campagnes de prélèvement, les activités biologiques des extraits après traitement sur un bioréacteur à membranes ont été évaluées.

Les résultats montrent que le traitement par bioréacteur à membrane a un taux d'abattement assez important, entre 85% à 99% pour l'activité œstrogénique et entre 91% et 98% pour l'activité *HAP-like*, selon les semaines de collecte (Figure 5). Après traitement des eaux usées, les concentrations mesurées pour l'activité œstrogénique sont comprises entre 3 ngE2-EQ/L et 15 ngE2-EQ/L. Concernant l'activité *HAP-like*, les concentrations varient entre 0,28 µgBaP-EQ/L et 12,7 µgBaP-EQ/L. Ces valeurs sont similaires à celles observées en sortie de station de traitement des eaux usées urbaines utilisant des traitements secondaires par boues activées ou biofiltres (Aït-Aïssa et al., 2017; Gardia-Parège, 2015; Penru et al., 2017).

Il est observé que les extraits d'eaux après traitement n'induisent plus une toxicité sur les modèles cellulaires utilisés. Le traitement par bioréacteur à membranes est donc efficace pour réduire les composés œstrogéno-mimétiques et *HAP-like* de la phase dissoute. Le traitement fonctionne correctement même lors de forts apports en contaminants actifs comme ceux observés en juillet 2016.



**Figure 5 : Abattement des activités œstrogéniques (ER) et *HAP-like* (AhR) dans les eaux usées hospitalières traitées par bioréacteur à membrane (BàM) prélevées durant le printemps (Campagne 1) et l'été 2016 (Campagne 2).**

#### **4.1.3. Efficacité du traitement par BàM couplé à un module de charbon actif**

L'efficacité d'un procédé par charbon actif pour assainir des eaux traitées par bioréacteur à membrane a été évaluée en testant les extraits d'eaux traitées sur le continuum amont pilote, aval traitement sur bioréacteur à membrane et à aval d'une colonne de charbon actif. Ces extraits ont été testés sur les modèles cellulaires ER et AhR lors de la seconde campagne de prélèvement.

Après adsorption du perméat sur la colonne de charbon actif, les extraits n'ont pas montré d'activité œstrogénique. Cette observation est en accord avec les analyses chimiques ciblées montrant que les concentrations en molécules tracées sont inférieures aux limites de détection après le passage du perméat sur la colonne de charbon actif (Cf. Livrable 2.2. de REMPARG<sup>2</sup>). Ce résultat illustre l'intérêt de combiner le bioréacteur à membrane avec une colonne de charbon actif pour réduire de façon significative les composés œstrogéno-mimétiques de la phase dissoute.

Concernant l'activité *HAP-like*, une activité a été détectée dans tous les extraits d'effluents traités sur charbon actif. Les concentrations mesurées varient entre 248 ngBaP-EQ/L et 1003 ngBaP-EQ/L (Tableau 2). L'activité *HAP-like* diminue entre 51% et 93% entre le traitement par bioréacteur à membrane et le procédé par charbon actif. Même si le traitement permet de réduire considérablement la concentration en composés ayant une activité *HAP-like*, il ne permet pas de les éliminer totalement de la phase dissoute.

<sup>2</sup> Le livrable 2.2. de REMPARG est consacré à l'étude de l'efficacité du pilote de bioréacteur à membrane pour le traitement des rejets du Pôle de Santé.

**Tableau 2 : Activité HAP-like en ngBaP-EQ/L dans les extraits d'eaux prélevés en amont et aval des traitements par bioréacteur à membrane et charbon actif.**

	Activité <i>HAP-like</i> (ngBaP-EQ/L)		
	Eaux brutes	Eaux traitées	
		Bioréacteur à membrane	Charbon actif
<i>Semaine 28</i>	8193	544	262
	11633	1057	367
<i>Semaine29</i>	12408	280	248
	10999	864	408
<i>Semaine30</i>	189708	12473	1003
	154520	12791	895

## **4.2 Exposition d'organismes modèles**

### **4.2.1. Efficacité du traitement par Bàm seul**

Nos 3 modèles biologiques ont été exposés durant 5 jours à deux types d'effluents hospitaliers, à savoir :

- Soit de l'effluent brut non traité (effluent d'entrée),
- Soit de l'effluent traité (récupéré à la sortie du Bàm, aussi appelé « perméat »).

#### **4.2.1.1 – Paramètres physico-chimiques**

##### **a. Suivi**

Trois paramètres (pH, température et conductivité) ont été suivis deux fois par jour (AM et PM) dans chaque composante du système tout au long des 5 jours d'expérimentation. Le Tableau 3 représente les valeurs moyennes  $\pm$  écart type obtenues pour ces paramètres physico-chimiques lors des expositions de *M. gigas* et *D. rerio*.

Durant les expérimentations, les températures dans les unités expérimentales (UEs) restent stables, avec des variations ne dépassant pas les 1,7 °C ou 0,8 °C pour les aquariums contenant *M. gigas* ou *D. rerio* respectivement.

En ce qui concerne le pH, les valeurs restent stables durant les expérimentations avec des écarts types ne dépassant pas 0,5. Les moyennes varient de 7,8 à 8,1 pour l'expérimentation menée sur *M. gigas* et de 7,8 à 8,3, avec des valeurs plus élevées dans les composantes ayant une part en eau plus élevée (dilution 1/10) lors de l'exposition de *D. rerio*.

La conductivité reste également stable au cours de l'expérimentation, bien que les valeurs de l'effluent hospitalier et du perméat brut aient une variabilité plus importante, notamment dans l'expérience de l'huitre. Dans cette même expérience, il est à noter que les valeurs de conductivité en présence d'eau de mer sont en mS.cm<sup>-1</sup>, due à la présence d'ion NaCl en grande quantité. Dans les 2 expérimentations, la conductivité de l'effluent brut est supérieure à celle du perméat (1613 > 1025  $\mu$ S,cm<sup>-2</sup> ; 1379 > 1078  $\mu$ S,cm<sup>-2</sup>), suggérant une diminution de la présence de composés dans le perméat.

La stabilité chimique de 4 molécules de types traceurs (carbamazépine, oxazépan, diclofénac et sulfaméthoxazole) est donnée en annexe 1.

Les concentrations de l'effluent brut varient fortement au cours du temps. De 60,01 à 194,20 ng.L<sup>-1</sup> pour la carbamazépine, de 129.84 à 697.13  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> pour le diclofénac, de 298.78  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> à 13.15 ng.L<sup>-1</sup> pour l'oxazépan et de 181.16 à 365.85  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> pour le sulfaméthoxazole.

**Tableau 3 : Valeurs moyennes obtenues pour la température, le pH et la conductivité au cours des 5 jours d'exposition dans les différentes composantes du système.**

	<i>C. gigas</i>			<i>D. rerio</i>		
	T° (°C)	pH	Conductivité	T° (°C)	pH	Conductivité ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
Eau brute (Eau salée ou Eau douce)	15,4 ± 0,8	8,0 ± 0,3	45 ± 1,0 mS,cm <sup>-2</sup>	16,7 ± 0,7	8,2 ± 0,2	292 ± 7
UE Témoin	15,6 ± 1,7	7,8 ± 0,2	45 ± 0,9 mS,cm <sup>-2</sup>	24,3 ± 0,8	8,0 ± 0,1	403 ± 23
EH	17,1 ± 1,8	7,9 ± 0,2	1613 ± 350 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$	19,0 ± 1,2	7,9 ± 0,3	1379 ± 85
EH 1/10	18,2 ± 1,7	7,7 ± 0,2	41 ± 0,4 mS,cm <sup>-2</sup>	19,6 ± 1,2	8,1 ± 0,2	408 ± 15
UE EH 1/10	16,1 ± 1,5	7,9 ± 0,2	41 ± 0,4 mS,cm <sup>-2</sup>	23,4 ± 0,6	8,3 ± 0,1	462 ± 8
Perméat	17,0 ± 1,6	8,1 ± 0,1	1025 ± 157 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$	19,3 ± 1,2	7,8 ± 0,1	1078 ± 58
Perméat 1/10	17,4 ± 1,6	8,0 ± 0,1	42 ± 0,7 mS,cm <sup>-2</sup>	20,1 ± 1,2	8,2 ± 0,1	394 ± 5
UE Perméat 1/10	16,1 ± 1,5	7,9 ± 0,2	41 ± 0,7 mS,cm <sup>-2</sup>	22,7 ± 0,5	8,2 ± 0,1	449 ± 16

En ce qui concerne les dilutions réalisées, le rapport de dilution de 1/10 est globalement respecté entre l'effluent brut et les bacs de dilution ou les UEs.

Dans les UEs, les concentrations en carbamazépine sont relativement stables au cours du temps ( $9,80 \pm 1,86 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Il en est de même pour le diclofénac, avec une concentration moyenne de  $31,15 \pm 6,66 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pour l'oxazépan, la concentration augmente brutalement à partir du 5<sup>ème</sup> jour. Cela est en concordance avec le pic de concentration en oxazépan mesuré dans l'effluent hospitalier le 4<sup>ème</sup> jour. Les concentrations en sulfaméthoxazole dans les bacs d'eau salée diminuent du tiers et du quart entre le début et la fin de l'expérience pour l'UE Huitres et l'UE Témoin abiotique respectivement (de 66,57 à 21,81  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$  et de 67,18 à 15,16  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

## **b. Conclusions**

Les analyses de l'expérimentation mettent en évidence des variations importantes de la composition de l'effluent brut tout au long de la semaine d'expérimentation. La consommation, l'utilisation et l'application de produits pharmaceutiques peut considérablement varier au cours du temps. La nature et la quantité de composés pharmaceutiques retrouvés dans les effluents hospitaliers sont le reflet du nombre de patients, de leur thérapie et du temps passé à l'hôpital (Verlicchi et al., 2010). Par exemple, dans le cas de patients externes, l'excrétion de produits pharmaceutiques non métabolisés se produira partiellement à l'intérieur de l'hôpital. De plus, pour chaque composé, les concentrations seront fonction de la prescription quotidienne des différentes substances actives, de la pharmacocinétique et de la dégradation biotique et abiotique de ces composés (Ferrari et al., 2003).

L'oxazépan (anxiolytique) est retrouvé à des concentrations plus élevées, contrairement à la carbamazépine qui montre des concentrations plus faibles mais stables. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces fortes concentrations en oxazépan : premièrement, les benzodiazépines font partie des médicaments les plus consommés. Deuxièmement, cette substance médicamenteuse est utilisée en tant que tel, c'est à dire en tant que substance active des médicaments. Elle est également le métabolite secondaire de nombreuses autres molécules de la famille des benzodiazépines comme le diazépam, le prazépam ou le clorazépate par exemple. Besse et Garric (2007) ont mis en évidence que plus de 95% du clorazépate est métabolisé en oxazépan chez l'Homme.

Concernant les analyses de micropolluants dans les bacs de dilution et les UEs, les résultats ont révélé que les dilutions au dixième étaient respectées. Le système évolue en fonction des valeurs

retrouvées dans l'effluent hospitalier brut, avec 24h de décalage. En effet, puisque le contenu des UEs était renouvelé de moitié tous les jours, les variations de concentrations ne sont pas visibles instantanément, mais uniquement le lendemain.

La conductivité moyenne mesurée dans l'effluent brut concorde avec les valeurs retrouvées dans la littérature, qui sont comprises entre 800  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  et 2000  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  selon la taille et la spécificité de l'hôpital (Boillot et al., 2008 ; El Morhit et al., 2015). Les fluctuations des valeurs sont le reflet d'un changement de composition chimique. Les valeurs de conductivité mesurées dans le perméat sont constamment inférieures à celles mesurées dans l'effluent hospitalier brut, indiquant une différence en termes de qualité et de quantité de composés.

Concernant le pH, les valeurs sont proches de la neutralité, ce qui est en accord avec les données de la littérature reportées dans Verlicchi et al. (2010), qui indique que la gamme de pH des effluents hospitaliers se situe entre 7,7 et 8,1. La variabilité des valeurs est due à la variabilité de la composition de l'effluent. Certains auteurs ont d'ailleurs mis en évidence des fluctuations de pH au cours d'une journée, avec des valeurs oscillant entre 5,1 et 10,4 qui seraient en lien avec les périodes de nettoyage utilisant d'important volume de détergents et désinfectants.

#### **4.2.1.2 – Effets chez les bivalves** **a - L'huitre creuse *C. gigas***

Après 5 jours d'exposition à l'effluent hospitalier brut dilué au 10<sup>e</sup>, toutes les fonctions métaboliques étudiées voient leur niveau d'expression modulé dans les branchies (Tableau 4). Sur les 12 gènes étudiés, 8 présentent des surexpressions significatives avec des facteurs d'induction allant de 5 pour le 12S à 142 pour la *gst*. Les deux isoformes des métallothionéines (*mt1* et *mt2*), la superoxyde dismutase cytoplasmique (*sod*) et le gène de la régulation du cycle cellulaire (*p53*) montrent pour leur part une répression au même moment. Les réponses moléculaires sont plus faibles au niveau de la glande digestive ou seuls les gènes *mt1*, *mt2*, *cyp1a1* et *p53* voient leur expression diminuer après exposition à l'effluent brut.

**Tableau 4 : Expression différentielle des gènes de stress dans les branchies et la glande digestive de *M. gigas* exposées à de l'effluent hospitalier brut ou du perméat durant 5 jours. / = pas de différence significative entre la condition et le témoin d'après une Anova ou un test de Mann-Whitney, suivi de test post hoc ( $p > 0,05$ ). \* = Différence significative entre le perméat et l'effluent brut d'après une Anova ou un test de Mann-Whitney, suivi de test post hoc ( $p < 0,05$ ).**

Fonction métabolique	Gène	Effluent		Perméat	
		Branchie	Glande digestive	Branchie	Glande digestive
Réponse au stress oxydant	<i>sod</i>	0,19	/	/	/
	<i>sodmt</i>	82	/	8*	/
	<i>cat</i>	47	/	/*	/
Système de détoxication	<i>mxr</i>	9	/	/	/
	<i>mt1</i>	0,01	0,02	/*	/*
	<i>mt2</i>	0,12	0,03	0,24	0,08
Métabolisation	<i>cyp1a1</i>	26	0,30	/*	0,03*
	<i>gst</i>	142	/	5*	0,13*
Métabolisme mitochondrial	<i>cox1</i>	13	/	/*	/
	<i>12S</i>	5	/	/*	/
Régulation cycle cellulaire et apoptose	<i>p53</i>	0,04	0,27	/*	/*
	<i>bax</i>	53	/	4*	/

L'exposition au perméat issu du traitement par BâM engendre beaucoup moins d'effets. Ainsi au niveau des branchies, la grande majorité des gènes étudiés présentent des niveaux d'expression comparables à ceux des témoins. Seuls la *sodmt*, la *gst* et *bax* restent modérément surexprimés. De la même façon, peu d'impacts sont visibles au niveau moléculaire dans la glande digestive après 5 jours d'exposition au perméat.

### **b – La corbicule *C. fluminea***

Les résultats obtenus avec *C. fluminea* sont comparables à ceux mis en évidence avec *C. gigas*. En effet, après 5 jours d'exposition à l'effluent brut, de fortes indications d'expression sont observées pour la grande majorité des gènes étudiés (Tableau 5). Ainsi, les gènes 12S et *gadd45* voient leur niveau d'expression surexprimé 706 et 830 fois respectivement par rapport aux témoins. Au niveau de la glande digestive, peu de modulations géniques sont mises en évidence avec seulement les gènes *cat*, *p53* et *c3* qui sont réprimés.

L'exposition au perméat ne montre pas de différence significative par rapport aux témoins, suggérant une absence d'effets de cette solution.

**Tableau 5 : Expression différentielle des gènes de stress dans les branchies et la glande digestive de *C. fluminea* exposées à de l'effluent hospitalier brut ou du perméat durant 5 jours. / = pas de différence significative entre la condition et le témoin d'après une Anova ou un test de Mann-Whitney, suivi de test post hoc ( $p > 0,05$ ). \* = Différence significative entre le perméat et l'effluent brut d'après une Anova ou un test de Mann-Whitney, suivi de test post hoc ( $p < 0,05$ ).**

Fonction métabolique	Gène	Effluent		Perméat	
		Branchie	Glande digestive	Branchie	Glande digestive
Réponse au stress oxydant	<i>sod</i>	/	/	/	/
	<i>sodmt</i>	5	/	/*	/
	<i>cat</i>	5	0,29	/*	/*
Système de détoxication	<i>mt</i>	38	/	/*	/
	<i>gadd45</i>	830	/	/*	/
Métabolisme mitochondrial	<i>cox1</i>	706	/	/*	/
	12S	0,1	/	/*	/
Régulation cycle cellulaire et apoptose	<i>p53</i>	0,31	0,31	/*	/*
	<i>bax</i>	8	/	/*	/
	<i>c3</i>	17	0,41	/*	/*

### **C – Conclusions**

- Réponse à l'effluent hospitalier brut

Dans les branchies, la stimulation du gène *cat* impliqué dans la production de l'enzyme métabolisant le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) confirme une réponse adaptative face à une pression oxydative (Rocher et al., 2006) induit par l'effluent hospitalier. En effet, cette enzyme, intervenant dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (EROs) qui peuvent s'accumuler dans les cellules, est largement utilisée comme biomarqueur dans la détection de contamination chimique (Market et al., 2003). L'exposition au mélange de micropolluants contenu dans les rejets hospitaliers serait donc dans notre cas à l'origine d'un stress oxydatif avec la production d'EROs dans les cellules branchiales. Le gène *sod* est lui aussi impliqué dans la réponse au stress oxydant et code pour l'enzyme métabolisant l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ). Cependant, ce gène est réprimé, ce qui pourrait potentiellement indiquer une faible quantité d' $O_2^-$  au sein du cytoplasme cellulaire, ou une conséquence de mécanisme épigénétique induit par l'exposition au mélange de composés toxiques

de l'effluent hospitalier (Vandegheuchte et Janssen, 2011). Néanmoins, une sur-expression du gène *sodmt*, lui aussi impliqué dans la transformation de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) au niveau mitochondrial, est observée.

Cette augmentation d'expression pourrait être dans notre étude liée à l'augmentation du métabolisme énergétique dans la mitochondrie (indiquée par la surexpression des gènes *cox1* et *12S*). En effet, le gène *cox1* est impliqué dans la respiration cellulaire qui a lieu dans les membranes de la mitochondrie. Ces réactions de phosphorylation oxydative produisent de l'ATP mais également d'EROs. La production intensive d'ATP par la respiration cellulaire reflète ici une demande accrue d'énergie par la cellule, qui pourrait être dans notre cas allouée dans la défense contre le stress chimique généré par l'exposition à l'effluent hospitalier. Les fonctions de métabolisation et de détoxification des xénobiotiques sont également affectées chez l'huître creuse. L'induction de l'enzyme de la superfamille des cytochromes P450 (*cypl1a1*) qui permet de rendre les composés plus hydrophiles afin de favoriser leur complexation (Regoli, 2012) et de l'enzyme de phase II glutathion S transférase (*gst*) impliquée dans la conjugaison des xénobiotiques au glutathion (Béguel, 2012) révèle que la cellule est en train de lutter contre les xénobiotiques, et essaye de s'en débarrasser. Les complexes formés durant cette biotransformation des xénobiotiques peuvent ensuite être excrétés plus facilement par les mécanismes de phase III tels que les « multixénobiotic resistance proteins » (MXR). Cela est d'ailleurs en accord avec la sur-régulation du gène *mxr*. L'activité concomitante de *gst* et *mxr* a déjà été observée chez les bivalves (Pain et Parant, 2003). Les gènes régissant le cycle cellulaire et ayant un rôle central dans le processus apoptotique (*p53* et *bax*) ont montré une expression contradictoire. En effet, bien que théoriquement le gène *p53* ait un rôle d'activation de l'expression du gène *bax* (Gamain, 2014), dans notre étude *bax* est surexprimé alors que *p53* est lui réprimé et ceci chez les deux espèces de bivalves. Une hypothèse peut être émise quant à ce résultat : le gène *p53* a bien été surexprimé au début de la contamination, et a engendré l'expression de *bax*. Tout cela a conduit à la dérégulation du cycle cellulaire et à la mise en place de mécanismes apoptotiques. Mais, certains toxiques sont réputés pour inhiber la mort cellulaire programmée (tel que le Cadmium, les radiations, certains pathogènes etc.), soit en raison de leurs effets sur l'ADN, soit par des effets épigénétiques. L'arrêt de son expression entrainera par la suite la répression de *bax*, mais qui n'est pas encore déclenchée après 5 jours d'exposition à l'effluent.

Le patron d'expression est totalement différent au niveau des glandes digestives. En effet, dans ce tissu aucune sur-expression de gènes impliqués dans la réponse au stress n'a été observée, au contraire certains gènes sont réprimés. Une des causes de cette diminution du niveau d'expression pourrait être l'existence de mécanismes épigénétiques, comme par exemple la méthylation de l'ADN (Vandegheuchte and Janssen 2011). L'épigénome est dynamique et répond aux signaux environnementaux par des changements dans l'expression des gènes (Liu et al., 2008). Parmi les effecteurs de ces changements épigénétiques, on retrouve les métaux lourds, les pesticides, les HAPs, les hormones, la radioactivité, les virus et bactéries, mais aussi les composés pharmaceutiques (Edwards et Myers, 2007). Il apparaît que la méthylation de l'ADN dans les régions régulatrices des gènes peut conduire à une diminution du niveau de l'expression de ces gènes (Pierron et al. 2014).

Finalement, les branchies, en contact direct avec la contamination du milieu, semblent être l'organe le plus sensible aux molécules contenues dans les rejets hospitaliers et répond de manière importante face à cette contamination. La différence d'expression établie entre les branchies et la glande digestive est principalement due au mode de contamination directe et non trophique utilisée lors de l'expérimentation. Dans ce type d'exposition, les branchies représentent le premier organe d'interface par lequel passe la contamination. Il est à noter qu'une huître filtre de grandes quantités d'eau par jour (environ 10 litres par heures ; Robert et al., 1995).

- Réponse au perméat

Après l'exposition de 5 jours au perméat, le schéma d'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress est très différent de celui obtenu après une exposition à l'effluent brut. En effet, dans les branchies, l'expression de la plus part des gènes est retournée au niveau basal comparable à celle des témoins. Ainsi, chez l'huître, seulement 4 gènes présentent une expression significativement différente. Les gènes *sodmt*, *gst* et *bax* sont surexprimés avec le perméat, mais 10 fois moins qu'après une exposition à l'effluent hospitalier brut, le gène *mt2* restant lui réprimé au même niveau. Ces résultats révèlent que le perméat, bien que beaucoup moins toxique pour les bivalves, est encore chargé en composés. Notons que chez *C. fluminea*, l'exposition ne révèle aucune différence de niveau d'expression des gènes comparée à celui des témoins. Ceci démontre une sensibilité différente de *C. gigas* et *C. fluminea*. En effet, les quelques surexpressions observées avec le perméat chez *M. gigas* suggèrent une plus grande sensibilité de cette espèce.

#### **4.2.1.3 – Effets chez le poisson *D. rerio***

##### **a. Résultats**

Après 5 jours de contamination à l'effluent brut, l'ensemble des fonctions métaboliques étudiées sont significativement surexprimées dans le cerveau et les branchies (tableau 6). Ces surexpressions, bien que présentes, sont moins nombreuses au niveau du tube digestif et du muscle. Les facteurs d'induction obtenus sont souvent très élevés (>50). Ceci est particulièrement vrai pour ce qui concerne le gène 12S qui voit son expression fortement induite dans le tube digestif et le muscle (7371 et 10559, respectivement) dénotant des atteintes au niveau du métabolisme mitochondrial.

**Tableau 6 : Expression différentielle des gènes de stress dans les branchies, le tube digestif, le muscle et le cerveau de *D. rerio* exposés à de l'effluent hospitalier brut ou du perméat durant 5 jours. / = pas de différence significative entre la condition et le témoin d'après une Anova ou un test de Mann-Whitney, suivi de test post hoc ( $p > 0,05$ ). \* = Différence significative entre le perméat et l'effluent brut d'après une Anova ou un test de Mann-Whitney, suivi de test post hoc ( $p < 0,05$ ).**

Fonction métabolique	Gène	Effluent				Perméat			
		Branchie	Tube digestif	Muscle	Cerveau	Branchie	Tube digestif	Muscle	Cerveau
Réponse au stress oxydant	<i>sod</i>	8	111	294	/	16	146	57*	/
	<i>sodmt</i>	33	0,13	/	35	/*	0,16	/	14
	<i>cat</i>	/	0,15	/	/	/	0,06	/	/
Système de détoxification	<i>laptm4a</i>	31	29	/	14	280*	/*	/	/*
	<i>tap</i>	17	74	453	75	59	11*	27 *	5*
	<i>mt2</i>	193	/	0,24	11	/*	/	/*	/*
Métabolisme mitochondrial	<i>cox1</i>	226	/	5	87	211	/	36*	10*
	<i>12S</i>	150	7 371	10 559	54	522*	727*	322*	/*
Régulation cycle cellulaire et apoptose	<i>p53</i>	/	/	13	3	/	3*	/*	/*
	<i>bax</i>	10	153	116	167	93*	218	58	/*

Comparés aux effets observés après exposition à l'effluent brut, ceux obtenus pour le perméat, restent forts pour les branchies, le tube digestif et le muscle. Certains gènes comme le 12S voient tout de même leur niveau d'induction être plus modéré dans cette condition. La diminution des impacts moléculaires est plus visible au niveau du cerveau. En effet, l'exposition au perméat n'induit plus qu'une surexpression de *sodmt*, *tap* et *cox1*, l'ensemble des autres gènes revenant à des niveaux comparables à ceux des témoins.

## **b. Conclusions**

### ▪ Réponse à l'effluent hospitalier brut

Comparée à celle des bivalves, l'exposition à l'effluent hospitalier semble avoir des effets plus importants chez *D. rerio* au niveau transcriptomique. A niveau des branchies, l'expression de gènes impliqués dans les fonctions métaboliques et la réponse au stress est stimulée. Ceci suggère qu'après 5 jours d'exposition, les cellules branchiales semblent avoir mis en place plusieurs mécanismes de défense. Les résultats obtenus révèlent une augmentation du nombre de mitochondries (surexpression de *12S*) et de l'activité mitochondriale (surexpression *cox1*), probablement dans le but de maintenir une quantité suffisante d'ATP et la viabilité des cellules, compensant l'effet délétère induit par le contaminant (Lucia et al., 2009) mais également une demande d'énergie accrue. De plus, une mise en place de système de neutralisation des composés toxiques est une nouvelle fois observée.

Les cellules branchiales semblent utiliser une stratégie pour combattre une pression oxydative (surexpression de *sod*) et la présence de xénobiotique dans la cellule (surexpression de *laptm4a*, *tap* et *mt2*). La protéine *Laptm4a* (lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha) possède un rôle important et efficace dans la détoxification, en permettant l'efflux des composés toxiques par transport, compartimentalisation et piégeage des xénobiotiques au niveau des lysosomes (Hogue et al., 2002). Son expression a d'ailleurs conduit à augmenter la résistance accrue contre plusieurs médicaments chez une souche de levure (Hogue et al., 2002). Le rôle du transporteur associé au traitement de l'antigène (*tap*) est de réaliser les translocations des peptides issus de la dégradation, du cytosol vers la lumière du réticulum endoplasmique, où ils sont pris en charge par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ayant un rôle clé dans le système de défense de l'organisme (Abele et Tampe, 2006). Tout comme dans les branchies de *C. gigas*, les gènes apoptotiques ont une expression inverse. Une surexpression de *bax* est observée, alors qu'au même moment *p53* ne l'est pas, comme pour les bivalves. L'hypothèse d'une inhibition de l'apoptose par les toxiques ou des pathogènes présents, et l'expression décalée de *bax*, peut une nouvelle fois être émise.

Au niveau du cerveau, des modulations transcriptomiques semblables à celles des branchies sont révélées. L'expression différentielle des gènes révèle ici encore, de nombreuses augmentations de l'expression de toutes les fonctions étudiées. Cette réponse génétique élevée pourrait être due, entre autres, à la présence de molécules agissant sur le système nerveux tels que les analgésiques, les anesthésiques ou encore les psycholéptiques. Les psycholéptiques sont des substances psychotropes considérées comme des sédatifs psychiques, qui ralentissent l'activité du système nerveux tel que l'oxazépam. Cette hypothèse peut être mise en relation et serait en accord avec les fortes concentrations en oxazépam retrouvées dans l'effluent hospitalier lors de l'expérience préliminaire. Il a été démontré que le système olfactif des poissons, en contact directe avec l'environnement, était une voie d'entrée directe vers le cerveau (Ménager et al., 2009) pour de nombreux métaux. Dans notre cas, il se peut que des mécanismes similaires se produisent également avec des composés organiques. Il est à noter que dans le cerveau, les molécules contenues dans l'effluent impacteraient préférentiellement les mitochondries. En effet, la surexpression du gène *sodmt*, et l'inhibition des gènes *cat* et *sod* (gènes cytosoliques) indiquent clairement un stress oxydatif localisé dans les mitochondries et sûrement dû à une sur-activité de ces dernières, traduit par l'importante induction de *cox1* et *12S*.

Dans le tube digestif, une stimulation supérieure de la fonction de métabolisation (*laptm4a* et *tap*) est observée, révélant l'impact chimique de l'effluent sur cet organe. Cela indique potentiellement la présence de composés xénobiotiques au sein des cellules. Les poissons ayant été nourris tous les deux jours avec des aliments secs en flocons on subit une contamination trophique en plus d'une contamination dissoute. Ainsi, il est possible qu'en se nourrissant, les poissons aient ingéré les substances toxiques de l'effluent à travers leur adsorption sur les particules alimentaires.

Il a d'ailleurs été montré que lors d'une contamination, la voie trophique induit des niveaux d'expressions géniques relatives significativement plus élevés que la voie dissoute (Bijoux 2014).

- Réponse au perméat

Au niveau du cerveau, la réponse biologique a significativement diminué, mais est encore présente. Les gènes *sodmt*, *tap* et *cox1* sont surexprimés, mais de façon significativement plus faible. Le bioréacteur semble avoir permis de diminuer la concentration des principales molécules toxiques pour ce tissu, à savoir possiblement les psychotropes. Il a d'ailleurs été démontré que le Bàm est capable d'éliminer  $89,7 \pm 6,67$  % de la paroxétine (antidépresseur ; Radjenovic et al., 2007). A l'inverse des bivalves, la réponse au stress n'a globalement pas changée dans les autres tissus en comparaison avec celle de l'effluent brut. Il est possible que cela vienne d'une infection microbiologique, ou bien que la voie de contamination trophique engendre un impact plus toxique vis-à-vis des organismes, même à de faibles concentrations (Bijoux, 2014). Il ne faut pas non plus sous-estimer le fait que, à l'inverse des bivalves, les poissons sont capables de métaboliser activement les composés et donc produire des métabolites souvent aussi actifs que les molécules mères.

#### **4.2.2. Efficacité du traitement par Bàm couplé à un module de charbon actif**

Les résultats des expositions sur 5 jours à l'effluent hospitalier et au perméat suggèrent chez l'huitre et le poisson zèbre que le traitement au Bàm, même s'il semble engendrer moins d'effets, probablement lié à une diminution des composés présents, reste tout de même actif. Un module de charbon actif a donc été rajouté en aval du Bàm afin d'améliorer ses capacités de rétention des composés médicamenteux. Pour vérifier l'efficacité de ce nouveau dispositif, une nouvelle expérience d'exposition de *C. fluminea* et de *D. rerio* a eu lieu en juillet 2016. Le dispositif expérimental a été le même que précédemment (dilution au dixième de l'effluent hospitalier et du perméat), mais cette fois-ci les organismes ont été placés dans les mêmes UEs à une température de 20°C. De plus, une condition supplémentaire a été rajoutée et correspond au perméat issu de la sortie du charbon actif (perméat bis noté CA).

Globalement, les expressions géniques observées démontrent un plus faible impact moléculaire de l'effluent utilisé, comparé aux précédentes expérimentations.

Chez *C. fluminea*, la réponse obtenue est comparable dans les branchies et la glande digestive, avec une répression du gène *cat* et une surexpression de *gadd45*, suggérant des atteintes génotoxiques modérées de l'effluent hospitalier (Tableaux 7). Une nouvelle fois, le perméat se montre sans effet sur ce bivalve de même que le perméat bis sorti du charbon actif.

**Tableau 7 : Expression différentielle des gènes de stress dans les branchies et la glande digestive de *C. fluminea* exposées à de l'effluent hospitalier brut, du perméat et du perméat bis (CA) durant 7 jours. / = pas de différence significative entre la condition et le témoin d'après une Anova ou un test de Mann-Whitney, suivi de test post hoc ( $p > 0,05$ ).**

Fonctions	Gènes	Branchies			Glande digestive		
		EH	Perméat	CA	EH	Perméat	CA
Réponse au stress oxydant	<i>sodCu</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>sodMn</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>cat</i>	<b>0,5</b>	/	/	<b>0,4</b>	/	/
Métabolisme mitochondrial	<i>cox1</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>12S</i>	/	/	/	/	/	/
Régulation du cycle cellulaire et a	<i>bax</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>P53</i>	/	/	/	/	/	/
Réparation de l'ADN	<i>gadd45</i>	<b>3,7</b>	/	/	<b>2,9</b>	/	/
Détoxification	<i>mt</i>	/	/	/	/	/	/
Immunité	<i>C3</i>	/	/	/	/	/	/

Chez le poisson *D. rerio*, une nouvelle fois, les réponses obtenues sont plus marquées. Au niveau des branchies et du foie, la moindre toxicité de l'effluent hospitalier de juillet 2016 est confirmée (Tableau 8). En effet, peu de fonctions biologiques sont surexprimées après exposition à cet effluent. C'est le cas notamment du gène *bax* qui dénote une atteinte apoptotique non négligeable dans ces cellules. L'exposition au perméat montre peu de différence par rapport à la condition « effluent hospitalier » dans les branchies. Au niveau du foie, le patron d'expression suggère dans cet organe une demande d'énergie accrue, via l'augmentation du nombre de mitochondries (montré par l'augmentation du gène 12S). Celle-ci est sûrement à relier avec la mise en place de mécanismes de détoxication (*laptm4*) et de réponse au stress oxydant (*cat*) forts demandeurs en énergie. L'ajout du module à charbon actif se montre efficace au niveau de ces deux organes. En effet, les réponses observées sont plus faibles au niveau du foie, alors qu'elles disparaissent au niveau des branchies.

**Tableau 8 : Expression différentielle des gènes de stress dans les branchies et le foie de *D. rerio* exposées à de l'effluent hospitalier brut, du perméat et du perméat bis (CA) durant 7 jours. / = pas de différence significative entre la condition et le témoin d'après une Anova ou un test de Mann-Whitney, suivi de test post hoc ( $p > 0,05$ ).**

Fonctions	Gènes	Branchies			Foie		
		EH	Perméat	CA	EH	Perméat	CA
Réponse au stress oxydant	<i>sodCu</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>sodMn</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>cat</i>	/	/	/	/	2	/
Métabolisme mitochondrial	<i>cox1</i>	/	/	/	/	/	/
	12S	/	/	/	/	18	5
Régulation du cycle cellulaire et apoptose	P53	/	/	/	/	/	/
	<i>bax</i>	2,5	2	/	2	/	/
Détoxication	<i>mt2</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>laptm</i>	/	/	/	2	/	2
	<i>tap</i>	0,3	/	/	/	2	/

La réponse génique est plus marquée dans le cerveau et le muscle où de fortes répressions de la quasi-totalité des gènes sont observées après exposition à l'effluent brut (Tableau 9). De même, peu de différences sont observées entre cette exposition et celle au perméat et au perméat bis. En effet, la grande majorité des répressions observées dans le cerveau subsiste lors de ces expositions. Au niveau du muscle, des réponses identiques sont obtenues avec une demande d'énergie accrue (12S) et la mise en place de mécanismes de détoxication et de réponse au stress oxydant.

**Tableau 9 : Expression différentielle des gènes de stress dans les branchies et le foie de *D. rerio* exposées à de l'effluent hospitalier brut, du perméat et du perméat bis (CA) durant 7 jours. / = pas de différence significative entre la condition et le témoin d'après une Anova ou un test de Mann-Whitney, suivi de test post hoc ( $p > 0,05$ ).**

Fonctions	Gènes	Cerveau			Muscle		
		EH	Perméat	CA	EH	Perméat	CA
Réponse au stress oxydant	<i>sodCu</i>	0,4	0,3	/	2,5	2	2
	<i>sodMn</i>	0,1	0,1	0,2	/	/	/
	<i>cat</i>	0,1	0,1	0,3	2,5	/	/
Métabolisme mitochondrial	<i>cox1</i>	0,0	0,1	0,1	0,2	/	/
	12S	0,2	0,2	0,4	/	3	4
Régulation du cycle cellulaire et apoptose	P53	/	0,3	0,4	/	/	/
	<i>bax</i>	0,3	0,3	0,2	0,4	/	/
Détoxication	<i>mt2</i>	0,2	0,1	0,4	0,1	0,03	0,03
	<i>laptm</i>	2,0	2,5	/	/	2	3
	<i>tap</i>	0,3	0,4	/	0,4	3	/

Au niveau biologique, l'adjonction du module à charbon actif ne se montre que peu efficace vis-à-vis de la toxicité potentielle de l'effluent traité par B&M, suggérant que les composés

responsables de cette activité ne sont pas éliminés par ces procédés. Une nouvelle fois, ces résultats seront à compléter par ceux obtenus lors des analyses chimiques de ces différents perméats.

#### 4. 3 Conclusion générale sur l'efficacité du bioréacteur à membrane

Le Bàm a été mis en place à la STEU de La Teste de Buch dans l'objectif de traiter les effluents arrivant directement du pôle de santé d'Arcachon, puisque les traitements épuratoires classiques ne sont pas adaptés pour traiter la plupart des molécules spécifiques aux rejets des hôpitaux (Radjenovic et al., 2007). La technologie des membranes est devenue une alternative techniquement et économiquement réalisable pour le traitement des eaux usées, en particulier en raison des temps de rétention des boues élevés obtenus dans les volumes de réacteurs compacts. Dans le Bàm, la concentration des microorganismes peut être augmentée jusqu'à 20 mg.L<sup>-1</sup>. En raison de cette concentration en biomasse élevée, la vitesse de dégradation est plus élevée et les organismes spécialistes sont cultivés pour les composés problématiques. Un autre avantage de ce traitement est la séparation des matières solides en suspension par les membranes (Radjenovic et al., 2007). La performance, en termes de qualité de l'effluent de sortie, est donc censée être meilleure. Des auteurs ont comparé le taux d'élimination de plusieurs substances pharmaceutiques après un traitement épuratoire conventionnel par boues activées, ou par un Bàm (Radjenovic et al., 2007). Pour de nombreux composés étudiés, le Bàm s'avère plus efficace sur le taux d'abattement (exemple : l'élimination du diclofénac est de 87 % par un Bàm contre 50 % par un traitement biologique, et celle du sulfaméthoxazole est de 60 % contre 55%). Cependant, certaines molécules sont encore réfractaires à ce type de traitement épuratoire, telle que la carbamazépine qui n'est pas du tout éliminée par le bioréacteur (Radjenovic et al., 2007).

Nos résultats montrent que l'efficacité du traitement des effluents hospitaliers par Bàm seul ou couplé à un module de charbon actif est différente en fonction du modèle biologique utilisé.

Le travail effectué **par bioessais sur culture cellulaire** a permis de montrer que les eaux usées hospitalières sont une source importante de composés œstrogéno-mimétiques et *HAP-like*. Il est donc primordial de traiter de façon adaptée ces effluents avant leur rejet dans le milieu naturel. Le traitement par bioréacteur à membrane représente une solution pertinente pour **réduire de manière partielle les hormones, les xéno-hormones et les molécules HAP-like de la phase dissoute**, et ce même lors de forts apports en composés actifs. Ce traitement possède des taux d'abattement en composés similaires à ceux des traitements classiques utilisés en station de traitement des effluents urbains. Ces travaux ont montré que l'ajout d'un traitement tertiaire (**charbon actif**) permet de diminuer l'activité œstrogénique des eaux usées hospitalières de sorte que sur l'ensemble des échantillons après traitement **aucune activité œstrogénique n'a été détectée**. Pour **l'activité HAP-like**, une activité résiduelle persiste dans les eaux traitées malgré l'utilisation du procédé par charbon actif mais cette activité est **abaissée de plus d'un facteur 100**.

Concernant les organismes modèles, les différents micropolluants et pathogènes contenus dans les rejets hospitaliers (désinfectants, détergents, résidus médicamenteux...), et leurs effets interactifs suscitent une toxicité élevée aussi bien chez **C. gigas et C. fluminea** que chez **D. rerio**. Ces résultats sont en accord avec les revues bibliographiques de Boillot et collaborateurs (2008) et Orias et Perrodin (2013), qui ont révélé la toxicité des eaux usées hospitalières, chez différents organismes. Les résultats obtenus lors d'une exposition au perméat révèlent une diminution de l'activité des différentes fonctions métaboliques impliquées dans la défense et la neutralisation des composés toxiques. **L'efficacité du Bàm sur la réduction de la toxicité des effluents hospitaliers au niveau génétique chez les deux espèces de bivalves semble donc être convaincante**. En effet, la réponse à ce type de contamination est très faible, et les fonctions métaboliques impliquées sont peu ou pas stimulées. Ce type de réponse est observé sur les perméats issus du **Bàm seul, mais aussi couplé au charbon actif**. **En revanche dans le cas du poisson D.**

**rerio, le perméat entraîne encore une toxicité.** Cela peut être dû à l'ajout de la voie trophique en termes de contamination, mais aussi par la présence potentielle de pathogènes. En effet, bien que le Bàm soit efficace dans l'élimination d'organismes microbiens, l'encrassement des membranes peut influencer la capacité à assurer la norme microbiologique requise pour le perméat obtenu (Marti et al., 2011). La porosité des membranes étant de 0,2 micron, elles réalisent une microfiltration des bactéries les plus grosses. Cependant, les bactéries de plus petites tailles et les virus nécessitent eux une ultrafiltration, non réalisée par les membranes du bioréacteur mis en place sur la station d'épuration de La Teste. Une autre hypothèse, à ne pas écarter, repose sur l'activité métabolique de ces organismes capables de dégrader les composés présents dans l'effluent et ainsi générer des métabolites ayant une activité biologique. **L'ajout du charbon actif ne se montre que peu efficace sur la diminution des effets observés, notamment au niveau du cerveau et du muscle, chez ce modèle.**

Le couplage d'un traitement par bioréacteur à membrane et d'une colonne de charbon actif se relève être un dispositif efficace pour l'assainissement des effluents hospitaliers du PSA notamment concernant le risque environnemental lié aux composés œstrogéno-mimétiques et *HAP-like*. Ce constat est sûrement vrai pour d'autres molécules. En effet, nos expérimentations sur une espèce modèle de poisson, capable de métaboliser efficacement les composés, montrent une bonne diminution de l'impact des effluents au niveau du cerveau après traitement au Bàm suggérant une élimination efficace de composés potentiellement psychotropes. Au niveau des autres organes, le traitement par Bàm entraîne une diminution notable de l'effet transcriptomique de l'effluent sans toutefois conduire à une diminution totale de ce dernier. **Ceci suggère que certaines molécules doivent continuer à échapper à ce type de traitement.** Nos résultats montrent également que les bivalves tels que l'huître et la corbicule sont globalement moins sensibles aux composés présents dans ces effluents et que le traitement par Bàm seul ou couplé à un charbon actif conduit à une disparition quasi complète de ces effets chez ces organismes.

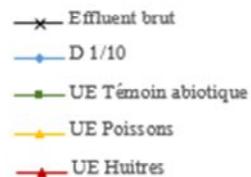
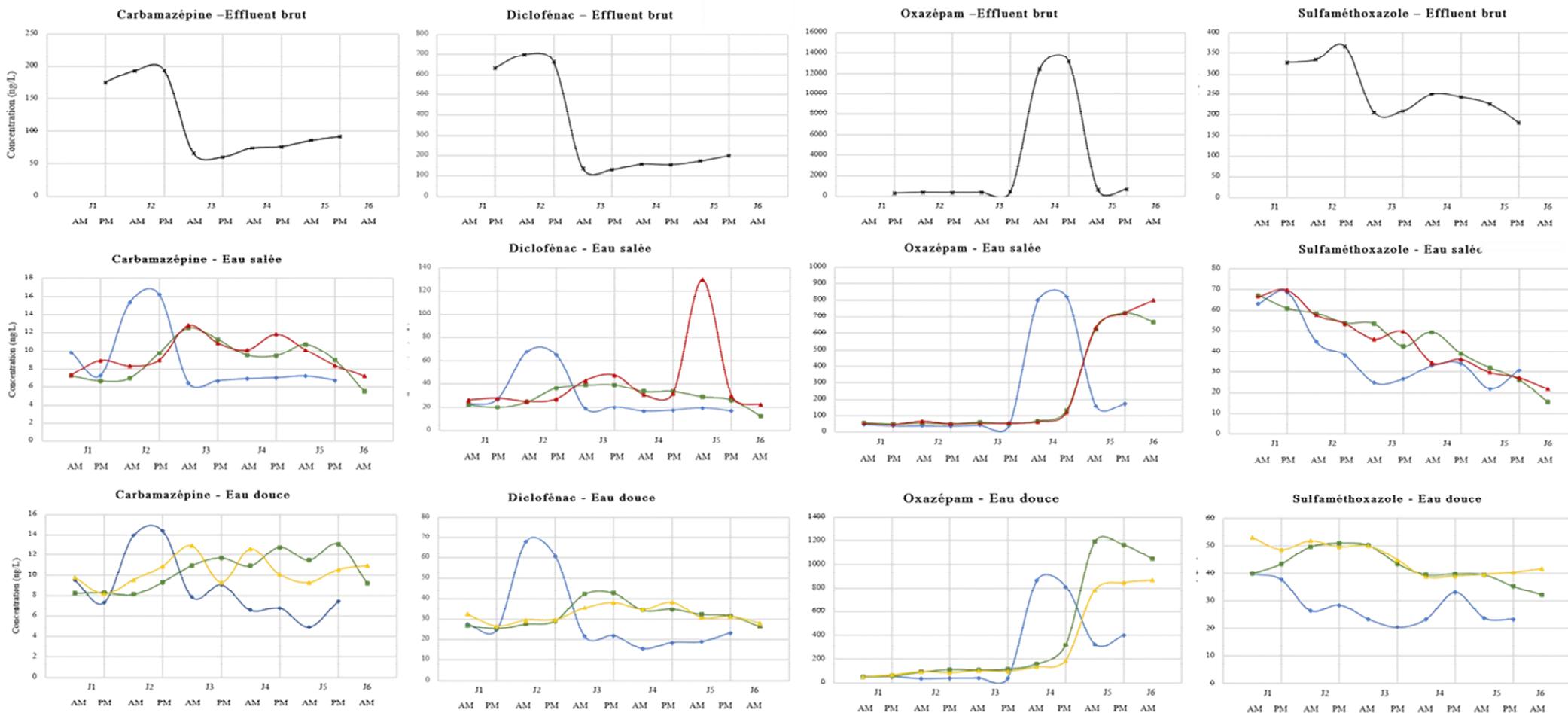
## 5. Bibliographie

- Abele, R., & Tampé, R. (2006). Modulation of the antigen transport machinery TAP by friends and enemies. *FEBS letters*, 580(4), 1156-1163.
- Aït-Aïssa, S., 2009. Outils bio-analytiques in vitro : Principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique (No. DRC-08-95306-16732A). INERIS.
- Aït-Aïssa, S., Maillot-Maréchal, E., Creusot, N., Gardia-Parège, C., Budzinski, H., 2017. Livrable 1.3.3 Détection de composés perturbateurs endocriniens et dioxin-like à l'aide de bioessais in vitro dans les eaux usées, pluviales et naturelles - Projet REGARD (Livrable).
- Aminot, Y., Le Menach, K., Pardon, P., Etcheber, H., Budzinski, H., 2016. Inputs and seasonal removal of pharmaceuticals in the estuarine Garonne River. *Marine Chemistry* 185, 3–11.
- Andreozzi R., Raffaele M. & Nicklas P., 2003, « Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment », *Chemosphere*, Vol. 50, Issue 10, 9. 1319-1330.
- Arini, A., Gourves, P. Y., Gonzalez, P., & Baudrimont, M. (2015). Metal detoxification and gene expression regulation after a Cd and Zn contamination: An experimental study on *Danio rerio*. *Chemosphere*, 128, 125-133
- Balaguer, P., François, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A.-M., Pons, M., Nicolas, J.-C., Casellas, C., 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total Environ.* 233, 47–56.
- Béguel, J. P. (2013). Étude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Doctoral dissertation, Université de Bretagne Occidentale).
- Bellet, V., Hernandez-Raquet, G., Dagnino, S., Seree, L., Pardon, P., Bancon-Montiny, C., Fenet, H., Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Cavailles, V., Budzinski, H., Antignac, J.-P., Balaguer, P., 2012. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Res.* 46, 1912–1922.
- Besse J-P., Kausch-Barreto C., Garric J., 2008, « Exposure Assessment of Pharmaceuticals and Their Metabolites in the Aquatic Environment: Application to the French Situation and Preliminary Prioritization » *Human & Ecological risk assessment*, Vol.14, p665-695.
- Besse, J. P., Garric, J. (2007). Médicaments à usage humain: risque d'exposition et effets sur les milieux récepteurs. Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à surveiller dans les eaux de surface continentales. Agence de l'Eau RMC, Lyon.
- Besse, J.-P., Latour, J.-F., Garric, J., 2012. Anticancer drugs in surface waters: What can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environ. Int.* 39, 73–86.
- Bijoux, H. (2014). Etude des impacts toxiques des contaminants chimiques du Bassin d'Arcachon sur l'huître cultivée *Crassostrea gigas*: Approche in-situ et expérimentale (Doctoral dissertation, Université de Bordeaux).
- Boillot C., Bazin C., Tissot-Guerraz F., Droguet J., Perraud M., Cetre J-C., Trepo D. & Perrodin Y., 2009, « Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers : application à un hôpital d'une grande ville française », *Techniques hospitalières*, Vol.67, p 42-46.
- Boillot, C., Bazin, C., Tissot-Guerraz, F., Droguet, J., Perraud, M., Cetre, J. C., ... & Perrodin, Y. (2008). Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. *Science of the total environment*, 403(1), 113-129.
- Choubert J-M., Pomis M., Miegé C., Martin Ruel S., Budzinski H., Wisniewski C. & Coquery M., 2012, « Elimination des micropolluants par les stations d'épuration domestiques », *Sciences Eaux et Territoires*, n°9, p 6-15.
- Choubert, J.-M., Martin-Ruel, S., Budzinski, H., Miège, C., Esperanza, M., Soulier, C., Lagarrigue, C., Coquery, M., 2011. Evaluer les rendements des stations d'épuration - Apports méthodologiques et résultats pour les micropolluants en filières conventionnelles et avancées. *Techniques Sciences et Méthodes* 44–62.
- Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J.-M., Budzinski, H., 2014. Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. *Env. Sci Technol* 3649–3657.

- Delfosse, V., Dendele, B., Huet, T., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Gerbal-Chaloin, S., Beucher, B., Roecklin, D., Muller, C., Rahmani, R., Cavailles, V., Daujat-Chavanieu, M., Vivat, V., Pascussi, J.-M., Balaguer, P., Bourguet, W., 2015. Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nat. Commun.* 6.
- El Mohit M., Yagoubi M., Belmakki A. et Zouhdi M., 2015, « Monthly physicochemical characterization of a hospital effluent according to technical and care activities », *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, Vol.4, Issue 04, p247-267.
- Escher, B.I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., McArdell, C.S., 2011. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res.* 45, 75–92.
- Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2014. Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: From hospital effluents through urban wastewater to natural environment. *Env. Poll.* 193, 216-223
- Ferrari, B., Paxeus, N., Giudice, R. L., Pollio, A., Garric, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(3), 359-370.
- Fuster, L., 2017. Mise en œuvre d'une démarche intégrée pour identifier des contaminants pertinents dans l'environnement (Thèse). Université de Bordeaux, Talence.
- Galli R., Schmid-kleikemper J., Ort C. & Scharer M., 2009, «Micropolluants dans les eaux: évaluation et réduction de la charge polluants des eaux usées urbaines», Edité par l'Office fédéral de l'environnement (OFEV), 105p.
- Gamain, P. (2016). Impact des polluants et du changement climatique sur les capacités de reproduction et le développement embryo larvaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon (Doctoral dissertation, Université de Bordeaux).
- Gardia-Parège, C., 2015. Développement et applications de l'analyse dirigée par l'effet pour la recherche et l'identification de contaminants à risque pour les écosystèmes aquatiques (Thèse). Université de Bordeaux, Talence.
- Gramaglia, C., & Da Silva, D. S., (2011). 18. Des mollusques pour «faire parler» les rivières?. In *Humains, non- humains* (pp. 221-233). La Découverte.
- Hahn, M.E., Lamb, T.M., Schultz, M.E., Smolowitz, R.M., Stegeman, J.J., 1993. Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquat. Toxicol.* 26, 185–208.
- Halling-Sorensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Lutzhoft H.C.H. & Jorgensen S.E., 1998, « Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment », a review. *Chemosphere*, Vol.36, p357–394.
- Hogue, D. L., Colin, N. A. S. H., Victor, L. I. N. G., Hobman, T. C. (2002). Lysosome-associated protein transmembrane 4 $\alpha$  (LAPTM4 $\alpha$ ) requires two tandemly arranged tyrosine-based signals for sorting to lysosomes. *Biochemical Journal*, 365(3), 721-730.
- INERIS, 2011, « Données technico-économique sur les substances chimiques en France : Diclofenac », 57p
- Kinani, S., Bouchonnet, S., Creusot, N., Bourcier, S., Balaguer, P., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S., 2010. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environ. Pollut.* 158, 74–83.
- Kümmerer K., 2004, « Pharmaceuticals in the Environment – Scope of the Book and Introduction », *Pharmaceuticals in the Environment*, p3-11.
- Kümmerer, K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere* 45, 957–969
- Kümmerer, K., 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *J. Environ. Manage.* 90, 2354–2366.
- Liu, J., Deng, M., Lancto, C. A., Abrahamsen, M. S., Rutherford, M. S., Enomoto, S. (2009). Biphasic modulation of apoptotic pathways in *Cryptosporidium parvum*-infected human intestinal epithelial cells. *Infection and immunity*, 77(2), 837-849.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408
- Marti, E., Monclús, H., Jofre, J., Rodriguez-Roda, I., Comas, J., Balcázar, J. L. (2011). Removal of microbial indicators from municipal wastewater by a membrane bioreactor (MBR). *Bioresource technology*, 102(8), 5004-5009.

- Ménager M.T., Garnier-Laplace J., Goyffon M., 2009, « toxicologie nucléaire environnementale et humaine », édition Lavoisier, p 357-358.
- Méplan, C., Mann, K., & Hainaut, P. (1999). Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(44), 31663-31670.
- Nagarnaik, P.M., Mills, M.A., Boulanger, B., 2010. Concentrations and mass loadings of hormones, alkylphenols, and alkylphenol ethoxylates in healthcare facility wastewaters. *Chemosphere* 78, 1056–1062.
- Neale, P.A., Altenburger, R., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Busch, W., de Aragão Umbuzeiro, G., Denison, M.S., Du Pasquier, D., Hilscherová, K., Hollert, H., Morales, D.A., Novák, J., Schlichting, R., Seiler, T.-B., Serra, H., Shao, Y., Tindall, A.J., Tollefsen, K.E., Williams, T.D., Escher, B.I., 2017. Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: Fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water. *Water Res.* 123, 734–750.
- Olalla, A., Negreira, N., López de Alda, M., Barceló, D., Valcárcel, Y., 2018. A case study to identify priority cytostatic contaminants in hospital effluents. *Chemosphere* 190, 417–430.
- Orias, F., Perrodin, Y. (2013). Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: a review. *Science of the Total Environment*, 454, 250-276.
- Pain, S., & Parant, M. (2003). Le mécanisme de défense multixénobiotique (MDMX) chez les bivalves. *Comptes Rendus Biologies*, 326(7), 659-672.
- Pawlowski, S., van Aerle, R., Tyler, C., Braunbeck, T., 2004. Effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 330–345.
- Penru, Y., Guillon, A., Aït-Aïssa, S., Couteau, J., 2017. Livrable 1 : Caractérisation de la toxicité des eaux usées à Sophia Antipolis. *Projet MICROPOLIS Indicateurs*.
- Petrovic, M., de Alda, M. J. L., Diaz-Cruz, S., Postigo, C., Radjenovic, J., Gros, M., Barcelo, D. (2009). Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 367(1904), 3979-4003.
- Pierron, F., Baillon, L., Sow, M., Gotreau, S., Gonzalez, P. (2014). Effect of low-dose cadmium exposure on DNA methylation in the endangered European eel. *Environmental science & technology*, 48(1), 797-803.
- Radjenovic, J., Petrovic, M., Barceló, D. (2007). Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(4), 1365-1377.
- Regoli, F. (2012). Chemical pollutants and the mechanisms of reactive oxygen species generation in aquatic organisms. *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, 308-316.
- Renault, T. (2006). Les virus infectant les bivalves marins. *Virologie*, 10, 35–41
- Robert, S., Bennett, A., Bernard, F., Blanchot, J., Bougrier, S., Buestel, D., ... & Jonquière, G. (1995). Etude de la respiration et de la filtration de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*: rapport final.
- Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., ... & Budzinski, H. (2006). Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquatic Toxicology*, 79(1), 65-77.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M., Sumpter, J.P., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1559–1565.
- Sanchez, W., Sremski, W., Piccini, B., Palluel, O., Maillot-Maréchal, E., Betoulle, S., Jaffal, A., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Thybaud, E., 2011. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Env. Int* 1342–1348.
- Soulier, C., Gabet, V., Le Menach, K., Pardon, P., Esperanza, M., Miège, C., Choubert, J.-M., Martin-Ruel, S., Bruchet, A., Coquery, M., Budzinski, H., 2011. Zoom sur les substances pharmaceutiques : présence, partition, devenir en station d'épuration. *Techniques Sciences et Méthodes* 63–77.
- Vandegheuchte, M. B., Janssen, C. R. (2014). Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 764, 36-45.
- Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D. (2010). Hospital effluents as a source of emerging pollutants: an overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*, 389(3), 416-428.

- Vieno, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2007). Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water research*, 41(5), 1001-1012.
- Vincent T., Brancotte V., (2000), « Le bivalve invasif asiatique *Corbicula fluminea* (*Heterodonta*, *Sphaeriacea*, *Corbiculidae*) dans le bassin hydrographique de la Seine (France) : première prospection systématique et hypothèse sur la colonisation. » In *Hydroecol. Appl.*, vol. ½. P147-1
- Vindimian, E., Robaut, C., Fillion, G., 1983. A method for cooperative or noncooperative binding studies using nonlinear regression analysis on a microcomputer. *J. Appl. Biochem.* 5, 261–268.
- Williams, T.D., Caunter, J.E., Lillicrap, A.D., Hutchinson, T.H., Gillings, E.G., Duffell, S., 2007. Evaluation of the reproductive effects of tamoxifen citrate in partial and full life-cycle studies using fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 695–707.



**Annexe 1 : Concentration des 4 traceurs chimiques étudiés dans les différents compartiments du système expérimental, au cours du temps, et analysées par LC-MS/MS. Les compartiments marin (« Eau salée ») et dulçaquicole (« Eau douce ») ont été séparés pour plus de clarté.**





Agence de l'Eau Adour-Garonne  
90 rue du Férétra  
CS 87801  
31078 Toulouse Cedex 4  
05 61 36 37 38  
[www.eau-adour-garonne.fr](http://www.eau-adour-garonne.fr)

Agence française pour la biodiversité  
Hall C – Le Nadar  
5, square Félix Nadar  
94300 Vincennes  
01 45 14 36 00  
[www.afbiodiversité.fr](http://www.afbiodiversité.fr)

SIBA  
16 allée Corrigan  
33120 Arcachon  
05 57 52 74 74  
[www.siba-bassin-arcachon.fr](http://www.siba-bassin-arcachon.fr)

EPOC UMR 5805 CNRS-OASU  
Equipe LPTC  
Bâtiment A12  
351 crs de la Libération  
33405 Talence  
05 40 00 69 98  
Equipe EA  
Place du Dr Bertrand Peyneau  
33120 Arcachon  
05 56 22 39 02  
[www.epoc.u-bordeaux.fr](http://www.epoc.u-bordeaux.fr)

LGC UMR 5503 INPT-CNRS-UPS  
4, allée Emile Monso  
BP 84234  
31030 Toulouse cedex 4  
05 34 32 36 00  
[www.lgc.cnrs.fr](http://www.lgc.cnrs.fr)

Irstea, centre de Bordeaux  
UR ETBX  
50 avenue de Verdun  
Gazinet 33612  
Cestas Cedex  
05.57.89.08.00  
[www.irstea.fr](http://www.irstea.fr)