Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

ÉTUDE DE LA PRÉSENCE, DU DEVENIR ET DE L'IMPACT DES PSYCHOTROPES DANS LA GARONNE ESTUARIENNE (FRANCE) ET LE FLEUVE SAINT LAURENT (QUEBEC, CANADA)

Par
Pédelucq Julie

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie de l'INRS-Institut Armand-Frappier

Et

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Docteur en chimie analytique et environnementale de l'Université de Bordeaux

Jury d'évaluation

Président du jury et Examinateur interne	St-Pierre Yves INRS-Institut Armand-Frappier
Examinateur interne	Schmitter Jean-Marie Université de Bordeaux
Examinateur externe	Geffard Olivier IRSTEA Lyon
Examinateur externe	Vulliet Emmanuelle ISA Lyon
Examinateur externe	Lajeunesse André Université du Québec à Trois-Rivières
Examinateur externe	Ségura Pédro A. Université de Sherbrooke
Directeur de recherche	Fournier Michel INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Budzinski Hélène Université de Bordeaux
Codirecteur de recherche	Mazellier Patrick Université de Bordeaux

© Droits réservés de *Julie Pédelucq*, 2016

RÉSUMÉ

L'urbanisation croissante et la propagation des activités humaines entrainent l'augmentation de l'apport de nombreux micropolluants dans le milieu aquatique. Le compartiment aquatique est alors défini comme le réceptacle ultime de la pollution environnementale apportée par diverses sources : les effluents municipaux et industriels, les lixiviats des sites d'élimination des déchets solides, le ruissellement des eaux urbaines et des eaux des sites agricoles.
Parmi les contaminants retrouvés dans l'eau, il y a les psychotropes (benzodiazépines, antidépresseurs, antiépileptiques, etc…) qui appartiennent à la grande famille des médicaments. Ce sont des molécules biologiquement actives, ubiquistes, qui sont principalement d'origine urbaine, qui sont apportées continuellement dans l'environnement aquatique et qui sont fortement consommées au niveau mondial.
Depuis quelques années, les scientifiques commencent à s'intéresser à cette famille thérapeutique mais il existe encore un réel manque de connaissance sur l'intégralité du problème de diffusion des psychotropes, de leur passage en station d'épuration à leur présence dans l'environnement et enfin à leur impact sur les organismes aquatiques. Ces travaux de thèse cherchent donc à documenter ce point en se focalisant sur l'étude de la présence, du devenir et de l'impact des psychotropes dans la Garonne estuarienne (France) et le fleuve Saint Laurent (Québec, Canada).

Dans un premier temps, une méthode analytique multi-résidus permettant l'analyse de 47 psychotropes dans les eaux usées et les eaux de surface a été développée et validée. Des échantillonneurs passifs de type POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) ont été calibrés et validés afin de permettre le suivi intégratif et continu des psychotropes dans les eaux de surface.
Dans un second temps, les effluents d'entrée et de sortie de station d'épuration des agglomérations de Bordeaux en France et de Repentigny et Montréal au Québec ont été caractérisés. Les résultats de cette étude montrent que les traitements épuratoires de chacune des stations d'épurations étudiées ont une efficacité limitée pour éliminer les psychotropes dans les eaux usées. Par la suite, le suivi effectué dans la Garonne estuarienne et dans le fleuve Saint Laurent a mis en évidence la présence de psychotropes dans l'environnement qui sont majoritairement apportés par l'amont des villes de Bordeaux et Montréal.
La comparaison des résultats obtenus pour la France et le Québec montre qu'il existe bien des habitudes de prescriptions et de consommations différentes entre les deux pays. Même si les procédés d'épuration sont différents entre les deux pays (traitement secondaire en France et primaire au Québec), l'efficacité d'élimination sur la famille thérapeutique des psychotropes reste insuffisante. Enfin il a été observé que le débit du milieu récepteur jouait un rôle important dans la dilution et le devenir des composés.
Dans un troisième et dernier temps, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que certains psychotropes pouvaient avoir un impact toxique sur les bivalves d'eau douce étudiés (*Elliptio complanata* et *Corbicula fluminea*) lors d'exposition de composés seuls ou en mélange à des concentrations de l'ordre du $mg.L^{-1}$ (concentrations expérimentales) et même du $ng.L^{-1}$ (concentrations environnementales).

Mots-clés : psychotropes, stations d'épuration, Garonne estuarienne, fleuve Saint Laurent, toxicité, *Elliptio complanata*, *Corbicula fluminea*, expositions *in vivo* et *in vitro*.

ABSTRACT

Title : Presence, fate and impact of psychotropic drugs in the Garonne estuarine (France) and the St. Lawrence River (Quebec, Canada).

Increasing urbanization and human activities cause an increase of micropollutant input in the aquatic environment. The water compartment is then defined as the ultimate receptacle of environmental pollution originating from various sources: municipal and industrial wastewaters, leachates from solid waste disposal sites, waters of urban and agricultural runoff.
Among the contaminants found in the water, there are psychotropic drugs (benzodiazepines, antidepressants or antiepileptics) belonging to the family of pharmaceuticals. These are biologically active molecules, ubiquitous, which are mainly of urban origin, which are continuously introduced into the aquatic environment and are heavily consumed around the world.
In recent years, scientists have begun to show interest for this therapeutic family, but there is still a real lack of knowledge about the full psychotropic diffusion problem; from their presence in wastewater treatment plant to their presence in the environment and finally to their impact on aquatic organisms.
In this global perspective these thesis works seek to document the presence, fate and impact of psychotropic drugs in the Garonne estuarine (France) and the St. Lawrence River (Quebec, Canada).
Firstly, a multi-residue analytical method for the analysis of 47 psychotropic drugs in wastewater and surface waters has been developed and validated. POCIS passive samplers were calibrated and validated for continuous integrative monitoring of psychotropic drugs in surface waters.
Secondly, the treatment plant influents and effluents of Bordeaux in France and Repentigny and Montreal in Quebec have been characterized. The results of this study show that treatment processes of studied wastewater treatment plants have limited performances to remove psychotropic drugs in wastewaters. Thereafter, the monitoring performed in the Garonne estuarine and in the St. Lawrence River has highlighted that the presence of psychotropic drug in the environment is mainly related to upstream input of Bordeaux and Montréal.
Comparison of the results obtained in the two countries surveyed show that there are many different patterns of prescriptions and consumption between the two countries. Although the treatment processes are different between the two countries (secondary treatment in France and primary in Quebec), their removal efficiency is still insufficient for psychotropic drugs. Finally it was observed that the flow rate of the receiving environment plays an important role in the dilution and the fate of the compounds.
In a third and final stage, *in vitro* and *in vivo* studies have shown that some psychotropic drugs could have a toxic impact on the studied freshwater bivalves (*Elliptio complanata* and *Corbicula fluminea*) upon exposure alone or in mixture with concentrations in the order of $mg.L^{-1}$ (tests concentrations) and even $ng.L^{-1}$ (environmental concentrations).

Keywords: psychotropic drugs, waste water treatment plants, Garonne estuarine, St. Lawrence River, toxicity, E*lliptio complanata*, *Corbicula fluminea*, *in vivo* and *in vitro* exposures.

REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse ont été menés dans le cadre du programme de recherche GaGiLau (Garonne, Gironde, St Laurent). Les différents partenaires financiers (Région Aquitaine, le CPER A2E, le FEDER, Bordeaux Métropole, l'agence de l'eau Adour-Garonne, l'Agence Nationale de la Recherche française (ANR), le Labex COTE et les fonds INRS) sont vivement remerciés pour leur soutien. L'ANR support Pharm@écotox, le projet Psych'eau de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) et l'Agence Régionale de Santé Aquitaine (ARS) sont également remerciés pour leurs concours financiers.

Je tiens à adresser ma gratitude aux directeurs de recherche qui m'ont accueillie : Eric Villenave, directeur de l'OASU (Observatoire Aquitain des Sciences de l'Univers), Antoine Grémare directeur de l'UMR EPOC (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux) et Charles M. Dozois, directeur du centre INRS-Institut Armand-Frappier.

Je tiens également à adresser mes sincères remerciements à Laurent Servant et Thierry Toupance, directeurs de l'école doctorale de chimie, pour leur aide et leurs conseils concernant la cotutelle.

Je souhaite vivement remercier Olivier Geffard, chargé de recherche à l'IRSTEA de Lyon, Emmanuelle Vulliet, chargé de recherche à l'ISA de Lyon, Yves St-Pierre, professeur à l'INRS-Institut Armand-Frappier, Jean-Marie Schmitter, professeur à l'Université de Bordeaux, André Lajeunesse, chercheur à l'Université du Québec à Trois-Rivières et Pedro A. Segura, professeur adjoint à l'Université de Sherbrooke pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ces travaux de thèse malgré les particularités de la cotutelle. Je tiens à remercier aussi Joëlle Forget-Leray, professeur à l'Université du Havre pour avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse. Enfin, je souhaite tous vous remercier d'avoir accepté les conditions, un peu particulières, de cette soutenance en visio conférence mais aussi pour vos échanges, vos remarques et vos conseils pertinents qui m'ont permis d'améliorer ce manuscrit.

Hélène, je souhaite t'exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir donné ma chance en tant que petite biologiste dans ce monde de la chimie analytique et de m'avoir fait confiance en me donnant cette thèse en cotutelle. Elle n'a pas toujours été facile, elle a même été parfois complexe entre les exigences de la France et du Québec mais je suis fière qu'on ait réussi à la terminer. Je voulais te remercier enfin pour toutes nos discussions, parfois très tardives, qui m'ont appris et fait grandir professionnellement et personnellement.

Michel, je souhaite t'exprimer mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueillie dans ton laboratoire, pour ta confiance, pour tes conseils et ta bonne humeur. Je voulais aussi te remercier car grâce à toi, j'ai pu de découvrir le Québec. Cette expérience restera inoubliable.

Enfin, Hélène et Michel, je voulais encore une fois vous remercier pour m'avoir fait confiance durant toutes ces années et pour m'avoir offert un cadre de travail exceptionnel.

Patrick, même si tu as suivi cette thèse de loin, je souhaite te remercier pour ta gentillesse et ton aide lors de la mise en place de la cotutelle.

Je souhaite aussi remercier Magalie pour ce fameux cours en licence 3 qui a révélé en moi une vraie passion pour l'écotoxicologie, qui a été confirmée lors de mes stages de master 1 et master 2 sous ta tutelle. Un grand merci pour tout ça et surtout pour ton extrême gentillesse.
Patrice, je souhaite également te dire un grand merci pour ton encadrement lors de mes stages de master et pour m'avoir donné le gout de la recherche. Travailler avec toi et ta bonne humeur a toujours été un grand plaisir. Merci d'avoir gardé un œil protecteur tout au long de ma thèse.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Anne Philippon, du programme d'enseignement de l'Institut Armand-Frappier, pour son aide, sa gentillesse et pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes nombreux mails.

Je voudrais également remercier Robert Vaillancourt et Jean-Christophe Boussin du Biodôme de Montréal pour leur aide et pour avoir pris soin de mes Elliptio, me permettant d'avoir des organismes en bonne santé pour toutes mes manipulations.

Cette thèse en cotutelle m'a donné l'opportunité de travailler dans deux laboratoires et dans deux univers différents : celui de la chimie analytique et celui de la biologie. Cela m'a permis de rencontrer deux fois plus de personnes, rendant cette aventure extrêmement enrichissante professionnellement et personnellement.
C'est pourquoi je voudrais tout d'abord remercier l'ensemble des membres permanents et non permanents du LPTC (en France) pour leur aide, que ce soit lors de missions, lors de filtrations ou encore lors de manipulations mais également pour la vie quotidienne du labo et tous les moments partagés ensemble lors de ces années de thèse.
J'adresse un remerciement particulier à Patrick pour m'avoir formé sur les LC-MS/MS, pour son aide et pour avoir su décrypter la fameuse phrase « Patrick, mes pics sont moches ! », à Sylvie, la seule personne du labo qui, comme moi, ne déteste pas l'UPLC et à Karyn et Laurent pour leur disponibilité et réactivité pour toutes les fois où j'ai oublié d'anticiper…

J'ai une pensée sincère pour tous les étudiants et contractuels avec qui j'ai pu partager un bout de paillasse, une pause-café, une conversation, un fou-rire, un verre ou encore une soirée : Yann, Jonathan, Justine, Laura F., Vincent D., Céline, Max, Juliette, Caro GP, Perrine, Nicolas, Jérémie, Caro M., Baptiste, Coralie, Gabriel, Mathilde, Caro SL, Laurine, Mohammed, Mylène, Thomas G, Imillia, Céciline, Thomas C, Angel, Ninette, Hoï, Vincent B., Fred, Vincent F., Sébastien, Geoffroy, Nathalie, Marion-Justine, Iris, Florane, Rami, Julien, Sophie, Jérémy, Laura M., Lucas, Delphine et Charlotte.

Je ne peux pas oublier Nadia, merci pour ta gentillesse, ta joie de vivre, ton grain de folie et pour toutes les discussions qu'on a eu au coin d'une porte ou dans mon bureau. Deux bavardes ensemble ça ne fait pas bon ménage.

Je voudrais ensuite remercier tous les membres du laboratoire de Michel Fournier (au Québec), Pauline pour son aide, Laurie pour sa gentillesse et Marlène pour sa disponibilité, sa bonne humeur et pour m'avoir tout appris sur la spectrométrie en flux.
J'ai également une pensée sincère pour tous les étudiants avec qui j'ai partagé ma vie à l'IAF : Cécile, Christine, Pierre-Hervé, Marc, Zora, Messika, Hermance, Méryle, Pierre-Luc et Alexandre.
Je voudrais faire un petit clin d'œil à Lauris que j'ai ridiculisé avec mes ponctions d'hémolymphe d'Elliptio mais avec qui j'ai partagé ma passion du gras et les galères de la cotutelle. Je voudrais dire un gros GROS merci à Emilie pour son aide, ses conseils et pour les manips des ténèbres qui étaient sans fin… Et pour tous les supers moments qu'on a passé ensemble au labo et en dehors. Tu as été une des belles rencontres de ma thèse.

Comme pour un grand nombre de doctorants, ma thèse c'était « ma vie, ma bataille ! » mais j'ai eu de la chance d'avoir des amis et une famille en or pour m'aider à déconnecter quelque fois… Donc, je voudrais dire un ENORME merci à mes amis, La Famille : Alex, Audrey, Belbête, Benja, Camille, Caro, Célion, Coco, Diana, Didi, Emi, Emma, Gus, Gros Gooby, Jéjé, Ju, Kiki, Lolo, Lorraine, Mano, Marion, Marie, Matthieu, Méla, Mumu, Nico, Nono, Oliv, Petit Goubi, Pinouche, Romy, Roro et Steph. Merci d'être là, d'être ce que vous êtes, d'avoir fait attention à moi pendant la thèse. Je suis chanceuse d'avoir des amis aussi exceptionnels que vous !

Je pense aussi aux collègues de labo qui sont devenus des amis ! Un GROS merci pour votre grain de folie !

Je voudrais remercier également Alban, Bastien, Benjamin, Bibi, Pascal, Quentin, Thomas et Vincent ; les copains du Québec ; qui ont rendu cette aventure encore plus folle.

Je ne peux pas non plus oublier les copains d'Arcachon : Cerise, Ika, Lolo et Nico. Un grand merci pour tous les moments passés ensemble, vous êtes géniaux !

Et je voudrais faire un petit clin d'œil à Sarah pour son amitié et pour avoir toujours été présente même si nos études nous ont fait prendre des chemins différents !

Une spéciale dédicace à Hugues alias Tatounette ! Depuis notre rencontre en L3 et surtout depuis notre master, on ne se lâche plus ! Ce qui nous a valu le surnom de « Pic et Poc » ! De vivre nos thèses ensemble et surtout dans le même labo, a rendu cette aventure plus facile et surtout a renforcé notre amitié ! Alors je voulais t'adresser un GIGANTESQUE merci pour tes conseils, ton soutien, ton aide, les soirées, les craquages, les fou-rires, etc… Merci vraiment pour TOUT ! Sans toi, cette thèse n'aurait pas été la même !

Parce que sans ma famille, je ne serais jamais arrivée jusque-là, je tiens à remercier mamounette, mamie Busche, Vincent, Gwen, Nell et Peyo. Merci de m'avoir laissée suivre mes propres choix, de m'avoir soutenue et d'avoir cru en moi.
Je voudrais également remercier ma belle-famille pour leur soutien infaillible.

Enfin, je voudrais remercier la personne qui a le plus vécu cette thèse avec moi, mon chéri, Rémi. Merci pour avoir été là depuis le début de l'aventure, merci de m'avoir suivie au Québec, de m'avoir fait confiance, de m'avoir supportée, de m'avoir rassurée, de m'avoir écoutée, de m'avoir remotivée, merci tout simplement d'être toi ! Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans toi !

Je voudrais remercier de manière générale, toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à cette thèse.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ..... **III**

ABSTRACT ..... **V**

REMERCIEMENTS ..... **VII**

TABLE DES MATIÈRES ..... **XIII**

LISTE DES FIGURES ..... **XIX**

LISTE DES TABLEAUX ..... **XXV**

LISTE DES ABRÉVIATIONS ..... **XXIX**

INTRODUCTION **1**

CHAPITRE I . SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **5**

1. LES MEDICAMENTS 10
   1.1. Définition *10*
   1.2. Règlementation française *10*
   1.3. Réglementation canadienne *14*
   1.4. Diversité des médicaments *17*
   1.5. Consommation *19*
2. LES PSYCHOTROPES 25
   2.1. Les antidépresseurs *25*
   2.2. Les antiépileptiques *25*
   2.3. Les anxiolytiques *25*
   2.4. Les hypnotiques *26*
   2.5. Les neuroleptiques *26*
   2.6. Les thymorégulateurs *26*
   2.7. Les substituts aux opiacés *26*
3. VOIES D'INTRODUCTION 28
4. PRESENCE 31
   4.1. Présence dans les stations d'épuration *31*
   4.2. Présence dans l'environnement *34*
5. DEVENIR DANS L'ENVIRONNEMENT 39
6. TOXICITE ET RISQUE 44
   6.1. Toxicité aigüe *44*
   6.2. Toxicité chronique *45*
   6.3. Le risque *47*
7. IMPACTS DES PSYCHOTROPES 49
   7.1. Les biomarqueurs *49*
   7.2. Impact des psychotropes sur les organismes aquatiques *50*
8. COMPARAISON FRANCE-QUEBEC 52
9. L'ESTUAIRE DE LA GIRONDE EN FRANCE 55
   9.1. Morphologie de l'hydrosystème Garonne-Dordogne-Gironde *55*

9.2. Caractéristiques hydrologiques *57*
9.3. Caractéristiques physico-chimiques *59*
9.4. Impacts anthropiques *62*
10. LE FLEUVE SAINT LAURENT AU QUEBEC 64
10.1. Morphologie du Saint Laurent *64*
10.2. Caractéristiques du tronçon fluvial *67*
10.3. Impacts anthropiques sur cette zone fluviale *71*
11. CADRE SCIENTIFIQUE : LE PROGRAMME MEDIC'EAU 75

OBJECTIF DES TRAVAUX DE THESE 77

CHAPITRE II . MATERIELS ET METHODES 80

1. MOLECULES ETUDIEES 82
1.1. Choix des composés *82*
1.2. Caractéristiques physico-chimiques *84*
1.3. Données d'occurrence *92*
2. STRATEGIES D'ECHANTILLONNAGE ET SITES D'ETUDE 95
2.1. Les différents types de prélèvements étudiés *95*
3. SITES D'ETUDES 96
3.1. Station d'épuration de la communauté urbaine de Bordeaux *96*
3.1.1. La station d'épuration de Clos de Hilde 97
3.1.2. La station d'épuration de Louis Fargue 100
3.2. La Gironde *106*
3.3. La Jalle de Blanquefort *109*
3.4. Station de traitement des eaux usées du Québec *113*
3.4.1. La STEP Jean Marcotte de Montréal 113
3.4.2. La STEP de l'île Lebel et les étangs aérés de Le Gardeur à Repentigny 116
3.5. Le Fleuve Saint Laurent *120*
4. ETUDE D'UN ECHANTILLONNEUR PASSIF : LE POCIS (POLAR ORGANIC CHEMICAL INTEGRATIVE SAMPLER) 122
4.1. Généralité sur l'échantillonneur passif *122*
4.2. Le POCIS *124*
4.3. Calibration et validation du POCIS *128*
4.3.1. Calibration en laboratoire 128
4.3.2. Calibration in situ 131
4.4. Extraction du POCIS *131*
5. PREPARATION ET EXTRACTION DES ECHANTILLONS D'EAU 133
5.1. Produits chimiques et solvants *133*
5.2. Filtration et conservation des échantillons *133*
5.3. Méthode d'extraction *134*
6. ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM 137
6.1. Technique analytique *137*
6.2. Méthode analytique développée pour les psychotropes *137*
6.3. Quantification *142*
7. MODELES BIOLOGIQUES ET BIOMARQUEURS ETUDIES 145
7.1. La moule d'eau douce Elliptio complanata *145*
7.1.1. Généralités 145
7.1.2. Analyses sur Elliptio complanata 151

7.2. La palourde asiatique Corbicula fluminea *156*
7.2.1. Généralités 156
7.2.2. Analyses sur Corbicula fluminea 159

CHAPITRE III . DEVELOPPEMENT, VALIDATION ET APPLICATIONS DES METHODES 164

1. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE MULTI-RESIDUS POUR L'ANALYSE DES PSYCHOTROPES DANS LES EAUX USEES ET LES EAUX DE SURFACE. 165
1.1. Introduction *165*
1.2. Validation des méthodes développées *166*
1.2.1. Performance de la méthode d'analyse et de l'instrument 166
1.2.2. Protocole de préparation d'échantillon 172
1.3. Application sur la Jalle de Blanquefort et discussion *186*
2. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ECHANTILLONNAGE POUR LES PSYCHOTROPES : LE POCIS. 191
2.1. Introduction *191*
2.2. Contrôle qualité *193*
2.3. Calibrations en laboratoire et in situ *199*
2.3.1. Comportement d'accumulation dans le POCIS 199
2.3.2. Taux d'échantillonnage 202
2.3.3. Constante d'élimination des PRC 203
2.4. Application de l'outil sur la Jalle de Blanquefort *205*
3. CONCLUSION 210

CHAPITRE IV . SUIVI DE LA CONTAMINATION EN PSYCHOTROPES DANS LES EAUX USEES ET LES EAUX DE SURFACES FRANÇAISES ET QUEBECOISES. 213

A. ETUDE DE LA CONTAMINATION EN PSYCHOTROPES DANS LES STEP BORDELAISES ET DANS LA GARONNE. ... 215

1. PRESENCE ET DEVENIR DES PSYCHOTROPES DANS LES STEP DE BORDEAUX 215
1.1. Etude des effluents d'entrée *215*
1.1.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentration 215
1.1.2. Comparaison des apports calculés à la consommation en psychotropes 220
1.2. Etude des effluents de sortie *225*
1.2.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentration 225
1.3. Etude des variabilités en entrée et en sortie de STEP *235*
1.4. Rendement d'épuration *246*
1.4.1. Méthodologie 246
1.4.2. Rendement moyenné par molécules 247
2. ETUDE DE LA CONTAMINATION EN PSYCHOTROPES DE LA GIRONDE 251
2.1. Suivi de la contamination par prélèvement ponctuel *251*
2.1.1. Fréquence de quantification, occurrence et gammes de concentrations 251
2.1.2. Etudes des variabilités par point et saisonnières 254
2.2. Suivi de la contamination par échantillonnage passif *260*
2.2.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentration 260
2.2.2. Comparaison avec l'échantillonnage ponctuel 263
2.2.3. Etude des variabilités par point et saisonnières 264
2.3. Caractérisation des apports *270*
2.4. Estimation du risque environnemental *275*
3. CONCLUSION 278

B. ETUDE DE LA CONTAMINATION EN PSYCHOTROPES DANS LES STEP QUEBECOISES ET DANS LE SAINT LAURENT. 280

1. 1. PRESENCE ET DEVENIR DES PSYCHOTROPES DANS LES STEP QUEBECOISES 280
1.1. Etude des eaux d'entrée de STEP 280
1.1.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentrations 280
1.2. Etude des eaux de sortie de STEP 293
1.2.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentration 293
1.3. Rendement d'épuration 299
2. ETUDE DE LA CONTAMINATION EN PSYCHOTROPES DU SAINT LAURENT 303
2.1. Suivi de la contamination par prélèvement ponctuel 303
2.1.1. Fréquence de quantification, occurrence et gammes de concentrations 303
2.1.2. Etude des variabilités par point et saisonnières 304
2.2. Suivi de la contamination par échantillonnage passif 307
2.2.1. Concentrations POCIS, taux d'échantillonnage et concentrations estimées 308
2.2.2. Comparaison avec l'échantillonnage ponctuel 309
2.3. Caractérisation des apports 311
2.4. Risque environnemental 314
3. CONCLUSION 316

C. COMPARAISON FRANCE – QUEBEC 318

CHAPITRE V . EXPOSITION IN VITRO ET IN VIVO DE PSYCHOTROPES SUR DES MODELES BIOLOGIQUES D'EAU DOUCE 323

1. EXPOSITION *IN VITRO* DES HEMOCYTES D'*ELLIPTIO COMPLANATA* AUX PSYCHOTROPES INDIVIDUELS ET EN MELANGE 324
1.1. Introduction 324
1.2. Matériels et méthodes 324
1.3. Principaux résultats et discussion 328
1.4. Publication 1 330
2. EXPOSITION *IN VIVO* D'*ELLIPTIO COMPLANATA* AUX PSYCHOTROPES INDIVIDUELS ET EN MELANGE 342
2.1. Introduction 342
2.2. Matériels et méthodes 343
2.3. Principaux résultats et discussion 346
2.4. Publication 2 349
3. EXPOSITION *IN VIVO* D'*ELLIPTIO COMPLANATA* AUX EAUX USEES DES STEP DE REPENTIGNY, AVANT ET APRES TRAITEMENT A L'OZONE. 362
3.1. Introduction 362
3.2. Matériels et méthodes 363
3.3. 3.3 Principaux résultats et discussion 363
3.4. Publication 3 367
4. EXPOSITION *IN VIVO* DE *CORBICULA FLUMINEA* A DES COMPOSES PHARMACEUTIQUES SEULS ET EN MELANGE AVEC DES PESTICIDES. 379
4.1. Introduction 379
4.2. Matériels et méthodes 379
4.3. Principaux résultats et discussion 381
4.4. Publication 4 384
5. CONCLUSION 396

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 400

ANNEXES **406**

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUES **455**

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES **487**

LISTE DES FIGURES

FIGURE I-1. FREQUENCE DE DETECTION EN POURCENTAGE DE 35 MICROPOLLUANTS (ADAPTEE DE LOOS ET *AL*., 2009). 9
FIGURE I-2. LES DIFFERENTES ETAPES DE L'EVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL, FAITE PAR L'EMA 12
FIGURE I-3. ETAPES DU PROCESSUS DE REGLEMENTATION DES MEDICAMENTS AU CANADA (SOURCE : SANTE CANADA : HTTP://WWW.HC-SC.GC.CA/) 15
FIGURE I-4. EXEMPLE DE LA CLASSIFICATION ATC POUR LE CLOBAZAM (VIDAL : HTTP://WWW.VIDAL.FR/CLASSIFICATIONS/ATC/, CONSULTE EN AVRIL 2015) 18
FIGURE I-5. POURCENTAGE DE PART DES PRINCIPAUX MARCHES MONDIAUX PHARMACEUTIQUES EN 2013. 19
FIGURE I-6. DEPENSES EN SANTE PAR HABITANT, 2011 (SOURCE : OCDE, 2013). 20
FIGURE I-7. DEPENSES PHARMACEUTIQUES PAR HABITANT DES PAYS DE L'OCDE EN 2011 (SOURCE : OCDE, 2013) 21
FIGURE I-8. CONSOMMATION D'ANTIDEPRESSEURS, 2000 ET 2011 (SOURCE : OCDE, 2013) 23
FIGURE I-9. REPARTITION DE LA CONSOMMATION EN BENZODIAZEPINES EN FRANCE, EN 2012. 24
FIGURE I-10. VOIES D'INTRODUCTION DES MEDICAMENTS A USAGE HUMAIN ET VETERINAIRE DANS LE MILIEU AQUATIQUE (ADAPTEE DE L'ANSES, 2011). 29
FIGURE I-11. PRODUITS DE PHOTODEGRADATION DE L'OXAZEPAM, LE DIAZEPAM, LE LORAZEPAM ET L'ALPRAZOLAM 37
FIGURE I-12. POURCENTAGE DES ETUDES PUBLIEES SUR DIFFERENTES FAMILLE THERAPEUTIQUES, SUR 112 ARTICLES PUBLIES ENTRE1998 ET 2007 (ADAPTEE DE SCHLÜSENER ET *AL*., 2008). 39
FIGURE I-13. VALEURS DE CE50 DE 14 COMPOSES PHARMACEUTIQUES DONNEES POUR LES ALGUES, LES INVERTEBRES ET LES POISSONS (ECHELLE LOGARITHMIQUE). REFERENCES : AHLFORD, 2007 ; CHRISTENSEN ET *AL*, 2007 ; CALISTO ET *AL*., 2009, SANTOS ET *AL*., 2010 ; MINGUEZ ET *AL*., 2016 45
FIGURE I-14. VALEURS DE NOEC DE 14 COMPOSES PHARMACEUTIQUES DONNEES POUR LES ALGUES, LES INVERTEBRES ET LES POISSONS (ECHELLE LOGARITHMIQUE). REFERENCES : FERRARI ET *AL*., 2003 ; HENRY ET *AL*., 2004 ; CRANE ET *AL*., 2006 ; DE LANGE ET *AL*., 2006 ; GARRIC ET *AL*., 2006 ; RICHARDS ET *AL*., 2006 ; AHLFORD, 2007 ; FLIPPIN ET AL., 2007 ; SCHMITT-JANSEN ET *AL*., 2007 ; STANLEY ET *AL*., 2007 ; CALISTO ET *AL*., 2009 ; BESSE, 2010 ; SANTOS ET *AL*., 2010 ; SILVA ET *AL*., 2015 46
FIGURE I-15. REPARTITION DES TYPES DE TRAITEMENTS EN FONCTION DE LA CAPACITE HYDRAULIQUE DES STEP DU QUEBEC (SOURCE : MAMROT, 2013). 53
FIGURE I-16. REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN ESTUAIRE D'APRES PRITCHARD (1967), DALRYMPLE ET *AL*. (1992) ET PERILLO (1995) (SOURCE : DELOFFRE, 2005). 55
FIGURE I-17. DECOUPAGE DU BASSIN VERSANT ADOUR-GARONNE-DORDOGNE-CHARENTE 56
FIGURE I-18. L'ESTUAIRE DE LA GIRONDE ET SES AFFLUENTS MAJEURS (SOURCE : ALLEN, 1972). 57
FIGURE I-19. DEBITS MENSUELS MOYENS SUR LA GARONNE ET SUR LA DORDOGNE DE 2011 A 2013 58
FIGURE I-20. VARIATIONS ANNUELLES MOYENNEES DES DEBITS, DE LA TEMPERATURE, DE LA SALINITE, DE L'OXYGENE DISSOUS ET DE LA SATURATION EN OXYGENE DISSOUS DE 2005 A 2013 SUR LES 4 SITES MAGEST (SOURCE : SCHMIDT ET SOTTOLICHIO, 2013). 60
FIGURE I-21. LES REGIONS HYDROGRAPHIQUES DU SAINT LAURENT : TRONÇON FLUVIAL, L'ESTUAIRE FLUVIAL, LE MOYEN ESTUAIRE ET LE SAGUENAY, L'ESTUAIRE MARITIME ET LE GOLFE (SOURCE : ENVIRONNEMENT CANADA, 1996). 65
FIGURE I-22. SCHEMA DES DIFFERENTES MASSES D'EAU DU TRONÇON FLUVIAL DU SAINT LAURENT 67
FIGURE I-23. STATION HYDROMETRIQUE PROCHE DE MONTREAL (SOURCE : CENTRE D'EXPERTISE HYDRIQUE : WWW.CEHQ.GOUV.QC.CA). 68
FIGURE I-24. DEBITS MENSUELS MOYENS A LA STATION LASALLE (AU NIVEAU DE MONTREAL) SUR LE SAINT LAURENT DE 1970 A 2012 (SOURCE : CENTRE D'EXPERTISE HYDRIQUE : WWW.CEHQ.GOUV.QC.CA). 68
FIGURE I-25. NIVEAU D'EAU ENREGISTRE DANS LE PORT DE MONTREAL ENTRE 1932 ET 2005 (SOURCE : TALBOT, ANDRE (DIR.). 2006). 69
FIGURE I-26. TEMPERATURE ENREGISTRE A LA JETEE DE MONTREAL DE JUILLA A DECEMBRE 2013 69

FIGURE I-27. REPRESENTATION SIMPLIFIEE DE LA DYNAMIQUE SEDIMENTAIRE ENTRE CORNWALL ET QUEBEC (ADAPTEE DE LEPAGE, 1997 ; RONDEAU ET *AL*., 2000). 70
FIGURE I-28. QUALITE DE L'EAU DU FLEUVE SAINT LAURENT ENTRE 2004-2005 (SOURCE : HEBERT, 2006)..... 72
FIGURE I-29. EVOLUTION DES REJETS DE PHOSPHORE, MES ET DBO5 PAR LES MUNICIPALITES DU QUEBEC DE 1979 A 2002 (SOURCE : HEBERT ET BELLEY, 2005). 72
FIGURE I-30. EVOLUTION DES REJETS DE MES ET DBO5 PAR LES INDUSTRIES DE PATES ET PAPIERS DU QUEBEC ENTRE 1981 ET 2001 (SOURCE : HEBERT ET BELLEY, 2005). 73
FIGURE II-1. DELIMITATION DE LA COMMUNAUTE URBAINE DE BORDEAUX ET REPRESENTATION DES ZONES D'INFLUENCE DES 6 STATIONS D'EPURATION ASSOCIEES (SOURCE : LANOUX, 2013)..... 96
FIGURE II-2. ZONE DE REJET DE LA STATION D'EPURATION CLOS DE HILDE A BEGLES..... 98
FIGURE II-3. DEBITS MENSUELS MOYEN DES DIFFERENTES EAUX ENTRANTS DANS LA STATION D'EPURATION CLOS DE HILDE EN 2011 (SOURCE : LYONNAISE DES EAUX)..... 100
FIGURE II-4. ZONE DE REJET DE LA STATION D'EPURATION LOUIS FARGUE (SOURCE : SIE ADOUR-GARONNE : HTTP://ADOUR-GARONNE.EAUFRANCE.FR/)..... 102
FIGURE II-5. DEBITS MENSUELS MOYEN DES DIFFERENTES EAUX ENTRANTS DANS LA STATION D'EPURATION LOUIS FARGUE EN 2011 (SOURCE : LYONNAISE DES EAUX)..... 103
FIGURE II-6. CARTE REPRESENTANT LES LOCALISATIONS DES STEP LOUIS FARGUE ET CLOS DE HILDE (PHOTOS : GOOGLE MAPS)..... 104
FIGURE II-7. CARTE DE L'ESTUAIRE DE LA GIRONDE REGROUPANT LES 10 POINTS DE PRELEVEMENTS SUIVIS POUR CES TRAVAUX DE THESE (ADAPTEE DE ALLEN, 1972). 107
FIGURE II-8. PRELEVEUR MANUEL LESTE CONTENANT UNE BOUTEILLE DE 2,5 L EN VERRE AMBRE..... 108
FIGURE II-9. POCIS (A), HOLDER (B) ET CAGE CONTENANT DES POCIS MONTE SUR DES HOLDERS (C)..... 109
FIGURE II-10. ZONE DE REJET DE LA STATION D'EPURATION CANTINOLLE (SOURCE : HTTP://ASSAINISSEMENT.DEVELOPPEMENT-DURABLE.GOUV.FR//). 110
FIGURE II-11. LOCALISATION DE LA STEP CANTINOLLE PAR RAPPORT AUX AUTRES STEP ETUDIEES (PHOTO : GOOGLE MAPS). 111
FIGURE II-12. CARTE REPRESENTANT LES POINTS DE PRELEVEMENT POUR L'ETUDE SUR LA JALLE DE BLANQUEFORT. 112
FIGURE II-13. LOCALISATION DES STATIONS DE TRAITEMENT DES EAUX USEES A MONTREAL ET A REPENTIGNY ET LES ETANGS AERES A REPENTIGNY..... 113
FIGURE II-14. PANACHE DE L'EFFLUENT TRAITE DE LA STATION DE TRAITEMENT DES EAUX USEES DE MONTREAL 115
FIGURE II-15. CARTE DE LA VILLE DE REPENTIGNY REPRESENTANT LA STEP DE L'ILE LEBEL DANS LE SECTEUR REPENTIGNY ET LES ETANGS AERES DANS LE SECTEUR DE LE GARDEUR. 116
FIGURE II-16. ZONE DE REJET DE LA STEP DE L'ILE LEBEL..... 117
FIGURE II-17. ZONE DE REJET DES ETANGS AERES DE LE GARDEUR. 118
FIGURE II-18. LOCALISATION DES POINTS ECHANTILLONNES SUR LE SAINT LAURENT (PHOTO : GOOGLE EARTH)..... 120
FIGURE II-19. SCHEMA D'UN POCIS 124
FIGURE II-20. PROFIL D'ACCUMULATION D'UN COMPOSE DANS UN POCIS AU COURS DU TEMPS (ADAPTE DE VRANA ET *AL*., 2005)..... 125
FIGURE II-21. SCHEMA DU SYSTEME EXPERIMENTAL EN FLUX CONTINU UTILISE LORS DES CALIBRATIONS DES POCIS..... 128
FIGURE II-22. SCHEMA DU DISPOSITIF UTILISE DANS LA CALIBRATION 1..... 129
FIGURE II-23. SCHEMA DU DISPOSITIF UTILISE DANS LA CALIBRATION 2..... 130
FIGURE II-24. JEUX DE POCIS EXPOSES SUR LE SITE DE CADAUJAC POUR LA VALIDATION *IN SITU*..... 131
FIGURE II-25. CARTOUCHE SPE EN VERRE CONTENANT DEUX FRITTES ET DE LA PHASE OASIS HLB. 132
FIGURE II-26. PHOTO DU DISPOSITIF NECESSAIRE POUR L'EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE (CUVE SOUS VIDE + CARTOUCHES SPE)..... 135
FIGURE II-27. PHOTO DE L'UPLC-MS/MS UTILISE LORS DE CES TRAVAUX DE THESE..... 138
FIGURE II-28. PHOTOGRAPHIE D'*ELLIPTIO COMPLANATA*. 145
FIGURE II-29. AIRE DE REPARTITION D'*ELLIPTIO COMPLANATA*..... 146
FIGURE II-30. SCHEMA DE L'ANATOMIE D'*ELLIPTIO COMPLANATA*. 147
FIGURE II-31. SCHEMA DU CYCLE DE VIE D'*ELLIPTIO COMPLANATA*..... 148

FIGURE II-32. LES DIFFERENTES ETAPES DE LA PHAGOCYTOSE (ADAPTEE DE PAUL-PONT, 2010). 150
FIGURE II-33. PHOTO DU CYTOMETRE DE FLUX (FACSCALIBUR) UTILISE LORS DE CES TRAVAUX DE THESE. 152
FIGURE II-34. PHOTOGRAPHIE DE *CORBICULA FLUMINEA* (SOURCE : DORIS.FFESSM.FR). 156
FIGURE II-35. AIRE DE REPARTITION DE *CORBICULA FLUMINEA* EN EUROPE (SOURCE : WWW.EUROPE-ALIENS.ORG). 157
FIGURE II-36. SCHEMA DES PRINCIPAUX ORGANES DE *CORBICULA FLUMINEA* (SOURCE : ARINI, 2011) 157
FIGURE II-37. STRUCTURE DE METALLOTHIONEINES (DANS LE CAS DE LA MOLECULE REPRESENTEE LES GROUPEMENTS THIOLS DES CYSTEINES SONT SATURES PAR DES ATOMES DE CADMIUM). 161
FIGURE III-1. REPARTITION DES MOLECULES PAR GAMME D'ECART-TYPE RELATIF REPRESENTANT LA REPRODUCTIBILITE. 168
FIGURE III-2. RENDEMENTS (%) DES 47 PSYCHOTROPES OBTENUS POUR L'ENSEMBLE DES ANALYSES DE CES TRAVAUX DE THESE AVEC UNE QUANTIFICATION PAR ETALONNAGE INTERNE (*N=62*). 176
FIGURE III-3. COMPARAISON DE LA QUANTIFICATION PAR GAMME EXTERNE ET PAR DILUTION ISOTOPIQUE POUR LES 47 PSYCHOTROPES ETUDIES. 177
FIGURE III-4. DIAGRAMME REPRESENTANT LES DONNEES DE VOLUME DE FUITE POUR LA CARBAMAZEPINE. 182
FIGURE III-5. DIAGRAMME REPRESENTANT LES DONNEES DE VOLUME DE FUITE POUR LE MEPROBAMATE. 182
FIGURE III-6. DIAGRAMME REPRESENTANT LES DONNEES DE VOLUME DE FUITE POUR LE LEVETIRACETAM. 182
FIGURE III-7. NOMBRE DE MOLECULES QUANTIFIEES PAR SITES ET PAR CAMPAGNE DE PRELEVEMENTS. 186
FIGURE III-8. CONCENTRATIONS DE LA GABAPENTINE QUANTIFIEES DANS LA STEP CANTINOLLE ET LA JALLE DE BLANQUEFORT EN DECEMBRE 2011 ET JUILLET 2012. 189
FIGURE III-9. CONCENTRATIONS DU MEPROBAMATE QUANTIFIEES DANS LA STEP CANTINOLLE ET LA JALLE DE BLANQUEFORT EN DECEMBRE 2011 ET JUILLET 2012. 190
FIGURE III-10. RENDEMENTS (%) DES 43 PSYCHOTROPES OBTENUS POUR L'ENSEMBLE DES ANALYSES DE CES TRAVAUX DE THESE AVEC UNE QUANTIFICATION PAR ETALONNAGE INTERNE (*N=24*). 196
FIGURE III-11. EXEMPLE DES 4 PROFILS (1 : LINEAIRE ; 2 : *BRUST EFFECT* ; 3 : *LAG EFFECT* ET 4 : ALEATOIRE) D'ACCUMULATION DANS LES POCIS OBSERVE LORS DANS LA CALIBRATION LABORATOIRE 1. 199
FIGURE III-12. DISSIPATION DES 3 PRC AU COURS DU TEMPS LORS DES 3 CALIBRATIONS. 203
FIGURE III-13. CONCENTRATIONS DANS L'EAU DU SULPIRIDE, LA VENLAFAXINE ET DE L'OXAZEPAM MESUREES PAR ECHANTILLONNAGE PONCTUEL ET ESTIMEES DANS LE POCIS (*N=3*) SUR LES 3 SITES D'ETUDE DE LA JALLE DE BLANQUEFORT. 207
FIGURE IV-1. QUANTITE DE GABAPENTINE ET LEVETIRACETAM EN MG/AN/HAB DANS LES DONNEES DE CONSOMMATION MEDIC'AM, APRES CORRECTION PAR LE TAUX D'EXCRETION SOUS FORME INCHANGEE ET DANS LES FLUX D'ENTREE DE LOUIS FARGUE ET DE CLOS DE HILDE CORRIGES PAR LE FACTEUR DE CORRECTION. 223
FIGURE IV-2. QUANTITE D'OXAZEPAM EN MG/AN/HAB DANS LES DONNEES DE CONSOMMATION MEDIC'AM, APRES CORRECTION PAR LE TAUX D'EXCRETION SOUS FORME INCHANGEE ET DANS LES FLUX D'ENTREE DE LOUIS FARGUE ET DE CLOS DE HILDE. 224
FIGURE IV-3. QUANTITE DE CITALOPRAM, FLUOXETINE, HYDROXYZINE ET ZOLPIDEM EN MG/AN/HAB DANS LES DONNEES DE CONSOMMATION MEDIC'AM, APRES CORRECTION PAR LE TAUX D'EXCRETION SOUS FORME INCHANGEE ET DANS LES STEP DE LOUIS FARGUE ET DE CLOS DE HILDE. 224
FIGURE IV-4. RAPPORT DE CONCENTRATIONS MOYEN ENTRE LFED ET LFET POUR LES PSYCHOTROPES QUANTIFIES. 229
FIGURE IV-5. RAPPORTS DE CONCENTRATIONS MOYENS ENTRE CHET2 ET CHET1 POUR LES PSYCHOTROPES QUANTIFIES. 233
FIGURE IV-6. RAPPORT DE CONCENTRATIONS MOYEN ENTRE CHET2 ET LFET, POUR LES 30 PSYCHOTROPES RETROUVES. 233
FIGURE IV-7. MOYENNE DES ECART-TYPES RELATIFS CALCULEE SUR LES 3 JOURS CONSECUTIFS DE PRELEVEMENTS DANS LES EFFLUENTS D'ENTREES ET DE SORTIE DE CLOS DE HILDE. 235
FIGURE IV-8. MOYENNE DES ECART-TYPES RELATIFS CALCULEE SUR LES 3 JOURS CONSECUTIFS DE PRELEVEMENTS DANS LES EFFLUENTS D'ENTREES ET DE SORTIE DE LOUIS FARGUE. 236
FIGURE IV-9. CONCENTRATIONS MOYENNES QUANTIFIEES DANS LES EFFLUENTS D'ENTREE DE CDH ET LF POUR LA CARBAMAZEPINE, LA GABAPENTINE, L'OXAZEPAM ET LE LEVETIRACETAM. 239
FIGURE IV-10. CONCENTRATIONS MOYENNES QUANTIFIEES DANS LES EFFLUENTS DE SORTIE DE CDH ET LF POUR LA CARBAMAZEPINE, LA GABAPENTINE, L'OXAZEPAM ET LE LEVETIRACETAM. 240

FIGURE IV-11. DEBITS DES EFFLUENTS D'ENTREE ET DE SORTIE DES STEP LOUIS FARGUE ET CLOS DE HILDE EN 2011 ET 2012. 241
FIGURE IV-12. FLUX MOYENS QUANTIFIES DANS LES EFFLUENTS D'ENTREE DE CDH ET LF POUR LA CARBAMAZEPINE, LA GABAPENTINE, L'OXAZEPAM ET LE LEVETIRACETAM. 243
FIGURE IV-13. FLUX MOYENS QUANTIFIES DANS LES EFFLUENTS DE SORTIE DE CDH ET LF POUR LA CARBAMAZEPINE, LA GABAPENTINE, L'OXAZEPAM ET LE LEVETIRACETAM. 244
FIGURE IV-14. EVOLUTION DE LA CONCENTRATION MOYENNE EN MEPROBAMATE DANS LES EFFLUENTS D'ENTREE ET DE SORTIE DE CDH ET LF POUR LES ANNEES 2011 ET 2012. 245
FIGURE IV-15. NOMBRE DE MOLECULES PAR CLASSE DE RENDEMENT D'ELIMINATION POUR LOUIS FARGUE ET CLOS DE HILDE. 249
FIGURE IV-16. NOMBRE DE MOLECULES QUANTIFIEES DANS L'ENSEMBLE DES ECHANTILLONS PRELEVES SUR LES 6 SITES D'ETUDE, CLASSES PAR GAMME DE TAUX DE DETECTION. 253
FIGURE IV-17. CONCENTRATIONS MESUREES DANS LES 6 SITES DE PRELEVEMENTS POUR LA GABAPENTINE, L'OXAZEPAM, LA CARBAMAZEPINE, L'AMISULPRIDE, LE TIAPRIDE ET LA SULPIRIDE. 255
FIGURE IV-18. LOCALISATION DU POINT DE PRELEVEMENT SAINT MACAIRE, DES DEUX CENTRES HOSPITALIER SPECIALISES DE CADILLAC ET DE LA STEP LANGON TOULENNE. 256
FIGURE IV-19. CONCENTRATIONS DE LA GABAPENTINE, L'OXAZEPAM ET LA CARBAMAZEPINE MESUREES DANS LES 6 SITES DE PRELEVEMENT DE L'ESTUAIRE, DE NOVEMBRE 2011 A FEVRIER 2013. LES MESURES EN-DESSOUS DE LA LIMITE DE QUANTIFICATION ONT ETE ENLEVEES. 257
FIGURE IV-20. CONCENTRATIONS DE L'AMISULPRIDE, LE TIAPRIDE ET LA SULPIRIDE MESUREES DANS LES 6 SITES DE PRELEVEMENT DE L'ESTUAIRE, DE NOVEMBRE 2011 A FEVRIER 2013. LES MESURES EN-DESSOUS DE LA LIMITE DE QUANTIFICATION ONT ETE ENLEVEES. 258
FIGURE IV-21. CONCENTRATIONS DU MEPROBAMATE MESUREES DANS LES 6 SITES DE PRELEVEMENT DE L'ESTUAIRE, DE NOVEMBRE 2011 A FEVRIER 2013. LES MESURES EN-DESSOUS DE LA LIMITE DE QUANTIFICATION ONT ETE ENLEVEES. 259
FIGURE IV-22. NOMBRE DE MOLECULES QUANTIFIEES DANS L'ENSEMBLE DES ECHANTILLONS PASSIFS PRELEVES SUR LES 6 SITES D'ETUDE, CLASSES PAR GAMME DE TAUX DE DETECTION. 262
FIGURE IV-23. NOMBRE DE MOLECULES QUANTIFIEES DANS L'ENSEMBLE DES ECHANTILLONS PONCTUELS ET PASSIFS PRELEVES SUR LES 6 SITES D'ETUDE, CLASSES PAR GAMME DE TAUX DE DETECTION. 263
FIGURE IV-24. CONCENTRATIONS MOYENNES EN NG.L^{-1} ET RAPPORTS DES CONCENTRATIONS DES COMPOSES QUANTIFIES DANS LES ECHANTILLONS PONCTUELS ET LES ECHANTILLONNEURS PASSIFS. 264
FIGURE IV-25. CONCENTRATIONS MOYENNES EN NG.L^{-1} ET RAPPORT DES CONCENTRATIONS DE LA CARBAMAZEPINE ET DE L'OXAZEPAM QUANTIFIES DANS LES ECHANTILLONS PONCTUELS ET LES ECHANTILLONNEURS PASSIFS PRELEVES DANS LES 6 SITES DE L'ESTUAIRE DE LA GIRONDE. 265
FIGURE IV-26. CONCENTRATIONS (NG.L^{-1}) EN OXAZEPAM ET CARBAMAZEPINE MESUREES A BORDEAUX DANS LES ECHANTILLONS PONCTUELS ET DANS LES POCIS LORS DES 16 PRELEVEMENTS. 266
FIGURE IV-27. VARIATIONS DES CONSTANTES D'ELIMINATION DES 3 PRC AU COURS DU SUIVI DANS LA GARONNE AU SITE DE BORDEAUX. 267
FIGURE IV-28. VARIATIONS DU POURCENTAGE DE PRC RESTANT DANS LES POCIS APRES EXPOSITION AU SITE DE BORDEAUX. 267
FIGURE IV-29. CONCENTRATIONS EN VENLAFAXINE MESUREES A BORDEAUX DANS LES ECHANTILLONS PONCTUELS ET DANS LES POCIS LORS DU SUIVI DANS LA GARONNE. 269
FIGURE IV-30. CONCENTRATIONS QUANTIFIEES PAR ECHANTILLONNAGE PASSIF DU CLORAZEPATE, CITALOPRAM, NORDIAZEPAM ET CYAMEMAZINE DANS LES 6 SITES DE PRELEVEMENT DU SUIVI SUR L'ESTUAIRE DE LA GIRONDE. 269
FIGURE IV-31. REPARTITION DES APPORTS EN PSYCHOTROPES DANS LA GIRONDE. 274
FIGURE IV-32. RAPPORTS DE CONCENTRATIONS MOYENS ENTRE LE GARDEUR ET CHARLEMAGNE POUR LES PSYCHOTROPES TROUVES. 284
FIGURE IV-33. CLASSEMENT DES PSYCHOTROPES QUANTIFIES DANS LES EFFLUENTS D'ENTREE DE LE GARDEUR ET ILE LEBEL PAR GAMME DE CONCENTRATIONS. 287
FIGURE IV-34. RAPPORTS DE CONCENTRATION MOYENS ENTRE ILE LEBEL ET JEAN MARCOTTE POUR LES PSYCHOTROPES QUANTIFIES. 290

FIGURE IV-35. CLASSEMENT DES PSYCHOTROPES RETROUVES DANS LES EFFLUENTS DE SORTIE DE LE GARDEUR ET ILE LEBEL PAR GAMME DE CONCENTRATIONS..... 295
FIGURE IV-36. RAPPORTS DES CONCENTRATIONS MOYENS ENTRE LES EFFLUENTS DE SORTIE D'ILE LEBEL ET LE GARDEUR. 295
FIGURE IV-37. CLASSEMENT DES PSYCHOTROPES TROUVES DANS L'EFFLUENT DE SORTIE JEAN MARCOTTE PAR GAMME DE CONCENTRATIONS..... 298
FIGURE IV-38. RAPPORTS DES CONCENTRATIONS MOYENS ENTRE LES EFFLUENTS DE SORTIE D'ILE LEBEL ET JEAN MARCOTTE..... 298
FIGURE IV-39. NOMBRE DE MOLECULES PAR CLASSE DE RENDEMENT D'EPURATION POUR LES 3 STATIONS QUEBECOISES ETUDIEES. 301
FIGURE IV-40. NOMBRE DE MOLECULES AVEC UN RENDEMENT EPURATOIRE FAIBLE ET INFERIEUR A 0% POUR LES 3 STATIONS QUEBECOISES ETUDIEES. 302
FIGURE IV-41. LOCALISATION DES 10 SITES ECHANTILLONS SUR LE FLEUVE SAINT LAURENT, LA RIVIERE DES PRAIRIES ET LA RIVIERE L'ASSOMPTION. 305
FIGURE IV-42. NOMBRE DE MOLECULES QUANTIFIEES DANS L'ENSEMBLE DES ECHANTILLONS PRELEVES DANS LES 10 SITES D'ETUDE, CLASSES PAR GAMME DE CONCENTRATIONS (EN NG.L^{-1})..... 306
FIGURE IV-43. CONCENTRATIONS MOYENNES (NG.L^{-1}) EN GABAPENTINE, OXAZEPAM ET CARBAMAZEPINE DETECTEES DANS LES 10 SITES D'ETUDE. 306
FIGURE IV-44. NOMBRE DE MOLECULES MESUREES DANS LES POCIS PRELEVES AU SITE 4 ET 5, CLASSE PAR GAMME DE CONCENTRATION. 309
FIGURE IV-45. NOMBRE DE PSYCHOTROPES PRESENTS DANS LES ECHANTILLONS PONCTUELS ET LES ECHANTILLONS PASSIFS POUR LES SITES 5 ET 4..... 309
FIGURE IV-46. CONCENTRATIONS MOYENNES MESUREES DANS LES POCIS ET LES ECHANTILLONS D'EAU AUX SITES 5 ET 4..... 310
FIGURE IV-47. REPARTITION DES APPORTS EN PSYCHOTROPES DE LA RIVIERE DES PRAIRIES DANS LE FLEUVE SAINT LAURENT. LES CHIFFRES CORRESPONDENT AUX FLUX EN PSYCHOTROPES CALCULES (EN G.J^{-1}) DANS LA RIVIERE DES PRAIRIES ET DANS LE FLEUVE SAINT LAURENT. 314
FIGURE V-1. PRESENTATION DES 10 CONDITIONS TESTEES LORS DE L'EXPOSITION *IN VIVO* AVEC DES PSYCHOTROPES INDIVIDUELS ET EN MELANGE..... 343
FIGURE V-2. GAMETES MALES ET FEMELLES DE MOULE D'EAU DOUCE *ELLIPTIO COMPLANATA* OBSERVEES AU MICROSCOPE..... 345
FIGURE V-3. PRESENTATION DES 9 CONDITIONS TESTEES LORS DE L'EXPOSITION *IN VIVO* AVEC LES AFFLUENTS, EFFLUENTS ET EFFLUENTS OZONES DES DEUX STEP DE REPENTIGNY. 363
FIGURE V-4. CONCENTRATIONS DE LA CARBAMAZEPINE, DU LORAZEPAM, DE LA GABAPENTINE ET DU LEVETIRACETAM DANS LES 8 CONDITIONS D'EXPOSITION DE L'ETUDE. 365
FIGURE V-5. PRESENTATION DES 5 CONDITIONS TESTEES LORS DE L'EXPOSITION *IN VIVO* AVEC LA CONCENTRATION DES PSYCHOTROPES TESTES INDIVIDUELLEMENT ET EN MELANGE AVEC DES PESTICIDES ET D'AUTRES MEDICAMENTS. 380

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I-1. FREQUENCE DE DETECTION PAR TYPE DE COMPOSES (SOURCE : KOLPIN ET *AL.*, 2002). 7
TABLEAU I-2. DEPENSE EN MEDICAMENTS ET EN SANTE PAR HABITANT (EN USD) DE CERTAIN PAYS DE L'OCDE ET LA PROPORTION DE LA DEPENSE EN MEDICAMENTS PAR RAPPORT A CELLE DE LA SANTE (SOURCE : OCDE, 2013). 20
TABLEAU I-3. DISTRIBUTION DES VENTES DE PRODUITS MEDICAMENTEUX BREVETES (EN POURCENTAGE) SELON LE GROUPE THERAPEUTIQUE, DANS PLUSIEURS PAYS, EN 2012 (SOURCE : CEPMB, 2013). 22
TABLEAU I-4. 23 BENZODIAZEPINES (OU APPARENTEES) COMMERCIALISES EN FRANCE, EN 2013. 27
TABLEAU I-5. COMPARAISON DE L'EFFICACITE D'ELIMINATION DES COMPOSES PHARMACEUTIQUES DANS DIFFERENTES STATIONS D'EPURATION (ADAPTEE DE LUO ET *AL.*, 2014). 33
TABLEAU I-6. INTERVALLE DE CONCENTRATIONS DE 14 COMPOSES SELECTIONNES DANS 3 MATRICES AQUEUSES : ENTREE DE STEP, SORTIE DE STEP ET EAUX DE SURFACE. L'INTERVALLE DE CONCENTRATIONS EST REPRESENTE PAR LA VALEUR MINIMALE ET MAXIMALE TROUVEES DANS LA LITTERATURE (UTILISATION D'UNE ECHELLE LOGARITHME EN BASE 10, 0=0,1 NG/L). 41
TABLEAU I-7. ESTIMATION DU RISQUE POTENTIEL DE 4 COMPOSES PHARMACEUTIQUES DANS LE MILIEU AQUATIQUE EN FRANCE ET EN ALLEMAGNE (SOURCE : FERRARI ET *AL.*, 2004). 47
TABLEAU I-8. EVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL ESTIME ET REEL POUR L'IBUPROFENE, LE PARACETAMOL, LE DICLOFENAC ET LA CARBAMAZEPINE (SOURCE : BOUISSON-SCHURTZ ET *AL.*, 2014) 48
TABLEAU I-9. BIOMARQUEURS UTILISES EN ECOTOXICOLOGIE DANS LES ETUDES DE LABORATOIRE ET DE TERRAIN, INDICATEURS D'EXPOSITION A DES CLASSES SPECIFIQUE ET NON-SPECIFIQUE DE POLLUANTS OU INDICATEUR D'EFFET DE SUBSTANCES TOXIQUES (SOURCE : GARRIC ET *AL.*, 2010). 49
TABLEAU I-10. EFFETS DE QUELQUES PSYCHOTROPES EXPOSES INDIVIDUELLEMENT ET EN MELANGE SUR DIFFERENTS ORGANISMES ET DIFFERENTS BIOMARQUEURS 51
TABLEAU I-11. QUELQUES CARACTERISTIQUES DE LA FRANCE ET DU QUEBEC. 52
TABLEAU I-12. DEBITS MESURES SUR LA GARONNE ET SUR LA DORDOGNE DE 2011 A 2013 (SOURCE : DREAL MIDI-PYRENEES / HYDRO-MEDD/DE OU HYDRO-EAU FRANCE.FR). 58
TABLEAU I-13. PARTICULARITE DES 4 ZONES DU SAINT LAURENT (ADAPTEE DE CENTRE SAINT-LAURENT, 1996) 66
TABLEAU I-14. CONCENTRATIONS ET TENDANCES TEMPORELLES DES SUBSTANCES PRIORITAIRES SUIVIES A L'ILE WOLF, A CARILLON ET A QUEBEC (SOURCE : RONDEAU, 2005). 74
TABLEAU II-1. SELECTION DES COMPOSES PSYCHOTROPES POUR LES TRAVAUX DE THESE. 83
TABLEAU II-2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET STRUCTURE DES 47 PSYCHOTROPES SELECTIONNES. 85
TABLEAU II-3. DONNEES D'OCCURRENCE DES 47 PSYCHOTROPES ETUDIES. 93
TABLEAU II-4. QUELQUES CARACTERISTIQUES DES 6 STEP DE BORDEAUX METROPOLE. 97
TABLEAU II-5. MOYENNE ANNUELLE DES PARAMETRES CLASSIQUES MESURES EN 2011 ET 2012 DANS LA STEP CLOS DE HILDE (SOURCE : DONNEES D'AUTOSURVEILLANCE DE LA LYONNAISE DES EAUX). 99
TABLEAU II-6. MOYENNE ANNUELLE DES PARAMETRES CLASSIQUES MESURES EN 2011 ET 2012 DANS LA STEP LOUIS FARGUE (SOURCE : DONNEES D'AUTOSURVEILLANCE DE LA LYONNAISE DES EAUX). 102
TABLEAU II-7. LISTE DES POINTS DE PRELEVEMENTS DES STEP ETUDIEES. 104
TABLEAU II-8. NOMBRE D'ECHANTILLONS MOYENNES 24H PRELEVES AU COURS DU SUIVI DES DEUX STEP DE BORDEAUX METROPOLE. 105
TABLEAU II-9. NOMS, DESCRIPTIONS ET COORDONNEES GPS DES POINTS ECHANTILLONNES SUR L'ESTUAIRE DE LA GIRONDE. 108
TABLEAU II-10. DEBITS MESURES SUR LA JALLE DE BLANQUEFORT DE 2011 A 2012 (SOURCE : LYONNAISE DES EAUX). 109
TABLEAU II-11. MOYENNE ANNUELLE DES PARAMETRES CLASSIQUES MESURES EN 2012 DANS LA STEP CANTINOLLE 110
TABLEAU II-12. COORDONNEES GPS DES SITES ECHANTILLONNES SUR LA JALLE DE BLANQUEFORT. 112
TABLEAU II-13. MOYENNE ANNUELLE DES PARAMETRES CLASSIQUES MESURES EN 2012 DANS LA STEP JEAN MARCOTTE 115
TABLEAU II-14. MOYENNE ANNUELLE DES PARAMETRES CLASSIQUES MESURES EN 2012 DANS LA STEP ILE LEBEL 117

TABLEAU II-15. MOYENNE ANNUELLE DES PARAMETRES CLASSIQUES MESURES EN 2012 DANS LES ETANGS AERES DE LE GARDEUR (SOURCE : MAMROT, 2013). 119
TABLEAU II-16. LISTE DES POINTS DE PRELEVEMENTS DES TROIS STEP ETUDIEES. 119
TABLEAU II-17. DESCRIPTIFS ET COORDONNEES GPS DES POINTS ECHANTILLONNES SUR LE SAINT LAURENT. 121
TABLEAU II-18. EXEMPLES D'ECHANTILLONNEURS PASSIFS EXISTANTS (SOURCE : VRANA ET AL., 2005 ; SEETHAPATHY, 2008). 123
TABLEAU II-19. TEMPS DE PRELEVEMENTS D'EAU ET DE POCIS LORS DE LA CALIBRATION 1. 130
TABLEAU II-20. SOLVANTS ET PRODUITS CHIMIQUES UTILISES LORS DES ANALYSES DE CETTE ETUDE. 133
TABLEAU II-21. PARAMETRES CHROMATOGRAPHIQUES ET DE SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ANALYSE DES PSYCHOTROPES SUR L'UPLC-MS/MS. 138
TABLEAU II-22. TRANSITIONS ET PARAMETRES ASSOCIES POUR L'ANALYSE DES PSYCHOTROPES SUR L'UPLC-MS/MS. 140
TABLEAU II-23. COMPOSES ETUDIES ET ETALONS INTERNES ASSOCIES. 143
TABLEAU II-24. GENES ETUDIES ET AMORCES CORRESPONDANTES (SOURCE : RENAULT ET AL., 2008). 160
TABLEAU III-1. BILAN DES COEFFICIENTS DE CORRELATION (R2) DES PSYCHOTROPES ETUDIES. 167
TABLEAU III-2. ECART-TYPE RELATIF (RSD EN %) POUR CHAQUE COMPOSE REPRESENTANT LES VARIATIONS INTRA-JOURS (N=5) ET INTER-JOURS (N=20). 169
TABLEAU III-3. LIMITES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATIONS INSTRUMENTALES OBTENUES POUR LES PSYCHOTROPES ETUDIES (EN PICOGRAMMES INJECTES). 171
TABLEAU III-4. RENDEMENTS D'EXTRACTION DES 47 PSYCHOTROPES ETUDIES. 173
TABLEAU III-5. RENDEMENTS DE QUANTIFICATION DES 47 PSYCHOTROPES ETUDIES. 175
TABLEAU III-6. FACTEURS DE CORRECTION, CONCENTRATIONS QUANTIFIEES EN STEP (ENTREE ET SORTIE) OBTENUES DANS CES TRAVAUX DE THESE, DANS LA LITTERATURE ET CONCENTRATIONS CORRIGEES. 178
TABLEAU III-7. CONCENTRATION EN NG.L-1 DE LA GABAPENTINE MESUREE DANS UN EFFLUENT D'ENTREE DE STEP QUANTIFIE A PARTIR DE LA CARBAMAZEPINE D10, D'UN FACTEUR DE CORRECTION MOYEN ET DE LA GABAPENTINE D4. 179
TABLEAU III-8. REPARTITION DES 47 PSYCHOTROPES SELON LEUR VOLUME DE FUITE. 181
TABLEAU III-9. LIMITES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION METHODOLOGIQUES POUR LES 47 PSYCHOTROPES SELECTIONNES. 184
TABLEAU III-10. CONCENTRATIONS MAXIMALES ET MINIMALES RETROUVEES DANS LA JALLE DE BLANQUEFORT ET DANS LA STEP DE CANTINOLLE POUR LES 22 COMPOSES PEU OU PAS ETUDIES DANS LA LITTERATURE. 187
TABLEAU III-11. CONCENTRATIONS DES COMPOSES QUANTIFIES LORS DES 2 CAMPAGNES DE PRELEVEMENTS DANS LA JALLE DE BLANQUEFORT. 188
TABLEAU III-12. LISTE DES PSYCHOTROPES CALIBRES AVEC LES POCIS ET LEUR LOG KOW. 193
TABLEAU III-13. RENDEMENTS DE QUANTIFICATION ET LIMITES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DES COMPOSES ETUDIES. 195
TABLEAU III-14. LIMITES DE QUANTIFICATION POCIS, TAUX D'ECHANTILLONNAGE (RS), LIMITES DE QUANTIFICATION EXTRAPOLEE ET LIMITES DE QUANTIFICATION EAU POUR LES PSYCHOTROPES ETUDIES. 198
TABLEAU III-15. REGIME D'ACCUMULATION ET PARAMETRES CINETIQUES DES COMPOSES ETUDIES DANS LE POCIS. 201
TABLEAU III-16. TAUX D'ECHANTILLONNAGE OBTENUS EN LABORATOIRE, SUR LE TERRAIN ET DANS LA LITTERATURE POUR LES PSYCHOTROPES ETUDIES. 202
TABLEAU III-17. CONSTANTES D'ELIMINATION (KE) DES 3 PRC ETUDIES LORS DES 3 CALIBRATIONS. 203
TABLEAU III-18. CONSTANTES D'ELIMINATION COMPILEE DES CALIBRATIONS LABORATOIRE ET IN SITU. 204
TABLEAU III-19. CONCENTRATIONS DE QUELQUES PSYCHOTROPES DETECTEES DANS L'EAU A CADAUJAC, MESUREES A PARTIR DE L'ECHANTILLONNAGE PONCTUEL ET ESTIMEES A PARTIR DES POCIS AVEC LES RS LABO ET RS CORRIGE. 205
TABLEAU III-20. CONSTANTES D'ELIMINATION DES 3 PRC ET COMPILEE OBTENUES SUR LES 3 SITES D'ETUDE DE LA JALLE DE BLANQUEFORT. 205
TABLEAU III-21. NOMBRE DE MOLECULES DETECTEES ET QUANTIFIEES DANS LA JALLE DE BLANQUEFORT SELON L'ECHANTILLONNAGE UTILISE. 206
TABLEAU III-22. RECAPITULATIF DES CONCENTRATIONS EN PSYCHOTROPES RETROUVES DANS LES ECHANTILLONS PONCTUELS ET PASSIFS PRELEVES DANS LES 3 SITES SUR LA JALLE DE BLANQUEFORT. 208

TABLEAU IV-1. FREQUENCES DE QUANTIFICATION ET CONCENTRATIONS DES PSYCHOTROPES QUANTIFIES DANS LES EFFLUENTS D'ENTREE DE 2 STEP DE L'AGGLOMERATION BORDELAISE (LFE ET CHE). 216
TABLEAU IV-2. CLASSEMENT DES PSYCHOTROPES QUANTIFIES DANS LES ECHANTILLONS LFE ET CHE PAR GAMME DE CONCENTRATIONS. 217
TABLEAU IV-3. FLUX D'ENTREE MOYEN DES STEP LOUIS FARGUE ET CLOS DE HILDE POUR 2011-2012. 219
TABLEAU IV-4. APPORT MOYEN ANNUEL EN PSYCHOTROPES D'UN HABITANT CONNECTE A LOUIS FARGUE OU CLOS DE HILDE ET CONSOMMATION MOYENNE ANNUELLE EN PSYCHOTROPES D'UN HABITANT EN FRANCE, POUR 2012. 221
TABLEAU IV-5. TAUX D'EXCRETION SOUS FORME INCHANGEE, EXCRETION SOUS FORME CONJUGUEE ET NOMS DES METABOLITES POUR LES 30 COMPOSES QUI ONT ETE TROUVES A LOUIS FARGUE ET CLOS DE HILDE. 222
TABLEAU IV-6. FREQUENCES DE QUANTIFICATION ET CONCENTRATIONS DES PSYCHOTROPES QUANTIFIES DANS LES EFFLUENTS DE SORTIE DE LA STEP LOUIS FARGUE (LFED ET LFET). 227
TABLEAU IV-7. CLASSEMENT DES PSYCHOTROPES QUANTIFIES DANS LES ECHANTILLONS LFED ET LFET PAR GAMME DE CONCENTRATIONS. 228
TABLEAU IV-8. FREQUENCES DE QUANTIFICATION ET CONCENTRATIONS DES PSYCHOTROPES QUANTIFIES DANS LES EFFLUENTS DE SORTIE DE LA STEP CLOS DE HILDE (CHET1 ET CHET2). 231
TABLEAU IV-9. CLASSEMENT DES PSYCHOTROPES QUANTIFIES DANS LES ECHANTILLONS CHET1 ET CHET2 PAR GAMME DE CONCENTRATIONS 232
TABLEAU IV-10. FLUX DE SORTIE MOYEN DES STEP LOUIS ET FARGUE ET CLOS DE HILDE POUR 2011-2012. 234
TABLEAU IV-11. CONSOMMATION, CONSOMMATION CORRIGEE ET APPORTS DES DEUX STEP POUR LE MEPROBAMATE. 246
TABLEAU IV-12. RENDEMENTS D'EPURATION MOYENS POUR CHAQUE MOLECULES QUI ONT ETE QUANTIFIEES A LOUIS FARGUE ET CLOS DE HILDE. LES RENDEMENTS INFERIEURS A 30% SONT REPRESENTES EN ROUGE, LES RENDEMENTS COMPRIS ENTRE 30% ET 70 % SONT EN ORANGE ET CEUX COMPRIS ENTRE 70% ET 100% SONT EN VERT. 248
TABLEAU IV-13. FREQUENCES DE QUANTIFICATION ET CONCENTRATIONS DES PSYCHOTROPES TROUVES DANS LES 86 ECHANTILLONS D'EAU DE LA GARONNE. 251
TABLEAU IV-14. DEBITS, STEP MAJORITAIRES SUR LA GARONNE ET LA JALLE DE BLANQUEFORT. LES CONCENTRATIONS DE LA GABAPENTINE ET LA CARBAMAZEPINE MESUREES DANS CES 2 HYDROSYSTEMES. 252
TABLEAU IV-15. FREQUENCES DE QUANTIFICATION ET CONCENTRATIONS EN NG/G DE PHASE DES PSYCHOTROPES TROUVES SUR L'ENSEMBLE DES POCIS POSES DANS LES SITES DE LA GARONNE. 260
TABLEAU IV-16. RS, RS CORRIGE ET CONCENTRATION MOYENNE EN NG.L-1 OBTENUS PAR LES POCIS PLACES DANS LA GARONNE. 261
TABLEAU IV-17. BILAN DES FLUX EN PSYCHOTROPES DEVERSES EN GARONNE PAR LES STEP CLOS DE HILDE ET LOUIS FARGUE 270
TABLEAU IV-18. FLUX MOYENS EN PSYCHOTROPES MESURES DANS LA GARONNE EN G.J-1 ET RAPPORT ENTRE LES FLUX CALCULES ET LES FLUX ESTIMES DANS LA GARONNE. 271
TABLEAU IV-19. FLUX MOYENS EN PSYCHOTROPES MESURES DANS L'AMONT DE LA GARONNE ET DE LA DORDOGNE ET DANS 2 AFFLUENTS L'ISLE ET LA JALLE DE BLANQUEFORT(EN G.J-1). 272
TABLEAU IV-20. EVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL A PARTIR DES DONNEES DE MEC DANS LA GIRONDE ET DE PNEC DE LA LITTERATURE 276
TABLEAU IV-21. FREQUENCES DE QUANTIFICATION ET CONCENTRATIONS DES PSYCHOTROPES QUANTIFIES DANS LES EFFLUENTS DES DEUX ENTREES DES ETANGS AERES DE LE GARDEUR (LE GARDEUR ET CHARLEMAGNE). 282
TABLEAU IV-22. FLUX D'ENTREE MOYENS DE LE GARDEUR ET CHARLEMAGNE. 285
TABLEAU IV-23. FREQUENCES DE QUANTIFICATION ET CONCENTRATIONS DES PSYCHOTROPES QUANTIFIES DANS LES EFFLUENTS D'ENTREE DES DEUX STEP DE REPENTIGNY, LE GARDEUR ET D'ILE LEBEL. 286
TABLEAU IV-24. FLUX D'ENTREE MOYENS DE LE GARDEUR ET ILE LEBEL. 288
TABLEAU IV-25. FREQUENCES DE QUANTIFICATION ET CONCENTRATIONS DES PSYCHOTROPES QUANTIFIES DANS LES EFFLUENTS D'ENTREE DE LA STEP JEAN MARCOTTE DE MONTREAL. 289
TABLEAU IV-26. FLUX D'ENTREE MOYENS DE JEAN MARCOTTE ET RAPPORTS DE CONCENTRATIONS MOYENS ENTRE LES STEP JEAN MARCOTTE ET ILE LEBEL. 291
TABLEAU IV-27. APPORTS MOYENS EN PSYCHOTROPE D'UN HABITANT CONNECTE A LE GARDEUR OU ILE LEBEL OU JEAN MARCOTTE. 292

TABLEAU IV-28. FREQUENCES DE QUANTIFICATION ET CONCENTRATIONS DES PSYCHOTROPES QUANTIFIES DANS LES EFFLUENTS DE SORTIE DE LE GARDEUR ET ILE LEBEL. 294
TABLEAU IV-29. FLUX DE SORTIE MOYENS D'ILE LEBEL ET LE GARDEUR. 296
TABLEAU IV-30. FREQUENCES DE QUANTIFICATION ET CONCENTRATIONS DES PSYCHOTROPES QUANTIFIES DANS LES EFFLUENTS DE SORTIE DE JEAN MARCOTTE. 297
TABLEAU IV-31. FLUX DE SORTIE MOYENS DES PSYCHOTROPES MESURES A JEAN MARCOTTE ET RAPPORT DE CONCENTRATION MOYEN ENTRE JEAN MARCOTTE ET ILE LEBEL. 299
TABLEAU IV-32. RENDEMENTS D'EPURATION MOYENS POUR CHAQUE PSYCHOTROPES TROUVES A LE GARDEUR, ILE LEBEL ET JEAN MARCOTTE. LES RENDEMENTS INFERIEURS A 30% SONT REPRESENTES EN ROUGE, LES RENDEMENTS COMPRIS ENTRE 30% ET 70 % SONT EN ORANGE ET CEUX COMPRIS ENTRE 70% ET 100% SONT EN VERT. 300
TABLEAU IV-33. FREQUENCES DE QUANTIFICATION ET CONCENTRATIONS DES PSYCHOTROPES TROUVES DANS LES 24 ECHANTILLONS D'EAU PRELEVES DANS LE SAINT LAURENT. 303
TABLEAU IV-34. CONCENTRATIONS MOYENNES EN NG/G DE PHASE, RS, RS CORRIGE ET CONCENTRATION MOYENNE EN NG.L-1 ESTIMEE A PARTIR DU POCIS. 308
TABLEAU IV-35. TAUX D'ECHANTILLONNAGE CORRIGE OBTENUS POUR LES POCIS EXPOSES SUR LE SUIVI ENTIER DE LA GARONNE, POUR LA PERIODE FEVRIER-MARS 2012 ET RS DES POCIS EXPOSES EN OCTOBRE-NOVEMBRE 2013 DANS LE SAINT LAURENT. 311
TABLEAU IV-36. BILAN DES FLUX EN PSYCHOTROPES DES ETANGS AERES DE LE GARDEUR DEVERSES DANS LA RIVIERE L'ASSOMPTION ET DES STEP ILE LEBEL ET JEAN MARCOTTE DEVERSES DANS LE FLEUVE SAINT LAURENT. 312
TABLEAU IV-37. FLUX MOYENS EN PSYCHOTROPES MESURES DANS LA RIVIERE L'ASSOMPTION ET DANS LE FLEUVE SAINT LAURENT ET RAPPORT ENTRE LES FLUX SORTANT DES STEP ET LES FLUX MESURES DANS LES DEUX MILIEUX. 313
TABLEAU IV-38. EVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL A PARTIR DES DONNEES DE MEC DANS LE FLEUVE SAINT LAURENT ET DE PNEC DE LA LITTERATURE. 315
TABLEAU IV-39. COMPARAISON ENTRE LA FRANCE ET LE QUEBEC AU NIVEAU DES PSYCHOTROPES DANS LES STATIONS DE TRAITEMENT DES EAUX USEES. 318
TABLEAU IV-40. COMPARAISON ENTRE LA FRANCE ET LE QUEBEC AU NIVEAU DES PSYCHOTROPES DANS LE MILIEU. 320
TABLEAU V-1. TOXICITE DES 9 COMPOSES ETUDIES (LORS DE L'EXPOSITION IN VITRO) SUR DES ALGUES ET DES INVERTEBRES 325
TABLEAU V-2. GAMME DE CONCENTRATION DES COMPOSES TESTES INDIVIDUELLEMENT ET EN MELANGE. 327
TABLEAU V-3. RECAPITULATIFS DES DIFFERENTS RESULTATS OBTENUS SUR LES 3 BIOMARQUEURS TESTES APRES EXPOSITION DES HEMOCYTES DE MOULE D'EAU DOUCE A 9 PSYCHOTROPES SEULS ET EN MELANGE. 328
TABLEAU V-4. CONCENTRATIONS EN NG.L-1 DES PSYCHOTROPES PLACES DANS LES DIFFERENTES CONDITIONS. 344
TABLEAU V-5. DETERMINATION DU NOMBRE DE MOULES D'EAU DOUCE MALES ET FEMELLES DANS LES 10 CONDITIONS ETUDIEES. 346
TABLEAU V-6. BILAN DE TOUS LES RESULTATS OBTENUS POUR LES MOULES D'EAU DOUCE EXPOSEES AUX 8 CONDITIONS CONTAMINEES AUX PSYCHOTROPES. 347
TABLEAU V-7. CONCENTRATIONS DES PSYCHOTROPES QUI ONT ETE QUANTIFIEES DANS LES 8 CONDITIONS D'EXPOSITION CONTENANT DES EAUX USEES DES DEUX STEP DE REPENTIGNY. 364
TABLEAU V-8. BILAN DES RESULTATS OBTENUS LORS DE L'EXPOSITION AUX EAUX USEES DES 2 STEP DE REPENTIGNY. 366
TABLEAU V-9. CONCENTRATIONS ($\mu G.L^{-1}$) DES COMPOSES UTILISES DANS LES CONDITIONS D'EXPOSITION (N=14, MOYENNE ± E-T). 381
TABLEAU V-10. BILAN DES RESULTATS OBTENUS POUR L'EXPRESSION DES GENES DANS LES BRANCHIES ET LA MASSES VISCERAL DES PALOURDES EXPOSEES. 382

LISTE DES ABRÉVIATIONS

12S : gène de l'ARN ribosomique mitochondrial
act : gène de la β-actine
ADN : Acide DesoxyriboNucléique
ADNc : Acide DesoxyriboNucléique complémentaire
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
Ansm : Agence national de sécurité du médicament et des produits de santé
ARN : Acide RiboNucléique
ATC : Anatomique, Thérapeutique, Chimique
ATP : Adénosine TriPhosphate
BAPE : Bureau d'Audiences Publiques sur l'Environnement
BSA : Bovin Serum Albumin (Albumine de sérum bovin)
cat : gène de la catalase
CdH : Clos de Hilde
CE_{50} : Concentration Efficace médiane
CHE : Clos de Hilde Entrée
CHET1 et **CHET2** : Clos de Hilde Entrée Traitée 1 et Entrée Traitée 2
CL_{50} : Concentration Létale médiane
cox 1 : gène de la sous-unité 1de la Cytochrome C oxydase
COX : CycloOXygénase
CSBE : Commissaire de la Santé et du Bien-Etre
DBO : Demande Biochimique en Oxygène
DBO_5 : Demande Biologique en Oxygène pendant 5 jours
DCE : Directive Cadre sur l'Eau
DCO : Demande Chimique en Oxygène
DCF : 2,7-dichlorofluorescein
DCFH-DA : 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DIA d5 : DésIsopropyl-Atrazine d5
DMSO : Diméthylsulfoxyde
ECP : Eau Claire Parasite
ECPP : Eau Claire Parasite Permanente
ECPM : Eau Claire Parasite Météorique
EDTA : Ethylène Diamine TétraAcétique
EH : Equivalent Habitant
EI : Etalon Interne
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (dosage immuno-enzymatique sur support solide)
EMA : European Medicines Agency (Agence européenne du médicament)
ERO : Espèces Réactive de l'Oxygène
EU : Eaux Usées

FSC : Forward Scatter Height (lecture de la taille relative d'une cellule avec un cytomètre en flux)
gst : gène de la glutathion transférase
H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HCl : Acide Chlorhydrique
HLB : Hydrophilic Lypophilic Balance
IC : Indice de Condition
IGS : Indice Gonado-Somatique
IL : Ile Lebel
INCB : (International Narcotics Control Board) Organe International de Contrôle des Stupéfiants
INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des risques
IP : Iodure de Propidium
ISRS : Inhibiteur Sélectif de la Recapture de la Sérotonine
JM : Jean Marcotte
Koc : coefficient de partage entre la fraction de carbone organique et l'eau dans le sol ou le sédiment
Kow : coefficient de partage octanol-eau
LC-MS/MS : Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry
LDI : Limites de Détection Instrumentales (**= IDL** : Instrumental Detection Limits)
LDM : Limites de Détection Méthodologiques (**= MDL** : Method Detection Limits)
LF : Louis Fargue
LFE : Louis Fargue Entrée
LFED : Louis Fargue Entrée Décantée
LFET : Louis Fargue Entrée Traitée
LG : Le Gardeur
LPTC : L'équipe de Physico-Toxico Chimie de l'environnement
LQI : Limites de Quantification Instrumentales (**= IQL** : Instrumental Quantification Limits)
LQM : Limites de Quantification Méthodologiques (**= MQL** : Method Quantification Limits)
MAGEST : Marel Gironde Estuaire (réseau d'observation automatisée pour la surveillance de la qualité des eaux de l'estuaire de la Gironde)
MCX : Mixed Cation exchange
MEC : Mesured Environment Concentration (concentration mesurée dans l'environnement)
MES : Matières en Suspension
Métolachlore ESA : métolachlore acide sulfonique
Métolachlore OA : métolachlore acide oxanilique
MBR : bioréacteur à membrane
MRM : Multiple Reaction Monitoring
mt : gène de l'isoforme 1 de la métallothionéine
MTs : Métallothionéines
NaCl : Chlorure de sodium
NO : Nitric Oxide (Oxide nitrique)
NOEC : No Observed Effect Concentration
NQE : Normes de Qualité Environnementale

NQE-CMA : Normes de Qualité Environnementale - Concentrations Maximales Admissibles
NQE-MA : Normes de Qualité Environnementale - Concentrations Moyennes Annuelles à ne pas dépasser
OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économiques
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAEQ : Programmes d'Assainissement des Eaux du Québec
PBDE : PolyBromoDiphénylEthers
PBS : Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate salin)
PCB : PolyChloroBiphényles
PCR : Polymerase Chain Reaction (**RT-qPCR** : Real time quantitative Polymerase Chain Reaction)
PDMS : PolyDiMéthylSiloxane ou silicone
PEC : Predicted Environnemental Concentration (concentration prévisionnelle pour l'environnement)
PEHD : PolyEthylène à Haute Densité
PES : PolyEtherSulfone
PK : Point Kilométrique
PNEC : Predicted No Effect Concentration (concentration prévisionnelle sans effet pour l'environnement)
PNRM : Plan National des Résidus de Médicaments dans l'eau
PNSE : Plan National Santé Environnement
POCIS : Polar Oragnic Chemical Integrative Sampler
PRC : Performance Reference Compounds
PRRI : Programme de Réduction des Rejets Industriels
PTFE : PolytéTraFluoroEthylène
R : Rendement d'épuration moyen
RM : Résidus Médicamenteux
RQ : Risk Quotient (quotient de risque environnemental)
SAGE : Schémas d'Aménagement et de Gestion des Eaux
SPE : Solid Phase Extraction
SBSE : Stir Bar Sorptive Extraction
sod : gene de la mt : gène de la supéroxyde dismutase
SSC: Size Scatter Height (lecture de la complexité interne d'une cellule avec un cytomètre en flux)
STEP : STation d'Epuration
TNF α : Tumor Necrosis Factor α (facteur de nécrose tumorale)
UPLC MS/MS : Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry
VGE : Valeurs Guides Environnementales

INTRODUCTION

En 1930, la production mondiale de produits chimiques est d'un million de tonnes, aujourd'hui elle est passée à 400 millions. En Europe, 100 000 composés organiques et inorganiques sont commercialisés, 30 000 à 70 000 seraient utilisés quotidiennement, cependant l'impact toxicologique de seulement 3 000 de ces molécules est connu. Ces données sont essentiellement obtenues pour les produits chimiques dont la production a débuté après l'application de la directive européenne 67/548/CEE, qui contraint les industriels à fournir des données toxicologiques sur les produits qu'ils souhaitent commercialiser.

Chaque jour, les activités humaines dispersent une grande variété de contaminants chimiques dans l'environnement. Les eaux de surface et les nappes phréatiques sont particulièrement affectées par ces pollutions ponctuelles ou diffuses. Le compartiment aquatique est alors défini comme le réceptacle ultime de la pollution environnementale apportée par diverses sources : les effluents municipaux et industriels, les lixiviats des sites d'élimination des déchets solides, le ruissellement des eaux urbaines, le ruissellement des eaux des sites agricoles et les retombées atmosphériques (Bedding et *al*., 1982).
Face à l'abondance et la variété des molécules polluantes, face à la complexité de leurs effets sur les écosystèmes et le vivant, les gestionnaires et les acteurs de l'eau expriment un besoin croissant de connaissances, d'outils et de méthodes opérationnelles. Les politiques publiques européennes souhaitent retrouver et/ou préserver la santé des milieux aquatiques ; pour cela ils adoptent la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) et ses directives filles, qui structurent depuis 2000 l'effort communautaire de surveillance et de protection des milieux aquatiques. La DCE demande aux états-membres, un effort de recherche et de développement dans de nombreux domaines : de la chimie environnementale à la modélisation des transferts dans les bassins versants, de l'écotoxicologie à l'ingénierie de l'assainissement.

Plusieurs études ont ainsi montré la présence d'une multitude de polluants chimiques dans les compartiments aquatiques. En Europe, une étude a cherché à donner un large aperçu de la contamination des eaux de surface. Sur les 100 rivières étudiées issues de 27 pays européens, plusieurs familles de composés ont été détectées : des perturbateurs endocriniens, des acides perfluorés, des plastifiants, des détergents, des pesticides, des hormones et des médicaments (Loos et *al*., 2009).
En France, de 2007 à 2009, un bilan de présence des micropolluants dans les milieux aquatiques a fait état de la recherche de près de 950 produits chimiques dans les rivières, plans d'eau, eaux souterraines, et sédiments des eaux superficielles. Sur l'ensemble des composés chimiques recherchés, 60% sont des pesticides ; les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (générés lors de divers processus de combustions : transports, incinération, chauffage) sont fréquemment retrouvés dans les cours d'eau de métropole et les polluants persistants tels que les polybromodiphényl-éthers (PBDE) (utilisés dans l'industrie comme retardateurs de flamme) ou les polychlorobiphényles (PCB) sont présents dans les sédiments de nombreux cours d'eau (Dubois et Lacouture, 2011).

Les avancées dans la chimie analytique ont permis de développer des méthodes plus sensibles permettant de détecter plusieurs micropolluants organiques ayant des propriétés physico-chimiques variées dans des gammes de concentrations différentes allant du $ng.L^{-1}$ au $mg.L^{-1}$ (Schwarzenbach et *al*., 2010).
Ces progrès en instrumentations analytiques ont donc permis de mettre en évidence depuis une dizaine d'années la présence de molécules retrouvées à l'état de traces dans l'environnement. Ces composés dits émergents sont constitués entre autres des produits pharmaceutiques, des stéroïdes, des détergents, des désinfectants, des produits cosmétiques, des retardateurs de flamme phosphatés, des antioxydants ou encore des drogues illicites. A titre d'exemple, aux Etats-Unis, une étude portant sur 139 cours d'eau a montré que les composés les plus fréquemment retrouvés sont des micropolluants émergents, tels que les stéroïdes, les médicaments (avec ou sans prescriptions médicales), les désinfectants, ou encore les antioxydants (Kolpin et *al*., 2002).
Les médicaments conçus pour être biologiquement actifs, sont ubiquistes ; leur principale origine est urbaine et leur apport dans l'environnement aquatique est continu. Bien que régulièrement étudiés dans de nombreux programmes de recherche, le devenir, la présence et l'impact de ces molécules dans l'environnement ne sont pas encore assez documentés et ni spécifiquement réglementés.
Depuis quelques années, les scientifiques commencent à s'intéresser à la famille thérapeutique des psychotropes (benzodiazépines, antidépresseurs, antiépileptiques, etc…) car ce sont des molécules fortement consommées au niveau mondial. Malgré les recherches mises en œuvre, il existe un réel manque de connaissance sur un grand nombre de molécules psychotropes, sur leur devenir dans les stations d'épuration et dans l'environnement, sur leur présence dans le milieu aquatique et enfin sur leur impact toxique sur les organismes aquatiques.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de thèse qui visent à comprendre l'intégralité du problème de diffusion des psychotropes, de leur passage en station d'épuration à leur présence dans l'environnement et enfin à leur impact sur les organismes aquatiques. Les objectifs de cette thèse sont de développer et valider des méthodes analytiques et d'échantillonnage afin de renseigner les niveaux de concentrations et les comportements des psychotropes sélectionnés dans les différents compartiments aquatiques étudiés : effluents d'entrée et de sortie de stations d'épuration (STEP) bordelaises et québécoises, eaux de la Garonne et eaux du Saint Laurent. Ce suivi de la contamination en psychotropes en France et au Québec a permis alors de comparer ces deux pays qui sont différents au niveau des habitudes de prescription et de consommation de ces composés, au niveau des traitements épuratoire mis en place dans les STEP mais aussi au niveau de leur hydrosystème récepteur. Pour finir, cette étude a aussi pour objectif d'apporter des renseignements sur l'éventuelle toxicité de certains psychotropes sur des bivalves d'eau douce.

Le premier chapitre de ce manuscrit est une synthèse bibliographique sur l'état des connaissances sur la contamination des milieux aquatiques par les médicaments et plus particulièrement par les psychotropes. Ce chapitre présente la consommation, les sources d'introduction, le devenir, la présence et la toxicité de ces molécules pour l'environnement. Cette synthèse apporte aussi quelques informations sur l'impact des psychotropes par l'intermédiaire de

l'utilisation de biomarqueurs. Enfin le fonctionnement et les caractéristiques des deux hydrosystèmes étudiés, la Gironde et le fleuve Saint Laurent, sont abordés.

Le choix des molécules, les sites de prélèvement, les techniques d'échantillonnage, les méthodes analytiques, les organismes aquatiques et les biomarqueurs étudiés sont détaillés dans le second chapitre de ce manuscrit.

Le troisième chapitre présente tout d'abord le développement et la validation des méthodes analytiques sélectionnées pour détecter dans les eaux de surface et les eaux usées, les 47 psychotropes choisis. Ce chapitre traite ensuite de la calibration et de la validation des échantillonneurs passifs de type POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) permettant le suivi intégratif et continu des psychotropes dans les eaux de surface.

Le quatrième chapitre décrit et discute les résultats obtenus sur la présence des psychotropes dans les stations d'épuration bordelaises et québécoises et sur leur devenir dans les eaux de l'estuaire de la Gironde et du fleuve Saint Laurent. Une comparaison entre la France et le Québec conclut ce chapitre.

Le cinquième chapitre de ce manuscrit présente l'étude de l'impact toxique de certains psychotropes sur deux bivalves d'eau douce (*Ellipto complanata* et *Corbicula fluminea*) grâce à : (1) une approche *in vitro* avec des concentrations en composé de l'ordre du $mg.L^{-1}$ et même de la centaine de $mg.L^{-1}$ et (2) une approche *in vivo* avec des niveaux de concentrations en psychotropes qui ont été retrouvés dans les STEP et dans les milieux aquatiques étudiés.

Pour finir, ce manuscrit se clôt par une conclusion générale qui intègre l'ensemble des résultats de ces travaux de thèse et par la présentation de perspectives.

CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES MEDICAMENTS 10
1.1. Définition 10
1.2. Règlementation française 10
a) Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) 10
b) Plan National des Résidus de Médicaments (PNRM) 13
c) Directive Cadre sur l'Eau (DCE) 13
1.3. Réglementation canadienne 14
a) Mise sur le marché des médicaments 14
b) La politique nationale de l'eau au Québec 15
c) Plan d'action Saint Laurent 16
1.4. Diversité des médicaments 17
1.5. Consommation 19
2. LES PSYCHOTROPES 25
2.1. Les antidépresseurs 25
2.2. Les antiépileptiques 25
2.3. Les anxiolytiques 25
2.4. Les hypnotiques 26
2.5. Les neuroleptiques 26
2.6. Les thymorégulateurs 26
2.7. Les substituts aux opiacés 26
3. VOIES D'INTRODUCTION 28
4. PRESENCE 31
4.1. Présence dans les stations d'épuration 31
a) Le traitement primaire 31
b) Le traitement secondaire 32
c) Traitement tertiaire 33
4.2. Présence dans l'environnement 34
5. DEVENIR DANS L'ENVIRONNEMENT 39
6. TOXICITE ET RISQUE 44
6.1. Toxicité aigüe 44
6.2. Toxicité chronique 45
6.3. Le risque 47
7. IMPACTS DES PSYCHOTROPES 49
7.1. Les biomarqueurs 49
a) Définition 49
b) Les biomarqueurs d'exposition 50
c) Les biomarqueurs d'effet 50
7.2. Impact des psychotropes sur les organismes aquatiques 50
8. COMPARAISON FRANCE-QUEBEC 52
9. L'ESTUAIRE DE LA GIRONDE EN FRANCE 55
9.1. Morphologie de l'hydrosystème Garonne-Dordogne-Gironde 55
9.2. Caractéristiques hydrologiques 57
9.3. Caractéristiques physico-chimiques 59
9.4. Impacts anthropiques 62

10. LE FLEUVE SAINT LAURENT AU QUEBEC 64
10.1. Morphologie du Saint Laurent *64*
10.2. Caractéristiques du tronçon fluvial *67*
10.3. Impacts anthropiques sur cette zone fluviale *71*
11. CADRE SCIENTIFIQUE : LE PROGRAMME MEDIC'EAU 75
OBJECTIF DES TRAVAUX DE THESE 77

De nombreux micropolluants sont présents dans le milieu aquatique, leur introduction est associée à plusieurs activités de types domestiques, industrielles ou encore agricoles. Le compartiment aquatique est alors défini comme le réceptacle ultime de la pollution environnementale apportée par diverses sources (Bedding et *al*., 1982) :

-les effluents municipaux
-les effluents industriels
-les lixiviats des sites d'élimination des déchets solides
-le ruissellement des eaux urbaines
-le ruissellement des eaux des sites agricoles
-les retombées atmosphériques

Les avancées dans la chimie analytique ont permis de développer des méthodes plus sensibles permettant de détecter des micropolluants organiques ayant des propriétés physico-chimiques variées dans des gammes de concentrations différentes allant du $ng.L^{-1}$ au $mg.L^{-1}$(Schwarzenbach et al. 2010). Ainsi plusieurs types de composés peuvent être détectés dans les eaux de rivières (Kolpin et *al*., 2002) (**Tableau I-1**).

Tableau I-1. Fréquence de détection par type de composés (source : Kolpin et *al*., 2002).

Types de composés	Fréquence de détection (%)
Stéroïdes	89
Médicaments sans prescription	81
Répulsifs	74
Dérivés de détergents	69
Désinfectants	65
Plastifiants	63
Retardateurs de flamme	59
Antibiotiques	48
Insecticides	45
HAPs	44
Hormones	39
Autres médicaments	32
Antioxidants	29
Fragrances	27
Solvants	23

L'étude de Kolpin et *al*. (2002) montre que dans le milieu aquatique plusieurs classes de composés sont retrouvées. Sur les 95 composés recherchés, ceux qui sont les plus fréquemment détectés sont les stéroïdes (89 %) mais aussi les médicaments sans prescription (81%). Parmi les différents types de composés détectés, 5 groupes (médicaments sans prescription, antibiotiques, hormones, autre médicaments et fragrances) peuvent être rassemblés en une seule famille, celle des Médicaments et des Produits cosmétique au sens large. Ainsi ces résultats montrent une forte présence et fréquence de détection des Médicaments et Produits cosmétiques dans les eaux testées.

En Europe, il y a plus de 100 000 produits chimiques enregistrés et entre 30 000 et 70 000 seraient utilisés quotidiennement. L'étude de Loos et *al*. (2009) a alors cherché à donner un large aperçu de la contamination des eaux de surface européennes. Pour cela, ils ont recherché 35

composés dans plus de 100 rivières issues de 27 pays européens. Parmi les 35 molécules recherchées, il y a des composés pharmaceutiques, des pesticides, des détergents, des hormones, des perturbateurs endocriniens, des acides perfluorés, etc...

La **Figure I-1** présente la fréquence de détection en pourcentage des composés analysés.

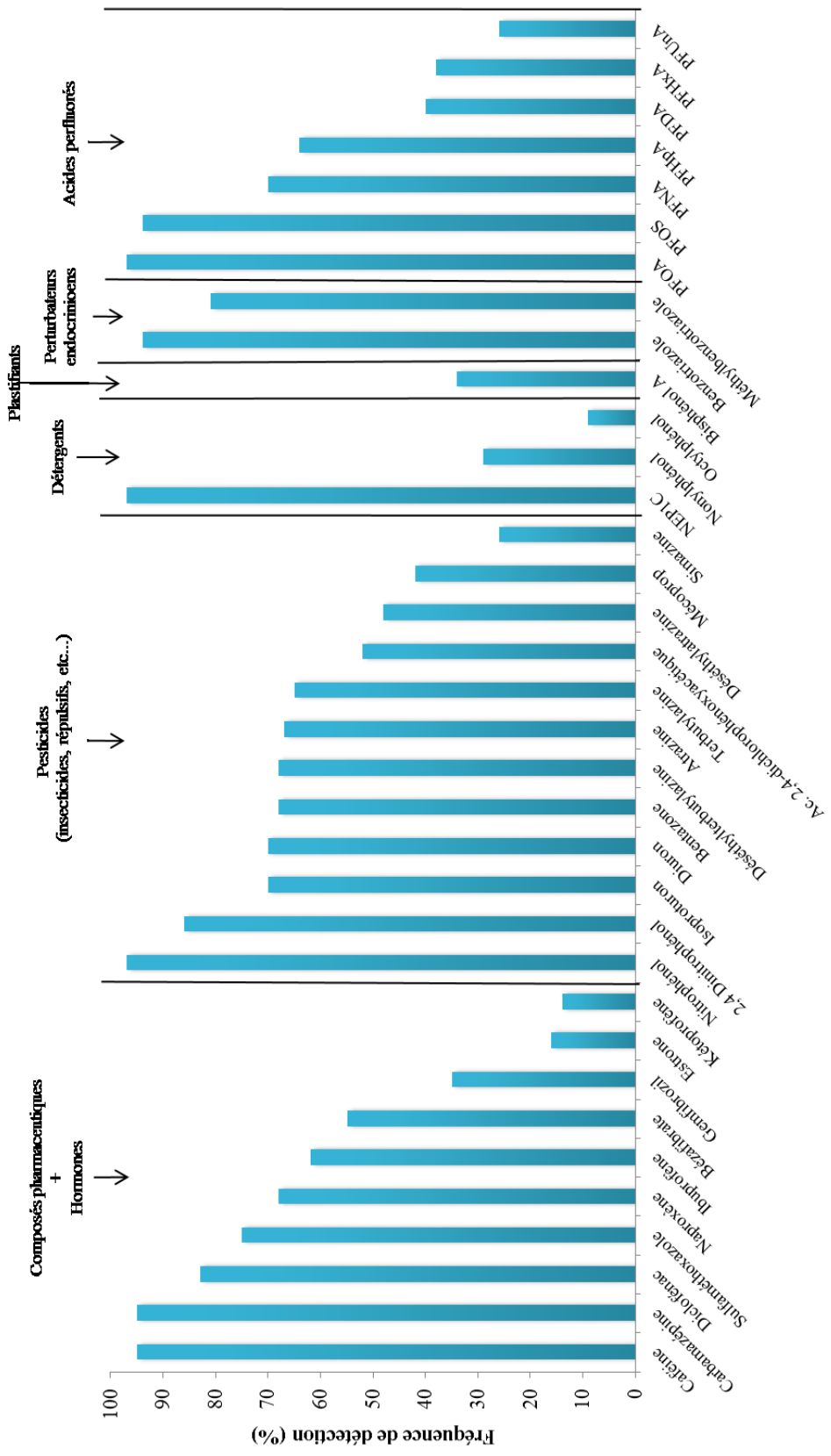


Figure I-1. Fréquence de détection en pourcentage de 35 micropolluants (adaptée de Loos et *al.*, 2009).

Les composés les plus fréquemment détectés sont le Nitrophénol (97%), le NEP1C (97%), le PFOA (97%), la Caféine (95%), la Carbamazépine (95%), le PFOS (94%) et le Benzotriazole (94%). Sur l'ensemble des pesticides et des médicaments analysés, 15 ont une fréquence de détection supérieure à 50%. Cependant les pesticides ne sont jamais détectés à des concentrations dépassant la centaine de $ng.L^{-1}$(sauf pour l'Isoproturon) alors que pour la plupart des médicaments, les concentrations maximales retrouvées peuvent atteindre le $\mu g.L^{-1}$ et même la dizaine de $\mu g.L^{-1}$. Cette différence de concentration serait due à la période d'échantillonnage qui a eu lieu en automne et qui ne correspond pas aux périodes de traitement des terres agricoles.
Certaines familles de contaminants peuvent avoir plusieurs sources comme les pesticides (d'origine agricole et urbaine) alors que les médicaments sont principalement d'origine urbaine apportés en continu dans le milieu aquatique par les effluents de stations d'épuration (STEP). C'est pourquoi les médicaments sont généralement détectés toute l'année à des concentrations plus ou moins importantes.

De par leur caractère ubiquiste, leur apport principal d'origine urbaine et leur apport continu dans le réceptacle aquatique, les médicaments sont devenus un objet d'étude pour la communauté scientifique cherchant à évaluer leur présence et leur impact dans l'environnement.

1.Les médicaments

1.1. Définition

Le code de la Santé publique définit un médicament comme « *toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique* » (http://legifrance.gouv.fr article L.5111-1).

1.2. Règlementation française

a) Autorisation de Mise sur le Marché (AMM)
Les composés pharmaceutiques sont d'origine synthétique ou naturelle, ils possèdent des propriétés curatives et préventives. Ils sont synthétisés pour le bien être ou la santé des consommateurs. Ce sont des molécules réglementées qui ont besoin d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) accordée par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) ou par l'Agence Européenne du Médicament (EMA). Cette réglementation est commune à l'ensemble des pays de l'Union européenne, elle permet ainsi de déterminer une grande partie des règles qui s'appliquent aux médicaments en Europe.

L'AMM est demandée par le laboratoire pharmaceutique qui développe le médicament en vue de sa commercialisation. Elle est basée sur un dossier comportant des données de qualité

pharmaceutique (aspects liés à la fabrication industrielle du médicament), de sécurité (ensemble des études *in vivo* conduites sur des organismes non humains lors du développement préclinique) et d'efficacité (ensemble des résultats des études cliniques menées sur l'Homme sain et/ou malade) du médicament à commercialiser. Ainsi, l'Autorisation de la Mise sur le Marché d'un médicament est établie à partir du rapport bénéfices / risques (effets thérapeutiques du médicament / risques pour la santé du patient) qui doit être favorable, c'est-à-dire au moins équivalent à celui de produits déjà sur le marché. Une fois commercialisé, le médicament est placé sous surveillance pour avoir une évaluation continue de son rapport bénéfices/risques, qui peut changer au cours de la vie du produit pharmaceutique.

A partir de 2004 le dossier d'AMM a eu pour obligation d'évaluer les risques que pourraient présenter le médicament pour l'environnement (la Directive 2004/27/CE) mais ce n'est qu'à partir de 2006 que ce dispositif a été opérationnel (CGEDD, 2010).
L'évaluation du risque environnemental mis en place par l'EMA est caractérisée par une démarche échelonnée (Erreur ! Source du renvoi introuvable.) avec pour première étape l'évaluation e l'exposition par estimation de la PEC pour Predicted Environnemental Concentration (concentration environnementale prédite). Cette concentration est exprimée en $mg.L^{-1}$ et est obtenue selon l'équation suivante :

$$PEC = \frac{DOSE \times Fpen}{Q\ eaux\ usées\ \times Dilution\ \times 100}$$

Où DOSE : dose journalière maximale du médicament consommée par habitant (mg/hab/jour) ; Fpen : facteur de pénétration du médicament sur le marché (valeur fixée à 1% par défaut) ; Q eaux usées : quantité d'eaux usées par jour et par habitant sur la zone considérée (l/hab/jour) (valeur fixée par défaut à 200 litres) et Dilution : facteur de dilution du composé entre l'effluent de STEP et le milieu récepteur (fixé à 10 par défaut).

Si cette concentration est inférieure à une valeur seuil (10 $ng.L^{-1}$, voir **Figure I-2**) alors l'EMA conclut à une absence de risque environnemental du médicament et donc s'affranchit de toute étude d'impact environnemental de la molécule. Si la valeur de la PEC est supérieure ou égale à cette valeur seuil alors le test passe à la deuxième étape qui est de définir, par des essais d'écotoxicité, la PNEC pour Predicted No Effect Concentration (concentration prédite sans effet pour l'environnement) (CGEDD, 2010).

Une fois les valeurs de PNEC obtenues, la caractérisation du risque peut être calculée grâce au rapport PEC/PNEC. Si ce rapport est inférieur à 1 alors l'EMA conclut à une absence de risque pour l'environnement du composé testé. Cependant s'il est supérieur à 1, la substance évaluée est considérée comme présentant un risque pour le milieu considéré.

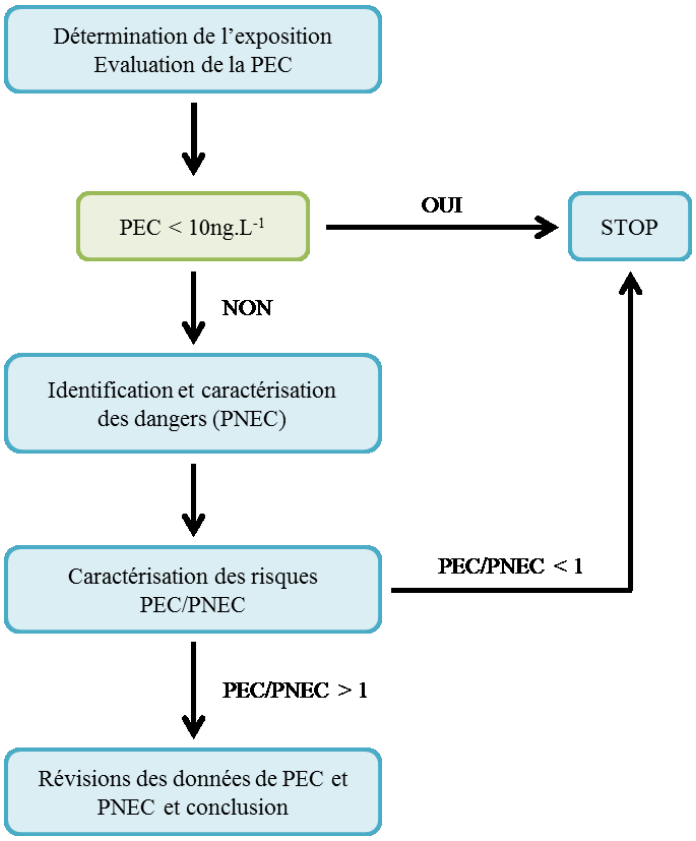


Figure I-2. Les différentes étapes de l'évaluation du risque environnemental, faite par l'EMA (adaptée de CGEDD, 2010).

Ainsi en 2012 et 2013, à partir de cette évaluation globale, trois benzodiazépines ont fait l'objet de mesures particulières (ANSM, 2013) :

-Clonazépam dont les conditions de prescription et de délivrance ont été sécurisées et encadrées par les spécialistes en neurologie et pédiatrie afin de limiter le détournement de son utilisation (usage détourné chez les toxicomanes et trafic reposant sur la falsification d'ordonnance).

-Tétrazépam dont la réévaluation du rapport bénéfices/risques a engendré son retrait du marché, au niveau européen.

-Flunitrazépam qui pour des raisons commerciales (diminution de 94% des ventes entre 2000 et 2009 à cause d'une restriction de prescription pour détournement de son utilisation à des fins criminels) a été retiré du marché.

Dans le même contexte, en avril 2012, une décision du directeur général de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) a interdit l'importation, la préparation, la prescription et la délivrance de préparations magistrales, officinales et hospitalières (définies à l'article L. 5121-1 du code de la santé publique) ainsi que les préparations homéopathiques, contenant l'une des substances suivantes : Clenbutérol, Clonazépam, Exénatide, Liraglutide, Méprobamate, Orlistat, Synéphrine (Décisions Gouv, 2012).

b) Plan National des Résidus de Médicaments (PNRM)

Dans le cadre du premier Plan National Santé Environnement de 2004 à 2008 (PNSE 1), des campagnes de mesures de contamination (76 composés pharmaceutiques) des eaux de surface et souterraines ont été effectuées dans les bassins hydrographiques Seine-Normandie, Rhône-Alpes et Adour-Garonne.

Les résultats ont montré que les concentrations rencontrées dans les eaux de surface et souterraines étaient de l'ordre de la dizaine de $ng.L^{-1}$ et pouvaient atteindre le $\mu g.L^{-1}$ dans les effluents des stations d'épuration.

A partir de cet état des lieux, le ministre en charge de l'écologie et de la santé lors du deuxième PNSE (PNSE 2) a mis en place un volet spécifique pour évaluer les risques éventuels des résidus de médicaments pour l'homme et les écosystèmes (PNRM). Ceci avait pour but de mettre en place des démarches visant à réduire la dispersion des médicaments dans l'eau.

Ce plan s'articule autour de 3 axes :

-Evaluer les risques (mise en place de campagnes de mesure de résidus médicamenteux (RM) dans l'eau, de campagnes de surveillance des rejets hospitaliers et des rejets de STEP et de développement de méthodes analytiques robustes).

-Définir des mesures de gestion (renforcer les filières de récupération et d'élimination des médicaments mais aussi sensibilisation de la population au bon usage des composés pharmaceutiques).

-Développer les connaissances par la recherche scientifique.

Depuis 2015, un troisième Plan National Santé Environnement (PNSE 3_2015-2019) a été mis en place par le gouvernement afin de réduire les impacts des facteurs environnementaux sur la santé humaine afin de permettre à chacun de vivre dans un environnement favorable à la santé.

Ce troisième plan s'articule autour de 4 catégories d'enjeux :

-Des enjeux de santé prioritaires.

-Des enjeux de connaissance des expositions et de leurs effets.

-Des enjeux pour la recherche en santé environnement.

-Des enjeux pour les actions territoriales, l'information, la communication et la formation.

c) Directive Cadre sur l'Eau (DCE)

La DCE établit un cadre communautaire pour la protection et la gestion de l'eau (eau de surface, eau souterraine, eau estuarienne et eau côtière) ; elle a été signée par l'union européenne en octobre 2000 (2000/60/ CE).

Son objectif était l'atteinte par les états membres d'un « bon état écologique et chimique » dans différentes masses d'eaux naturelles en 2015. De plus, elle visait à prévenir et réduire la pollution des eaux, promouvoir leur utilisation durable, protéger l'environnement et améliorer l'état des écosystèmes.

Afin de prévenir et de réduire une éventuelle contamination des masses d'eau, les concentrations en polluants retrouvés dans les milieux étudiés sont comparées à des Normes de Qualité Environnementale (NQE). Une NQE est définie selon la définition 35 de l'article 2 de la DCE, comme étant « *la concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants dans l'eau, les sédi-*

ments ou le biote qui ne doit pas être dépassée afin de protéger la santé humaine et l'environnement ».

Les NQE sont utilisées pour deux types d'évaluation :

-L'évaluation de l'état chimique des cours d'eau, concernant 45 substances dites prioritaires par la DCE.

-L'évaluation de l'état chimique dans l'état écologique concernant les substances pertinentes de la DCE établie au niveau national. En France, c'est l'INERIS qui propose des Valeurs Guides Environnementales (VGE).

En 2008, une première liste de 33 substances prioritaires (polluants présentant un risque significatif pour l'environnement aquatique) a été publiée lors de la première directive fille (2008/105/CE) révisant la DCE (2000/60/CE). Cette première directive fille permet aussi de déterminer les NQE des 33 composés sélectionnés, pour les eaux de surface.
En 2013, la deuxième directive fille (2013/39/CE) a permis de réviser la DCE (2000/60/CE) et la première directive fille (2008/105/CE). Cette deuxième directive fille ajoute 12 nouvelles substances prioritaires à la première liste élaborée (**Annexe 1**).

Les valeurs seuils à ne pas dépasser des substances prioritaires afin de protéger l'environnement et la santé humaine sont les NQE-CMA (concentrations maximales admissibles en $\mu g.L^{-1}$) et les NQE-MA (concentrations moyennes annuelles à ne pas dépasser en $\mu g.L^{-1}$) (**Annexe 2**).

Le 20 mars 2015, la décision d'exécution (UE) n° 2015/495 a établi une liste de vigilance relative aux substances soumises à surveillance à l'échelle de l'Union dans le domaine de la politique de l'eau en vertu de la directive (2008/105/CE) du Parlement européen et du Conseil. Cette liste comprend 10 molécules dont 3 composés pharmaceutiques ou apparentés : le 17α-éthinylestradiol, le 17 β-estradiol (hormone) et le Diclofénac (anti-inflammatoire) (**Annexe 3**).

1.3. Réglementation canadienne

a) Mise sur le marché des médicaments

En 1920, la *Loi des aliments et drogues* a été mise en place afin d'établir des exigences précises en matière d'homologation des médicaments. Le ministre de la Santé avait alors le pouvoir d'annuler ou de suspendre une licence en cas de manquement aux exigences. Depuis 1951, les fabricants sont tenus de soumettre des présentations de nouvelles drogues avant de pouvoir mettre leurs produits sur le marché et doivent obtenir un avis de conformité de Santé Canada (VGC, 2011).
Selon la Loi des aliments et drogues et son règlement d'application, Santé Canada, à titre d'organisme fédéral de réglementation, est chargé d'évaluer et de surveiller l'innocuité et l'efficacité des médicaments mis sur le marché au pays. Pour cela, le Ministère met en œuvre diverses activités liées à la réglementation qui visent à évaluer et à surveiller l'innocuité, l'efficacité et la qualité des médicaments avant et après leur commercialisation (**Figure I-3**).

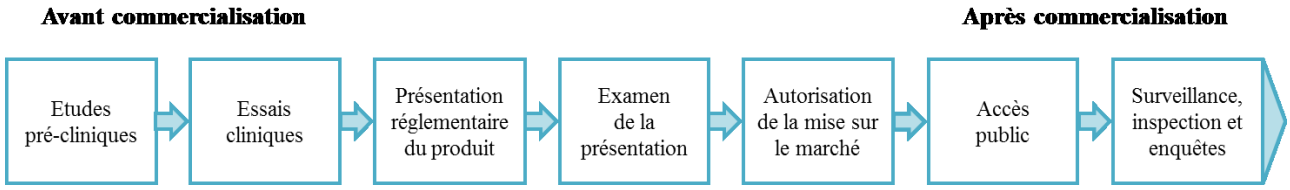


Figure I-3. Etapes du processus de réglementation des medicaments au Canada (source : Santé Canada : http://www.hc-sc.gc.ca/).

En 2011, le rapport du vérificateur général du Canada (VGC, 2011) a montré que Santé Canada n'arrivait pas à assumer de manière adéquate la plupart de ses principales responsabilités liées aux essais cliniques, à l'examen des présentations de médicaments et aux activités post-commercialisation visant les médicaments. A la suite de celui-ci, le Ministère et Santé Canada se sont engagés à suivre les différentes recommandations formulées pour améliorer ces lacunes.

b) La politique nationale de l'eau au Québec

En décembre 1987, le Symposium sur la gestion de l'eau a été tenu, réunissant divers experts nationaux et iunternationaux. Celui-ci a permis de dresser un portrait des différents usages de l'eau et de ses modes de gestion au Québec (Villeneuve et *al*., 1998).

À la suite de ce Symposium, en 1999, le Bureau d'Audiences Publiques sur l'Environnement (BAPE) a été mandaté pour tenir, dans toutes les régions du Québec, une vaste consultation publique destinée à recueillir les opinions de la population en général.

Le 1er mai 2000, a eu lieu la publication et le dépôt auprès du ministre de l'Environnement, du rapport contenant les recommandations de la commission sur la gestion de l'eau où y traite les diverses problématiques soulevées lors des audiences du BAPE : l'exportation de l'eau, l'exploitation de l'eau souterraine, la privatisation des services d'eau, la santé, l'assainissement des eaux, le Saint-Laurent, la protection des milieux aquatiques, la tarification de l'eau et la gestion par bassin versant.

Le 15 juin 2000, le gouvernement publie le cadre général d'orientation de la future politique sur la gestion de l'eau (http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/orientation/index.htm), contenant des orientations, des objectifs ainsi que des principes devant servir à l'élaboration de la Politique nationale de l'eau.

Les 3 enjeux majeurs de cette Politique nationale de l'eau sont (MDDELCC, 2011):

- reconnaître l'eau comme patrimoine collectif
- assurer la protection de la santé publique et des écosystèmes aquatiques
- gérer l'eau de façon intégrée dans une perspective de développement durable

Afin de donner vie aux trois enjeux, le gouvernement du Québec a structuré cette politique autour de cinq orientations majeures :

- réformer la gouvernance de l'eau
- implanter la gestion intégrée du Saint-Laurent
- protéger la qualité de l'eau et des écosystèmes aquatiques
- poursuivre l'assainissement de l'eau et améliorer la gestion des services d'eau
- favoriser les activités récréotouristiques relatives à l'eau.

En décembre 2005 est conclue une entente entre le Québec, l'Ontario et 8 états américains (Illinois, Indiana, Michigan, Minnesota, New York, Ohio, Pennsylvanie, Wisconsin) afin de protéger les ressources en eaux durables du bassin des Grands Lacs et du fleuve Saint-Laurent (MDDELCC, 205). Dans ce cadre, le Québec adopte les objectifs gouvernementaux de conservation et d'utilisation efficace de l'eau.
Les quinze objectifs gouvernementaux ont été regroupés en cinq orientations :

1 - Agir pour pérenniser les approvisionnements en eau en considérant les écosystèmes et les usages de l'eau.

2 - Adopter et mettre en œuvre une gestion de la disponibilité de l'eau et des prélèvements d'eau qui tient compte de l'impact anticipé des changements climatiques.

3 - Mettre en place un suivi du programme de conservation et d'utilisation efficace de l'eau.

4 - Encourager la recherche scientifique, le développement technologique et l'acquisition de connaissances.

5 - Sensibiliser, informer, outiller et mobiliser les acteurs et utilisateurs de l'eau

c) Plan d'action Saint Laurent

En 1972, le Groupe de travail Canada-Québec sur le fleuve Saint Laurent reçoit le mandat de dresser un portrait de la situation. Il constate que les usages récréatifs, fauniques et commerciaux sont menacés par la pollution des eaux.

En 1978, un deuxième comité fédéral-provincial d'études sur le fleuve Saint Laurent est contitué et recommande la mise en place de plans d'interventions visant à garantir une eau potable de qualité, l'assainissement des eaux usées municipales et une réglementation adéquate concernant les rejets industriels.

En 1988, les gouvernements du Canada et du Québec entament un travail avec divers collaborateurs afin de conserver, restaurer, protéger et mettre en valeur le fleuve Saint Laurent, appelé Plan d'action Saint Laurent.
Depuis cette date, 4 ententes quinquennales ont permis de coordonner les interventions gouvernementales sur le Saint Laurent et d'accomplir des progrès accomplis en matière de conservation et de mise en valeur du Saint-Laurent :

- 1988-1993 : Plan d'action Saint Laurent - Phase I.

Cette première phase a permis de faire des progrès sur l'assainissement des eaux du fleuve et sur la sauvegarde de l'écosystème du Saint Laurent.

- 1993-1998 : Plan d'action Saint Laurent – Phase II ou « Saint Laurent Vision 2000 ».

Saint-Laurent Vision 2000 couvrait 7 domaines d'intervention : la biodiversité, l'agriculture, l'implication communautaire, l'aide à la prise de décision, la santé, la protection et la restauration.
Cette seconde phase a permis de stimuler et d'harmoniser les efforts du plus grand nombre possible de partenaires, en faisant appel à la population. De plus, elle a permis de mettre en place les comités Zones d'intervention prioritaire (ZIP).

- 1998-2003 : Plan d'action Saint Laurent – Phase III.

Dans la phase 3, les efforts des Phases I et II ont été maintenus. Le domaine de la navigation a été ajouté aux domaines d'intervention déjà suivi dans les deux premières phases (l'agriculture, la biodiversité, l'implication communautaire, l'industriel et l'urbain ainsi que la santé humaine).

- 205-2010 : Plan d'action Saint Laurent – Phase IV.

La phase IV avait pour objectif de favoriser l'intégrité écologique, le respect de l'environnement dans les activités économiques, l'engagement des collectivités et une gouvernance concertée et intégrée du Saint-Laurent.

Les activités visaient 6 domaines d'intervention : l'implication communautaire et la sensibilisation, l'accessibilité aux rives, l'agriculture, l'intégrité écologique, la navigation et le suivi de l'état du Saint Laurent.

Enfin en 2011, une cinquième entente entre le Canada et le Québec a été mise en place jusqu'en 2026.

Celle-ci poursuit les actions conjointes portant sur : la conservation de la biodiversité, l'amélioration de la qualité de l'eau et la pérennité des usages.

De plus, deux programmes ont été mis en place :

- pour suivre l'état du Saint Laurent
- pour simuler, à l'aide de modèles, l'évolution des processus physiques, biologiques ou chimiques du Saint Laurent et de son bassin versant, afin de prévoir l'état de leur environnement terrestre et aquatique.

1.4.Diversité des médicaments

En 2010, Santé Canada a recensé 13 000 médicaments en vente au canada (VGC, 2011) et en 2013, 2 800 substances actives ont été commercialisées en France, réparties sur près de 11 000 spécialités pharmaceutiques (ANSM, 2014). Toutes ces substances sont utilisées pour la fabrication de médicaments de prescription. Ainsi les médicaments peuvent être classés de différentes façons.

La classification la plus connue est l'ATC (Anatomique, Thérapeutique, Chimique) établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Les médicaments sont classés selon l'organe sur lequel ils agissent et/ou leurs caractéristiques thérapeutiques et chimiques (**Figure I-4**).

Cette classification se décline en cinq niveaux hiérarchiques :

1. Classe anatomique principale
2. Sous-classe thérapeutique
3. Sous-classe pharmacologique
4. Sous-classe chimique
5. Substance active

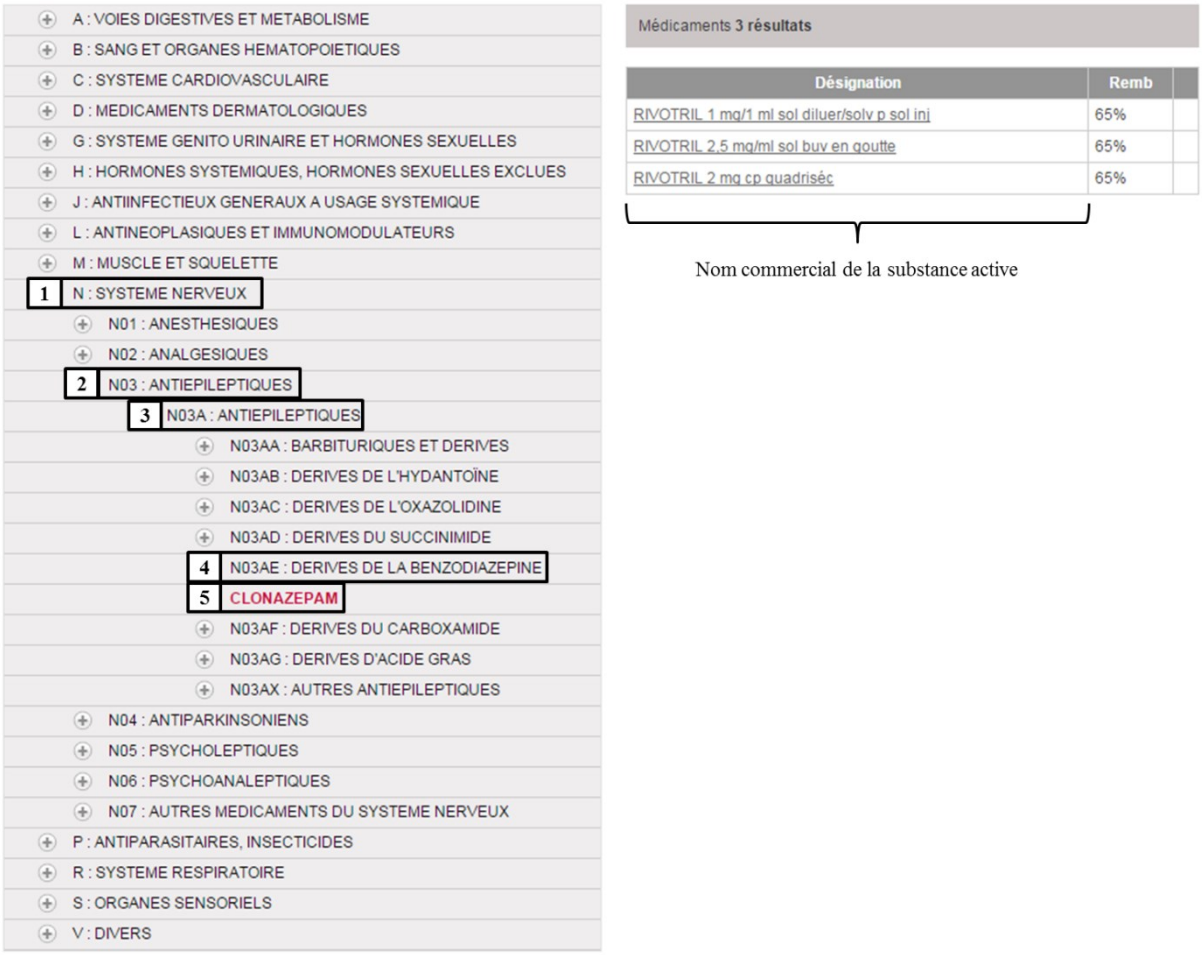


Figure I-4. Exemple de la classification ATC pour le Clobazam (Vidal : http://www.vidal.fr/classifications/atc/, consulté en avril 2015)

Cette classification est très spécifique et complexe. Cependant, les médicaments peuvent être aussi simplement classés selon leur classe thérapeutique.

- Les analgésiques et anti-inflammatoires
- Les anti-infectieux (antibiotiques et antiparasitaires)
- Les psychotropes
- Les antinéoplasiques (anticancéreux)
- Les médicaments du système digestif (anti-diarrhéiques, antispasmodiques, antiémétiques et les médicaments de l'ulcère gastroduodénale)
- Les antihistaminiques
- Les hypolipidémiants
- Les bêtabloquants
- Les hormones
- Les agents de contraste
- Les bronchodilatateurs
- Les autres classes (vitamines, antidiabétiques, diurétiques, antihypertenseurs, anti-arythmiques, etc…)

1.5. Consommation

Le marché mondial du médicament en 2013 représente environ 639 milliards de dollars de chiffre d'affaires, soit une hausse de 4,5% par rapport à 2012 (LEEM, 2013).
Le marché américain (Etats-Unis) est le plus important avec 38,2 % du marché mondial, alors que les principaux marchés européens (Allemagne, France, Italie, Royaume-Uni et Espagne) ne représentent que 17,8% du marché mondial. La France reste en 2013, le deuxième marché européen derrière l'Allemagne. Le Japon et les pays émergents (Chine et Brésil) quant à eux constituent respectivement 9,4% et 9,7% de part du marché. Il a été montré que les pays industrialisés sont les plus consommateurs de médicaments (**Figure I-5**).

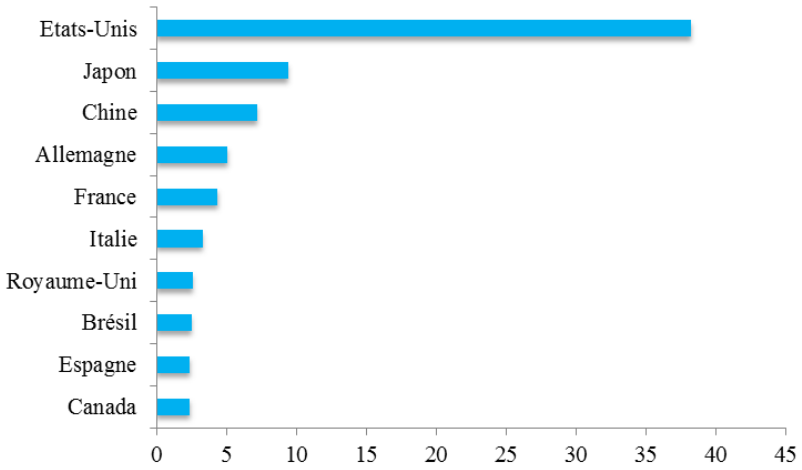
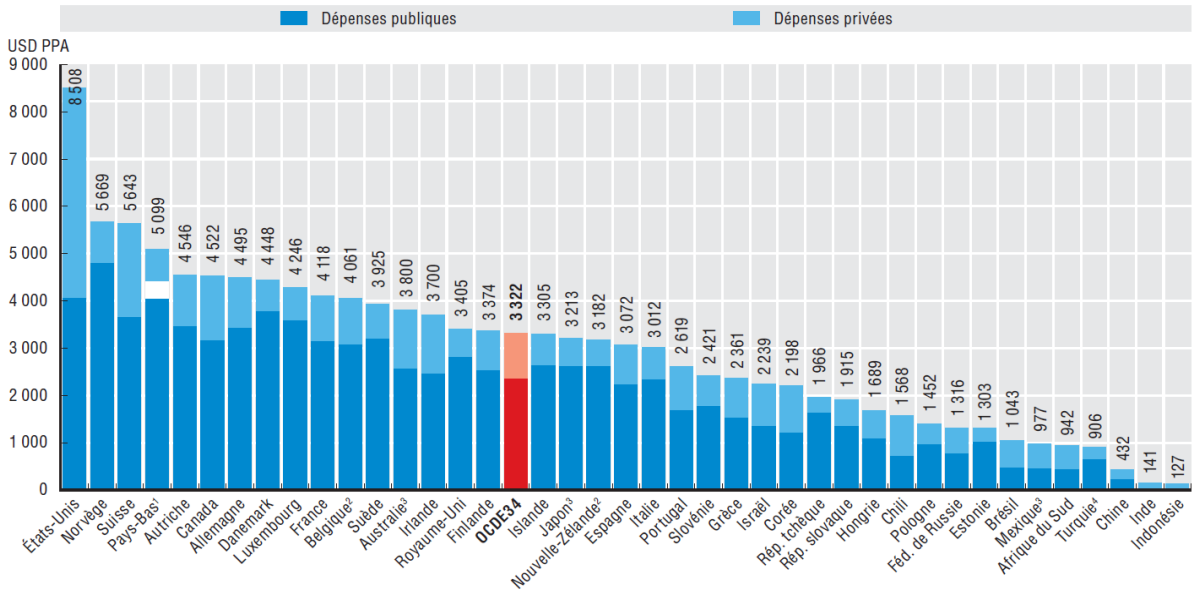


Figure I-5. Pourcentage de part des principaux marchés mondiaux pharmaceutiques en 2013.

La **Figure I-6** représente, les dépenses totales de santé pour les pays de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques), en dollar américain (USD), en 2011. Les niveaux de dépense de santé du pays est dépendant de différents facteurs économiques et sociaux.
Les dix pays qui ont les plus grandes dépenses de santé sont : les Etats-Unis, la Norvège, la Suisse, les Pays-Bas, l'Autriche, le Canada, l'Allemagne, le Danemark, le Luxembourg et la France. La dépense de santé par habitant des Etats-Unis est de 8050 USD, soit une fois et demi plus que les dépenses de la Norvège (5669 USD) et la Suisse (5643 USD) qui sont classés en deuxième et troisième position. De plus, les Etats-Unis dépensent approximativement deux fois plus par habitant que certains grands pays européens, comme l'Allemagne (4495 USD) et la France (4118 USD).



1. Aux Pays-Bas, il n'est pas possible de distinguer clairement la part privée de la part publique des dépenses de santé liées aux investissements.
2. Dépenses de santé courantes.
3. Les données se rapportent à 2010.
4. Les données se rapportent à 2008.

Source : Statistiques de l'OCDE sur la santé 2013, http://dx.doi.org/10.1787/health-data-fr ; Base de données de l'OMS sur les dépenses mondiales de santé.

StatLink http://dx.doi.org/10.1787/888932922500

Figure I-6. Dépenses en santé par habitant, 2011 (source : OCDE, 2013).

Des variations importantes entre les pays sont observées, en raison des différences dans le volume, les structures de consommation et le prix des médicaments. Les 10 pays qui ont les dépenses en médicaments les plus importantes sont : les Etats-Unis (985 USD), le Canada (701 USD), la Grèce (673 USD), le Japon (648 USD), l'Irlande (648 USD), l'Allemagne (632 USD), la Belgique (627 USD), la France (615 USD), l'Australie (587 USD) et la Hongrie (541 USD).
La dépense en pharmaceutiques par habitant de 985 USD des États-Unis est nettement supérieure à celles des autres pays.

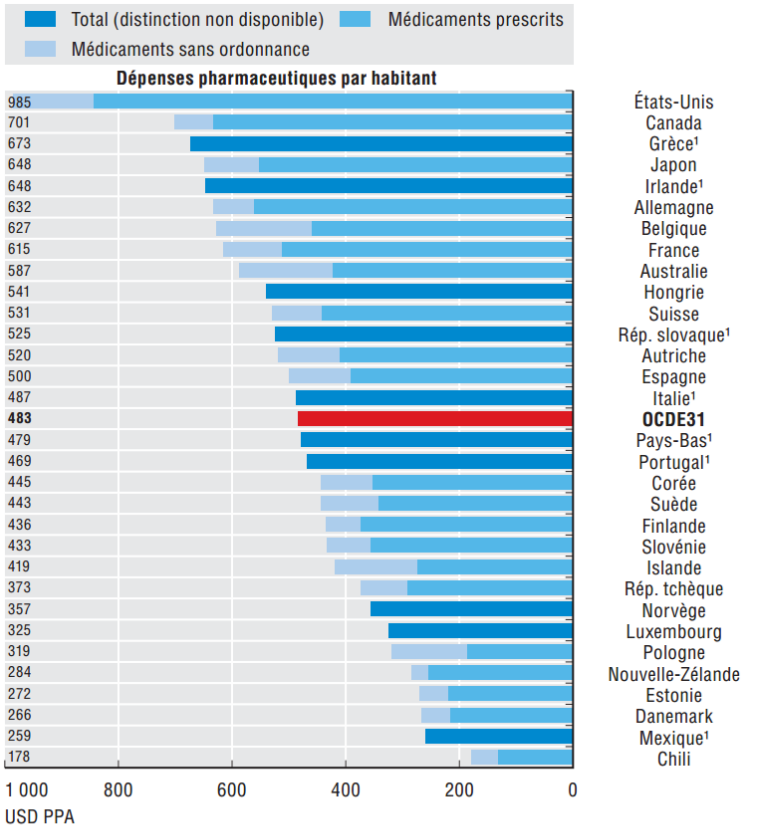
Le **Tableau I-2** représente la dépense en médicaments et en santé par habitant de certains pays de l'OCDE, ainsi que la proportion de la dépense en médicaments par rapport à la dépense en santé.

Tableau I-2. Dépense en médicaments et en santé par habitant (en USD) de certain pays de l'OCDE et la proportion de la dépense en médicaments par rapport à celle de la santé (source : OCDE, 2013).

Pays	Dépense en médicament par habitant (en USD)	Dépense en santé par habitant (en USD)	Proportion (en %)
Etats-Unis	985	8508	12
Canada	701	4522	16
Grèce	673	2361	29
Japon	648	3213	20
France	615	4118	15
OCDE	483	3322	15
Chili	173	1568	11

Ces proportions peuvent varier du simple au double selon les pays. Alors que les Etats-Unis ont la plus grosse dépense en médicaments par habitant, cela ne représente que 12 % de la dépense en santé d'un habitant, ce qui est quasiment le même cas pour le Chili (11%) qui est le pays avec la plus faible dépense en médicament par habitant (**Figure I-7**). La France (15%) et le Canada (16%) ont des proportions identiques ou très proches de celle de la moyenne des pays de l'OCDE (15%). La Grèce et le Japon qui ont des dépenses en santé 3 à 4 fois plus faible que les Etats-Unis, ont tout de même un rapport de dépenses médicaments/santé plus élevé (respectivement 29% et 20 %), ce qui traduit une préférence dans l'achat de médicaments à d'autres systèmes de santé.

La **Figure I-7** représente les dépenses en composés pharmaceutiques des pays de l'OCDE par habitant (en USD) en 2011.



1. Inclut les produits médicaux non durables.

Source : Statistiques de l'OCDE sur la santé 2013, http://dx.doi.org/10.1787/health-data-fr.

Figure I-7. Dépenses pharmaceutiques par habitant des pays de l'OCDE en 2011 (source : OCDE, 2013).

En 2014, le rapport annuel de 2013 du Conseil d'examen du prix des médicaments brevetés (CEPMB) du Canada, présente la distribution des ventes de produits médicamenteux selon les groupes thérapeutiques, dans plusieurs pays (**Tableau I-3**).

Tableau I-3. Distribution des ventes de produits médicamenteux brevetés (en pourcentage) selon le groupe thérapeutique, dans plusieurs pays, en 2012 (source : CEPMB, 2013).

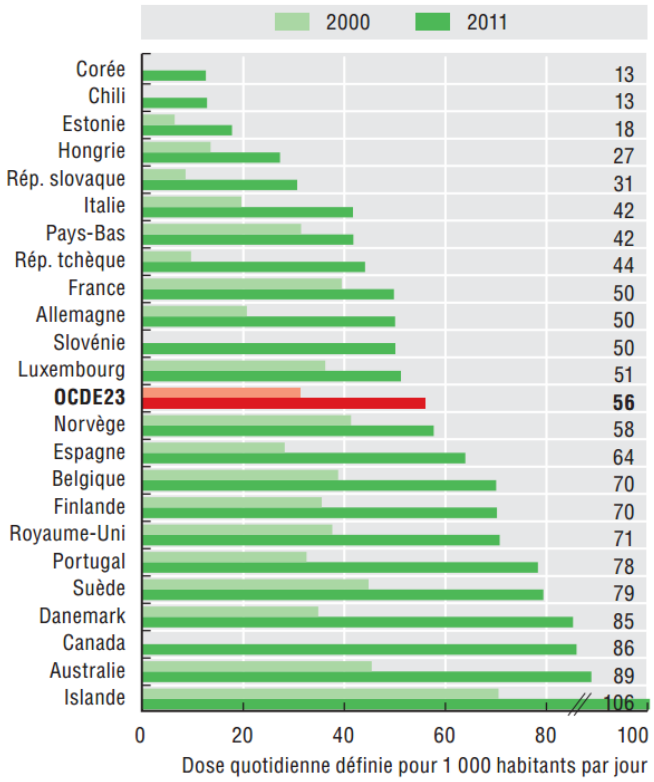
Groupe thérapeutique	Canada	Pays de comparaison	France	Italie	Allemagne	Suède	Suisse	Royaume-Uni	États-Unis
A : Tube digestif et métabolisme	12,4	12,4	10,3	11,1	11,2	9,7	11,1	10,9	13,0
B : Sang et organes sanguinoformateurs	4,1	5,1	7,5	8,2	6,1	8,0	5,2	4,4	4,4
C : Système cardiovasculaire	11,8	9,5	11,8	12,8	8,8	5,3	10,6	7,6	9,2
D : Produits dermatologiques	3,2	3,0	2,5	2,1	2,7	2,6	3,6	3,1	3,1
G : Système génito-urinaire et hormones sexuelles	5,3	5,1	3,2	4,0	3,5	4,8	4,6	4,3	5,7
H : Préparations hormonales systémiques	1,3	2,2	2,0	2,1	2,1	2,6	1,6	2,4	2,2
J : Antiinfectieux généraux pour usage systémique	7,5	10,7	12,0	13,0	9,7	7,2	10,6	10,7	10,5
L : Agents antinéoplastiques et agents immunomodulateurs	17,2	17,7	18,0	17,2	22,1	23,2	21,1	17,9	17,0
M : Système musculo-squelettaire	3,8	3,2	3,3	3,8	3,7	3,3	4,9	2,6	3,1
N : Système nerveux	18,3	17,2	14,5	11,8	14,4	18,1	15,2	18,4	18,2
P : Produits antiparasitaires	0,2	0,2	0,2	0,0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
R : Système respiratoire	7,4	7,4	6,2	5,7	7,0	9,0	6,4	9,8	7,5
S : Organes sensoriels	3,7	2,7	3,1	2,1	2,7	2,7	3,4	3,6	2,6
V : Divers	4,0	3,8	5,3	6,0	5,8	3,3	1,7	4,1	3,2
Tous les groupes thérapeutiques*	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

* Il se peut que les valeurs n'équivaillent pas à 100,0 en raison de l'arrondissement.

Source : MIDAS©, 2005–2013, IMS Health Incorporated ou sociétés affiliées. Tous droits réservés[16].

Les résultats font ressortir une grande uniformité entre les différents pays. Les 3 premiers groupes thérapeutiques en haut du classement en fonction de leur distribution des ventes de médicaments sont « les agents antinéoplasiques et les agents immunomodulateurs », « le système nerveux » et « le tube digestif et métabolisme ». La vente de médicaments brevetés du système nerveux, aussi appelés psychotropes, représente 18,3% des ventes au Canada, 18,2% aux Etats-Unis, 14,4% en Allemagne et 14,5% en France.

La **Figure I-8** représente la consommation en antidépresseurs (classe de composés appartenant à la famille des psychotropes) en 2000 et 2011 dans les pays de l'OCDE, exprimée en dose quotidienne définie pour 1000 habitants (DQD). La consommation d'antidépresseurs a sensiblement augmenté dans la plupart des pays de l'OCDE entre 2000 et 2011.
La prescription d'antidépresseurs, l'intensité et la durée des traitements varient d'un pays à l'autre suivant les habitudes des médecins généralistes et des psychiatres.
Les plus hauts niveaux de consommation d'antidépresseurs enregistrés en 2011 sont obtenus par l'Islande (106 DQD), l'Australie (89 DQD), le Canada (86 DQD) et le Danemark (85 DQD).



Source : Statistiques de l'OCDE sur la santé 2013, http://dx.doi.org/10.1787/health-data-fr.

Figure I-8. Consommation d'antidépresseurs, 2000 et 2011 (source : OCDE, 2013)

La France est en dessous de la moyenne des pays de l'OCDE avec 50 DQD, cependant c'est un pays qui a une forte consommation de psychotropes autre que les antidépresseurs tels que les anxiolytiques et les hypnotiques.

En 2012, 131 millions de boîtes de benzodiazépines (classe de composés appartenant à la famille des psychotropes) ont été vendues en France dont 66,8 millions de boîtes d'anxiolytiques et 50,7 millions de boites d'hypnotiques (dérivés ou apparentés aux benzodiazépines). La consommation de cette classe de molécules est alors répartie en quatre classes thérapeutiques : les anxiolytiques, les hypnotiques, les myorelaxants et les antiépileptiques, représentant près de 4% de la consommation totale en médicaments de la France, en 2012 (**Figure I-9**). Le composé le plus vendu (en nombre de boîte) est l'Alprazolam suivi du Zolpidem et du Zopiclone (ANSM, 2013).

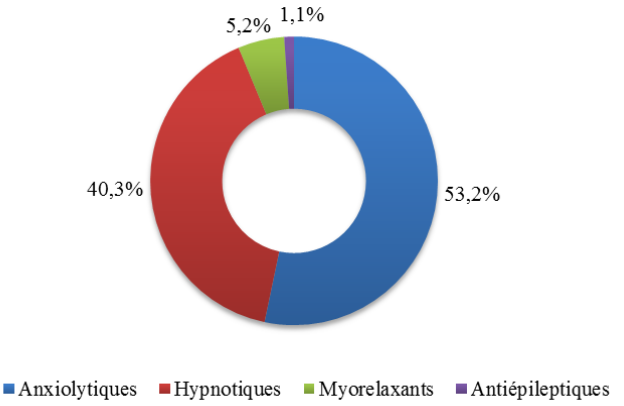


Figure I-9. Répartition de la consommation en benzodiazépines en France, en 2012.

Ainsi, la vente et la consommation de composés agissant sur le système nerveux (psychotropes) sont relativement importantes dans un grand nombre de pays comme les Etats-Unis, le Canada, la France ou encore le Royaume-Uni, par rapport à d'autres groupes thérapeutiques.
La forte utilisation de ces médicaments peut être expliquée par les problèmes de société actuels comme les crises économiques, le chômage, le surmenage professionnel, etc…
Nous pouvons alors nous demander si la consommation de ces molécules psychoactives peut avoir un impact sur leur présence et leur devenir dans les eaux usées et dans les milieux aquatiques. C'est pourquoi, dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons choisi de focaliser notre étude essentiellement sur la famille thérapeutique des psychotropes.

2. Les psychotropes

Par définition, les psychotropes sont des « *substances chimiques agissant sur le système nerveux central, en modifiant certains processus biochimiques et physiologiques cérébraux* ». Les psychotropes sont souvent utilisés pour une indication principale mais aussi pour des indications secondaires, en complément d'autres médicaments. Ainsi, une molécule anxiolytique pourra parfois être utilisée comme hypnotique ou encore comme antidépresseur. Cette classe thérapeutique regroupe de nombreuses sous-classes :

2.1. Les antidépresseurs

Ce sont des substances chimiques qui soulagent les symptômes de la dépression et du trouble de l'humeur. Ils agissent sur les neurotransmetteurs de la sérotonine et de la noradrénaline.
Exemples : Fluoxétine (Prozac®), Citalopram (Seropram®), Venlafaxine (Effexor®), Mirtazapine (Norset®), etc…
Ils peuvent aussi avoir un mode d'action sur la régulation du sommeil souvent perturbé lors d'épisodes dépressifs.
Exemples : Miansérine (Athymil®).
Ces médicaments ont également d'autres indications, en particulier les troubles obsessionnels compulsifs (T.O.C.), les troubles de panique et l'anxiété généralisée.

2.2. Les antiépileptiques

Ces substances chimiques sont souvent utilisées dans la prévention ou le traitement de l'épilepsie. Ils permettent d'atténuer la fréquence des crises voire même de les supprimer mais ils ne guérissent pas la maladie ; c'est donc un traitement continu.
Ces médicaments aussi appelés anticonvulsivants peuvent être aussi préconisés comme des anxiolytiques ou encore des thymorégulateurs.
Exemples : Carbamazépine (Tegretol®), Acide valproïque (Depakine®), Gabapentine (Neurotin®), etc…

2.3. Les anxiolytiques

Aussi appelés « tranquillisants », ces médicaments soignent l'anxiété (insomnie, tremblements, palpitations, irritabilité), l'angoisse et les troubles émotionnels. Ces substances chimiques ne guérissent pas mais atténuent les symptômes.
Exemples : La famille des benzodiazépines : Bromazepam (Lexomil®), Diazepam (Valium®), Lorazepam (Temesta®), Prazepam (Lysanxia®), Oxazépam (Séresta®), Alprazolam (Xanax®), etc…

2.4. Les hypnotiques

Ce sont des médicaments qui traitent les troubles du sommeil. Ces médicaments aussi appelés « somnifères » ; ils vont induire le sommeil.
Exemples : Zopiclone (Imovane®), Zolpidem (Stilnox®), Témazépam (Normison®), etc…

2.5. Les neuroleptiques

Ils vont être utilisés dans le traitement de certaines maladies du système nerveux central comme la psychose, la schizophrénie, les hallucinations ou encore les délires. Ces médicaments aussi appelés « antipsychotiques » vont diminuer les effets des pathologies et vont permettre d'améliorer l'état psychique des patients et ainsi faciliter leur adaptation sociale.
Exemples : Chlorpromazine (Largactil®), Cyamémazine (Tercian®), Amisulpride (Solian®), etc…

2.6. Les thymorégulateurs

Ce sont des régulateurs de l'humeur. Ces médicaments vont soigner les troubles bipolaires, ils vont agir en particulier sur les épisodes dépressifs des patients. Ils permettent de diminuer la fréquence et l'intensité de ces épisodes dits aigus.
Exemples : Carbonate de lithium (Téralithe®).
Les autres médicaments utilisés dans les troubles bipolaires, sont des molécules qui agissent également sur les troubles épileptiques.
Exemples : la Carbamazépine (Tegretol®) et les sels de l'acide valproïque (Depamide®, Depakote®).

2.7. Les substituts aux opiacés

Ce sont des médicaments qui ont pour but de substituer la consommation d'opiacés procurant un effet euphorisant (héroïne, morphine et certains analgésiques) et ainsi d'aider les personnes à stabiliser leur pulsion et leur manque. Ils sont souvent utilisés dans les traitements de sevrage.
Exemple : Méthadone.
Dans cette famille thérapeutique, il y une classe particulière appelée les **Benzodiazépines**. Ce sont des molécules qui agissent sur le système nerveux central avec des propriétés hypnotiques, anxiolytiques, myorelaxantes et anticonvulsivantes (**Tableau I-4**) (ANSM, 2013).

Tableau I-4. 23 benzodiazépines (ou apparentées) commercialisés en France, en 2013.

Sous-classe thérapeutique	Substance active
Anxiolytique	Alprazolam
	Bromazépam
	Clobazam
	Clorazépate
	Clotiazépam
	Diazépam
	Ethyl loflazépate
	Lorazépam
	Nitrazépam
	Oxazépam
	Prazépam
Myorelaxant	Tétrazépam
Hypnotique	Estazolam
	Flunitrazépam
	Loprazolam
	Lormétazépam
	Midazolam
	Nitrazépam
	Témazépam
Apparenté aux benzodiazépines	Zolpidem
	Zopiclone
Anticonvulsivant	Clonazépam
	Midazolam

Le Zolpidem et Zopiclone sont des molécules hypnotiques avec des structures chimiques différentes des benzodiazépines mais qui possèdent le même mécanisme d'action (diminuent l'hyperactivité cérébrale associée à l'anxiété en agissant sur les récepteurs GABA présents sur les neurones) et des effets proches de ceux de cette classe, c'est pourquoi elles y sont apparentées.

En 2012, en France, 23 molécules benzodiazépines étaient commercialisées, 1 français sur 5 consommait chaque année une benzodiazépine ou une molécule apparentée, prescrite le plus souvent par un médecin généraliste et 3 benzodiazépines ont fait l'objet de mesures particulières en 2012 et 2013 : le Clonazépam ; le Tétrazépam et le Flunitrazépam (**Chapitre. 1 section 1.2)**.

Les psychotropes appartenant à la grande famille des médicaments vont avoir des voies d'introduction, un devenir en station d'épuration et dans l'environnement mais aussi une présence dans le compartiment aquatique semblables aux composés pharmaceutiques qui ont des propriétés physico-chimiques proches. C'est pourquoi, dans les **Parties 3**, **4**, **5 et 6** nous parlerons des médicaments en général en essayant d'apporter des exemples pour les psychotropes.

3. Voies d'introduction

Il existe plusieurs voies d'introduction des médicaments à usage humain et vétérinaires dans l'environnement aquatique (**Figure I-10**) :
-les décharges (déchets domestiques)
-l'assainissement individuel
-les rejets directs d'eaux usées et les fuites des égouts
-les rejets d'eaux traitées dans les stations d'épuration
-les épandages de boues résiduaires des STEP
-les déchets des vétérinaires
-les déchets d'élevage (épandages, enfouissements)
-les déjections animales émises directement dans le milieu
-les déversements dans les fermes aquacoles
-les déchets d'industries pharmaceutiques
-les rejets accidentels (industries pharmaceutiques et chimiques)

Une fois ingérés, les médicaments à usage humain vont être plus ou moins transformés dans l'organisme et vont être excrétés principalement par les urines et les fèces soit sous la forme de molécule mère, soit de métabolites (molécules issues de la transformation de la molécule mère par conjugaison, oxydation, réduction et/ou hydrolyse) (Halling-Sorensen et *al*., 1998). Les molécules excrétées transitent alors dans les réseaux d'eaux usées qui rassemblent les rejets des personnes traitées à leur domicile, sur leur lieu de travail ou encore dans les établissements de soin (hôpitaux, cliniques, maisons de retraite, etc…). Ces eaux usées chargées de résidus médicamenteux (RM) sont dirigées vers les stations d'épuration afin d'être traitées avant d'être rejetées dans les eaux superficielles (cours d'eau, lac ou encore milieu marin) (Monpelat et *al*., 2010). La dégradation et/ou l'élimination des médicaments dépendra du composé et des traitements qui lui seront appliqués (Jelic et *al*., 2011). Cependant il arrive lors d'importants épisodes pluvieux que le réseau d'eaux usées soit saturé engendrant un rejet direct *via* les déversoirs d'orage ou les égouts, des eaux usées chargées en médicaments dans les eaux de surface ou les sols à proximité (Musolff et *al*., 2009 ; Del Río et *al*., 2013).
Certains traitements de STEP génèrent des boues dans lesquels les RM y sont piégés. Celles-ci peuvent être utilisées comme fertilisant sur les sols agricoles mais l'arrêté du 08/01/98 du ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie fixe des prescriptions techniques à leur utilisation. Ainsi les boues ne peuvent être épandues si les teneurs dans les sols en certains éléments-traces métalliques et composés-traces organiques (PCB, HAP) dépassent des valeurs limites (Arrêté du 08/01/98, 1998). Cependant aucun RM ne fait partie de cette liste de micropolluants. Ainsi les pluies, les phénomènes de lessivage et de ruissellement pourraient entrainer les RM anciennement piégés dans les boues vers les eaux souterraines et les eaux de surface adjacentes aux terrains agricoles fertilisés (Martin et *al*., 2012).

Les médicaments à usage vétérinaire contenus dans les excréments des animaux d'élevage ainsi que dans les lisiers et fumiers sont épandus sur les sols agricoles. *In fine*, ces RM peuvent se retrouver dans les eaux de surface par ruissellement ou dans les eaux souterraines par infiltration (Capdeville, 2011).

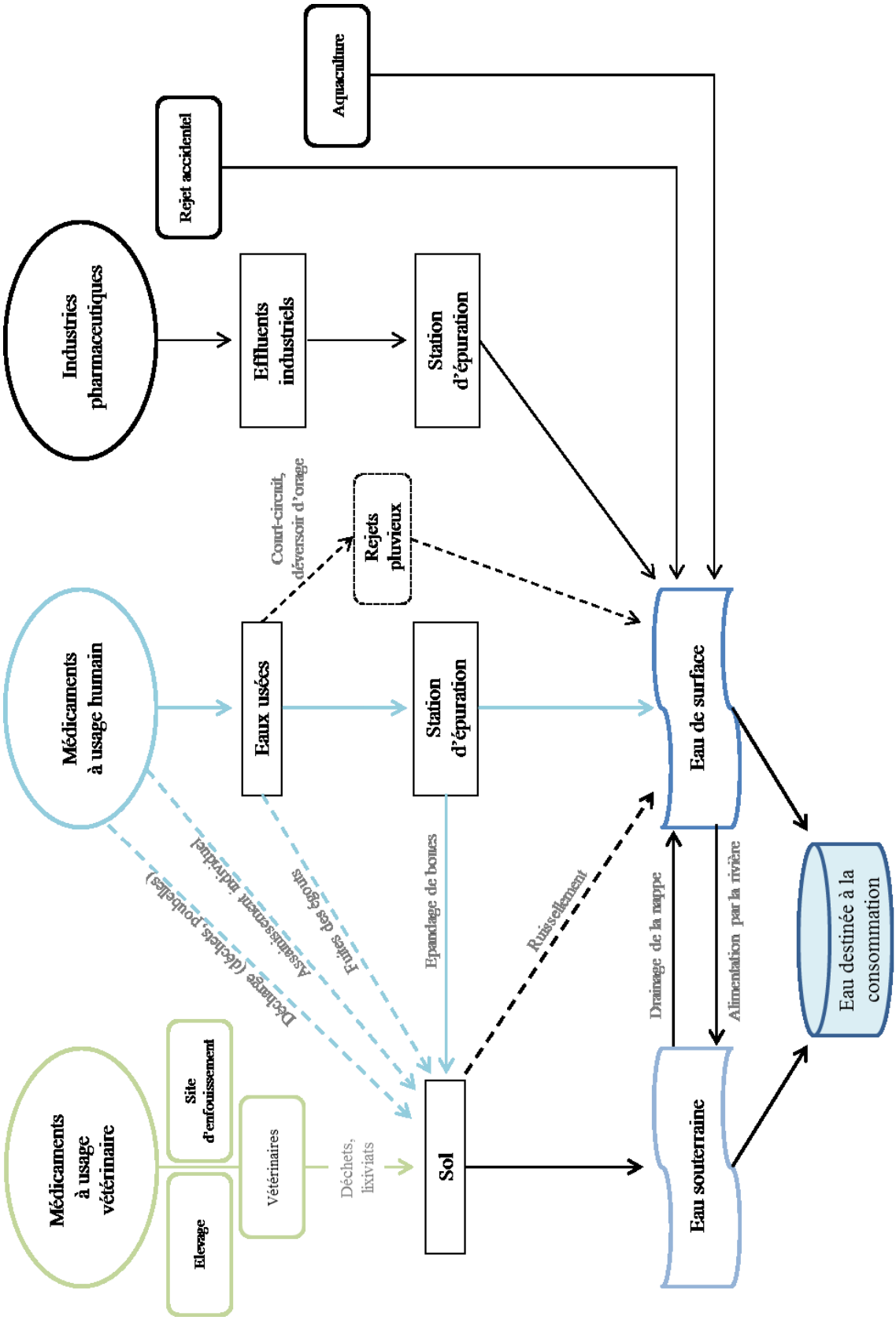


Figure I-10. Voies d'introduction des médicaments à usage humain et vétérinaire dans le milieu aquatique (adaptée de l'Anses, 2011).

Il existe comme autres apports d'introduction de médicaments, les rejets des industries pharmaceutiques et chimiques, même si elles respectent les normes ISO 14000 et la législation sur les installations classées. La revue de Cardoso et *al*. (2014) recense plusieurs études mettant en évidence que les rejets de ces industries contribuent à augmenter les teneurs en médicaments des rejets de STEP auxquelles elles sont raccordées mais aussi des cours d'eau à proximité. En Espagne, l'étude de Collado et *al*. (2014) a signalé des concentrations inhabituelles de deux psychotropes, la Venlafaxine (2659 $ng.L^{-1}$) et la Paroxétine (179 $ng.L^{-1}$) dans les effluents d'une STEP traitant des rejets industriels.

La revue de Cardoso et *al*. (2014) cite aussi des études montrant que les effluents des usines pharmaceutiques induisent un grand nombre d'effets indésirables chez les poissons, les amphibiens et les communautés bactériennes qui pourraient modifier la biodiversité dans le milieu aquatique (Carlsson et *al*., 2009 ; Gunnarsson et *al*., 2009 ; Kristiansson et *al*., 2011 ; Beijer et *al*., 2013).

4. Présence

Une fois ingérés et excrétés par l'homme les médicaments se retrouvent dans les eaux usées. Ces eaux brutes transitent *via* le réseau de collecte vers les stations d'épuration afin d'être traitées.
Le comportement des composés pharmaceutiques dépend d'un grand nombre de processus complexes mais il est aussi influencé par les différentes propriétés physico-chimiques de ces molécules (Sabljic et *al*., 1995 ; Yamamoto et *al*., 2009 ; Li et *al*., 2014):

- Le coefficient de partage octanol-eau (Kow) permet de définir si la molécule est hydrophile ou lipophile. Un composé est considéré liposoluble quand son log (Kow) > 5 (Tissier et *al*., 2005).
- Le pKa qui est le logarithme de la constante d'acidité (Ka), dépend de la nature et conditions du milieu (ex. pH, solvant, température, etc…). Cette constante va alors nous informer du degré de dissociation d'un acide.
- La solubilité du composé dans l'eau correspond à sa concentration de saturation dans l'eau à une température donnée. Une molécule avec une solubilité <1 $mg.L^{-1}$ est dite non soluble (Tissier et *al*., 2005).
- Le coefficient de partage entre la fraction de carbone organique et l'eau dans le sol ou le sédiment (Koc), indique approximativement le degré d'adsorption d'une molécule sur un milieu donné et dépend de la teneur en carbone organique. Un composé avec un log Koc > 3 est significativement adsorbable (Tissier et *al*., 2005).

Ces différentes caractéristiques physico-chimiques peuvent rendre le comportement des molécules pharmaceutiques complexe. Généralement les composés pharmaceutiques sont polaires, solubles dans l'eau, ionisables et faiblement volatiles, ce qui favorisent leur mobilité dans le milieu aquatique et modèrent leur rétentions sur les boues et les sédiments (Monpelat et al., 2010). Les travaux de Yamamoto et *al*. (2009), montrent que les composés avec un groupement amine (Aténolol, Ifenprodil et Propranolol) ont un log Koc plus élevé que les acides carboxylique (Ibuprofène, Indométacine et l'Acide méfénamique) ou les neutres (Acétaminophène et Carbamazépine), ce qui engendre des interactions hydrophobes jouant un rôle dans l'adsorption de ces composés sur le sédiment ou les boues.

4.1. Présence dans les stations d'épuration

Les stations d'épuration ont pour objectif de traiter les eaux usées en éliminant les matières solides, les matières dissoutes organiques, les nutriments mais aussi les micropolluants, afin de pouvoir rejeter dans l'environnement des eaux respectant les normes de qualités.
Cette partie s'attache à montrer l'efficacité d'élimination des traitements épuratoires vis-à-vis des composés pharmaceutiques et en particulier des psychotropes.

a) Le traitement primaire
Ce traitement intervient après l'étape de prétraitement (dégrillage, dessablage et dégraissage) qui permet d'éliminer les éléments solides ou particulaires les plus grossiers. Le traitement primaire consiste en une décantation des particules en suspension présentes dans les eaux

d'entrée de STEP. Les particules séparées de la phase dissoute se déposent au fond du décanteur pour former les boues primaires qui sont alors récupérées par raclage. Le traitement primaire élimine 50 à 55% des matières en suspension et réduit d'environ 30% la demande biochimique en oxygène (DBO) et la demande chimique en oxygène (DCO). Le piégeage des matières en suspension (MES) permet l'élimination des contaminants organiques hydrophobes (ex : HAP) et des métaux adsorbables (ex : Hg, Cu, Ag, Cd) (Choubert et *al*., 2011).
Ce traitement reste cependant insuffisant pour toutes les molécules hydrosolubles comme la majorité des médicaments. L'élimination par ce traitement est efficace pour les médicaments avec un log Kow > 4 (ex : Sertraline et Imipramine). De manière générale, l'adsorption sur les particules de boues primaires est limitée (Behera et *al*., 2011 ; Soulier *al*., 2011). L'étude de Carballa et *al*. (2004) montre que lors de l'étape de coagulation-floculation le Diazépam n'est éliminé qu'à 25 % et que la Carbamazépine n'est pas du tout affectée par ce traitement. Ces résultats sont aussi confirmés dans l'étude de Subedi et Kannan (2015) qui montre que la Carbamazépine n'est pas éliminée lors du traitement primaire et que ce traitement a une efficacité d'élimination sur la Sertraline de 55%, de 35% sur le Diazépam, de 15% sur le Citalopram et 10% sur l'Oxazépam.

b) Le traitement secondaire
Le traitement secondaire est un traitement biologique réalisé par des bactéries. Les microorganismes éliminent la matière organique dissoute biodégradable (carbone, azote, phosphore) contenue dans les eaux usées. Il existe des procédés biologiques à cultures libres (boues activées, bioréacteur à membranes) où les bactéries sont en contact permanent avec les matières polluantes et des procédés biologiques à cultures fixées (bio-filtres, lits bactériens, disques biologiques, filtres plantés) où les bactéries se développent sur un support (biofilm). A l'issue du traitement secondaire, des boues biologiques provenant de la dégradation des matières organiques sont récupérées.
Lors du traitement secondaire les contaminants sont soumis à plusieurs processus : dispersion, dilution, adsorption, biodégradation et transformation abiotique (Luo et *al*., 2014). Ces nombreux mécanismes vont engendrer l'élimination des composés parents (Jelic et *al*., 2011). Néanmoins, la biodégradation et l'adsorption sont les processus majeurs d'élimination durant ce traitement (Verlicchi et *al*., 2012). Les travaux de Lajeunesse et *al*. (2012) montrent que le traitement secondaire par élimination des nutriments biologiques est plus efficace qu'un traitement primaire sur l'ensemble des antidépresseurs étudiés.
Exemples : Citalopram : 32% ; Sertraline : 35% ; Amitriptyline : 55% ; Carbamazépine : 11% ou encore Mirtazapine ; 62%.
Généralement les composés qui ont tendance à s'adsorber sur les solides vont être mieux éliminés par le traitement à boues activées que par les autres traitements secondaires (lits bactériens, lagunes anaérobique, etc…). Ceci peut être dû à l'aération forcée et à la grande quantité de boues utilisés lors de ce traitement (Camacho-Muñoz et *al*., 2012). Les travaux de Yamamoto et *al*. (2009) montrent que les 8 composés étudiés (Aténolol, Ifenprodil, Propranolol, Acétaminophène, Ibuprofène, Carbamazépine, Indométacine, Acide méfénamique) sont facilement dégradés dans les boues activées.

De manière générale, le traitement par boues activées s'est révélé être un processus efficace pour l'élimination des composés pharmaceutiques, des drogues illicites, des produits de soins personnels et des perturbateurs endocriniens (Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009). Cependant l'étude de Radjenović et *al*. (2009) explique que le traitement secondaire par bioréacteur à membrane (MBR) est plus efficace que ceux par boues activées, car il permet d'éliminer un plus large spectre de micropolluants même ceux résistant aux boues activées.

c) Traitement tertiaire

Le traitement tertiaire est mis après un traitement secondaire comme ultime étape pour éliminer les substances fertilisantes (phosphate et nitrate) ou les germes pathogènes. Ce traitement utilise des procédés biologiques, chimiques ou physico-chimiques. Le plus connu est le traitement par ozonation.

L'ozone peut dégrader les contaminants directement (ex : Carbamazépine) ou indirectement (via la formation d'agent oxydant comme $HO^{\bullet}$) (ex : Méprobamate) (Luo et *al*., 2014).

Les travaux de Hollender et *al*. (2009) trouvent que l'ozonation contribue à l'élimination de 40 à 50% du Naproxène, de l'Aténolol et de la Clarithromycine ; 60 à 70% du Métoprolol et du Sulfaméthoxazole et enfin à plus de 80% du Diclofénac et de la Carbamazépine sur toutes les stations d'épuration qui ont été étudiées. De même, les travaux de Soulier *al*. (2011) constate que le traitement par ozonation plusieurs psychotropes ont des rendements d'élimination supérieur à 70% comme la Carbamazépine, l'Amitriptyline, le Bromazépam ou encore la Fluoxétine. Cependant cette étude montre aussi que ce procédé ne permet la complète suppression des composés pharmaceutiques comme la Caféine et le Nordiazépam qui ont des rendements d'élimination compris entre 30 et 70 %.

Les travaux de Luo et *al*. (2014) comparent les différents traitements qui peuvent être mis en place dans des STEP et montrent que les traitements dits « à faible coût » (utilisés dans les petites agglomérations, ex : lits bactériens ou lagunes) sont moins efficaces pour les composés pharmaceutiques que les traitements dits « conventionnels » (ex : boues activées). De même, l'étude montre que les traitements « conventionnels » sont eux aussi moins efficaces pour éliminer les médicaments que les traitements avancés (traitement tertiaire, ex : ozonation ou UV) (**Tableau I-5**).

Tableau I-5. Comparaison de l'efficacité d'élimination des composés pharmaceutiques dans différentes stations d'épuration (adaptée de Luo et *al*., 2014).

Composés	Elimination en % dans différentes STEP		
	Conventionnelles	A faible coût	Avancées
Ibuprofène	72 - 100	17 - > 99	> 99
Diclofénac	< 0 - 81	0 - 96	89 - 100
Kétoprofène	11 - 100	0 - 99	69 - 95
Carbamazépine	< 0 - 62	0 - 66	60 - 100

Bien que les différents traitements mis en place dans les stations d'épuration permettent d'éliminer une partie des composés pharmaceutiques, quelques études ont trouvé que pour certains composés la concentration en sortie de STEP était supérieure à celle en entrée de STEP. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence de substances (ex : métabolites humains ou

produits de transformation dans l'entrée de STEP) qui vont être transformées en composés parents lors du traitement biologique. Une autre explication est que les composés sont enfermés dans les particules de matière fécale et seront libérés lors du traitement biologique (Göbel et *al*., 2007 ; Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009). Calisto et Esteves (2009) constatent que les benzodiazépines sont largement métabolisées dans le foie en une forme glucuro-conjuguée, pharmacologiquement inactive, qui est ensuite déconjuguée en composé parent par une enzyme, la β-glucuronidase, qui est produite par les bactéries fécales comme *Escherichia coli*. Ainsi ce processus de déconjugaison va augmenter la quantité de composés parents en sortie de STEP (Ternes, 1998 ; Calisto et Esteves, 2009).
Cette élimination négative peut être aussi le résultat d'un échantillonnage approximatif dû à la fluctuation des concentrations dans les STEP mais aussi à une incertitude analytique ou encore à une désorption des composés des boues ou des particules en suspension (Clara et *al*., 2004 ; Kasprzyk-Hordern et *al*., 2007 ; Durán-Álvarez et *al*., 2012).

Les psychotropes se comportent comme la plupart des médicaments, le traitement primaire est peu ou pas efficace pour l'élimination de ces composés. Seulement les molécules les plus hydrophobes (log Kow > 4) vont être partiellement éliminées et adsorber sur le sédiment ou les boues.
Exemples : la Sertraline, l'Amitriptyline ou l'Imipramine (Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009 ; Soulier et *al*., 2011 ; Subedi et *al*., 2015).
Le traitement secondaire est plus efficace mais cela dépend aussi des types de procédés utilisés. Kasprzyk-Hordern et *al*. (2009) montrent que le traitement secondaire à boues activées va avoir une efficacité d'élimination de 85 % sur la Gabapentine alors que le traitement à lit bactérien ne va avoir aucun effet sur cette molécule. Enfin les traitements tertiaires vont être plus efficaces que les traitements secondaires mais leur performance épuratoire va aussi dépendre des traitements utilisés. Soulier et *al*. (2011) montre que les traitements tertiaires avancés comme l'ozonation, l'osmose inverse et la filtration sur charbon actif vont donner des rendements d'élimination supérieurs à 70% pour la plupart des psychotropes étudiés alors que les traitements tertiaires d'affinage ont une efficacité épuratoire plus faible.
Cette partie montre bien qu'il est utile d'étudier la présence des psychotropes dans les STEP car selon les propriétés physico-chimiques des molécules et selon les procédés utilisés dans les stations d'épurations étudiées, ces composés vont être plus ou moins retrouvés dans les effluents de sortie et donc dans l'environnement.

4.2. Présence dans l'environnement

Les composés pharmaceutiques sont donc principalement apportés dans le milieu aquatique par les rejets continus des stations d'épuration (Bucheberger, 2007). Le comportement de ces molécules dans l'environnement est lié à plusieurs phénomènes : le transport, l'adsorption et la dégradation (abiotique et biotique).

Le transport des molécules pharmaceutiques dans l'environnement dépend essentiellement de leur degré d'atténuation naturelle (adsorption, biodégradation, photodégradation, etc…) et de leur caractéristique physico-chimique (Li et *al*., 2014 ; Salbjic et *al*., 1995).

Dans les eaux de surface, les niveaux de concentrations des composés pharmaceutiques diminuent suite à l'intervention de plusieurs phénomènes physico-chimiques et biologiques (Mompelat et *al*., 2009).:

- la dilution par les masses d'eau
- l'adsorption sur les particules solides, les colloïdes ou encore la matière organique dissoute
- la photolyse directe ou indirecte
- la biodégradation

L'adsorption sur le sédiment est souvent corrélée au log Kow du composé. L'étude de Rogers (1996) propose de caractériser la mobilité des composés organiques en fonction de la valeur de leur log Kow. Ainsi, les composés avec un log Kow < 2,5 ont une faible adsorption, ceux avec un log Kow entre 2,5 et 4 sont moyennement adsorbés et enfin ceux avec un log Kow > 4 sont fortement adsorbés. Cependant, les travaux de Löffler et *al*. (2005) ont montré que les composés ayant des log Kow < 2,5 ou entre 2,5 et 4 comme l'Oxazépam, la Carbamazépine ou encore l'Ivermectine avaient une faible dégradation mais une forte adsorption sur le sédiment. Donc ce paramètre à lui seul ne suffit pas à définir l'adsorption d'un composé. De même l'étude de Pal et *al*. (2010) a montré qu'une molécule avec un log Kow > 5 et un faible poids moléculaire a un coefficient d'adsorption élevé et sera alors facilement adsorbée sur le sédiment. Ce qui est généralement le cas des composés pharmaceutiques avec une fonction amine comme l'Aténolol, le Propranolol ou la Fluoxétine. Au contraire, les composés pharmaceutiques neutres ou avec un groupement acide carboxylique ont, quant à eux, un coefficient d'adsorption plus faible. Leur présence est donc déterminé par d'autres phénomènes comme la dégradation (Yamamoto et *al*., 2009).
L'étude de Schultz et *al*. (2011) a révélé la présence de Fluoxétine dans les sédiments d'un ruisseau impacté par une station d'épuration, à des concentrations allant de 0,4 à 19,4 $ng.g^{-1}$. Cette étude a aussi constaté la présence d'autres psychotropes tels que la Norfluoxétine, la Sertraline, la Norsertraline, le Citalopram, la Paroxétine et la Venlafaxine.

L'adsorption d'une molécule dépend aussi de la qualité de la matière organique du sédiment et de son degré d'adsorption (Martínez-Hernández et *al*., 2014). De plus, l'étude de Schaffer et *al*. (2012) a montré que le degré d'ionisation des composés, qui est lié au pH de l'environnement, est un facteur supplémentaire pouvant jouer sur l'adsorption du composé dans le sédiment.

La dégradation des médicaments peut être de type abiotique et induite par la lumière, on parle de photodégradtion. C'est une transformation chimique qui dépend de l'intensité du rayonnement solaire, de la profondeur de l'eau, de la composition de la matière organique, des conditions d'eutrophisation du milieu, de la latitude et des saisons (Mompelat et *al*., 2009).
La photodégradation peut être directe par adsorption de photons induisant une transformation chimique ou indirecte par l'intermédiaire de radicaux générés par l'irradiation des nitrates ou des

acides humiques (Andreozzi et *al*., 2003 ; Boreen et *a*l., 2003). Les travaux de Yamamoto et *al*. (2009) montrent que sur les 8 composés étudiés seulement 3 composés (Propranolol, Indométacine et Ifenprodil) sont facilement dégradés par la lumière alors que les 5 autres dont la Carbamazépine et la Fluoxétine sont relativement persistants à la photodégradation. De même l'étude de Calisto et *al*. (2011) sur la photodégradation des benzodiazépines dans l'environnement aquatique, constate que l'Oxazépam, le Diazépam et l'Alprazolam sont résistants à la photodégradation. Sur l'ensemble des composés étudiés, seulement le Lorazépam est sensible à ce type de dégradation.

Cependant la photodégradation peut contribuer à la formation de produits de transformation peu ou pas connus avec des propriétés physico-chimiques et biologiques nouvelles et dont leur persistance dans l'environnement est méconnue. De plus ces produits de photodégradation peuvent être plus toxiques que la molécule mère et avoir des propriétés génotoxique et mutagène (Chiron et *al*., 2006). La **Figure I-11** montre les produits de transformation de 4 psychotropes (Oxazépam, Diazépam, Lorazépam et Alprazolam) après photodégradation.

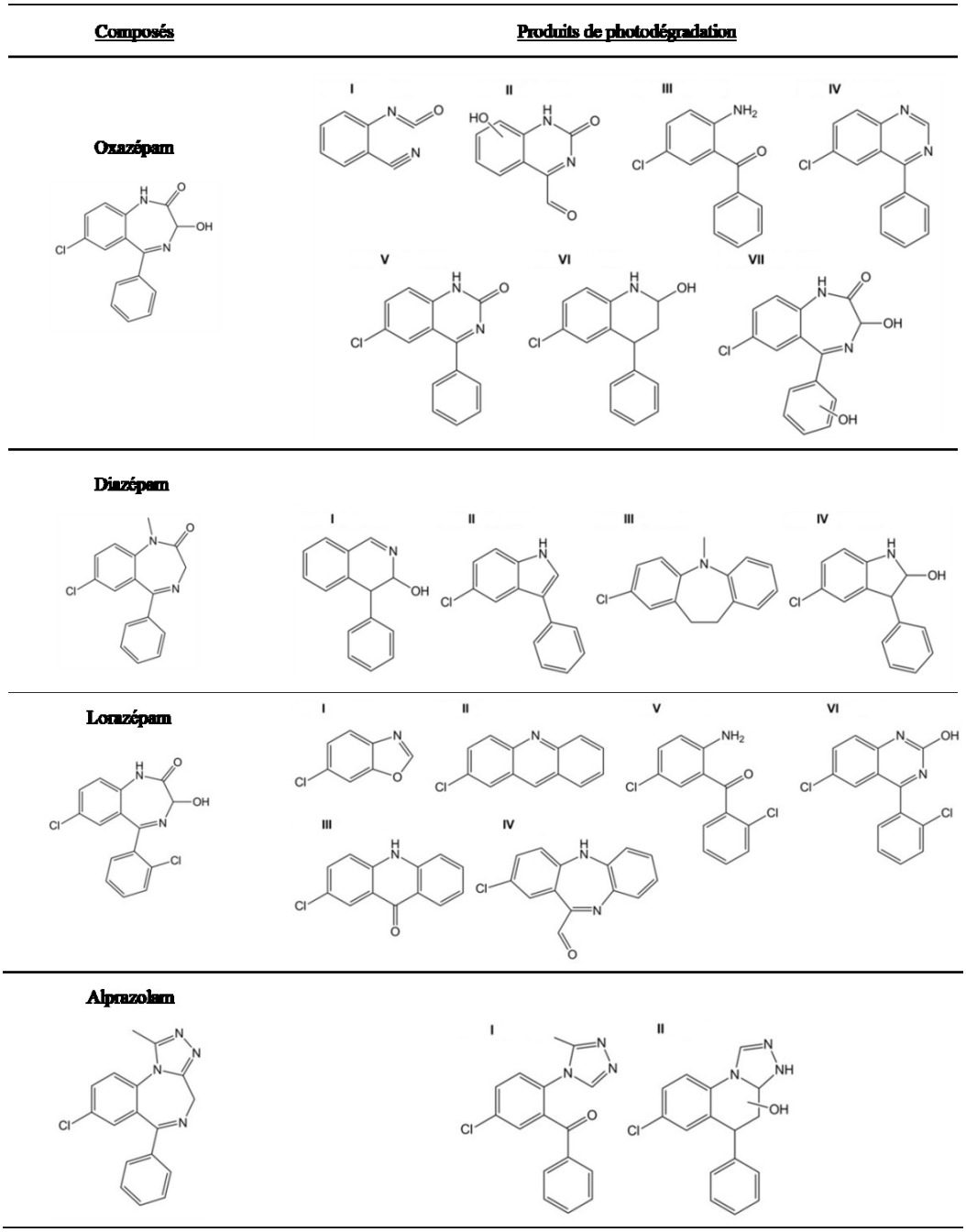


Figure I-11. Produits de photodégradation de l'Oxazépam, le Diazépam, le Lorazépam et l'Alprazolam (source : Calisto et *al*., 2011)

L'autre type de dégradation est dite biotique ; on parle de biodégradation par les micro-organismes. Quelques travaux ont montré que la biodégradation dans l'eau naturelle était insignifiante. Plusieurs composés pharmaceutiques ne sont pas biodégradables dans l'eau mais ceux qui le sont vont mettre plusieurs mois pour se dégrader (Buerge et *al*., 2006 ; Pérez et Barceló, 2007). L'étude de Yamamoto et *al*. (2009) confirme ce résultat et montre que les 8 composés choisis sont résistants à la dégradation microbienne de la rivière étudiée.

Néanmoins, au niveau du sol, la biodégradation est plus active car les micro-organismes y sont très présents. Les travaux de Suga et *al*. (2013) montrent que l'Oxytétracycline met 30 jours pour être presque totalement éliminée de la colonne d'eau par adsorption dans le sédiment et biodégradée par les micro-organismes présents dans celui-ci. Cette étude explique alors que le sédiment a une plus grande capacité à éliminer le composé étudié que la colonne d'eau.
Cette dégradation bactérienne peut conduire à l'élimination totale ou partielle des composés. Les travaux de Kosjek et *al*. (2012) constatent que le Diazépam est partiellement dégradé en plusieurs produits dont l'Oxazépam, le Témazépam ou encore le Nordiazépam. Ainsi la biodégradation contribue à la formation de produits qui peuvent être stables ou biodégradables, actifs ou non actifs et engendre une augmentation du nombre de molécules présentes dans le milieu aquatique.
Enfin, la biodégradation des composés pharmaceutiques est généralement plus efficace dans les boues activées des traitement biologique des STEP que dans les sédiments naturels (Yamamoto et *al*., 2009).

Bien que l'atténuation naturelle soit un processus essentiel pour diminuer les concentrations en médicaments dans l'environnement, les différentes études de la littérature suggèrent que ces mécanismes ne sont pas assez efficaces. En effet, certains composés sont résistants à toute sorte de dégradation et sont donc persistants dans le milieu aquatique. C'est le cas de la Carbamazépine et du Diazépam (Loffler et *al*., 2005) qui sont des molécules persistantes dans les stations d'épuration mais aussi dans l'environnement. Cependant il ne faut pas corréler la transformation environnementale avec la métabolisation humaine car bien que la Carbamazépine et le Diazépam soient stables dans le milieu aquatique, ils sont très rapidement métabolisés dans le corps humain (Loffler et *al*., 2005).

Les psychotropes non traités par les STEP et rejetés dans le milieu aquatique ont un caractère hydrosoluble ainsi l'atténuation naturelle par des phénomènes d'adsorption, photodégradation ou encore biodégradation ne permet qu'une élimination partielle de ces composés. De plus, certains d'entre eux comme la Carbamazépine sont persistants dans l'environnement (Barra Caracciolo et *al*., 2015). Il est donc important de s'intéresser à la présence dans l'environnement de cette famille thérapeutique.

5. Devenir dans l'environnement

La problématique du devenir des composés pharmaceutiques dans l'environnement a été abordée pour la première fois aux Etats-Unis dans les années 70 (Garrison et *al*., 1976 ; Hignite et Hazarnoff., 1977). Les avancées sur les techniques analytiques ont permis d'améliorer la détection des composés pharmaceutiques dans de nombreuses matrices aqueuses : entrée et sortie de STEP, eaux de surface, eaux souterraines, eaux marines et eaux de boissons. Ces progrès ont aussi permis de trouver ces composés à des limites de détection allant de quelques $ng.L^{-1}$ à quelques $\mu g.L^{-1}$. Ainsi de nombreux projets ont été mis en place afin d'évaluer les niveaux d'occurrence des composés pharmaceutiques dans divers compartiments aquatiques. Parmi eux, KNAPPE qui est un projet européen, a permis de faire un bilan sur l'état des connaissances sur le devenir des composés pharmaceutiques dans les milieux aqueux entre 1998 et 2007. A partir de plusieurs bases de données (publications scientifiques, projets nationaux et internationaux, etc…), ces travaux ont permis d'établir une liste de 135 composés pharmaceutiques détectés dans l'environnement (Schlüsener et *al.*, 2008).

Ce projet a mis en évidence que les milieux les plus étudiés sont les eaux de surfaces (43%) et les effluents de STEP (32%) et que les familles thérapeutiques les plus recherchées sont les antibiotiques, les anti-inflammatoires, les analgésiques, les bêtabloquants et les antiépileptiques/anxiolytiques (**Figure I-12**).

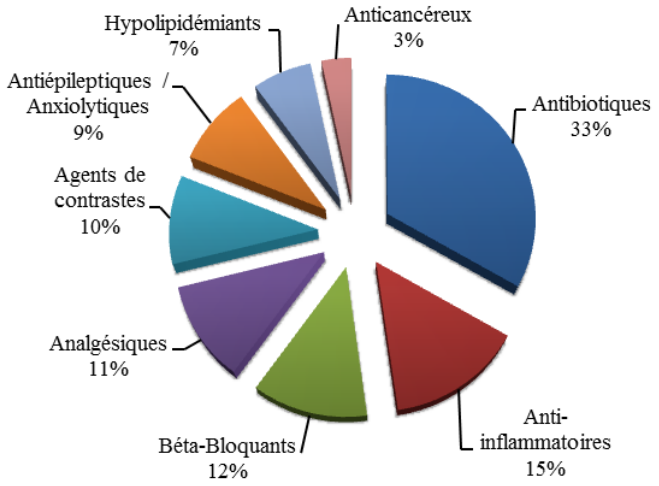
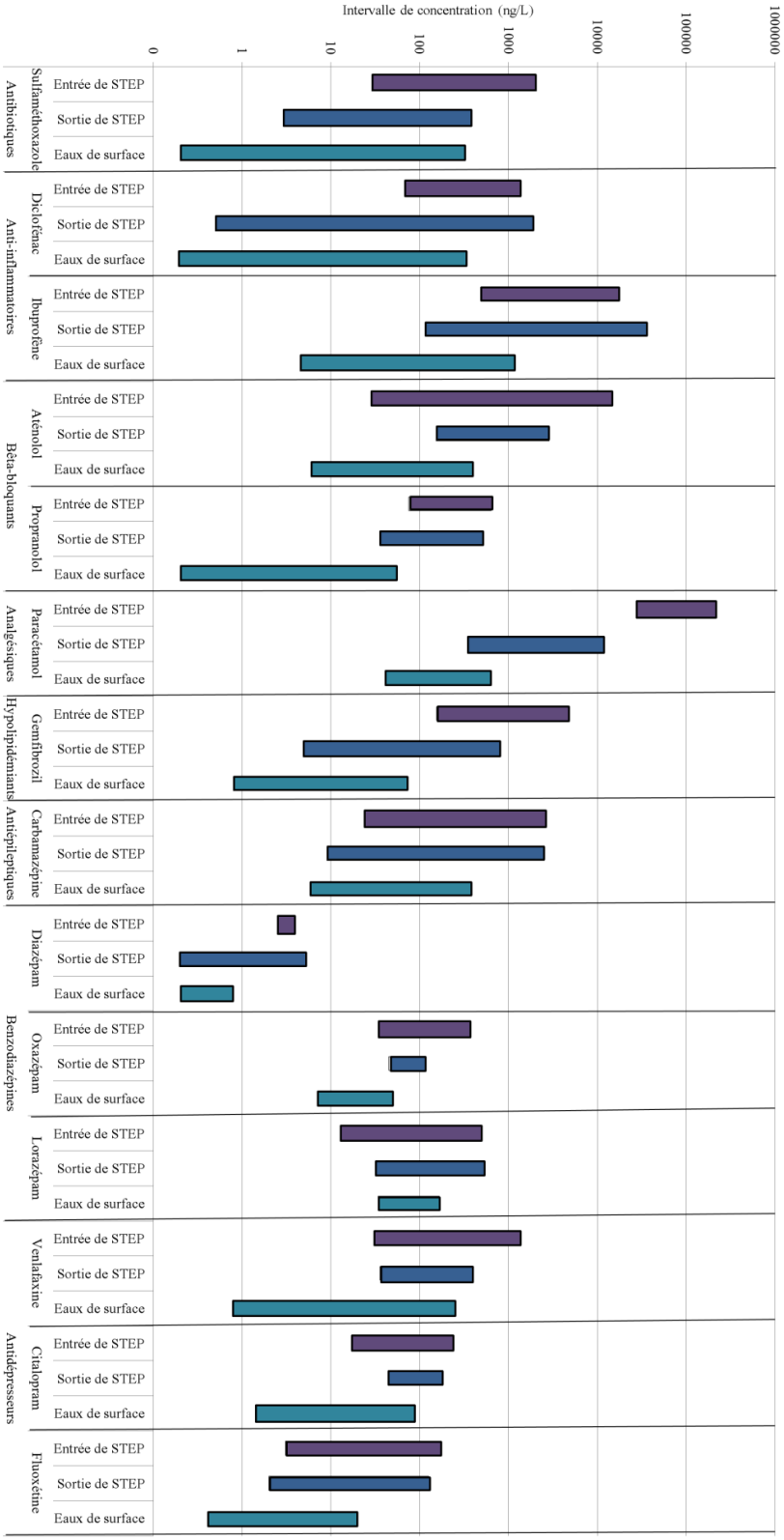


Figure I-12. Pourcentage des études publiées sur différentes famille thérapeutiques, sur 112 articles publiés entre1998 et 2007 (adaptée de Schlüsener et *al*., 2008).

A partir de 28 articles scientifiques sélectionnés (Lee et *al*., 2005 ; Gros et *al*., 2006 ; Vanderford et Snyder, 2006 ; Vieno et *al*., 2006 ; Lajeunesse et *al*., 2008 ; Schultz et Furlong, 2008 ; Togola et Budzinski, 2008 ; Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009 ; Miège et *al*., 2009 ; Gonzalez Alonso et *al*., 2010 ; Huerta-Fontela et *al*., 2010 ; Morash et *al*., 2010 ; Pal et *al*., 2010 ; Unceta et *al*., 2010 ; Baker et Kasprzyk-Hordern, 2011 ; Ferreira da Silva et *al*., 2011 ; Ferrer et *al*., 2012 ; Grabic et *al*., 2012 ; Hass et *al*., 2012 ; Lajeunesse et *al*., 2012 ; Idder et *al*., 2013 ; Deblonde et *al*., 2014 ; Giebultowicz et Nalecz-Jawecki, 2014 ; Petrie et *al*., 2014 ; Mendoza et *al*., 2014 ; Petrović et *al*., 2014 ; Racamonde et *al*., 2014 ; Sheng et *al*., 2014) sur l'occurrence des composés pharmaceutiques dans le milieu aqueux, nous avons établi un tableau présentant quelques données de concentrations d'une sélection de 14 composés pharmaceutiques (Sulfaméthoxazole, Diclofénac, Ibuprofène, Aténolol, Propranolol, Paracétamol, Gemfibrozil, Carbamazépine, Diazépam, Oxazépam, Lorazépam, Venlafaxine, Citalopram et Fluoxétine) en entrée de STEP, en sortie de STEP et dans les eaux de surface (**Tableau I-6**).

Tableau I-6. Intervalle de concentrations de 14 composés sélectionnés dans 3 matrices aqueuses : entrée de STEP, sortie de STEP et eaux de surface. L'intervalle de concentrations est représenté par la valeur minimale et maximale trouvées dans la littérature (utilisation d'une échelle logarithme en base 10, 0=0,1 ng/L).



La famille thérapeutique des antibiotiques est faiblement dégradée par les stations d'épuration. Le taux d'abattement varie en fonction du type de traitement utilisé. Dans l'étude de Behera et *al*. (2011) ce phénomène est observé avec le Sulfaméthoxazole qui a des taux d'élimination qui varient entre 25% et 80% selon les 5 traitements appliqués. De même pour l'Erythromycine qui a un taux d'élimination de 50% lors de traitement à boues activées et de 100% lors de traitement à lit bactérien (Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009). Ainsi ces variations d'éliminations vont jouer un rôle sur les niveaux de concentrations retrouvés dans les eaux de surface. D'après le **Tableau I-6**, l'intervalle de concentration pour le Sulfaméthoxazole dans l'eau de surface fluctue entre 0,2 et 320 $ng.L^{-1}$. Dans les eaux souterraines ce même composé est détecté à une concentration maximale de 170 $ng.L^{-1}$ en Californie (Fram et Belitz, 2011) et dans les eaux de boissons à une concentration maximale de 12,7 ± 3,6 $ng.L^{-1}$ dans le Sud-Est des Etats-Unis (Padhye et *al*., 2014).

Les anti-inflammatoires et les analgésiques sont des familles thérapeutiques souvent retrouvées dans les STEP et dans les eaux de surface. Parmi ces deux familles, les composés les plus étudiés et détectés sont l'Ibuprofène, le Paracétamol et le Diclofénac. L'élimination de l'Ibuprofène et du Paracétamol par les STEP est très efficace, leurs taux d'abattement sont alors compris entre 80 et 100%. Pour le Diclofénac les taux d'élimination vont beaucoup varier (< 0 – 81,4%) en fonction des traitements mis en place par les stations d'épuration (Behera et *al*., 2011 ; Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009 ; Luo et *al*., 2014). Concernant le Paracétamol, bien que les concentrations en entrée de STEP puissent être supérieures à 200 000 $ng.L^{-1}$, ce composé assez bien dégradé est retrouvé dans les eaux de surface à des niveaux de concentrations allant de 41 à 615 $ng.L^{-1}$ (**Tableau I-6**). Pour le Diclofénac, les concentrations dans les eaux de surface sont comprises entre 0,2 et 324 $ng.L^{-1}$ alors qu'il peut atteindre des concentrations de 1 880 $ng.L^{-1}$ en sortie de STEP.
L'étude de Togola et Budzinski (2008) confirme la présence du Diclofénac et de l'Ibuprofène dans les effluents de STEP et les eaux de surface. De plus les auteurs mettent en avant la présence de ces composés dans les eaux de boissons mais à de faibles concentrations (< 5 $ng.L^{-1}$).

La Carbamazépine est une molécule définie comme traceur des rejets de STEP car elle est résistante aux traitements épuratoires et ses taux d'élimination peuvent aller de -50% jusqu'à 62% (Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009 ; Behera et *al*., 2011 ; Luo et *al*., 2014). De plus cette molécule est aussi persistante aux atténuations naturelles donc elle est souvent détectée dans les eaux de surface avec des niveaux de concentration dépassant la centaine de $ng.L^{-1}$ (Santos et *al*., 2010 ; Luo et *al*., 2014) (**Tableau I-6**). De par sa persistance, cette molécule est aussi détectée dans les eaux souterraines et les eaux de boissons à des concentrations non négligeables, de l'ordre de la dizaine de $ng.L^{-1}$ (Togola et Budzinski, 2008 ; Luo et *al*., 2014).

Les antidépresseurs et les benzodiazépines sont des molécules qui sont peu ou moyennement éliminées par les procédés mis en place dans les STEP. L'étude de Baker et Kasprzyk-Hordern (2013) montre que les STEP étudiées utilisant un traitement secondaire à lit bactérien ou à boues activées ont une efficacité d'élimination comprise entre 40 et 50% pour la Fluoxétine, entre 25 et 40% pour la Venlafaxine mais sont inefficaces pour l'élimination de l'Oxazépam. Les

données d'occurrence en STEP de l'Oxazépam, le Diazépam, le Lorazépam, la Venlafaxine, le Citalopram et la Fluoxétine présentées dans le **Tableau I-6** confirment ces résultats. De plus ces valeurs montrent que ce sont des composés qui sont généralement détectées en sortie de STEP à des concentrations pouvant aller jusqu'à la centaine de $ng.L^{-1}$. Ainsi ces composés psychotropes faiblement éliminés sont retrouvés dans le milieu aquatiques à des concentrations non négligeables et pouvant atteindre pour certains (Lorazépam et Venlafaxine) la centaine de $ng.L^{-1}$ (Gonzalez Alonso et *al*., 2010 ; Huerta –Fontela et *al*., 2010 ; Giebultowicz et Nalecz-Jawecki, 2014 ; Mendoza et *al*., 2014).
Bien que les rejets de STEP contribuent en majorité à la présence des composés pharmaceutiques dans les compartiments aquatiques, il faut noter que la morphologie du milieu récepteur joue aussi un rôle dans ce phénomène. Ainsi un grand hydrosystème comme un estuaire peut diluer plus efficacement les contaminants et donc avoir des niveaux de contamination en résidus médicamenteux beaucoup plus faibles qu'une rivière.

Le devenir de composés pharmaceutiques dans les eaux souterraines et dans les eaux de boissons peut être le résultat de ruissellement ou d'infiltration des sols d'élevage, d'interaction entre les eaux de surface et les eaux souterraines ou encore d'un traitement de potabilisation peu efficace pour la décontamination. De plus, les composés qui vont être retrouvés dans ces compartiments aquatiques sont soit très consommés, soit très persistants.

Pour finir, les avancées dans les techniques analytiques ont aussi permis de détecter la présence de composés pharmaceutiques dans des matrices plus complexes que les matrices aqueuses telles que les sols, les sédiments ou encore les particules en suspension (Ferreira da Silva et *al*., 2011 ; Li et *al*., 2014). Ainsi l'ubiquité de ces composés les rend accessibles aux organismes biologiques. C'est pourquoi depuis quelques années les scientifiques s'intéressent aux effets toxiques de ces molécules sur le vivant.

La famille des psychotropes est constituée de composés qui sont peu éliminés par les STEP, qui ont une faible atténuation naturelle et certains d'entre eux sont persistants dans l'environnement. C'est pourquoi ces composés sont détectés dans le milieu aquatique à des concentrations qui vont de quelque $ng.L^{-1}$ à la centaine de $ng.L^{-1}$. De plus, leur devenir dans l'environnement et les niveaux de concentrations auxquelles ils sont détectés vont être influencés par la zone géographique étudiée et de sa démographie, par les habitudes de prescription et de consommation de la population étudiée, par les procédés épuratoires utilisés par les STEP mais aussi par les facteurs environnementaux des sites d'échantillonnage.
Il est donc important de continuer à documenter sur le devenir de cette famille thérapeutique dans les différents milieux aquatiques en France et à l'étranger.

---

6. Toxicité et risque

Les composés pharmaceutiques sont produits pour agir sur une cible spécifique (voie moléculaire ou métabolique) chez l'humain ou l'animal. Cependant quand ils sont introduits dans le milieu aquatique ils peuvent affecter des organismes non ciblés ayant des organes, des tissus ou des cellules cibles identiques ou similaires à ceux des organismes ciblés. C'est pourquoi ces composés peuvent être responsables d'effets néfastes pour les organismes (toxicité) mais aussi les écosystèmes (écotoxicité).
Il existe deux types de toxicité :

-la toxicité aigüe qui est une toxicité à court terme résultant d'une exposition courte à une forte dose d'un xénobiotique.

-la toxicité chronique qui est une toxicité à long terme et qui résulte d'une exposition prolongée à une dose plus ou moins faible d'un contaminant.

Depuis plusieurs années les scientifiques s'intéressent aussi aux effets des mélanges de composés pharmaceutiques. Les différentes études ont montré qu'en mélange ces composés pouvaient avoir des effets additifs, synergiques ou antagonistes (Cleuvers et *al*., 2003 ; Eguchi et *al*., 2004 ; Schnell et *al*., 2009 ; Gust et *al*., 2013).

6.1. Toxicité aigüe

Cette toxicité est généralement mesurée par la CE50 qui est la concentration efficace médiane (ou CL50 qui est la concentration létale médiane). Elle correspond à la concentration pour laquelle un effet maximal a été observé pour 50% des individus exposés. L'évaluation de cette toxicité se fait à partir de tests standardisés (ISO, OECD, etc…) et sur des organismes sélectionnés tels que des algues, des poissons et des invertébrés. De plus, les valeurs de CE50 doivent être données pour une durée d'exposition et une espèce ciblée. D'après la littérature, les classes thérapeutiques les plus toxiques sont les antibiotiques (Amoxicilline et Clarithromycine) et les antipsychotiques (Fluoxétine, Sertraline) (Fent et *al*., 2006 ; Besse et Garric, 2007)
La **Figure I-13** regroupe les valeurs de CE50, de 14 composés pharmaceutiques (Sulfaméthoxazole, Diclofénac, Ibuprofène, Aténolol, Propranolol, Paracétamol, Gemfibrozil, Carbamazépine, Diazépam, Oxazépam, Lorazépam, Venlafaxine, Citalopram et Fluoxétine), cherchées dans la littérature (Ahlford, 2007 ; Christensen et *al*, 2007 ; Calisto et *al*., 2009, Santos et *al*., 2010 ; Minguez et *al*., 2016).
Lors des tests normalisés de toxicité aigüe, des effets ne sont observés qu'à des concentrations en composés pharmaceutiques élevées (du $\mu g.L^{-1}$ au $mg.L^{-1}$), soit 100 à 1 000 fois supérieures aux concentrations environnementales. Ainsi, des effets ont été observés chez des algues avec la Fluoxétine (qui est l'antidépresseur le plus toxique) à des concentrations supérieures à 10 $\mu g.L^{-1}$ alors que les concentrations environnementales auxquelles elle a été retrouvée sont inférieures à 0,01 $\mu g.L^{-1}$ (Fent et *al*., 2006 ; Santos et *al*., 2010). C'est pourquoi le risque aigu des composés pharmaceutiques reste négligeable.
Sur les 7 psychotropes sélectionnés, aucunes valeurs de CE50 n'ont été trouvées dans la littérature pour l'Oxazépam et le Lorazépam. Ceci montre bien qu'il manque encore des données sur la toxicité aigüe des psychotropes.

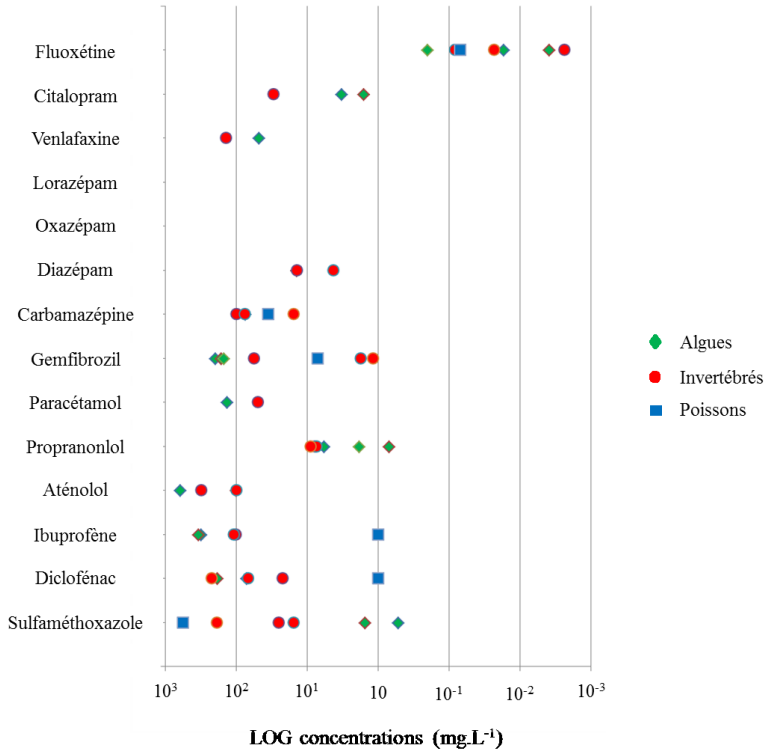


Figure I-13. Valeurs de CE50 de 14 composés pharmaceutiques données pour les algues, les invertébrés et les poissons (échelle logarithmique). Références : Ahlford, 2007 ; Christensen et *al*, 2007 ; Calisto et *al*., 2009, Santos et *al*., 2010 ; Minguez et *al*., 2016

6.2. Toxicité chronique

Cette toxicité est souvent caractérisée par le NOEC (No Observed Effect Concentration) qui correspond à la concentration maximale pour laquelle aucun effet n'est observé chez l'organisme. L'évaluation de cette toxicité se faisant sur de longues périodes, les doses d'exposition sont alors plus faibles que celles utilisées dans les tests aigus. Ainsi, ce type d'essai permet de se rapprocher des concentrations environnementales.

La **Figure I-14** regroupe les valeurs de NOEC, de 14 composés pharmaceutiques (Sulfaméthoxazole, Diclofénac, Ibuprofène, Aténolol, Propranolol, Paracétamol, Gemfibrozil, Carbamazépine, Diazépam, Oxazépam, Lorazépam, Venlafaxine, Citalopram et Fluoxétine), cherchées dans la littérature (Ferrari et *al*., 2003 ; Henry et *al*., 2004 ; Crane et *al*., 2006 ; De Lange et *al*., 2006 ; Garric et *al*., 2006 ; Richards et *al*., 2006 ; Ahlford, 2007 ; Flippin et al., 2007 ; Schmitt-Jansen et *al*., 2007 ; Stanley et *al*., 2007 ; Calisto et *al*., 2009 ; Besse, 2010 ; Santos et *al*., 2010 ; Silva et *al*., 2015).

Les valeurs trouvées dans la littérature vont de la centaine de $ng.L^{-1}$ à la dizaine de $mg.L^{-1}$ cependant peu de données ont été retrouvées pour les composés sélectionnés et pour 3 psychotropes (Oxazépam, Lorazépam et Venlafaxine) aucunes données n'ont été obtenues. D'après la **Figure I-14**, des effets ont été observés chez des invertébrés avec le Propranolol à des concentrations de l'ordre du $\mu g.L^{-1}$ alors que les concentrations environnementales détectées sont inférieures à 0,01 $\mu g.L^{-1}$ (Santos et *al*., 2010). De plus, pour la Fluoxétine, des effets ont été obser-

vés à des concentrations plus faibles que pour les CE50, aux alentours de 100 ng.L^{-1}, qui sont des niveaux de concentrations non détectés dans les eaux de surface mais retrouvés en sortie et entrées de STEP.
En toxicité chronique, les classes thérapeutiques les plus toxiques sont les antibiotiques (Amoxicilline), les bêtabloquants (Propranolol) et les antipsychotiques (Fluoxétine) (Besse et Garric, 2007).

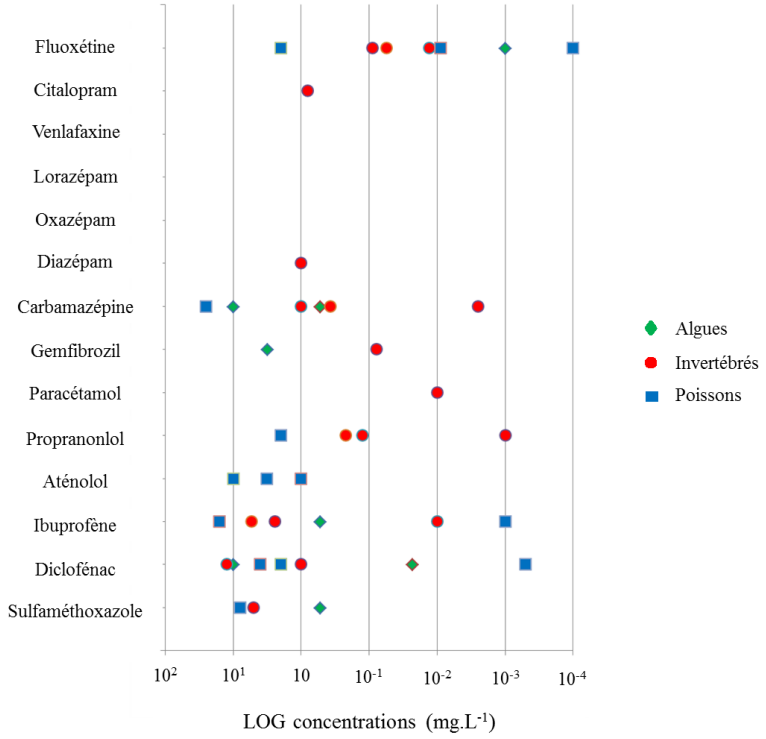


Figure I-14. Valeurs de NOEC de 14 composés pharmaceutiques données pour les algues, les invertébrés et les poissons (échelle logarithmique). Références : Ferrari et *al.*, 2003 ; Henry et *al.*, 2004 ; Crane et *al.*, 2006 ; De Lange et *al.*, 2006 ; Garric et *al.*, 2006 ; Richards et *al.*, 2006 ; Ahlford, 2007 ; Flippin et al., 2007 ; Schmitt-Jansen et *al.*, 2007 ; Stanley et *al.*, 2007 ; Calisto et *al.*, 2009 ; Besse, 2010 ; Santos et *al.*, 2010 ; Silva et *al.*, 2015

Bien que les valeurs de NOEC soient supérieures aux concentrations environnementales des composés pharmaceutiques, le risque chronique n'est pas négligeable et doit être surveillé.

Parmi les psychotropes et les autres médicaments étudiés dans cette partie, la Fluoxétine est la molécule la plus toxique avec une valeur minimale de CE50 de 2,4 µg.L^{-1} et une valeur minimale de NOEC de 100 ng.L^{-1}, qui est une concentration qui peut être retrouvée en entrée et en sortie de STEP.
De plus, cette partie montre qu'il existe un réel manque d'étude sur la toxicité aigüe et chronique des psychotropes sur les organismes aquatiques, c'est pourquoi cette classe thérapeutique a besoin d'être encore étudiée.

6.3. Le risque

L'évaluation du risque environnemental d'un composé dépend de la quantité et de la qualité des données disponibles telles que sa quantité consommée, sa métabolisation, sa dégradation, sa concentration dans l'environnement (mesurée ou estimée) ou encore ses données de toxicité aigüe et/ou chronique (Ferrari et *al*., 2004).
A partir de la méthode de mesure du risque mis en place par l'EMA (**Chapitre 1. Section 1.2**), plusieurs valeurs de risque pour des composés pharmaceutiques ont été publiées dans différents pays européens. L'étude de Ferrari et *al*. (2004) évalue le risque pour le compartiment aquatique de 6 composés pharmaceutiques dont la Carbamazépine, le Diclofénac, le Propranolol et le Sulfaméthoxazole (**Tableau I-7**).

Tableau I-7. Estimation du risque potentiel de 4 composés pharmaceutiques dans le milieu aquatique en France et en Allemagne (source : Ferrari et *al*., 2004).

	Diclofénac	Propranolol	Sulfaméthoxazole	Carbamazépine
		France		
PEC/PNEC aigüe	0,033	4,25	11,4	0,038
PEC/PNEC chronique	0,024	104	0,52	2,4
		Allemagne		
PEC/PNEC aigüe	0,124	0,488	59,3	0,061
PEC/PNEC chronique	0,09	11,9	2,72	3,85

Cette étude montre que, selon le pays, les valeurs estimées des risques ne sont pas les mêmes. Par exemple, pour le Propranolol, il y a un facteur 10 entre les valeurs obtenues en France et celles obtenues en Allemagne.
Dans cette même étude, les auteurs ont choisi de calculer les risques avec des valeurs de PNEC obtenues à partir de tests de toxicité aigües comme le propose l'EMA dans sa procédure mais aussi avec des valeurs de PNEC obtenues à partir de tests chroniques. Le **Tableau I-7** montre que selon les données de PNEC utilisées, les valeurs de risque vont être différentes. Par exemple, pour la Carbamazépine en France et en Allemagne, avec des tests aigus, cette molécule ne représente aucun risque alors qu'avec des tests chroniques les valeurs du rapport PEC/PNEC sont bien supérieures à 1 ; cet antiépileptique représente donc un risque pour l'environnement. Cette différence de données change alors les conclusions à propos du risque potentiel de la Carbamazépine dans l'environnement aquatique.
Les auteurs de l'étude de Ferrari et *al*. (2004) se posent alors la question de la pertinence d'utiliser des tests aigus pour prédire le risque potentiel d'un composé dans le milieu aquatique. Cependant, il existe un manque de connaissance sur les effets chroniques, les effets sur la reproduction et les effets liés au mécanisme pharmacologique permettant de calculer des PNEC « chronique » comme le montre les travaux de Carlsson et *al*. (2006). Par manque de données, les auteurs ne peuvent pas estimer de valeur de risque environnemental pour l'Aténolol, le Kétoprofène ou encore l'Oxazépam.

Dans l'étude récente de Bouissou-Schurtz et *al*. (2014), les auteurs calculent le risque potentiel pour l'environnement d'une liste de composés surveillés par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). Pour cela, ils utilisent le rapport

PEC/PNEC mais aussi le rapport MEC/PNEC où la MEC (Mesured Environment Concentration) correspond à la concentration du composé mesurée dans l'environnement. Ils précisent alors que le rapport PEC/PNEC donne une valeur estimée du risque environnemental alors que le rapport MEC/PNEC donne une valeur réelle (**Tableau I-8**).

Tableau I-8. Evaluation du risque environnemental estimé et réel pour l'Ibuprofène, le Paracétamol, le Diclofénac et la Carbamazépine (source : Bouisson-Schurtz et *al*., 2014).

	Ibuprofène	Paracétamol	Diclofénac	Carbamazépine
PEC/PNEC	600	1,6	15	3,2
MEC/PNEC	1,9	0,04	0	0

La **Tableau 8** montre que les valeurs du risque estimé sont beaucoup plus élevées que celles du risque réel. De plus avec le rapport PEC/PNEC les 4 composés pharmaceutiques ont un risque potentiel pour l'environnement alors qu'avec le rapport MEC/PNEC seulement l'Ibuprofène représente un risque.

Cette étude montre encore que l'estimation du risque environnemental pour les composés pharmaceutique reste complexe et qu'elle nécessite d'être encore documentée. De plus, les scientifiques se questionnent si l'évaluation du risque ne devrait pas se faire sur les mélanges de composés comme dans l'environnement.

L'estimation du risque d'un composé pharmaceutique dans l'environnement aquatique est complexe, il nécessite l'obtention de valeurs de toxicité aigüe et/ou chronique. Cependant ce sont des données qui manquent encore aujourd'hui pour un grand nombre de psychotropes. C'est pourquoi il existe aussi très peu de valeur de risque pour cette famille thérapeutique.

7. Impacts des psychotropes

7.1. Les biomarqueurs

a) Définition

Les biomarqueurs sont « des paramètres biologiques mesurant le comportement, la physiologie, la biochimie, l'intégrité cellulaire, l'expression et la structure génomique des individus, que ce soit au niveau d'une cellule, d'un tissu ou de l'organisme entier » (Lagadic et al., 1997). Ce sont les indicateurs d'un état normal ou d'un changement chez les individus au sein d'une population étudiée. En écotoxicologie, ce sont des outils mis en œuvre pour établir un diagnostique du risque environmental. Leurs usages et leur intérêt sont devenus incontournables pour la surveillance de l'état écologique des cours d'eau. Certains biomarqueurs peuvent être spécifiques car ils répondent préférentiellement à un type de contaminants. De plus, ils peuvent avoir un caractère intégratif du message toxique car l'organisme exposé n'intègre que la partie bio-disponible du xénobiotiques.Les biomarqueurs peuvent être regroupé dans deux familles (Tableau I-9) :

-les biomarqueurs d'exposition

-les biomarqueurs d'effet

Tableau I-9. Biomarqueurs utilisés en écotoxicologie dans les études de laboratoire et de terrain, indicateurs d'exposition à des classes spécifique et non-spécifique de polluants ou indicateur d'effet de substances toxiques (source : Garric et *al.*, 2010).

	Biomarqueurs	Commentaires	Effets	Substances chimiques
Biomarqueurs d'exposition	CYP 1A1, expression et activité EROD, BaP hydroxylase, Glutathion-S-transferase	Les activités monooxygénases impliquant diverses isoformes de cytochromes P450 (la mesure la plus connue est l'induction de l'activité enzymatique EROD) sont impliquées dans le métabolisme des composés endogènes lipophiles, et sont inductibles par des substances exogènes.	Induction	Pesticides organochlorés, PCBs, dioxines, HAPs, BaP, non spécifique
	Protéines multi, xénobiotique, résistance (MXR)	Les protéines de transport membranaire (système MXR/MDR) peuvent être induites ou inhibées par diverses substances organiques. C'est un mécanisme de défense cellulaire qui permet à la cellule transporter des métabolites ou des xénobiotiques.	Induction/ inhibition	Substances organiques (HAPs, PCBs et métabolites...)
	Acétyl cholinestérase	Activité enzymatique du métabolisme de neurotransmetteurs.	Inhibition	Pesticides (organo-phosphorés, carbamates)
	Vitellogénine	Protéines de réserves des œufs synthétisés dans le foie.	Induction (mâle)	Perturbateurs endoctriniens
	Métallothionéines/ phytochélatines, protéines de stress	Les métallothionéines (MTs) et phytochélatines (PCs) normalement exprimées dans les tissus, impliquées dans l'homéostasie des métaux, peuvent être surexprimées en présence de métaux, mais aussi de composés organiques aromatiques inducteurs de stress oxydatif cellulaire.	Induction	Métaux, autres xénobiotiques
	Dommage ADN, adduits ADN	Les polluants (HAPs, organiques persistants...), comme des facteurs physiques, peuvent altérer de différentes façons l'intégrité de la structure de l'ADN (cassure simple et double brin, liaison ADN, dommages chromosomiques), soit directement soit *via* leurs métabolites.	Occurence	Mutagènes, génotoxiques
Biomarqueurs d'effet	Dommage ADN		Occurence	Mutagènes, génotoxiques ?
	Acétyl cholinestérase		Inhibition	Pesticides (organo-phosphorés, carbamates)
	Peroxydation lipidique Enzymes antioxydantes	Des polluants peuvent augmenter les niveaux cellulaires de molécules oxygénées fortement réactives (ROS), soit par une induction de synthèse soit par une inhibition des mécanismes de défense. Lorsque ces derniers sont débordés les lipides membranaires, les protéines cellulaires sont endommagées par des réactions de peroxydation. Ces processus peuvent être mesurés et utilisés comme indicateurs de stress.	Induction Induction/ inhibition	Non spécifiques
	Intégrité lysosomiale	La stabilité de la membrane semi-perméable des lysosomes est un indicateur de l'état de la cellule.	Diminution	

b) Les biomarqueurs d'exposition

Ils sont caractérisés par leur réponse précoce et leur réactivité spécifique. Ils sont généralement induits par un type de polluant donc leur variation est indicatrice d'une exposition de l'organisme à cette classe de contaminants. Ils témoignent alors de la présence d'un contaminant dans le milieu et de sa biodisponibilité pour l'organisme exposé. Ces biomarqueurs traduisent alors un changement de l'environnement de l'organisme étudié.

Les paramètres qui sont alors mesurés sont la bioaccumulation du contaminant dans l'organisme, la mesure des réactions cellulaires de certains effets biologiques précoces ne présentant pas de toxicité immédiate pour les organismes tels que les dommages à l'ADN ou encore les métallothionéines (MT) qui sont généralement induites lors d'une contamination métallique.

c) Les biomarqueurs d'effet

Ils caractérisent une altération biologique et selon l'intensité de la réponse, elle peut altérer l'état physiologique de l'organisme exposé (croissance, reproduction, comportement, etc…). Ces biomarqueurs ne sont pas spécifiques d'un type de contaminants contrairement aux biomarqueurs d'exposition mais ils intègrent de multiples toxicités complexes. C'est pourquoi ces biomarqueurs sont nombreux et variés suivant le niveau d'organisation biologique étudié : biochimique, cellulaire, physiologique, etc…

Bien que cette classification soit couramment utilisée, la limite entre les deux groupes est souvent mince et dépend généralement du contaminant ou de l'organisme étudié. C'est pourquoi, il est nécessaire d'avoir une approche multi-biomarqueurs afin d'améliorer l'évaluation de la qualité du milieu ou la compréhension du comportement d'un contaminant sur l'organisme.

7.2. Impact des psychotropes sur les organismes aquatiques

L'impact des psychotropes sur les organismes aquatiques est peu étudié. Quelques biomarqueurs ont tout de même était utilisés pour identifier l'impact de certains de ces composés sur le biologique (**Tableau I-10**).

Dans la littérature, les composés psychoactifs les plus étudiés sont la Fluoxétine, la Carbamazépine et la Venlafaxine. Les études d'exposition aux psychotropes sur les invertébrés aquatiques et les poissons ont cherché à identifier des effets immunotoxiques, cytotoxiques, génotoxiques, sur le stress oxydatif, sur des fonctions enzymatique, sur la modulation de l'expression de gènes d'intérêts mais aussi sur la croissance des individus, leur reproduction et leur comportement (alimentaire, prédation, locomotion).

Selon les composés, les effets sur un même biomarqueur vont être différents. L'étude de Lacaze et *al*. (2015) montre que la Venlafaxine va induire une augmentation de l'activité phagocytaire des hémocytes de moule bleue alors que la Paroxétine et la Fluoxétine vont diminuer cette activité. De plus, un même composé peut moduler différemment un biomarqueur selon les concentrations d'exposition utilisées, comme cela a pu être observé dans les travaux de Minguel et *al*. (2014b). Ainsi, l'exposition des hémocytes d'ormeau à l'Amitriptyline conduit à une augmen-

tation des niveaux d'ERO à la concentration environnementale de 0,001 mg.L^{-1} alors qu'aux concentrations de 17,03 mg.L^{-1} ; 24,42 mg.L^{-1} et 45,24 mg.L^{-1} une diminution de ces niveaux est observée. Cette stimulation à une faible concentration en contaminant est un effet hormétique, l'organisme en présence d'une faible dose de polluant stimule ses mécanismes de défense afin de neutraliser l'effet du toxique et de réparer les fonctions altérées.

Tableau I-10. Effets de quelques psychotropes exposés individuellement et en mélange sur différents organismes et différents biomarqueurs.

Organismes	Molécules	Biomarqueurs	Effets	Références
Mytilus edulis	Paroxétine	Viabilité cellulaire	Inhibition	Lacaze et *al* ., 2015
	Fluoxétine	Phagocytose	Inhibition / Inhibition	
	Carbamazépine	Production EROs	Induction	
	Venlafaxine	Dommage à l'ADN	Induction	
Crassostrea gigas (juvénile)	Fluoxétine	Activité GST	Induction à 1j et 28j / Inhibition à 7j	Di Poi et *al* ., 2016
		Activité Catalase	Induction à 7j et 28j / Inhibition à 14j	
		Niveau LPO	Induction à 14j / Inhibition à 7j	
		Survie, croissance, reproduction	Augmentation de la taille de la coquille	
Haliotis tuberculata	Amitryptyline	Phagocytose	Induction / Inhibition	Minguez et *al* ., 2014b
	Paroxétine	Production EROs	Induction / Inhibition	
	Citalopram	Stabilité membranes lysosomales	Induction / Inhibition	
	Clomipramine	Viabilité des cellules	Inhibition	
Sepia officinalis	Fluoxétine	Comportement de défence	Diminution du niveau d'homochromie	Di Poi et *al* ., 2014b
		Chimie du cerveau	-	
Elliptio complanata	Carbamazépine	Phagocytose	Induction	Gagné et *al* ., 2006
	Fluoxétine	Viabilité des hémocytes	Induction	
		Adhérence des hémocytes	Induction / Inhibition	
		Niveau LPO	-	
Gasterosteus aculeatus	Citalopram	Comportement alimentaire	Diminution consommation de nourriture	Kellner et *al* ., 2015
Bar rayé hybride *Morone saxatilis* x *Morone chrysops*	Venlafaxine	Comportement de prédation	Augmentation du temps de capture des proies	Bisesi et *al* ., 2014
		Niveau sérotonine dans cerveau	Altération	
Ruditapes philippinarum	Carbamazépine	Stabilité membranes lysosomales	Inhibition	Aguirre-Martinez et *al* ., 2013
Carcinus maenas	Sertraline	Activité AChEg et AChEm	Induction / Inhibition	Rodrigues et *al* ., 2015
		Activité LDH	Induction	
		Activité IDH	Induction	
		Activité GST	Induction	
		Activité Catalase	Induction / Inhibition	
		Activité GPx	Inhibition	
		Activité GR	Induction / Inhibition	
		NiveauTG	Induction	
		Niveau LPO	Induction	
Lymnaea stagnalis	Mélange (Carbamazépine, Diazépam, Venlafaxine)	Viabilité des hémocytes	-	Gust et *al* ., 2013
		Cellularité	-	
		Phagocytose	-	
		Production EROs	-	
		Production de thioles	-	
		Expression de gènes (HSP70, NOS1, NOS2, TLR4, AIF-1, CAT, GR, MDM, SeGPx)	Induction de TLR4, HSP70 et SeGPx Répression de AIF-1, CAT et Gr	
Oryzias latipes	Mélange (Citalopram, Cyamémazine, Fluoxétine, Oxazépam, Serttraline, Acide valproïque)	Activité locomotrice	Diminution de la vitesse de nage, la distance parcourue et de la mobilité en période de nuit.	Chiffre et *al* ., 2014

Les quelques études d'impacts montrent que les psychotropes ont bien un effet sur les organismes aquatiques que ce soit à des niveaux de concentration élevés, de l'ordre du mg.L^{-1}, ou à des concentrations environnementales. C'est pourquoi, il est nécessaire de continuer à documenter l'impact de ces composés avec des molécules qui n'ont pas encore étudiées mais aussi avec des mélanges comme ont commencé à le faire Gust et *al*. (2013) et Chiffre et *al*. (2014).

8. Comparaison France-Québec

Dans ces travaux de thèse, le suivi de la contamination en psychotropes a été mené dans deux principaux hydrosystèmes qui sont l'estuaire de la Gironde en France et le Saint Laurent au Québec. C'est pourquoi dans cette partie nous avons voulu regarder les différences existantes entre la France et le Québec.

Le **Tableau I-11** énonce quelques caractéristiques de la France et du Québec.

Tableau I-11. Quelques caractéristiques de la France et du Québec.

	France	Québec
Superficie du pays (km^2)	671 308	1 667 441
Démographie (en nbre d'hab.)	66 318 000 (en 2015)	8 215 000 (en 2014)
Part du maché mondial du médicaments (%)	4,4	2,4 (Canada)
Proportion dépenses méd./dépense santé (%)	15	19,7
Dépense en médicaments (USD/ hab.)	615	812
Dépense tot. en psychotropes (%)	14,5	20,6
Nombre de station d'épuration	19 901	822
Procédés épuratoires	Traitement primaire (12,1%) Traitement secondaire (43%) Traitement tertiaire (25,1%)	Traitement primaire (2%) Traitement secondaire - Etangs aérés (67%) Traitement secondaire - Autre (10%) Divers (21%)
STEPs étudiées	Louis Fargue (Bordeaux)	Jean Marcotte (Montréal)
Traitement épuratoire	secondaire (filtres biologiques)	primaire (physico-chimique)
Psychotropes détectés en STEP*	Bromazépam, Nordiazépam, Alprazolam, Diazépam, Oxazépam, Lorazépam, Clonazépam, Méprobamate, Imipramine, Amitriptyline, Fluoxétine, Primidone, Carbamazépine	Fluoxétine, Carbamazépine, Paroxétine, Citalopram, Amitriptyline, Venlafaxine, Nortriptyline, Sertraline, Desméthylsertraline, Desméthylvenlafaxine, Norfluoxétine
Niveaux de concentration des psychotropes en STEP*	Entrée de STEP : >1 $ng.L^{-1}$ à >1000 $ng.L^{-1}$ Sortie de STEP : >1 $ng.L^{-1}$ à >1000 $ng.L^{-1}$	Entrée de STEP : >1 $ng.L^{-1}$ à <400 $ng.L^{-1}$ Sortie de STEP : >1 $ng.L^{-1}$ à <400 $ng.L^{-1}$
Milieu étudié	Estuaire de la Gironde	Saint Laurent
Superficie (km^2)	51 260	839 200
Débit moyen ($m^3.s^{-1}$)	481 (Garonne)	8 540 (tronçon fluvial, à Montréal)
Psychotropse détectés dans le milieu*	Carbamazépine, Oxazépam, Nordiazépam, Lorazépam, Méprobamatae, Primidone, Amitriptyline	Fluoxétine, Carbamazépine, Paroxétine, Citalopram, Amitriptyline, Venlafaxine, Nortriptyline, Sertraline, Desméthylsertraline, Desméthylvenlafaxine, Norfluoxétine
Niveaux de concentration des psychotropes dans le milieu*	<1 $ng.L^{-1}$ à 30 $ng.L^{-1}$	<1 $ng.L^{-1}$ à 70 $ng.L^{-1}$

* Références bibliographiques : Lajeunesse et *al*., 2008 ; Lajeunesse et *al*., 2012 ; Aminot, 2013 et Aminot et *al*., 2016.

Le Québec se situe au Canada, représente la plus grande province canadienne soit 16,7% du territoire canadien (Le Comparatif_Québec-France, 2012). Le Québec est environ 3 fois plus grand que la France mais a 8 fois moins d'habitants. La densité de la population en France est de 98,8 hab/km^2 contre 4,9 hab/km^2 au Québec.

La part du marché mondial du médicament de la France représente 4,4 % avec une dépense en médicaments par habitant de 615$ US. La part du marché mondiale en médicament au Québec est plus faible car celle du Canada ne représente que 2,4%, cependant la dépense en médicaments des québécois est plus élevée que celle des français avec 822$ US/habitant. Au Québec 20,6% de la dépense en médicament est allouée aux composés psychotropes contre 14,5% en France.

Même si un français dépense moins en médicament qu'un québécois, la dépense totale en médicament de la France (40 785 570 000$ US) est tout de même 6,7 fois supérieure à celle du Québec (6 752 730 000$ US).

Comme précisé dans la **Section 3** de ce chapitre, l'apport principal de médicament dans l'environnement est généralement le rejet des stations de traitement des eaux usées. Le Québec dénombre plus de 800 STEP alors que la France en comptabilise plus de 19 900. Dans les STEP françaises, le procédé épuratoire le plus utilisé est le traitement secondaire par boues activées (Golia et *al*., 2010) et au Québec c'est aussi le traitement secondaire mais par étangs aérés (MAMROT, Ministère des Affaires municipales, des Régions et de l'Occupation du territoire, 2013). Cependant, l'étude de MAMROT (2010) montre que lorsque le traitement épuratoire est réparti en fonction de la capacité hydraulique des stations d'épuration, le traitement physico-chimique (primaire) est majoritaire avec 54,5% (**Figure I-15**).

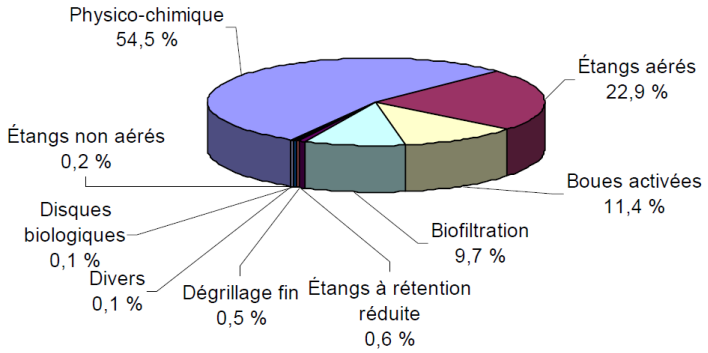


Figure I-15. Répartition des types de traitements en fonction de la capacité hydraulique des STEP du Québec (source : MAMROT, 2013).

Ce changement est principalement dû à la STEP de Montréal qui, à elle seule, représente 42% de la capacité hydraulique des STEP québécoises utilisant un traitement physico-chimique.

Des études sur les STEP de Montréal et de Bordeaux (traitement secondaire par filtre biologique) ont montré la présence de quelques psychotropes comme la Fluoxétine et la Carbamazépine (**Tableau I-11**) (Lajeunesse et *al*., 2012 ; Aminot, 2013). La gamme de concentration des composés psychoactifs retrouvés dans la STEP de Bordeaux est comprise entre quelques $ng.L^{-1}$ et quelques $\mu g.L^{-1}$ alors que dans la STEP de Montréal, la gamme va de quelques $ng.L^{-1}$ à la centaine de $ng.L^{-1}$.
Les rejets de la station Louis Fargue (Bordeaux) sont déversés dans l'estuaire de la Gironde et particulièrement dans la Garonne et ceux de la station Jean Marcotte (Montréal) sont évacués dans le Saint Laurent et particulièrement dans le tronçon fluvial. C'est deux hydrosystèmes ont des superficies différentes et le Saint Laurent a un débit (8 540 $m^3.s^{-1}$) 18 fois plus élevé que celui de la Garonne (481 $m^3.s^{-1}$).
Les travaux de thèse d'Aminot (2013) montrent qu'en plus d'être détectés en station d'épuration les quelques psychotropes étudiés sont aussi retrouvés dans la Garonne à des concentrations qui vont de quelque $ng.L^{-1}$ à 30 $ng.L^{-1}$. De même l'étude de Lajeunesse et *al*. (2012) observe également que certains des composés étudiés, retrouvés en station d'épuration, sont aussi dé-

tectés dans le fleuve Saint Laurent à des concentrations qui vont de quelques $ng.L^{-1}$ à 70 $ng.L^{-1}$. Ces deux études permettent de donner une idée sur la présence de quelques psychotropes dans les STEP de Bordeaux et de Montréal mais aussi dans la Garonne et dans le fleuve Saint Laurent.

Cependant, plusieurs variables comme les habitudes de prescriptions des médecins, la consommation de la population, la zone géographique d'étude, la démographie de cette zone, les procédés de traitements des stations d'épuration et les caractéristiques du milieu aquatique recevant les rejets de STEP vont intervenir sur le type de composés et les concentrations retrouvés en station d'épuration mais aussi dans le milieu aquatique.

9. L'estuaire de la Gironde en France

Un estuaire est une zone d'interaction entre les eaux douces et les eaux salées.
Les travaux de Pritchard (1967) définissent pour la première fois un estuaire d'un point de vue physique comme étant « *une masse d'eau côtière semi-fermée, qui a une connexion libre avec l'océan et à l'intérieur duquel l'eau de mer est diluée d'une façon mesurable avec de l'eau douce issue du drainage du bassin versant* ».
Plusieurs définitions ont ensuite été proposées dans la littérature prenant en compte les processus physiques, chimiques, biologiques et sédimentaires de l'estuaire (Dalrymple et *al*., 1992 ; Perillo, 1995) (**Figure I-16**).

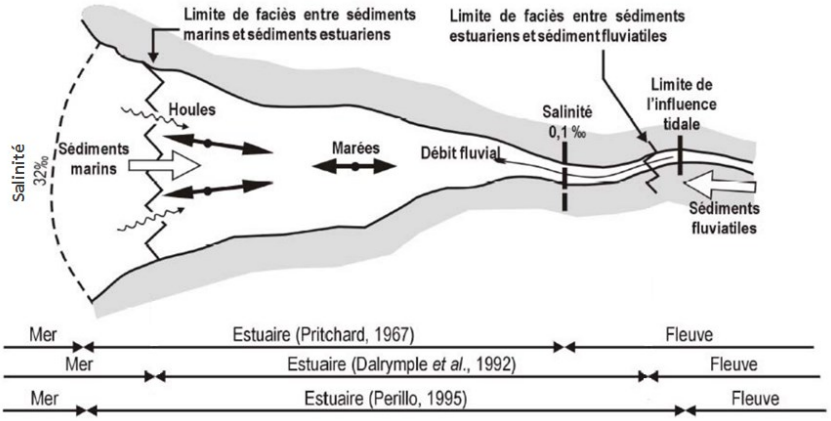


Figure I-16. Représentation schématique d'un estuaire d'après Pritchard (1967), Dalrymple et *al*. (1992) et Perillo (1995) (source : Deloffre, 2005).

9.1. Morphologie de l'hydrosystème Garonne-Dordogne-Gironde

L'estuaire de la Gironde se situe dans le sud-ouest de la France, il est à la confluence de deux rivières la Garonne et la Dordogne. La Garonne, d'une longueur de 647 km, draine la partie sud du bassin versant girondin d'une superficie de 51 260 km² à son exutoire au Bec d'Ambès. La Dordogne (490 km) draine une superficie de 14 980 km² à son exutoire au Bec d'Ambès (**Figure I-17**).

Figure I-17. Découpage du bassin versant Adour-Garonne-Dordogne-Charente (adaptée de http://www.siahsudcharentetudedronne.com/).

Allen (1972) propose une découpe de l'estuaire en 3 zones délimitées par des points kilométriques (PK) dont l'origine est située au pont de Pierre à Bordeaux (PK0) et le PK100 au niveau de l'embouchure de l'estuaire après Royan (**Figure I-18**) :

- **L'estuaire fluvial** : s'étend de l'amont du Bec d'Ambès (PK25, à la confluence de la Garonne et de la Dordogne) jusqu'à la limite de la marée dynamique (Pessac-sur-Dordogne sur la Dordogne et La Réole sur le Garonne).
- **L'estuaire amont** : est compris entre Saint-Christoly (PK68) et le Bec d'Ambès. Zone à chenaux secondaires constituée de nombreuses îles et bancs sableux.
- **L'estuaire aval** : se situe de l'embouchure de l'estuaire (entre Royan et la pointe de Grave) jusqu'à Saint-Christoly. Zone constituée de deux chenaux principaux (chenal Saintonge et chenal de navigation).

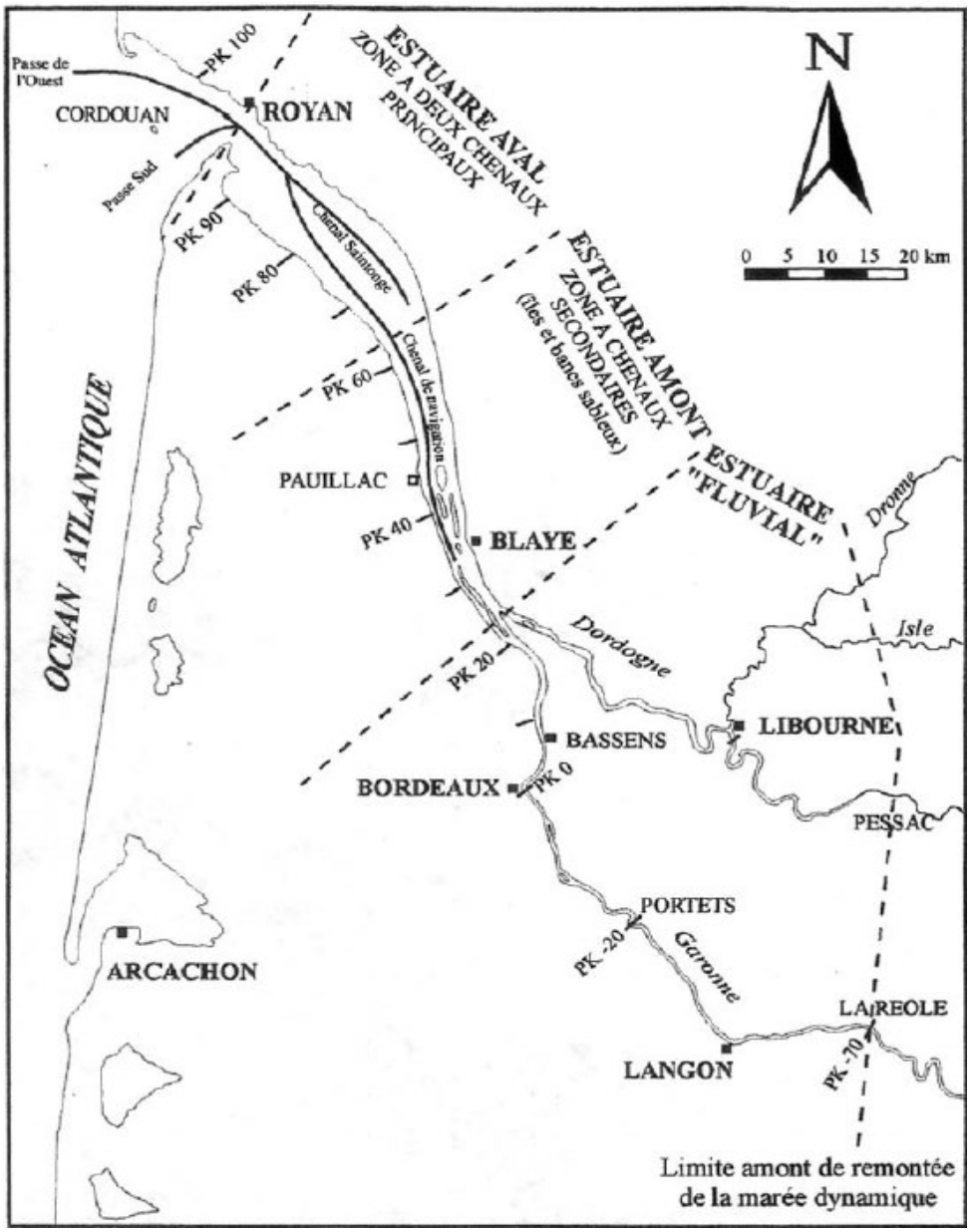


Figure I-18. L'Estuaire de la Gironde et ses affluents majeurs (source : Allen, 1972).

9.2. Caractéristiques hydrologiques

L'estuaire de la Gironde est un estuaire macrotidal avec un marnage à l'embouchure qui varie entre 1,5 et 5,5 m (Sottolichio et Castaing, 1999). Sa surface est de 635 km^2 à marée haute et de 450 km^2 à marée basse (Salomon, 2002). C'est un système hydrodynamique très influencé par la marée, il est ainsi soumis à un cycle de marée semi diurne d'une période de12,5 h. La limite d'action de la marée dynamique se situe à 180 km de l'embouchure de l'estuaire, soit dans les sections fluviales de la Garonne et de la Dordogne (Sottolichio et Castaing, 1999). Ainsi, en période d'étiage, la marée se fait sentir jusqu'à La Réole (Garonne) et Pessac-sur-Dordogne (Dordogne). L'onde de marée pénétrant dans l'estuaire est alors progressivement

ralentie à cause des amplitudes de niveau d'eau, on parle alors d'une onde dissymétrique. Ainsi les durées de jusant (marée descendante) sont plus longues que les périodes de flot (marée montante) et la vitesse des ondes en pleine mer se propage plus vite qu'en basse mer (Allen, 1972 ; Sottolichio et Castaing, 1999).
Les données de débits des principaux affluents (Garonne et Dordogne) de l'estuaire de la Gironde sont prises pour la période d'échantillonnage qui a été faite durant ces travaux de thèse, de 2011 à 2013 (**Tableau I-12** et **Figure I-19**).

Tableau I-12. Débits mesurés sur la Garonne et sur la Dordogne de 2011 à 2013 (source : DREAL Midi-Pyrénées / HYDRO-MEDD/DE ou HYDRO-eau France.fr).

	Garonne	Dordogne
Débit moyens annuels (2011-2013)	481 $m^3.s^{-1}$	228 $m^3.s^{-1}$
Variation des débits moyens annuels (2011-2013)	141 à 716 $m^3.s^{-1}$	61 à 400 $m^3.s^{-1}$
Minimum journalier (de 2011 à 2013)	82 $m^3.s^{-1}$ (16-08-2012)	42 $m^3.s^{-1}$ (24-09-2012)
Maximum journalier (de 2011 à 2013)	3300 $m^3.s^{-1}$ (21-01-2013)	967 $m^3.s^{-1}$ (12-02-2013)

Les débits moyens sur les 3 années d'échantillonnage sont de 481 $m^3.s^{-1}$ pour la Garonne (mesuré à Tonneins) et 228 $m^3.s^{-1}$ pour la Dordogne (mesuré à Pessac-sur-Dordogne). Le débit le plus élevé lors de crue est mesuré sur la Garonne le 21 janvier 2013 avec 3 300 $m^3.s^{-1}$ et le 12 février 2013 avec 967 $m^3.s^{-1}$ pour la Dordogne.

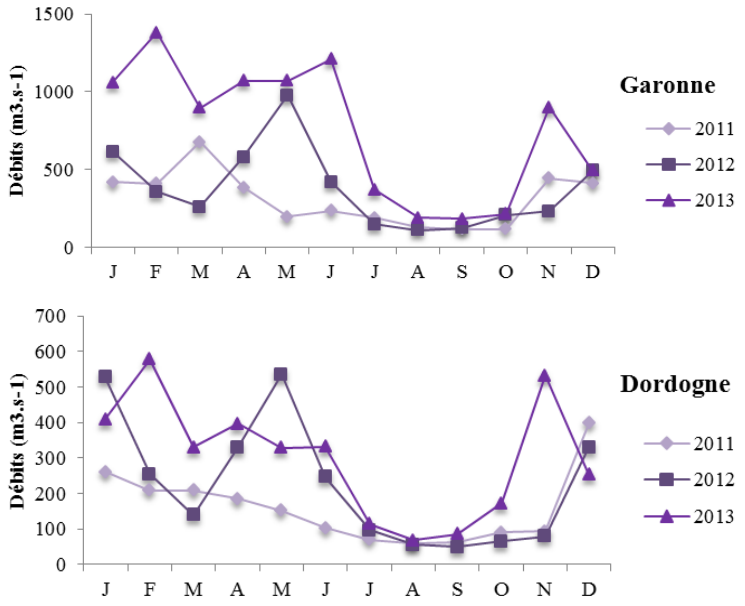


Figure I-19. Débits mensuels moyens sur la Garonne et sur la Dordogne de 2011 à 2013 (source : DREAL Midi-Pyrénées / HYDRO-MEDD/DE ou HYDRO-eau France.fr).

De fortes crues sont observables en période hivernale (de Décembre à Février) et au printemps (Avril et Mai) et les périodes d'étiage débutent au mois de Juillet et se terminent vers le mois d'Octobre. Ceci caractérise un régime pluvio-nival de l'estuaire de la Gironde (Romaña et Marchand, 1977). Cependant, ces variations saisonnières ne sont pas représentatives de toutes les années, exemple en 2011 sur la Dordogne où la période de crue n'est pas marquée au printemps. De plus, en 2013 sur la Garonne et la Dordogne, les débits sont plus élevés par rapport aux deux autres années précédentes.
En raison de la forte intrusion marine, les temps de séjour de l'eau et des matières en suspension sont importants, provoquant le développement d'une zone maximale de turbidité avec des concentrations en matière en suspension (MES) de l'ordre du $g.L^{-1}$ (Allen et *al*., 1977 ; Etcheber et *al*., 2011 ; Jouanneau et *al*., 1999).
Cette zone maximale de turbidité est aussi appelée « Bouchon vaseux » ; il est causé par l'onde de marée dissymétrique se propageant vers l'amont de l'estuaire couplée à la circulation importante de particules en suspensions. La concentration saisonnière en MES dans l'estuaire de la Gironde varie entre 0,1 et 10 $g.L^{-1}$ et celle dans le noyau du Bouchon vaseux est supérieur à 1 $g.L^{-1}$ (Castaing et Allen, 1981).

9.3. Caractéristiques physico-chimiques

Depuis 2004, le réseau d'observation automatisé en continue MAGEST crée une banque de données référence pour améliorer les connaissances sur le fonctionnement de l'estuaire de la Gironde au niveau hydrologique et biogéochimique ainsi que sur la dynamique des sédiments. Le réseau d'observation récupère les données sur la température, la salinité, la turbidité et l'oxygène dissous sur différents sites de l'estuaire de la Gironde (Bordeaux, Libourne, Portets et Pauillac) (Etcheber et *al*., 2011) (**Figure I-20**).

La température et la salinité sont des paramètres représentatifs des conditions hydrologiques (intrusion océanique, émissions fluviales et saisons). La turbidité est un bon traceur hydrodynamique et la teneur en oxygène dissout est un indicateur de la qualité du milieu.

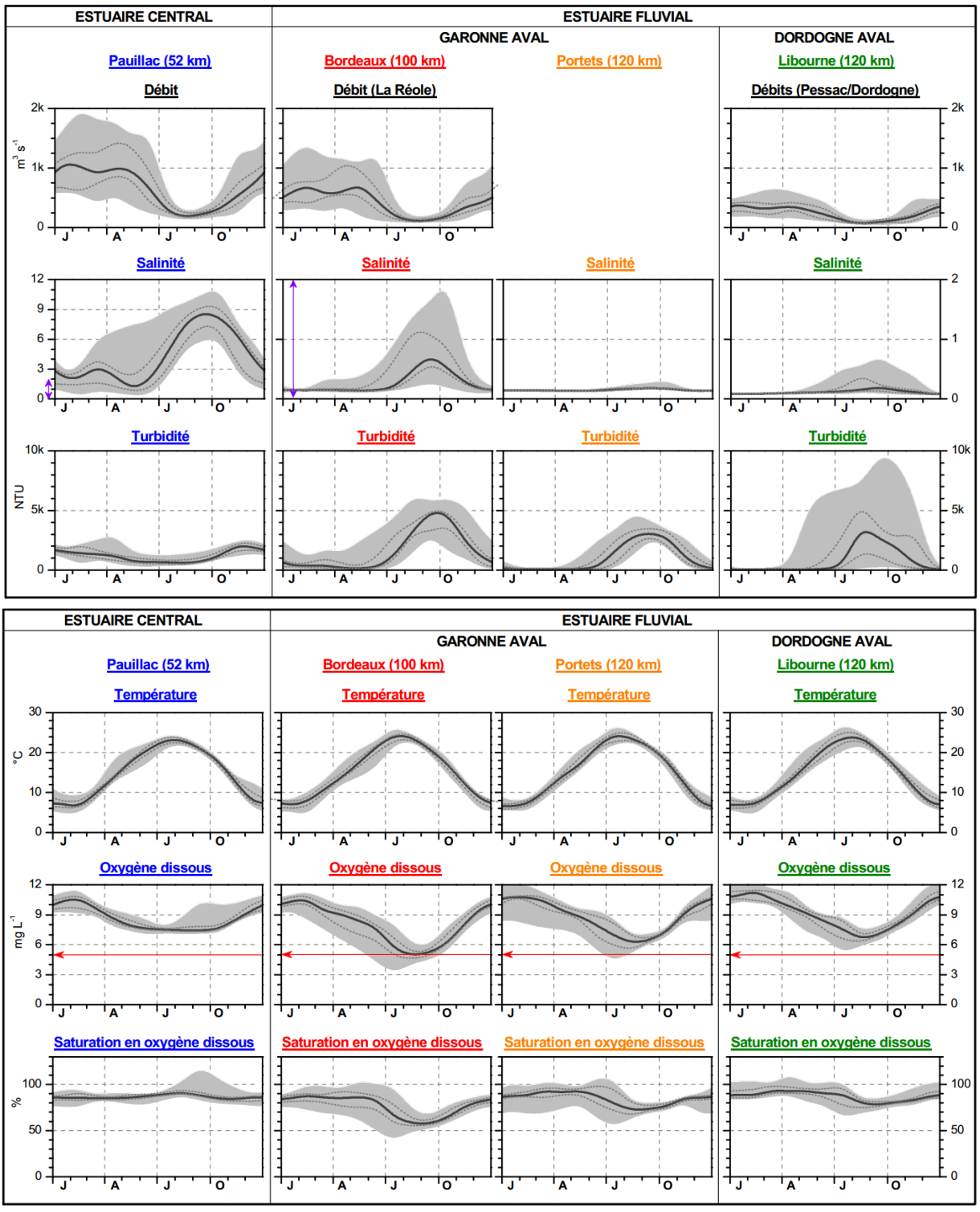


Figure I-20. Variations annuelles moyennées des débits, de la température, de la salinité, de l'oxygène dissous et de la saturation en oxygène dissous de 2005 à 2013 sur les 4 sites MAGEST (source : Schmidt et Sottolichio, 2013).

- **La température**

La température de l'eau de surface de l'estuaire varie entre 7 et 24 °C entre 2005 et 2013. Les températures les plus basses sont obtenues pendant le mois Février (max - min : 4,2 °C - 8,3 °C). Et les températures les plus élevées obtenues au mois de Juillet (max – min : 21,6 °C – 26,6 °C). Il y a très peu de différence entre les 4 stations MAGEST. A Pauillac, les eaux sont légèrement plus chaudes en hiver et plus froides en été en raison de sa proximité avec l'océan Atlantique.
Les causes naturelles de changement de température dans l'estuaire de la Gironde sont dues aux variations rapides de la température atmosphérique, à l'intrusion océanique mais surtout à l'évolution saisonnière.

- **La salinité**

La salinité de l'eau donne des indications sur la propagation des eaux océaniques vers l'amont de l'estuaire lors de période de flot. La salinité dépend de l'importance des débits et des coefficients de marée ainsi la salinité sera à son maximum lors de pleine mer.

La **Figure 19** montre que les données de salinité les plus élevées sont pour le site de Pauillac (variations mensuelles entre 0,4 et 11,3) qui est dans l'estuaire amont et donc davantage soumis aux influences salines que les autres stations.
A l'inverse, les salinités les plus basses sont observées à Portets alors que Libourne sur la Dordogne enregistre un très léger signal pendant la période estivale (de 0,06 à 0,7).

- **La turbidité**

La turbidité correspond à la concentration en MES, elle est exprimée en NTU.
L'estuaire de la Gironde est l'un des estuaires d'Europe les plus turbides. La Garonne et la Dordogne apportent 3 mégatonnes de MES dans l'estuaire dont 80% des apports proviennent du bassin versant de la Garonne (Maneux, 1998).

D'après la **Figure 19**, la turbidité est plus importante dans l'estuaire fluvial que dans l'estuaire amont. A Pauillac, contrairement aux autres stations, il y a très peu de variations de la turbidité entre les différentes saisons. Ceci est dû à la présence tout au long de l'année du bouchon vaseux et/ou de son panache.
Pour les autres sites, une forte saisonnalité est observée avec des valeurs très faibles pendant les périodes de crues (hiver et printemps). Les turbidités les plus faibles sont enregistrées à Bordeaux et à Portets avec des valeurs inférieures à 100 NTU.
Au cours de l'année, la turbidité augmente significativement en été. Le bouchon vaseux est présent 5 à 8 mois de l'année à Bordeaux et entre 2 à 5 mois par an à Libourne.

De plus une turbidité importante va jouer un rôle sur la qualité du milieu car cela entraine une diminution de la pénétration de la lumière et donc une baisse de l'activité de la photosynthèse.

- **L'oxygène dissous**

L'oxygène dissout traduit l'état du milieu, une concentration supérieure à 5 $mg.L^{-1}$ (valeur seuil donnée par le SAGE) correspond à un bon état du milieu. Sous ce seuil, le manque d'oxygène dissout peut engendrer un impact sur les organismes biologiques présents dans le milieu.

L'évolution de l'oxygène dissous est inverse à celle de la température, les concentrations les plus élevées (entre 10 et 12,5 $mg.L^{-1}$) sont enregistrées en hiver car les faibles températures favorisent la solubilité de l'oxygène. C'est donc en été (Juillet-Août) que les valeurs les plus basses sont obtenues. Les variations de ces valeurs basses sont plus importantes dans les 3 stations de l'estuaire fluvial (entre 3,1 et 9,0) qu'à Pauillac (de 7,1 à 8,8). De plus, à Bordeaux en Août, la valeur médiane annuelle (4,9 $mg.L^{-1}$) est même en dessous de la valeur seuil préconisée par le SAGE.

9.4. Impacts anthropiques

Le bassin versant de la Gironde a connu une contamination polymétallique historique affectant le continuum Riou Mort-Lot-Garonne-Gironde. Entre 1871 et 1987, l'activité métallurgique de traitement de minerais de Zinc au niveau de Decazeville en Aveyron (à 350 km de l'amont de l'estuaire) a engendré un fort apport de sous-produits métallurgiques. Les éléments traces métalliques concernés par cette contamination sont le Cadmium (Cd), le Cuivre (Cu), le Mercure (Hg), le Plomb (Pb) et le Zinc (Zn) (Audry et *al*., 2004 ; Castelle et *al*., 2007 ; Schäfer et *al*., 2006). Ainsi, les flux métalliques transportés par le Lot et entrant dans la Gironde, *via* la Garonne, sont constitués de 74-90% Cd, 50-60% Cu, 80% Pb et 60% Zn (Audry et *al*., 2004).
Les stocks de ces éléments traces métalliques sont piégés dans les sédiments de barrages du Lot soit environ 200t Cd, 300t Cu, 5-13t Hg, 1 000t Pb et 10 000t Zn (Audry et *al*., 2004 ; Lapaquellerie et *al*., 1995 ; Schâfer et *al*., 2006). Ainsi, lors d'épisode de crues ou de travaux, il y a remobilisation des sédiments chargés en métaux ce qui peut engendrer une augmentation de 4 à 13 fois les apports annuels de ces métaux dans l'estuaire de la Gironde (Audry et *al*., 2010).
Les apports métalliques sont aussi dus aux activités agricoles (Cu présent dans la bouillie bordelaise) qui représentent 50% de la superficie du bassin versant de la Gironde.

L'activité agricole est aussi une cause de présence de pesticides (fertilisant). Les travaux de thèse de Belles (2012) ont mis en évidence la présence de nombreux pesticides tels que le S-métolachlore et ses métabolites, l'Atrazine et ses métabolites, le Diuron et ses métabolites, la Carbétamide, l'Isoproturon, l'Imidaclopride, etc… Le S-métolachlore est le composé le plus détecté dans l'estuaire de la Gironde avec des concentrations qui peuvent atteindre le $\mu g.L^{-1}$. Cependant, l'apport de pesticides dans l'estuaire est saisonnier, il dépend des périodes de fertilisation.

D'autres contaminants organiques peuvent être détectés dans l'estuaire comme les PCB, les PBDE (Tapie, 2006), les HAP (Abou Mrad, 2011) ou encore les produits pharmaceutiques (Aminot, 2013).
Le bassin versant de la Gironde est l'un des moins urbanisé d'Europe (Abril et *al*., 2002), seulement deux agglomérations sont présentes, Bordeaux et Toulouse. Cependant les stations

d'épuration sont des apports non négligeables de composés pharmaceutiques dans l'estuaire de la Gironde (projet ETIAGE). Les travaux de recherche de Aminot (2013) montrent que sur les 53 médicaments étudiés seulement 17 ne sont jamais détectés. Sur les 36 qui sont retrouvés dans l'estuaire, les concentrations vont de 0,1 $ng.L^{-1}$ à la centaine de $ng.L^{-1}$.
Parmi les composés pharmaceutiques les plus détectés, un psychotrope et un antiépileptique sont retrouvés : l'Oxazépam et la Carbamazépine avec des concentrations supérieures à 10 $ng.L^{-1}$.

10. Le fleuve Saint Laurent au Québec

10.1. Morphologie du Saint Laurent

Le fleuve Saint Laurent relie les Grands Lacs de l'Amérique du Nord à l'océan Atlantique au Canada. Il borde en partie la province de L'Ontario sud et traverse le Québec en entier.
L'estuaire du Saint Laurent se situe en aval du fleuve Saint Laurent et en amont du golfe du Saint Laurent.

L'estuaire est divisé en 4 zones (**Figure I-21**) :

- **Le tronçon fluvial** qui s'étend de Cornwall (Ontario) au lac Saint Pierre (Québec). C'est une zone de 240 km qui est formée principalement de rapides, de lacs, d'îles et d'ilots. Ce tronçon est peu influencé par la marée et est constitué d'eau douce.

- **L'estuaire fluvial** qui se situe entre le lac Saint Pierre et la pointe de l'île d'Orléans, qui a une longueur de 160 km et une largeur variant de 3 à 5 km.

- **Le moyen estuaire et le Saguenay** qui commence à la pointe de l'île d'Orléans et se finit à l'embouchure du Saguenay, d'une longueur de 150 km, une largeur de 17 km et une superficie de 3 277 km². C'est une zone de transition entre les eaux douces et les eaux salées qui est soumise à de forts courants entrainant une remise en suspension des sédiments, ce qui en fait une zone très turbide.

- **L'estuaire maritime et golf** qui est situé entre Tadoussac et La Pointe-des-Monts, d'une longueur de 230 km, une largeur de 42 km et une superficie de 12 600 km². Dans cette zone le mélange et la circulation des masses d'eau sont complexes et influencés par plusieurs facteurs comme la marée, la température, le vent, les apports locaux en eau douce ou encore la bathymétrie.

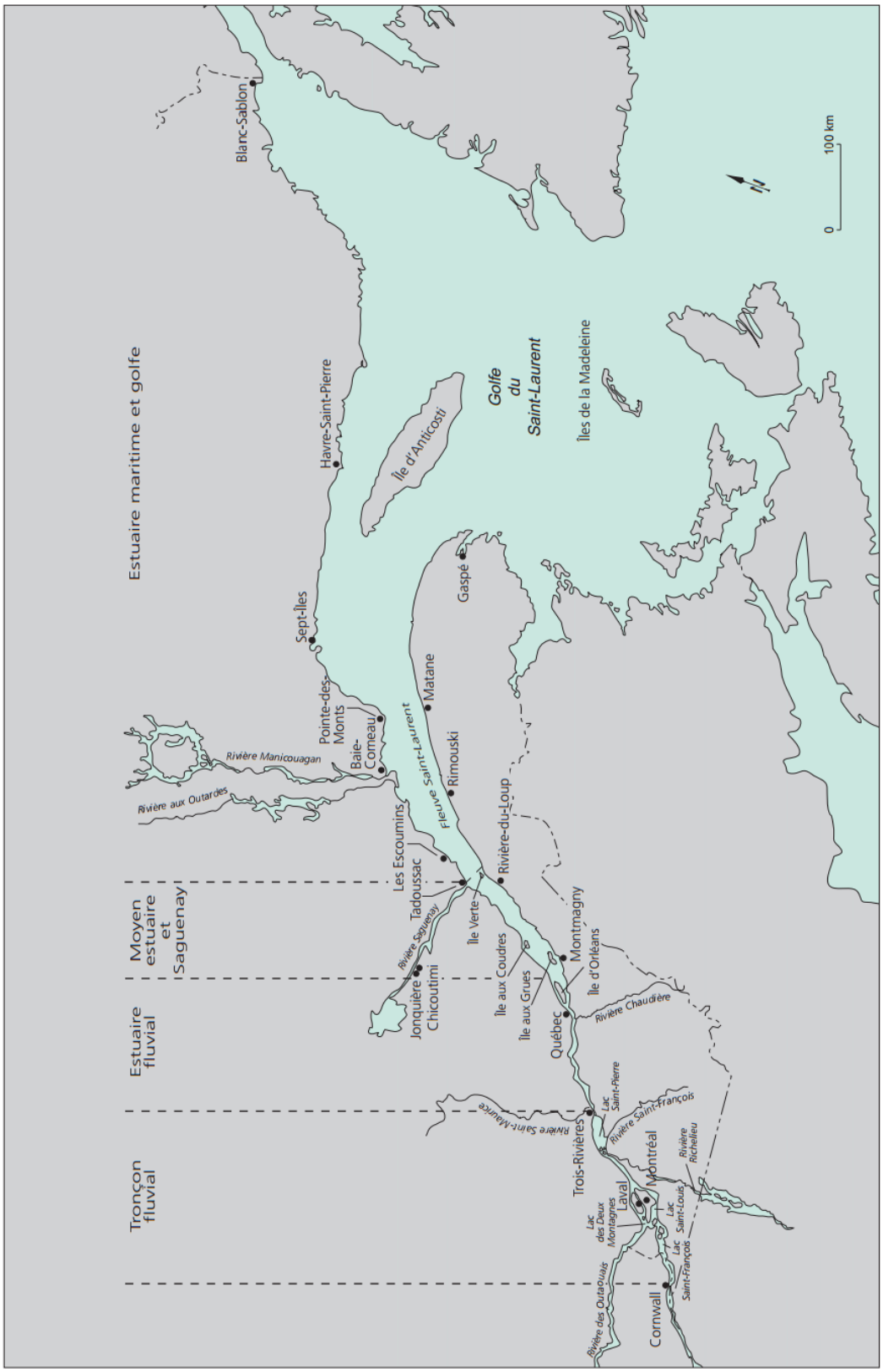


Figure I-21. Les régions hydrographiques du Saint Laurent : tronçon fluvial, l'estuaire fluvial, le moyen estuaire et le Saguenay, l'estuaire maritime et le golfe (source : Environnement canada, 1996).

Le **Tableau II-13** recense les particularités (débit moyen, nombre de tributaires, densité de la population, activités industrielles, etc…) des 4 zones du Saint-Laurent (Centre Saint-Laurent, 1996).

Tableau I-13. Particularité des 4 zones du Saint Laurent (adaptée de Centre Saint-Laurent, 1996)

	Régions hydrographiques			
	Tronçon fluvial	**Estuaire fluvial**	**Moyen estuair et Saguenay**	**Estuaire maritime et golfe**
EAU				
Masses d'eau	distinctes	distinctes jusqu'à Portneuf	zone de mélange des eaux douces et salés	3 masses d'eaux superposées en été et 2 en hiver
Nombre de tributaires	38	25	47	134
Débit moyen annuel ($m^3.s^{-1}$)	7800 (Corwall)	11 500 (Trois-Rivières)	14 100 (La Malbaie)	16 800 (Baie-Comeau)
Caractéristiques de salinité	Eaux douces	Eaux douces	Eaux saumâtres et eaux salées	Eaux salées
USAGES				
Densité de la pop. en 1991 (hab/km^2)	749	213	38	3
Ports commerciaux (en 1992)	Montréal-Contrecoeur Sorel	Québec Bécancour Trois-Rivières	Baie-des-Ha! Ha!	Port-Cartier Sept-îles Baie-Comeau Havre Saint-Pierre Cap-aux meules
Activités industrielles * : nombre d'usine et leur secteur d'activité	27 Chimie inorganique (9) Chimie organique (10) Métallurgie (6) Pâtes et papiers (2)	10 Chimie inorganique (1) Chimie organique (1) Métallurgie (2) Pâtes et papiers (6)	10 Chimie inorganique (1) Métallurgie (3) Pâtes et papiers (6)	2 Métallurgie (1) Pâtes et papiers (1)
Utilisation des rives :				
Milieux humides	7,7%	4,0%	3,4%	Nd
Forêts	19,8%	49,7%	66,0%	
Zones agricoles et friches	56,4%	41,4%	28,0%	
Zones bâties et sols nus	16,1%	10,9%	2,6%	

Dans la suite de cette partie, nous nous intéresserons uniquement au tronçon fluvial car les campagnes d'échantillonnage se sont effectuées dans cette zone.

10.2. Caractéristiques du tronçon fluvial

Le tronçon fluvial présente plusieurs aménagements hydrauliques servant à la production d'électricité et à la navigation commerciale. Ce tronçon principalement constitué d'eau douce et dépourvu de marées, s'élargie pour créer trois lacs : Saint-François, Saint-Louis et Saint-Pierre (**Figure I-22**).
Il draine les eaux de plusieurs rivières dont celles des Outaouais, Châteauguay ou encore Richelieu. Donc tout ceci contribue à la fluctuation de son débit.

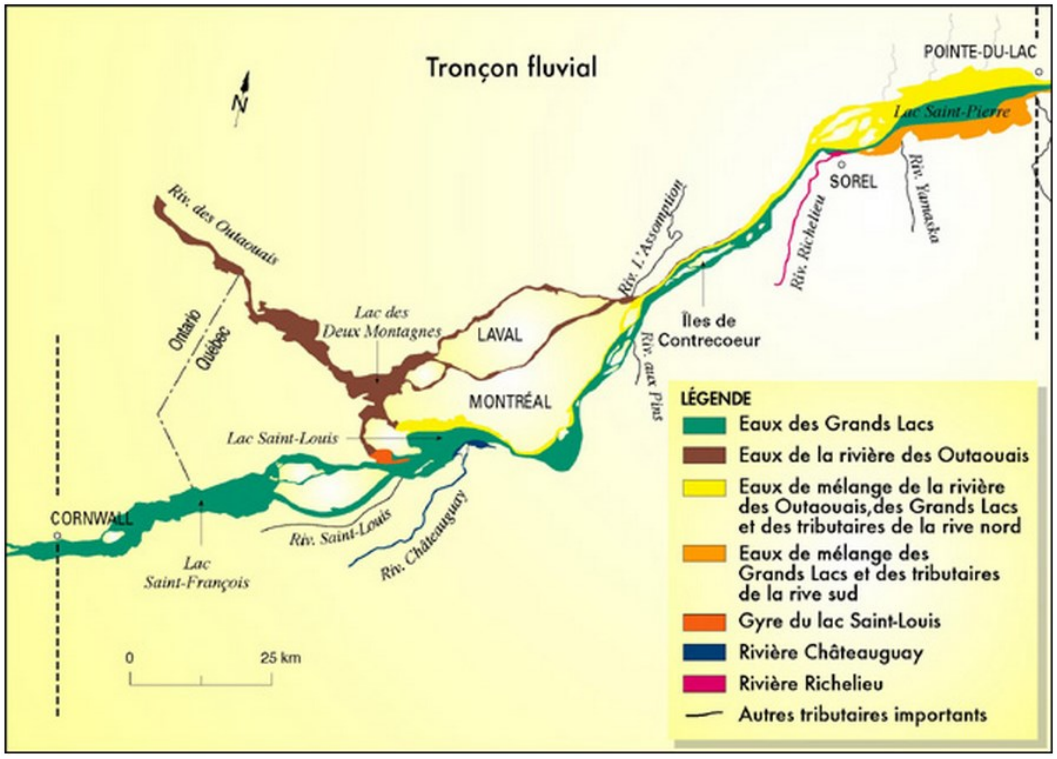


Figure I-22. Schéma des différentes masses d'eau du tronçon fluvial du Saint Laurent (source : Environnement canada : www.ec.gc.ca).

Les eaux vertes des Grands Lacs (bassin versant : 774 000 km^2) représentent 80% du débit du tronçon fluvial et les eaux brunes de la rivière des Outaouais (bassin versant : 146 000 km^2) contribuent quant à elles à 16% de son débit et peuvent aller jusqu'à 50% lors des crues printanières (Hébert et Belley, 2005). La contribution en eau de ces deux grands bassins versants dépend des conditions climatiques et de la régulation des eaux (affectée par plusieurs barrages).
Ainsi, les débits moyens doublent presque d'une zone à l'autre : au niveau de Cornwall le débit est de 7 800 $m^3.s^{-1}$ et de 12 600 $m^3.s^{-1}$ à Québec.

- **Le débit et le niveau d'eau**

Les débits mensuels moyens de 1970 à 2012 de la station Lasalle situé à Montréal (**Figure I-23**) sont représentés dans la **Figure I-24**.

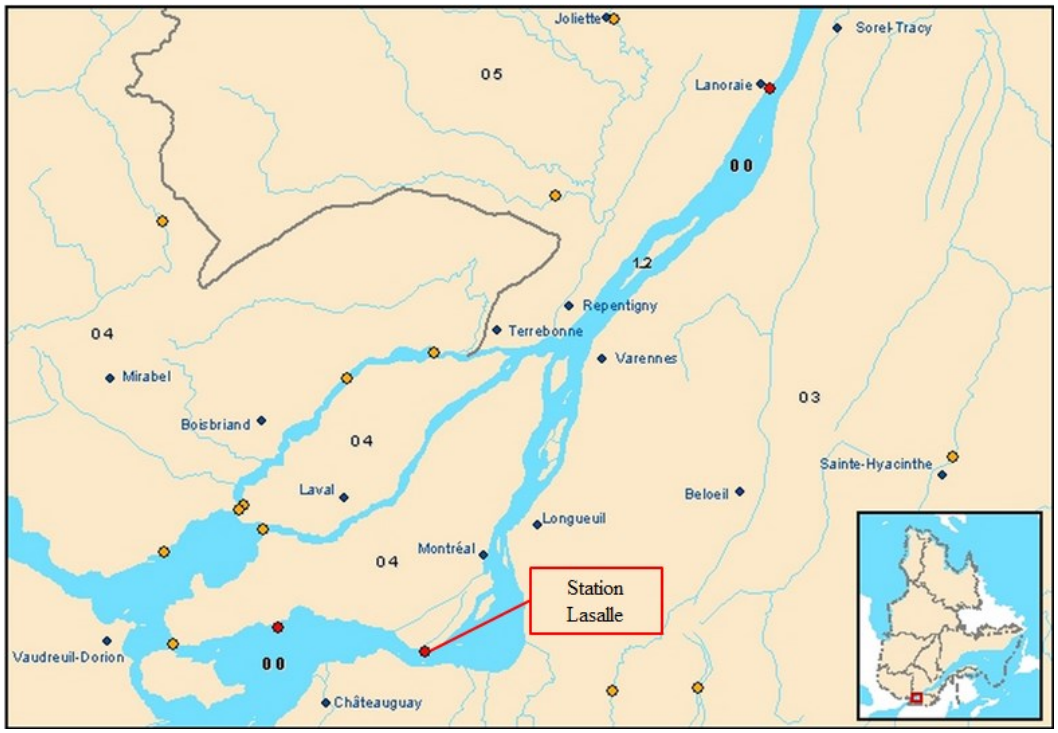


Figure I-23. Station hydrométrique proche de Montréal (source : Centre d'expertise hydrique : www.cehq.gouv.qc.ca).

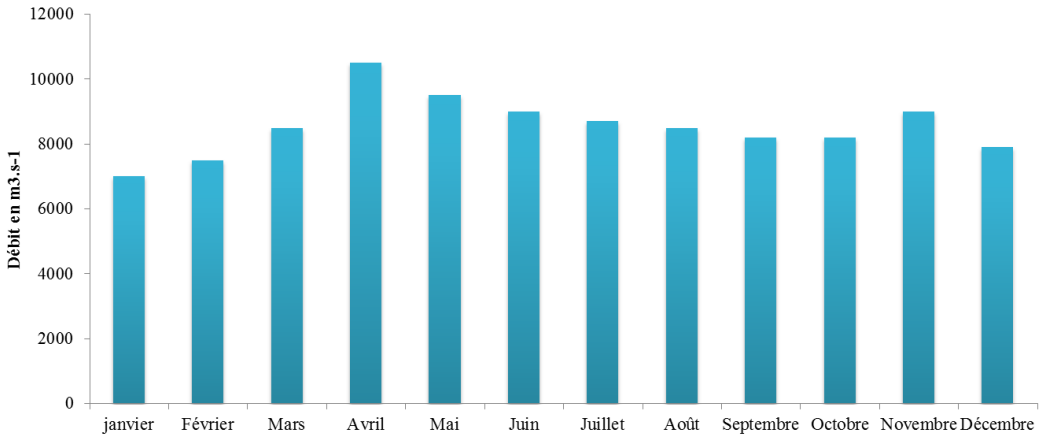


Figure I-24. Débits mensuels moyens à la Station Lasalle (au niveau de Montréal) sur le Saint Laurent de 1970 à 2012 (source : Centre d'expertise hydrique : www.cehq.gouv.qc.ca).

Le débit moyen annuel de 1970 à 2012 à cette station hydrométrique est de 8 540 $m^3.s^{-1}$. Les débits extrêmes rencontrés pendant cette période sont de 15 000 $m^3.s^{-1}$ en avril et 5 500 $m^3.s^{-1}$ en décembre.

Il est à noter que le débit va avoir une influence sur certains paramètres comme la turbidité, le phosphore et les matières en suspension.
Chaque aménagement (dragage, construction d'îles, construction de pont-tunnel, construction de réservoir, gestion des glaces et structure de protection des berges) qui a été réalisé sur le fleuve Saint Laurent va induire un effet sur les niveaux d'eau. Ainsi à Montréal les niveaux d'eau ont diminué entre 1932 et 2005. Le niveau maximal de 13,5 m a été atteint en 1946 et le minimum de 7,5 m en 2001 (**Figure I-25**).

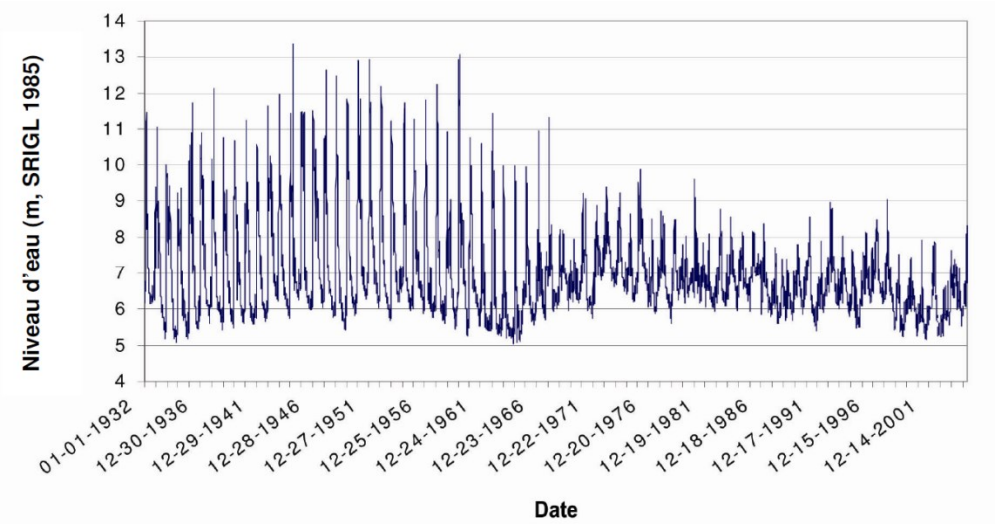


Figure I-25. Niveau d'eau enregistré dans le port de Montréal entre 1932 et 2005 (source : Talbot, André (dir.). 2006).

- **La température**

La température de l'eau au niveau de Montréal connait des variations entre l'hiver et l'été de plus de 20°C, avec une couche de glace qui est présente du mois de Décembre jusqu'aux mois Mars-Avril (**Figure I-26**).

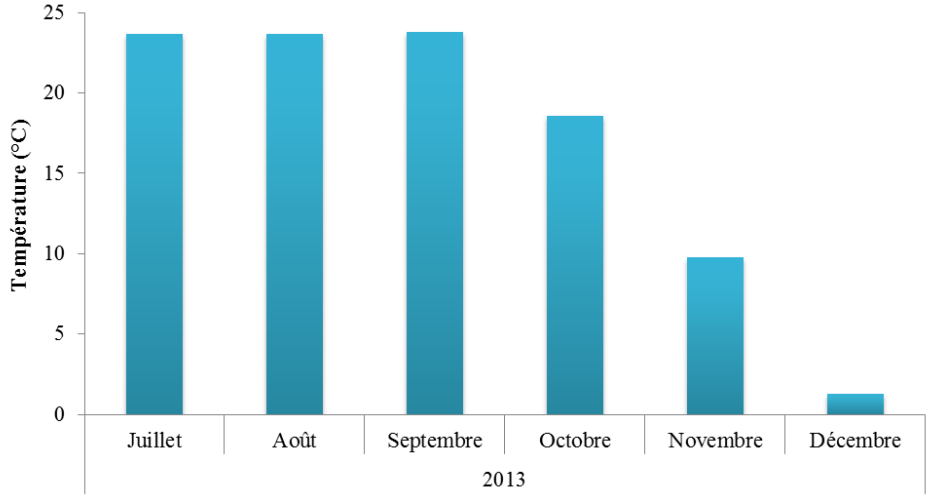


Figure I-26. Température enregistré à la jetée de Montréal de juillà à Décembre 2013 (source : Observatoire global du Saint Laurent : http://ogsl.ca/fr/obs/donnees.html).

La température moyenne pour la période de Juillet à Décembre 2013 (période d'échantillonnage pour cette thèse) est de 16,8 °C. Un maximum de 23,8 °C a été obtenu en Septembre 2013 et un minimum de 1,3 °C en Décembre 2013.

- **Les matières en suspension**

Tout cours d'eau transporte plus ou moins de matières en suspension en fonction de la capacité de charge de l'écoulement et du type de matériaux disponibles.
Plus d'une centaine d'îles modifient l'écoulement du fleuve entre Montréal et Sorel. Elles piègent les sédiments et forment des zones de sédimentation à courant faible. Sur l'ensemble du tronçon fluvial, les sédiments de surface forment un dépôt de quelques dizaines de cm à 3 m d'épaisseur.
Il existe dans ce tronçon trois grandes zones d'accumulation de MES permanentes (les apports en particules sont supérieurs aux pertes) : les lacs Saint François, Saint Louis et Saint Pierre.

Cependant, dans ce tronçon, les charges en solide sont faibles avec des concentrations en MES de l'ordre de 1-2 $mg.L^{-1}$ à la sortie des Grands Lacs, 4-5 $mg.L^{-1}$ dans le lac Saint François, 7-8 $mg.L^{-1}$ dans le lac Saint Louis, 9-13 $mg.L^{-1}$ dans le lac Saint Pierre et 16-20 $mg.L^{-1}$ au niveau de Québec. Le maximum de turbidité est observé dans l'estuaire moyen avec des concentrations en MES comprises entre 200 et 400 $mg.L^{-1}$ (Frenette et *al.*, 1989 ; Lepage, 1997).
En considérant les débits moyens du Saint Laurent, environ 199 000 tonnes de MES transitent annuellement par Cornwall alors que 6 900 000 t/an ressortent à Québec. En conclusion, il existe de forts apports sédimentaires venant des tributaires Nord et Sud du fleuve, des effluents de la Communauté Urbaine de Montréal (CUM) et des autres urbanisations du tronçon fluvial et de l'érosion des lits et des berges du Saint Laurent (**Figure I-27**).

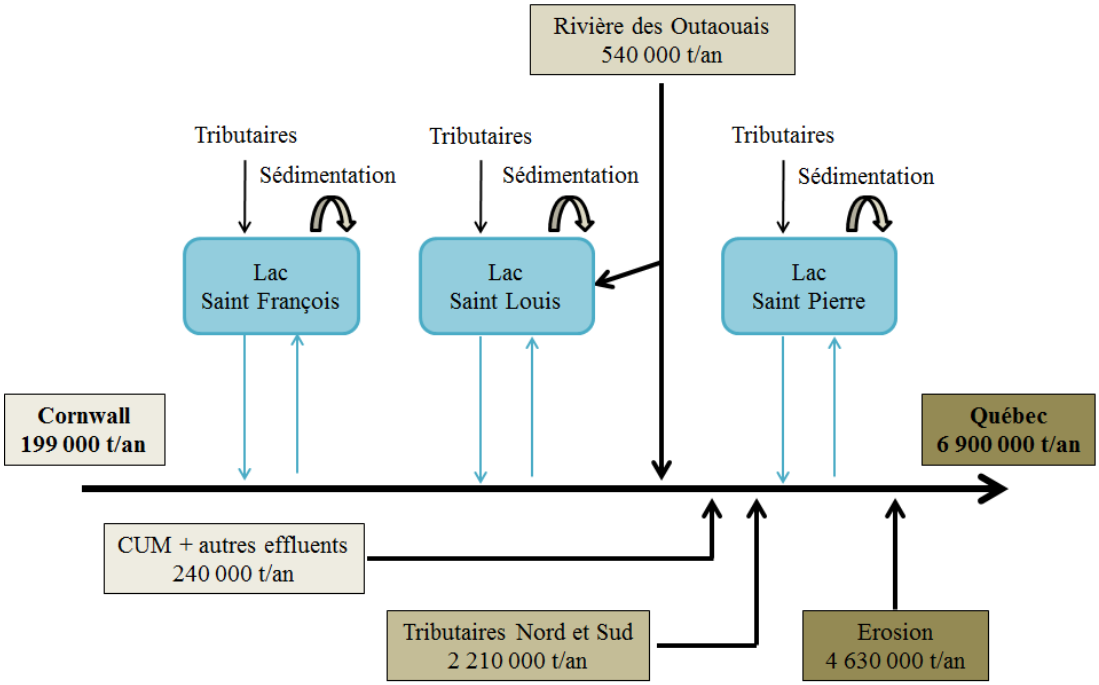


Figure I-27. Représentation simplifiée de la dynamique sédimentaire entre Cornwall et Québec (adaptée de Lepage, 1997 ; Rondeau et *al.*, 2000).

Ces particules fines sont propices à l'accumulation des contaminants ainsi le sédiment du fond du Saint Laurent est contaminé à cause des activités industriels.

10.3. Impacts anthropiques sur cette zone fluviale

Ce tronçon fluvial est la zone la plus urbanisée, il est constitué de 75 % de la population riveraine québécoise. Les activités industrielles y sont les plus présentes avec le secteur de la métallurgie, du papier, de la chimie, de la pétrochimie, des traitements de surface et de la préservation du bois.
De plus ce tronçon regroupe la majorité des prises d'eau potable du Québec (30 sur les 36 existantes) car 45 % de la population québécoise puisent son eau potable dans le fleuve.
Les rejets industriels peuvent être des apports de contamination dans le Saint Laurent comme les rejets urbains. Le Saint Laurent reçoit 60 % des rejets urbains traités du Québec et 47 % des eaux usées de la province sont traitées par les stations d'épuration de Montréal, Longueuil et Repentigny.

Les principaux problèmes et les pertes d'usage dans le tronçon fluvial touchent le chenal de navigation et la masse d'eau au nord de ce chenal. Ceci est dû à la contamination bactériologique provenant des stations d'épuration de Montréal, Longueuil et Repentigny que ne désinfectent pas les eaux traitées avant de les rejeter (eaux traitées venant de 2,2 millions de personnes) (Hébert et Belley, 2005). Mais cette contamination est aussi due au débordement des égouts lors de temps de pluie.
La contamination bactériologique commence à s'estomper au niveau du lac Saint Pierre mais reste perceptible jusqu'à Bécancour (environ à 125 km de Montréal) (Hébert, 2006) (**Figure I-28**).

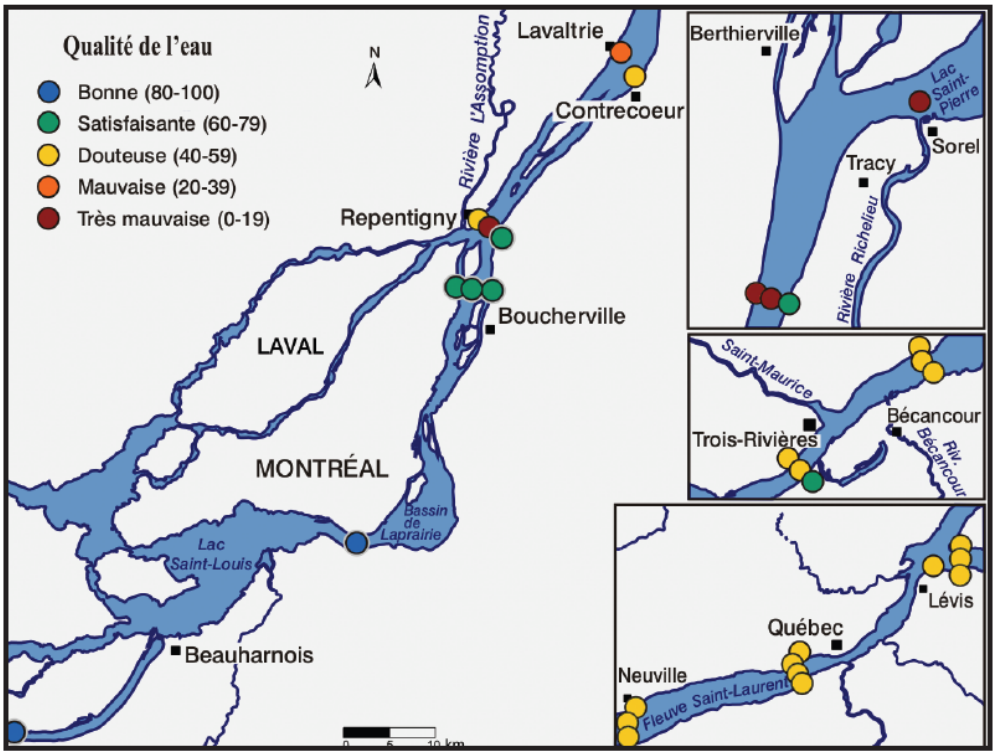


Figure I-28. Qualité de l'eau du fleuve Saint Laurent entre 2004-2005 (source : Hébert, 2006).

Malgré ce problème bactériologique, des programmes d'assainissement des eaux du Québec (PAEQ) ont été mis en place depuis 1978, permettant ainsi de réduire les rejets de matières organiques (DBO_5), de MES et de phosphore (**Figure I-29**) (Hébert et Belley, 2005).

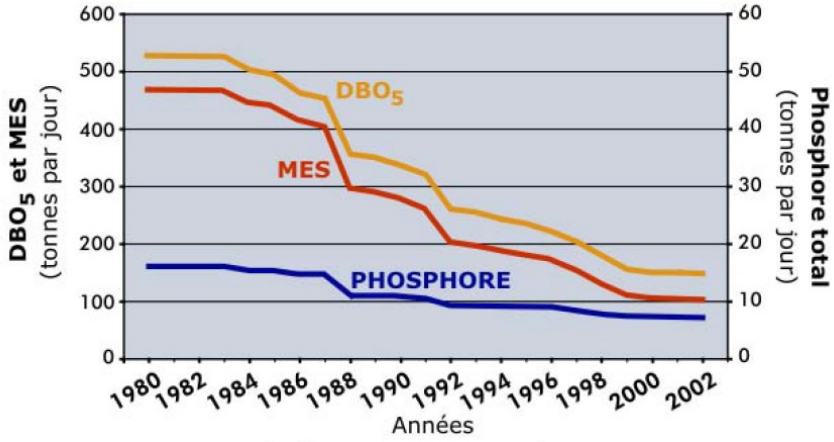


Figure I-29. Evolution des rejets de phosphore, MES et DBO5 par les municipalités du Québec de 1979 à 2002 (source : Hébert et Belley, 2005).

Ainsi une forte diminution des niveaux de DBO_5 et de MES a été observée de 1980 à 2002.

Depuis 1990, les mêmes mesures ont été mises en place sur les rejets des industries de pâtes et papiers avec le programme de réduction des rejets industriels (PRRI), permettant ainsi de diminuer de 96 % les rejets de DBO_5, de 87 % les rejets de MES et de 39 % des rejets d'eaux usées (**Figure I-30)**.

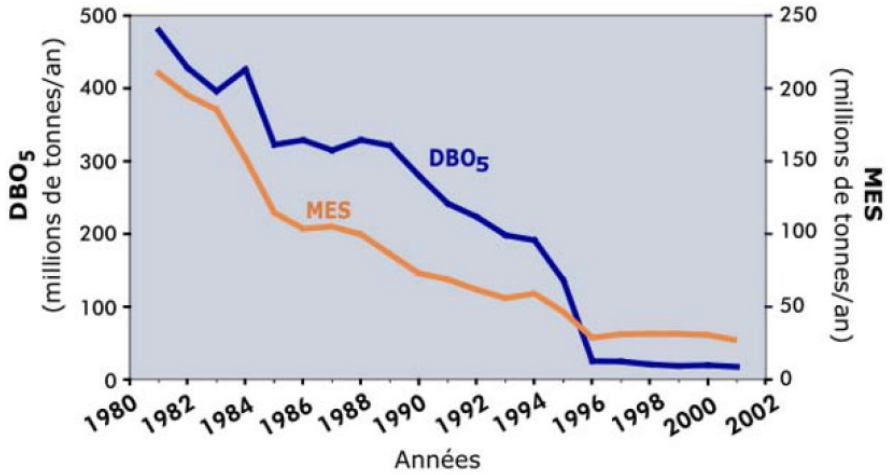


Figure I-30. Evolution des rejets de MES et DBO5 par les industries de pâtes et papiers du Québec entre 1981 et 2001 (source : Hébert et Belley, 2005).

Ainsi, ces programmes ont grandement servi à améliorer la qualité de l'eau du fleuve Saint Laurent.

Le Plan Saint-Laurent cherche à élaborer des indicateurs environnementaux à partir de données recueillies par plusieurs organismes (le ministère de l'Environnement du Canada, le ministère des Pêches et des Océans du Canada, le ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, etc…) dans le cadre des activités de suivi environnemental de l'eau, des sédiments, des ressources biologiques et des usages des rives.
Pour cela, une liste de substances prioritaires d'Environnement Canada, Environmental Protection Agency des États-Unis et de la Commission mixte internationale a été suivie à l'île Wolfe et à Carillon dans le tronçon fluvial et à Québec dans l'estuaire fluvial (**Tableau I-14**) (Rondeau, 2005).

Tableau I-14. Concentrations et tendances temporelles des substances prioritaires suivies à l'île Wolf, à Carillon et à Québec (source : Rondeau, 2005).

Paramètres	Concentrations moyennes (ng/L)			Critères de qualité (ng/L)*	Tendances temporelles à Québec (1995-2002) (changements estimés en %)	
	Carillon 2004	île Wolfe 2003-2004	Québec 2003-2004		Dissous	Particulaires
MÉTAUX						
Aluminium	33 000	13 000	19 000	100 000	↑ 10	↓ 2
Arsenic	340	780	590	5 000	↑ 4	AT
Cadmium	11	13	17	800	AT	↓ 8
Cuivre	960	800	1 000	2 000	↑ 3	↓ 2
Fer	185	58	50	300 000	↑ 15	↓ 3
Mercure	1,2	0,3	0,9	100	↑ 11	↑ 12
Nickel	660	1 200	1 100	65 000	↓ 4	↓ 2
Plomb	36	16	25	2 000	AT	↓ 2
Zinc	817	440	700	30 000	↑ 17	↓ 3
PESTICIDES						
Atrazine	—	53	41	1 800	AT	AT
Métolachlore	—	18	13	7 800	AT	AT
Simazine	—	AT	9	10 000	AT	AT
HAP						
Anthracène	0,09	0,02	0,15	12	AT	AT
Benzo[*a*] anthracène	< 0,03	< 0,03	0,06	18	AT	AT
Benzo[*a*] pyrène	0,04	< 0,01	0,09	15	AT	AT
Fluoranthène	1	0,36	0,8	40	AT	↑ 9
Fluorène	0,3	0,34	0,9	3 000	↑ 5	AT
Phénanthrène	1,8	0,85	2	400	AT	↑ 10
Pyrène	1,4	0,25	0,8	25	↓ 4	↓ 6

*Protection de la vie aquatique (toxicité chronique).
AT : Aucune tendance.

Cette étude a permis de montrer la présence d'une contamination variée dans le Saint Laurent. De même la présence de produits pharmaceutiques dans le fleuve Saint Laurent et dans l'eau de boissons a aussi été démontré dans l'étude de Garcia-Ac et *al*. (2010).

11. Cadre scientifique : le programme Médic'eau

Le projet Médic'eau s'intègre dans le regroupement **GaGiLau** (**Ga**ronne, **Gi**ronde, St **La**urent) qui cherche à projeter l'état des fleuves dans l'avenir en diagnostiquant les enjeux environnementaux actuels. Les domaines d'étude prioritaire de **GaGiLau** sont l'hydrologie, l'écotoxicologie et les changements climatiques. Les objectifs spécifiques de **GaGiLau** sont de :

-caractériser la vulnérabilité et les stratégies d'adaptation dans les Environnements Fluviaux-Estuariens (EFE) du Saint-Laurent et du système Garonne-Gironde.

-structurer, coordonner et réaliser des projets de recherche multidisciplinaires et internationales dans le domaine des sciences naturelles, physiques et humaines, fondamentales et appliquées, relatives à l'avenir des EFE.

-contribuer à la formation de jeunes chercheurs (étudiants de 2ème et 3ème cycles et stagiaires postdoctoraux) dans le cadre d'un programme scientifique basé sur la collaboration internationale.

-créer un groupe de recherche dynamique qui se rencontre lors d'un colloque annuel.

-informer le public et les décideurs des grands enjeux des EFE et de faciliter la recherche d'expertise parmi les membres de **GaGiLau**.

Le projet Médic'eau cherche à réactualiser les connaissances acquises lors des projets préliminaires antérieurs (Togola, 2006) qui ont commencé à documenter sur le problème des résidus de médicaments dans l'estuaire de Gironde. Les acteurs de Médic'eau souhaitent alors étendre la gamme des composés étudiés à la fois au sein des familles thérapeutiques déjà prises en compte par le passé (une vingtaine de composés ont été suivis appartenant à la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens, des analgésiques, des bronchodilatateurs, des hypolipidémiants ou encore des antidépresseurs) mais aussi d'autres familles d'intérêt majeur comme les antibiotiques, les anti-cancéreux ou les psychotropes. Les composés étudiés feront partis des familles les plus consommées mais aussi celles présentant les plus fortes toxicités potentielles. De plus dans ce projet, les situations des villes de Bordeaux, Toulouse et Montréal seront comparées.
Médic'eau a alors pour vocation de développer des connaissances scientifiques permettant de saisir l'intégralité du problème de diffusion de résidus médicamenteux tout au long du circuit qui va de la prescription et de la consommation de médicaments jusqu'à l'analyse de l'impact des RM sur la qualité des milieux aquatiques. Cela implique d'observer toute une série de relations causes-effets au niveau de l'ensemble du circuit des médicaments :

1- Composantes sociales et économiques : quels sont les causes/effets des politiques de santé, des prescriptions médicales, de l'organisation des soins, des modes de vie et des modes de consommation des médicaments sur la diffusion des RM dans l'eau ?

2- Composantes techniques : quelles sont les capacités, les limites et les perspectives des techniques actuelles de recueil, de stockage et de traitement des RM ?

3- Composantes environnementales : Quelles sont les concentrations de RM dans le milieu naturel ? Comment mesurer l'origine et la présence des RM ? Quelles sont les contributions respectives des apports par les villes et par les bassins versants ? Comment mesurer les impacts sanitaires et environnementaux de leur présence dans les milieux ? Quels sont les effets microbiologiques et écotoxicologiques ? Quels effets sur les communautés vivantes comme les communautés microbiennes ?

Afin de répondre à ces questions, le programme de travail se décompose en 7 tâches complémentaires :

Tâche 1 : Dispositif méthodologique des enquêtes sociologiques.

Tâche 2 : Développements analytiques et méthodologiques pour la caractérisation de la présence et du devenir des RM tant dans le milieu naturel que dans les entrées et sorties de STEP.

Tâche 3 : Etude des effets toxiques des RM en lien avec la présence dans le milieu aquatique.

Tâche 4 : Etude des effets des antibiotiques sur les bactéries multi-résistantes.

Tâche 5 : Dégradation des effluents et des composés modèles.

Tâche 6 : Bio-remédiation naturelle.

Tâche 7 : Intégration des démarches sociologiques, chimiques, toxicologiques et environnementales.

Les travaux de cette thèse s'incluent dans les tâches 2 et 3 de ce projet, en se focalisant sur une liste de composés appartenant exclusivement à la famille thérapeutique des psychotropes.

OBJECTIF DES TRAVAUX DE THESE

L'amélioration et la protection de la qualité des milieux aquatiques préoccupent depuis quelques années nos sociétés. En effet, il existe une grande variété de molécules chimiques présentes à l'état de trace dans le compartiment aquatique. Parmi elles, on retrouve les composés pharmaceutiques dont la présence dans le milieu aquatique est principalement liée à la consommation humaine et aux rejets continuels des eaux usées par les stations d'épuration. Leur devenir dans les STEP va être lié aux procédés épuratoires utilisés mais aussi aux propriétés physico-chimiques de chaque molécule, comme pour leur devenir dans l'environnement. La présence de composés pharmaceutiques a été mise en évidence dans différentes matrices : eaux de surface, eaux usées, eaux souterraines, eaux de boissons, sédiments, sols, particules, boues d'épandage, animaux ou encore plantes. Les molécules pharmaceutiques étant biologiquement actives, une fois rejetées dans l'environnement, elles peuvent avoir un impact toxique sur les organismes aquatiques non ciblés (si homologies de récepteur ou de site d'action). Enfin bien que régulièrement étudiées dans de nombreux programmes de recherche, la présence, le devenir et l'impact des molécules pharmaceutiques dans l'environnement ne sont pas encore assez documentés et ni spécifiquement réglementés.

Une grande famille de composés pharmaceutiques a été étudiée dans ces travaux de thèse, celle des psychotropes. Depuis quelques années, les scientifiques commencent à s'intéresser à quelques membres de cette famille thérapeutique tels que la Carbamazépine, la Fluoxétine, le Diazépam ou encore la Venlafaxine. Cependant, la synthèse bibliographique de ce manuscrit a fait ressortir un réel manque de connaissance sur un grand nombre de molécules psychotropes, sur leur devenir dans les STEP et dans l'environnement, leur présence dans le milieu aquatique et sur leur impact toxique sur les organismes aquatiques.
Ainsi, ces travaux de thèse cherchent à compléter ces informations sur les psychotropes dans deux pays, en France et au Canada (particulièrement au Québec).

Le premier objectif de cette thèse a été de développer et de valider deux types de méthodes :

-une méthode analytique multi-résidus permettant de détecter une liste de psychotropes (préalablement sélectionnés) dans les eaux de surface mais aussi dans les eaux usées.

-une méthode d'échantillonnage passif des psychotropes basée sur le POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler). Cet outil a pour vocation de donner accès à une concentration pondérée par le temps d'exposition du dispositif, de diminuer les limites de détection et donc de trouver des composés à l'état de trace dans l'environnement qui ne sont pas visibles lors d'un échantillonnage ponctuel classique.

Ces développements ont permis la faisabilité du deuxième objectif de cette thèse qui est d'évaluer la contamination en psychotropes dans deux stations d'épuration de la région bordelaise et dans la Garonne. Mais aussi de l'évaluer dans trois stations de traitement des eaux usées québécoises et dans le Saint Laurent. Ce suivi de la contamination en psychotropes en France et au Québec a permis de comparer ces deux pays qui sont différents au niveau des

habitudes de prescription et de consommation de ces composés, au niveau des traitements épuratoire mis en place dans les STEP mais aussi au niveau de leur hydrosystème récepteur.

Le dernier objectif de cette thèse a été d'évaluer l'impact toxique de certains psychotropes sur des bivalves d'eau douce (*Ellipto complanata* et *Corbicula fluminea*) grâce à une approche *in vitro* avec des concentrations de l'ordre du $mg.L^{-1}$ et même de la centaine de $mg.L^{-1}$. Ainsi qu'avec une approche *in vivo* avec des niveaux de concentrations qui ont été retrouvés dans les STEP et dans les milieux aquatiques étudiés.

Ces travaux de thèse permettent alors de comprendre l'intégralité du problème de diffusion des psychotropes de leur passage en station d'épuration à leur présence dans l'environnement et pour finir par leur impact sur les organismes aquatiques.

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

1. MOLECULES ETUDIEES 82
1.1. Choix des composés 82
1.2. Caractéristiques physico-chimiques 84
1.3. Données d'occurrence 92
2. STRATEGIES D'ECHANTILLONNAGE ET SITES D'ETUDE 95
2.1. Les différents types de prélèvements étudiés 95
a) Prélèvement ponctuel 95
b) Prélèvement moyenné 24h 95
c) Echantillonnage passif 95
3. SITES D'ETUDES 96
3.1. Station d'épuration de la communauté urbaine de Bordeaux 96
3.1.1. La station d'épuration de Clos de Hilde 97
3.1.2. La station d'épuration de Louis Fargue 100
a) Description des points de prélèvement 104
b) Stratégie d'échantillonnage 105
3.2. La Gironde 106
a) Description des points de prélèvement 106
b) Stratégie d'échantillonnage 108
3.3. La Jalle de Blanquefort 109
a) Description des points de prélèvement 111
b) Stratégie d'échantillonnage 112
3.4. Station de traitement des eaux usées du Québec 113
3.4.1. La STEP Jean Marcotte de Montréal 113
3.4.2. La STEP de l'île Lebel et les étangs aérés de Le Gardeur à Repentigny 116
3.4.2.1 La STEP de l'île Lebel 116
3.4.2.2 Les étangs aérés Le Gardeur 118
a) Description des points de prélèvement 119
b) Stratégie d'échantillonnage 119
3.5. Le Fleuve Saint Laurent 120
a) Description des points de prélèvement 120
b) Stratégie d'échantillonnage 121
4. ETUDE D'UN ECHANTILLONNEUR PASSIF : LE POCIS (POLAR ORGANIC CHEMICAL INTEGRATIVE SAMPLER) 122
4.1. Généralité sur l'échantillonneur passif 122
4.2. Le POCIS 124
a) Description 124
b) Principe 125
c) Montage du POCIS 127
4.3. Calibration et validation du POCIS 128
4.3.1. Calibration en laboratoire 128
a) Calibration 1 129
b) Calibration 2 130
4.3.2. Calibration in situ 131
4.4. Extraction du POCIS 131
a)Mise en cartouche 131
b) Extraction de la phase réceptrice 132
5. PREPARATION ET EXTRACTION DES ECHANTILLONS D'EAU 133
5.1. Produits chimiques et solvants 133

5.2. Filtration et conservation des échantillons 133
5.3. Méthode d'extraction 134
a) Généralité 134
b) Principe 135
c) Protocole d'extraction pour les psychotropes étudiés 135
6. ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM 137
6.1. Technique analytique 137
6.2. Méthode analytique développée pour les psychotropes 137
6.3. Quantification 142
a) Etalon interne 142
b) Quantification 144
7. MODELES BIOLOGIQUES ET BIOMARQUEURS ETUDIES 145
7.1. La moule d'eau douce Elliptio complanata 145
7.1.1. Généralités 145
a) Systématique 145
b) Origine et aire de répartition 145
c) Biologie et écologie 146
d) Utilisation en écotoxicologie 150
7.1.2. Analyses sur Elliptio complanata 151
7.1.2.1 Technique d'analyse des paramètres hémocytaires 151
7.1.2.1.1 Prélèvement de l'hémolymphe 151
7.1.2.1.2 Mesure par cytométrie en flux 151
a) Viabilité 152
b) Concentration hémocytaire 152
c) Activité de phagocytose 153
d) Production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) 153
7.1.2.2 Mesure par spectrophotométrie 154
a) Activité de la Cyclooxygénase 154
b) Production d'oxyde nitrique 154
c) Activité des lysozymes 155
7.1.2.3 L'essai des comètes 155
7.2. La palourde asiatique Corbicula fluminea 156
7.2.1. Généralités 156
a) Systématique 156
b) Origine et aire de répartition 156
c) Biologie et écologie 157
d) Utilisation en écotoxicologie 158
7.2.2. Analyses sur Corbicula fluminea 159
7.2.2.1 Technique transcriptomique : expression de gènes d'intérêts 159
7.2.2.2 Quantification des métallothionéines 161

1. Molécules étudiées

1.1. Choix des composés

Parmi les 14 familles thérapeutiques existantes, recouvrant plus de 3 000 molécules actives commercialisées, ces travaux de thèse se sont focalisés sur une famille de composés : **les Psychotropes**. Ce sont des molécules dont la consommation augmente depuis ces dernières années dans le monde entier (**Chapitre. 1 section 1.5**).

Ainsi 47 molécules psychotropes de 6 classes thérapeutiques différentes ont été choisies pour être étudiées au cours de ces travaux de recherche. Cette sélection a pu être faite à partir : (1) des données de consommation, (2) des données d'occurrence (effluents urbains, eau de surface), (3) de la base de données des pharmacies de Caen obtenues pour le projet Pharm@écotox, (4) de la base de données du centre hospitalier psychiatrique Vauclaire de Montpont-Menestrol obtenue pour le projet Psych'eau, (5) de la liste des différentes classes de molécules établies sur la base des valeur de PEC (**Annexe 4**) proposée dans le rapport de Besse et Garric (2007) et enfin à partir (6) du rapport sur les substances psychotropes de l'INCB 2012 (Organe International de Contrôle des Stupéfiants ; établie avec les données de 2010) (**Tableau II-1**).

Cette liste contient des molécules qui ont déjà été très étudiées dans le monde de la recherche que ce soit au niveau de la chimie analytique que dans le milieu de la biologie (ex. : la Carbamazépine, la Fluoxétine, le Diazépam ou encore la Paroxétine). Ces molécules correspondent aux 17 qui ont déjà été étudiés au laboratoire (correspondant à la colonne « Dosés au LPTC » du **Tableau II-1**). Ce choix permet de comparer nos données à celles de la bibliographie scientifique. Cependant des molécules ont aussi été sélectionnées car peu voire aucune donnée bibliographique n'est disponible sur ces composés en France, au Québec ou encore dans les domaines étudiés pour cette thèse (ex. : le Lévétiracétam, l'Amisulpride, la Gabapentine, la Sulpiride ou encore le Tiapride).

Cette liste de composés a alors été conçue pour analyser un grand nombre de psychotropes à l'aide d'une méthode multi-résidus afin d'établir un « screening » (étude à large spectre). Ces molécules ont été recherchées dans les eaux de station d'épuration la communauté urbaine de Bordeaux et dans la région de Montréal mais aussi dans les eaux de la Gironde et du Saint Laurent.
A partir de ces données, des composés seront ensuite sélectionnés pour étudier leur toxicité sur des bivalves d'eau douce.

Tableau II-1. Sélection des composes psychotropes pour les travaux de thèse.

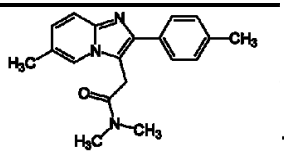
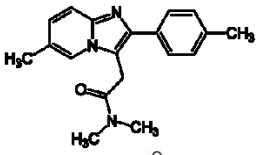
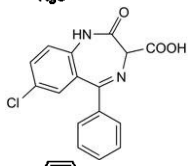
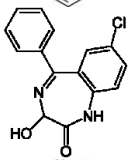
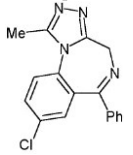
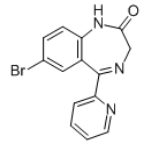
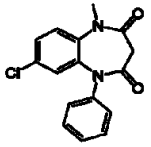
Classes thérapeutiques	Composés	Fournisseurs	Pharm@écotox	Psych'eau	Besse et Garric (2007)	INCB 2012 (Canada)	INCB 2012 (France)
Benzodiazépines	Zopiclone		X		X		
	Zolpidem		X		X	X	X
	Nordiazépam	X	X		X	X	X
	Oxazépam	X	X	X	X	X	X
	Alprazolam	X	X	X	X	X	X
	Bromazépam	X	X		X	X	X
	Clobazam		X			X	X
	Clonazépam	X	X			X	X
	Clorazépate		X		X	X	X
	Diazépam	X	X		X	X	X
	Lorazépam	X			X	X	X
	Flunitrazépam		X			X	X
	Témazépam		X			X	X
	Prazépam		X		X	X	X
Antidépresseurs	Mirtazapine		X				
	Milnacipran		X	X			
	Venlafaxine		X	X			
	Miansérine		X	X	X		
	Amoxapine		X				
	Citalopram		X		X		
	Tianeptine				X		
	Paroxétine	X	X	X	X		
	Imipramine	X					
	Maprotiline		X				
	Duloxétine	X	X	X			
	Amitriptyline	X	X	X			
	Fluoxétine	X	X	X	X		
	Sertraline		X	X	X		
	Doxépine	X	X				
	Norfluoxétine	X					
	Clomipramine		X	X			
Antipsychotiques – Neuroleptiques	Sulpiride		X				
	Cyamémazine		X	X	X		
	Chlorpromazine		X				
	Tiapride		X				
	Amisulpride		X	X			
	Pimozide		X				
Antiépileptiques	Gabapentine		X	X			
	Valpromide		X	X			
	Carbamazépine	X	X	X	X		
	Lévétiracétam		X				
	Lamotrigine		X				
	Primidone	X	X				
Anxiolytiques	Méprobamate	X	X			X	X
	Buspirone		X				
	Hydroxyzine		X				
Substituts aux opiacés	Méthadone		X				

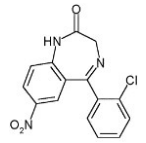
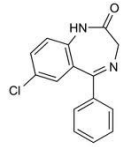
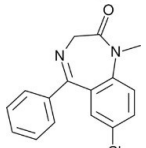
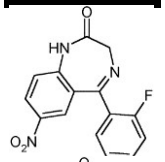
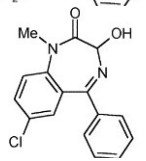
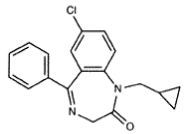
1.2. Caractéristiques physico-chimiques

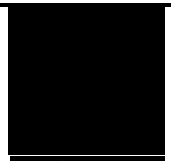
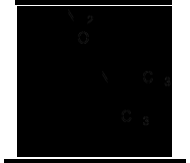
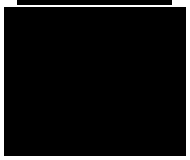
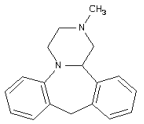
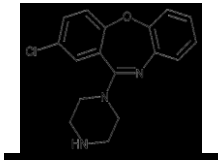
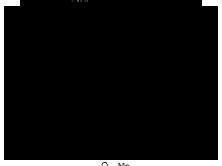
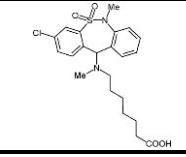
Le **Tableau II-2** centralise les principales propriétés physico-chimiques des 47 psychotropes étudiés dans ces travaux de recherche (source : www.drugbank.ca).
Dans ce tableau figure pour chaque molécule :

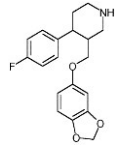
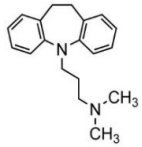
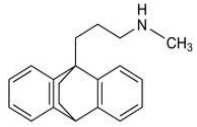
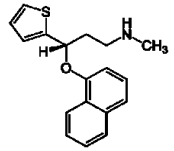
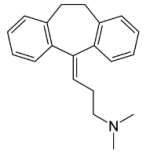
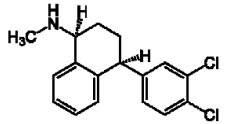
- sa classe thérapeutique
- son nom
- son numéro de CAS
- sa masse moléculaire ($g.mol^{-1}$)
- son log Kow
- son pKa
- sa formule développée

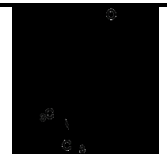
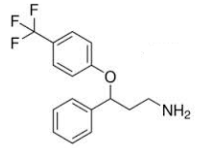
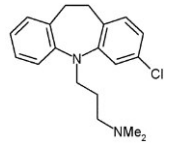
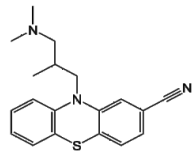
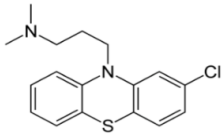
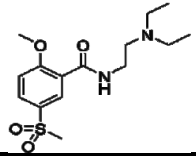
Tableau II-2. Propriétés physico-chimiques et structure des 47 psychotropes sélectionnés.

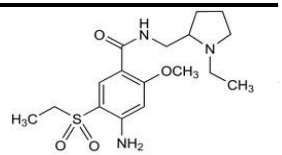
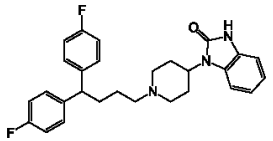
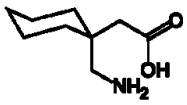
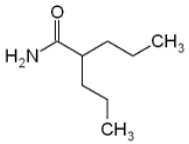
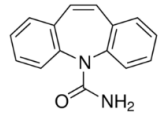
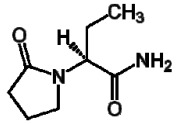
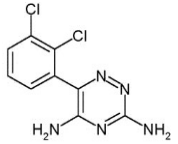
Classes thérapeutiques	Composés	N° CAS	Masse moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Log Kow	pKa	Formule moléculaire	Formule développée
Benzodiazépines	Zopiclone	43200-80-2	388,81	0,81	6,89 – 13,4	$C_{17}H_{17}ClN_6O_3$	
Benzodiazépines	Zolpidem	82626-48-0	307,4	3,02	0 – 5,65	$C_{19}H_{21}N_3O$	
Benzodiazépines	Nordiazépam	1088-11-5	270,71	3,21	2,85 – 12,3	$C_{15}H_{11}ClN_2O$	
Benzodiazépines	Oxazépam	604-75-1	286,71	2,92	-1,5 – 10,61	$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$	
Benzodiazépines	Alprazolam	28981-97-7	308,76	2,37	5,08 – 18,3	$C_{17}H_{13}ClN_4$	
Benzodiazépines	Bromazépam	1812-30-2	316,15	2,54	2,68 – 12,24	$C_{14}H_{10}BrN_3O$	
Benzodiazépines	Clobazam	22316-47-8	300,74	2,55	-6,7 – 4,07	$C_{16}H_{13}ClN_2O_2$	

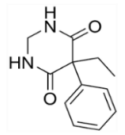
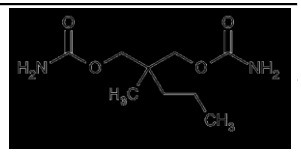
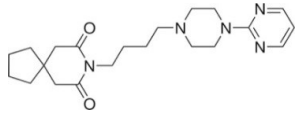
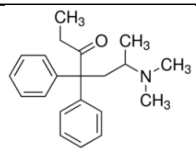
Classes thérapeutiques	Composés	N° CAS	Masse moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Log Kow	pKa	Formule moléculaire	Formule développée
Benzodiazépines	Clonazépam	1622-61-3	315,71	3,15	1,86 – 11,89	$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$	
Benzodiazépines	Clorazépate	23887-31-2	314,72	3,21	-0,64 – 3,32	$C_{16}H_{11}ClN_2O_3$	
Benzodiazépines	Diazépam	439-14-5	284,74	3,08	2,92	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	
Benzodiazépines	Lorazépam	846-49-1	321,16	3,53	-2,2 – 10,61	$C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$	[redacted]
Benzodiazépines	Flunitrazépam	1622-62-4	313,28	2,55	1,7	$C_{16}H_{12}FN_3O_3$	
Benzodiazépines	Témazépam	846-50-4	300,74	2,79	-1,4 – 10,68	$C_{16}H_{13}ClN_2O_2$	
Benzodiazépines	Prazépam	2955-38-6	324,8	3,86	3,06	$C_{19}H_{17}ClN_2O$	

Classes thérapeutiques	Composés	N° CAS	Masse moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Log Kow	pKa	Formule moléculaire	Formule développée
Antidépresseurs	Mirtazapine	61337-67-5	265,35	3,21	6,67	$C_{17}H_{19}N_3$	
Antidépresseurs	Milnacipran	92623-85-3	246,35	1,42	9,83	$C_{15}H_{22}N_2O$	
Antidépresseurs	Venlafaxine	93413-69-5	277,4	2,74	8,91 – 14,42	$C_{17}H_{27}NO_2$	
Antidépresseurs	Miansérine	24219-97-4	264,36	3,83	6,92	$C_{18}H_{20}N_2$	
Antidépresseurs	Amoxapine	14028-44-5	313,78	3,08	8,83	$C_{17}H_{16}ClN_3O$	
Antidépresseurs	Citalopram	59729-33-8	324,39	3,76	9,78	$C_{20}H_{21}FN_2O$	
Antidépresseurs	Tianeptine	66981-73-5	436,95	1,53	4,22 – 8,10	$C_{21}H_{25}ClN_2O_4S$	

Classes thérapeutiques	Composés	N° CAS	Masse moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Log Kow	pKa	Formule moléculaire	Formule développée
Antidépresseurs	Paroxétine	61869-08-7	329,36	3,15	9,77	$C_{19}H_{20}FNO_3$	
Antidépresseurs	Imipramine	50-49-7	280,41	4,28	9,2	$C_{19}H_{24}N_2$	
Antidépresseurs	Maprotiline	10262-69-8	277,4	4,37	10,54	$C_{20}H_{23}N$	
Antidépresseurs	Duloxétine	136434-34-9	297,41	4,2	9,7	$C_{18}H_{19}NOS$	
Antidépresseurs	Amitriptyline	50-48-6	277,4	4,81	9,76	$C_{20}H_{23}N$	
Antidépresseurs	Fluoxétine	54910-89-3	309,33	4,17	9,8	$C_{17}H_{18}F_3NO$	
Antidépresseurs	Sertraline	79617-96-2	306,23	5,15	9,85	$C_{17}H_{17}Cl_2N$	

Classes thérapeutiques	Composés	N° CAS	Masse moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Log Kow	pKa	Formule moléculaire	Formule développée
Antidépresseurs	Doxépine	1668-19-5	279,38	3,84	9,76	$C_{19}H_{21}NO$	
Antidépresseurs	Norfluoxétine	83891-03-6	295,3	3,74	9,77	$C_{16}H_{16}F_3NO$	
Antidépresseurs	Clomipramine	303-49-1	314,85	4,88	9,2	$C_{19}H_{23}ClN_2$	
Antipsychotiques – Neuroleptiques	Sulpiride	15676-16-1	341,43	0,22	8,39 – 10,24	$C_{15}H_{23}N_3O_4S$	
Antipsychotiques – Neuroleptiques	Cyamémazine	3546-03-0	323,45	4,27	9,42	$C_{19}H_{21}N_3S$	
Antipsychotiques – Neuroleptiques	Chlorpromazine	50-53-3	318,86	4,54	9,2	$C_{17}H_{19}ClN_2S$	
Antipsychotiques – Neuroleptiques	Tiapride	51012-32-2	328,43	0,53	13,23	$C_{15}H_{24}N_2O_4S$	

Classes thérapeutiques	Composés	N° CAS	Masse moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Log Kow	pKa	Formule moléculaire	Formule développée
Antipsychotiques – Neuroleptiques	Amisulpride	53583-79-2	369,48	0,25	7,05 – 14,3	$C_{17}H_{27}N_3O_4S$	
Antipsychotiques – Neuroleptiques	Pimozide	2062-78-4	461,55	5,83	8,38 – 12,9	$C_{28}H_{29}F_2N_3O$	
Antiépileptiques	Gabapentine	60142-96-3	171,24	-1,3	4,63 – 9,91	$C_9H_{17}NO_2$	
Antiépileptiques	Valpromide	2430-27-5	143,23	1,99	0,13 – 17,09	$C_8H_{17}NO$	
Antiépileptiques	Carbamazépine	298-46-4	236,27	2,77	-3,8 – 15,97	$C_{15}H_{12}N_2O$	
Antiépileptiques	Lévétiracétam	102767-28-2	170,21	-0,6	-1 – 16,09	$C_8H_{14}N_2O_2$	
Antiépileptiques	Lamotrigine	84057-84-1	256,09	1,93	5,85 – 14,98	$C_9H_7Cl_2N_5$	

Classes thérapeutiques	Composés	N° CAS	Masse moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Log Kow	pKa	Formule moléculaire	Formule développée
Antiépileptiques	Primidone	125-33-7	218,25	1,12	-6,2 – 11,5	$C_{12}H_{14}N_2O_2$	
Anxiolytiques	Méprobamate	57-53-4	218,25	0,93	15,17	$C_9H_{18}N_2O_4$	
Anxiolytiques	Buspirone	36505-84-7	385,5	1,78	7,62	$C_{21}H_{31}N_5O_2$	
Anxiolytiques	Hydroxyzine	68-88-2	374,9	3,41	7,82 – 15,12	$C_{21}H_{27}ClN_2O_2$	
Substituts aux opiacés	Méthadone	76-99-3	309,44	5,01	9,12 – 18,78	$C_{21}H_{27}NO$	

1.3. Données d'occurrence

Le **Tableau II-3** présente les données d'occurrence relevées dans la littérature pour les composés sélectionnés pour ces travaux de thèse.

Sur les 47 psychotropes étudiés, 19 (Zolpidem, Clobazam, Clonazépam, Clorazépate, Flunitrazépam, Prazépam, Milnacipran, Miansérine, Tianeptine, Maprotiline, Duloxétine, Clomipramine, Sulpiride, Chlorpromazine, Tiapride, Amisulpride, Lévétiracétam, Lamotrigine et Hydroxyzine) ont été peu voire pas détectés dans les eaux usées ou les eaux de surface et 6 molécules (Zopiclone, Amoxapine, Cyamémazine, Pimozide, Valpromide et Buspirone) n'ont jamais été recherchées dans les eaux de station d'épuration ni dans les eaux environnementales.

Globalement, les concentrations maximales détectées dans les eaux brutes sont de l'ordre de la centaine de $ng.L^{-1}$ mais pour certains composés elles peuvent atteindre le $\mu g.L^{-1}$, même la dizaine de $\mu g.L^{-1}$. Les eaux traitées ont des concentrations maximales qui varient entre la dizaine et la centaine de $ng.L^{-1}$ et les eaux de surface ont des niveaux de concentration qui varient en fonction des caractéristiques du milieu de quelques $ng.L^{-1}$ à la centaine de $ng.L^{-1}$. Seulement la Gabapentine peut atteindre des concentrations allant jusqu'aux $\mu g.L^{-1}$ dans les eaux de surface. Ce psychotrope recense les concentrations les plus élevées que ce soit dans les eaux usées brutes ou traitées mais aussi dans les eaux de surface. A partir des données de nombre de boîtes remboursées MEDIC'AM converties en mg/an/hab nous avons pu observer que la Gabapentine était l'un des psychotropes les plus consommés entre 2012 et 2015 avec le Lévétiracétam (**Annexe 5**).

Tableau II-3. Données d'occurrence des 47 psychotropes étudiés.

Composés	Concentration en ng.L^{-1}						Références
	Entrée de STEP		Sortie de STEP		Eau de surface		
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	
Benzodiazépines							
Zopiclone							
Zolpidem	2,9	3,9	1,5	1,9	-	-	[8] [17] [19]
Nordiazépam	0,05	36,8	8,3	99	2,4	26	[2] [19] [24]
Oxazépam	12,4	1 218	27	324	30	90	[1] [2] [8] [10] [11] [19]
Alprazolam	3,3	30	1	29	2,9	9,1	[8] [10] [18] [19] [27]
Bromazépam	2,3	3 662	4,9	154	-	-	[10] [19] [34]
Clobazam	-	-	-	-			[5]
Clonazépam	-	-	-	1,6	-	-	[8] [17] [19] [27]
Clorazépate	-	6,2	-	-			[20]
Diazépam	5,4	49	2,2	3,2	3,3	55,7	[10] [11] [18] [19] [24] [25]
Lorazépam	13	502	32	532	4	167	[10] [18] [19] [25] [34]
Flunitrazépam	-	-	-	-	-	-	[5] [16] [19]
Témazépam	5,8	100,7	4,9	50	1,3	23	[2] [11] [19] [34]
Prazépam	-	-	-	-	0,43	0,47	[19] [36]
Antidépresseurs							
Mirtazapine	49	117,3	-	64	0,9	5	[5] [7] [8] [14] [22] [35]
Milnacipran	-	-					[22]
Venlafaxine	30,3	1343	36	372	0,8	250	[1] [2] [7] [10] [14] [15] [22] [25]
Miansérine	-	-	-	1,5	1,2	9	[7] [8] [17] [22]
Amoxapine							
Citalopram	18	650	<10	520	1,5	90	[1] [7] [8] [14] [15] [21] [22] [25] [33] [35]
Tianeptine					-	1,8	[7]
Paroxétine	4,6	16	4,3	12	1,3	3	[7] [8] [10] [14] [15] [21] [22]
Imipramine	10,6	48	30	55	-	-	[7] [22] [24] [25]
Maprotiline	-	-	-	-	-	-	[7] [8]
Duloxétine	-	-			1,2	2	[21] [22]
Amitriptyline	17,6	1249	6	197	-	4	[2] [7] [8] [12] [14] [15] [22] [24] [25]
Fluoxétine	3,1	177	2	127	0,42	20	[1] [2] [7] [8] [10] [14] [15] [21] [22] [25]
Sertraline	6	40,6	5,1	12	0,84	49	[7] [8] [10] [14] [15] [21] [22]
Doxépine	16,1	154	5	170	1,9	54	[7] [11] [22] [24] [34]
Norfluoxétine	1,8	25,2	1,7	7,4	0,83	1,3	[2] [10] [14] [15] [21] [22]
Clomipramine	77,5	101,7	-	61	-	-	[7] [8] [22] [27]
Antipsychotiques - Neuroleptiques							
Sulpiride	7	126	65	135	-	-	[13] [23] [27]
Cyamémazine							
Chlorpromazine	-	23	-	33	-	-	[8] [10] [22] [27]
Tiapride					-	-	[29]
Amisulpride					2	22	[29] [32]
Pimozide							

Composés	Concentration en ng.L^{-1}						Références
	Entrée de STEP		Sortie de STEP		Eau de surface		
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	
Antiépileptiques							
Gabapentine	2 056	37 426	1 786	42 611	25	1 879	[12] [26] [30] [31]
Valpromide							
Carbamazépine	16	3 110	4,96	4 596	6	647	[1] [10] [11] [12] [14] [24] [25] [31] [32]
Lévétiracétam	8157,2	10825	-	-	10	22	[30] [32]
Lamotrigine	582	1750	56	4120	5	45	[5] [30] [31] [32] [33]
Primidone	132	440	120	710	10	180	[9] [10] [11] [31] [32]
Anxiolytiques							
Méprobamate	-	1440	< 20	1270	< 20	594	[9] [28]
Buspirone							
Hydroxyzine			-	1,1			[17]
Substituts aux opiacés							
Méthadone	2,6	171,1	1,4	91	0,55	54,8	[2] [3] [4] [6] [18] [36]

Les « - » signifie que les valeurs étaient sous la limite de quantification ou que le composés n'a pas été détecté et lorsqu'une case est vide cela signifie qu'aucune donnée n'a été trouvée dans la littérature.

[1] González Alonso et *al*., 2010, [2] Baker et Kasprzyk-Hordern, 2011, [3] Baker et *al*., 2014, [4] Boleda et *al*., 2007, [5] Borova et *al*., 2014, [6] Castiglioni et *al*., 2006, [7] Giebułtowicz et Nałęcz-Jawecki, 2014, [8] Grabic et *al*., 2012, [9] Hass et *al*., 2012, [10] Huerta-Fontela et *al*., 2010, [11] Hummel et *al*., 2006, [12] Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009, [13] Kubo et *al*., 2014, [14] Lajeunesse et *al*., 2008, [15] Lajeunesse et *al*., 2012, [16] Lin et *al*., 2010, [17] Loos et al., 2013, [18] Mendoza et *al*., 2014, [19] Racamonde et al., 2014, [20] Salgado et al., 2010, [21] Schultz et Furlong, 2008, [22] Sheng et *al*., 2014, [23] Sui et *al*., 2011, [24] Togola et Budzinski, 2008, [25] Unceta et *al*., 2010, [26] Yu et *al*., 2006, [27] Yuan et *al*., 2013, [28] Vanderford et Snyder, 2006, [29] Wode et *al*., 2015 ; [30] Gurke *at*., 2015a ; [31] Oliveira et *al*., 2015 ; [32] Ruff et *al*., 2015 ; [33] Writer et *al*., 2013 ; [34]Wu et *al*., 2015 ; [35] Evans et *al*., 2015 ; [36] Brieudes et *al*., 2015.

2. Stratégies d'échantillonnage et sites d'étude

2.1. Les différents types de prélèvements étudiés

Lors de ces travaux de thèses différents type d'échantillonnage ont été effectués selon les sites d'étude.

a) Prélèvement ponctuel
L'échantillonnage ponctuel est un prélèvement d'eau spécifique d'un endroit et d'un moment donné. Ce type de prélèvement est souvent utilisé car il est facilement réalisable et permet de réduire les coûts d'échantillonnage. Cependant il n'est pas toujours représentatif de la contamination du milieu car ce prélèvement ne prend pas en compte des phénomènes naturels (pluie, tempête, etc…) ou accidentels (débordement des stations d'épuration, accident industriel, etc…) pouvant faire fluctuer les concentrations des composés recherchés.
Dans ces travaux, les prélèvements d'eau ponctuels ont été réalisés à l'aide d'un préleveur manuel lesté contenant une bouteille en verre de 2,5 L.

b) Prélèvement moyenné 24h
L'échantillonnage automatique moyenné sur 24h est un mélange de plusieurs prélèvements faits à un même endroit mais à des temps différents ou faits à un même moment mais à des profondeurs différentes. Cet échantillonnage est généralement fait par préleveur automatique mais il peut aussi se faire de manière manuelle.
Le prélèvement moyenné 24h va caractériser la contamination sur une journée. Il est souvent utilisé dans les stations d'épuration afin de caractériser les rejets qui sont variables au cours d'une journée. Cette méthode minimise ainsi le risque de ne pas échantillonner certains composés brièvement émis dans une journée (Ort et *al*., 2010c).
Lors de ces travaux, les échantillons moyennés 24h ont été prélevés par un préleveur automatique des STEP étudiées.

c) Echantillonnage passif
L'échantillonnage passif (**Chapitre 2. Section 4.**) est un outil spécifique du milieu étudié et des contaminants recherchés. Ainsi l'échantillonneur va intégrer la contamination durant le temps de son exposition et va permettre de lisser la fluctuation des niveaux de contamination lié à des évènements particuliers (relargage intensif de station d'épuration, tempête, etc…).
Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'échantillonnage passif a été effectué avec des POCIS (Polar Organis Chemical Integrative Sampler) qui ont été submergés dans l'eau pendant 3 semaines.

Dans ces travaux de thèse, seule la phase dissoute a été analysée car les travaux d'Aminot et *al*. (2015) (qui ont été effcetués dans le site de la Jalle de Blanquefort) montrent que peu de médicaments sont détectés et quantifiés dans la phase particulaire et le sédiment.

3. Sites d'études

3.1. Station d'épuration de la communauté urbaine de Bordeaux

Bordeaux Métropole regroupe 28 communes depuis juillet 2013 représentant 724 224 habitants. Le système d'assainissement de bordeaux métropole s'étend sur une superficie de 578 km^2, il est organisé en 6 bassins de collectes et de traitements d'eaux usées associés chacun à une station d'épuration (**Figure II-1** et **Tableau II-4**).
Le linéaire du service d'assainissement de Bordeaux Métropole est fait de réseaux unitaires (les eaux usées domestiques et les eaux de pluies transitent dans une même canalisation : collecteur unitaire) et de réseaux séparatifs (les eaux usées domestiquent et les eaux de pluies ont un raccordement différent : des collecteurs d'eau usées et des collecteurs d'eaux pluviales).

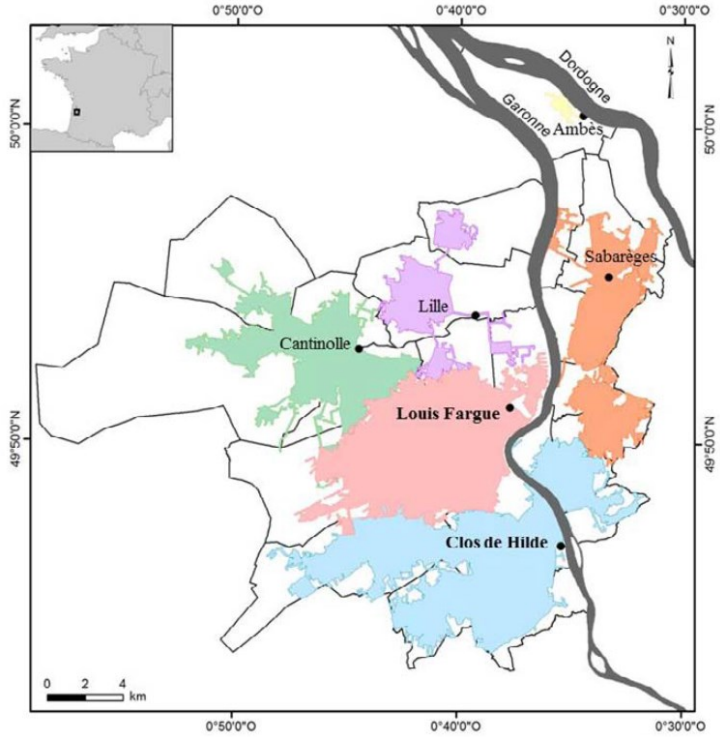


Figure II-1. Délimitation de la Communauté urbaine de Bordeaux et représentation des zones d'influence des 6 stations d'épuration associées (source : Lanoux, 2013).

Tableau II-4. Quelques caractéristiques des 6 STEP de Bordeaux Métropole.

Station d'épuration de Bordeaux Métropole	Commune d'implantation	Capacité de traitement (EH)	Type de traitement secondaire	Milieu récepteur
Clos de Hilde	Bègles	408 300	Décantation lamellaire Biofiltration	Garonne
Louis Fargue	Bordeaux	300 000	Boues activées (Décantation lamellaire Biofiltration en 2011)	Garonne
Sabarèges	Ambarès	117 000	Décantation lamellaire Biofiltration	Estey du Gua
Cantinolle	Eysines	85 000	Décantation lamellaire Biofiltration	Jalle de Blanquefort
Lille	Blanquefort	67 000	Boues activées	Jalle de Blanquefort
Ambès CD 10	Ambès	3 000	Boues activées	Dordogne

La caractérisation des effluents urbains de Bordeaux Métropole a été faite sur les STEP de Clos de Hilde (CdH) et de Louis Fargue (LF) car elles représentent les deux principaux bassins de collectes. De plus, contrairement aux autres STEP de Bordeaux Métropole, elles rejettent leurs effluents directement dans la Garonne qui est un de nos milieux d'étude.

3.1.1. La station d'épuration de Clos de Hilde

La station d'épuration Clos de Hilde a été construite en 1994 dans la commune de Bègles. La population raccordée au réseau de CdH estimée par la Lyonnaise des Eaux en 2010 est de 264 600 habitants. Sur les 28 communes de Bordeaux Métropole, 7 communes de la rive gauche de la Garonne (Bègles, Talence, Gradignan, Pessac, Villenave d'Ornon, et Bordeaux) et 3 de la rive droite (Floirac, Cenon et Bouliac) sont raccordées à cette STEP. Le réseau d'assainissement de la station d'épuration Clos de Hilde s'étend sur 854 km où 87% du réseau est séparatif et 13% est unitaire. Le type d'habitat connecté est essentiellement pavillonnaire cependant 44 industriels sont raccordés à cette station dont 3 hôpitaux (Xavier Arnozan, Haut Lévêque et Robert Picqué) et 4 cliniques (Béthanie, la chirurgicale mutualiste, Saint Martin et la maison Sainte Bagatelle).

- Procédés de traitement de la station d'épuration Clos de Hilde

Le synoptique des procédés utilisés ainsi que les points de mesures et de prélèvements dans la station d'épuration Clos de Hilde sont présentés en **Annexe 6**.
Les eaux brutes arrivant en entrée de la station d'épuration CdH vont subir différents traitements.

- **Prétraitement**

Les effluents bruts vont passer dans un premier dégrillage de 50 mm puis dans un second de 16 mn afin de les débarrasser de la majorité de leurs déchets solides. Par la suite ils vont transi-

ter vers un procédé de dessablage/dégraissage afin de faire décanter les sables et les graviers présents dans les eaux brutes et de faire remonter les graisses à la surface.
Une fois le prétraitement fini ces eaux sont dirigées vers deux filières de traitement identiques comprenant un traitement primaire et secondaire.

- **Traitement primaire physico-chimique**

Les effluents vont transiter dans un décanteur lamellaire afin d'éliminer les matières en suspension. De plus des processus de coagulation par injection de chlorure ferrique et de floculation par ajout de polymère (copolymère d'acrylamide et d'acide acrylique) sont utilisés pour augmenter la formation de flocs (particules agrégées) plus volumineux et ainsi améliorer la décantation.

- **Traitement secondaire biologique**

Les effluents qui ont été extraits de la majorité de leurs particules vont passer dans un biofiltre appelé BIOFOR® qui est un réacteur biologique. Les effluents passent à travers le filtre biologique sur lequel se développent des bactéries fixées sur des billes d'argile expansées. Par prolifférant, les micro-organismes vont contribuer à l'élimination de la pollution carbonée et azotée.

Une fois que les effluents sont passés par les traitements primaire et secondaire des deux filières, ils se rejoignent pour *in fine* être rejetés dans la Garonne (sur la rive gauche) face à l'île d'Arcins (**Figure II-2**).

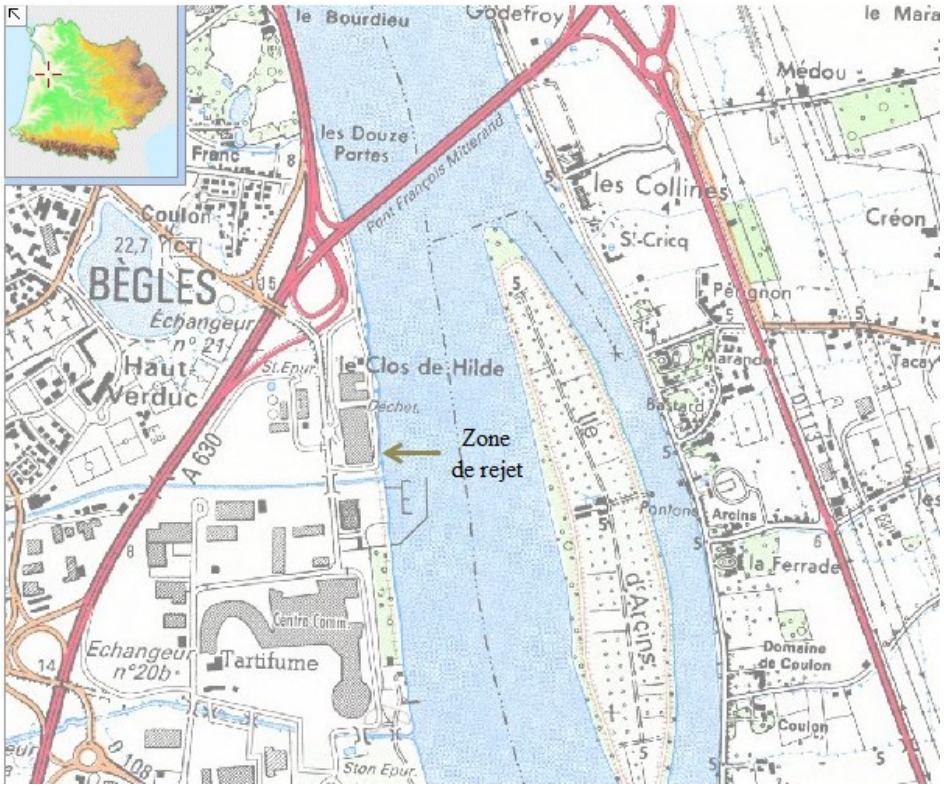


Figure II-2. Zone de rejet de la station d'épuration Clos de Hilde à Bègles (source : SIE Adour-Garonne : http://adour-garonne.eaufrance.fr/).

- Caractéristiques physico-chimique

Les valeurs moyennes de débit par temps de pluie et temps sec, les concentrations moyennes de MES, DCO (Demande Chimique en Oxygène) et DBO_5 (Demande Biologique en Oxygène pendant 5 jours) de la STEP Clos de Hilde sont représentées dans le Erreur ! Source du renvoi ntrouvable. (les valeurs des paramètres sont données pour 2011 et 2012 car ce sont les années correspondantes à nos périodes d'échantillonnage).

Tableau II-5. Moyenne annuelle des paramètres classiques mesurés en 2011 et 2012 dans la STEP Clos de Hilde (source : données d'autosurveillance de la Lyonnaise des Eaux).

Année	Caractéristiques	Eaux brutes (en entrée)	Eaux traitées (en sortie)
2011	**Débit journalier moyen** *Temps sec et de pluie* ($m^3.j^{-1}$)	60 971	61 360
	DBO_5 ($mg.L^{-1}$)	191	28
	DCO ($mg.L^{-1}$)	480	101
	MES ($mg.L^{-1}$)	243	34
2012	**Débit journalier moyen** *Temps sec et de pluie* ($m^3.j^{-1}$)	64 488	70 130
	DBO_5 ($mg.L^{-1}$)	184	8
	DCO ($mg.L^{-1}$)	435	52
	MES ($mg.L^{-1}$)	228	7

Le débit moyen en sortie de STEP observé par temps sec et de pluie en 2011 est de 61 360 $m^3.j^{-1}$ et de 70 130 $m^3.j^{-1}$ en 2012. Ainsi les effluents de sortie sont rejetés dans la Garonne avec un débit moyen sur les 2 années de 0,75 $m^3.s^{-1}$.

La station d'épuration Clos de Hilde à un réseau de collecte majoritairement séparatif cependant il existe des eaux claires parasites (ECP) qui transitent dans ce circuit. Les eaux claires sont des eaux qui pénètrent dans les réseaux séparatifs ou unitaires. Deux types d'eaux claires existent selon leurs origines :

-Les eaux parasitaires d'infiltration de nappes phréatiques qui pénètrent par le biais d'anomalies structurelles du réseau ou par des problèmes d'étanchéité sont dites des eaux claires parasites permanentes (ECPP).

-Les eaux pluviales qui s'introduisent dans le réseau *via* des branchements ou des raccordements incorrects du réseau sont appelées des eaux claires parasites météoriques (ECPM).

Ainsi les stations d'épuration font la distinction dans la composition des effluents de leur système de collecte. Les effluents de la station d'épuration Clos de Hilde sont alors composés de 47% d'eaux usées (EU), 42% d'eaux claires parasites permanentes et à 11% d'eaux claires parasites météoriques (**Figure II-3**).

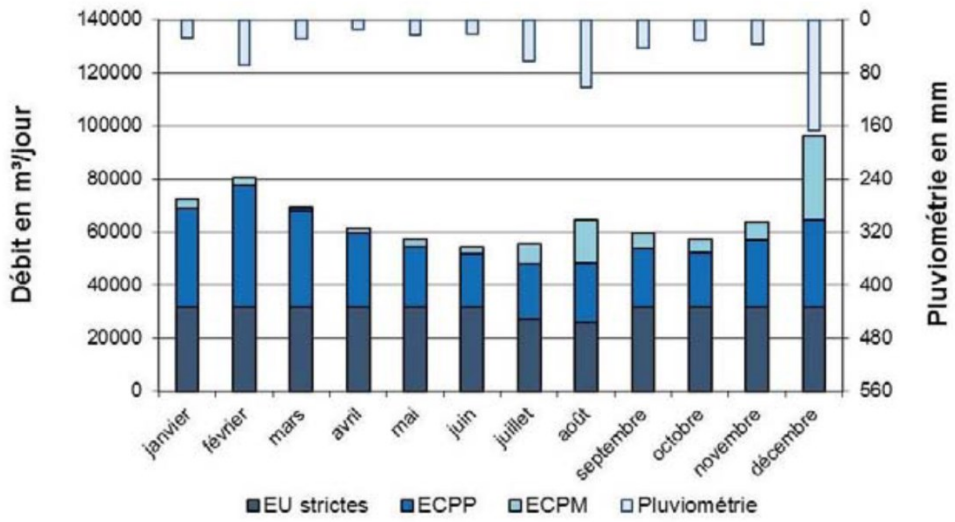


Figure II-3. Débits mensuels moyen des différentes eaux entrants dans la station d'épuration Clos de Hilde en 2011 (source : Lyonnaise des eaux).

3.1.2. La station d'épuration de Louis Fargue

La station d'épuration Louis Fargue a été construite en 1974, réhabilitée en 2003 ainsi que récemment en 2011. Elle se situe dans la commune de Bordeaux et près de 305 814 habitants y sont connectés (estimation de la Lyonnaise des Eaux en 2010). Sur les 28 communes appartenant à Bordeaux Métropole, 7 agglomérations situées sur la rive gauche de la Garonne sont raccordées à la STEP Louis Fargue. La ville du Bouscat y est entièrement connectée alors que les villes de Bordeaux, Bruges, Eysines, Mérignac, Pessac et Talence ne le sont que partiellement. Le réseau de collecte de la station d'épuration Louis Fargue s'étend sur 928 km où 60% du réseau est unitaire et 40% est séparatif. Le type d'habitat connecté est urbain avec la présence de 69 industriels dont 5 hôpitaux et 13 cliniques dont les Centres Hospitaliers Universitaires (CHU) de Bordeaux. La STEP louis Fargue collecte les eaux usées de l'hôpital Pellegrin qui est l'une des plus vaste structure hospitalière de France.

- Procédés de traitement de la station d'épuration Louis Fargue

Au cours de cette étude, la station d'épuration LF a subi une réhabilitation en 2011 engendrant des changements dans les procédés de traitement primaire et secondaire. Ainsi les deux processus (avant et après réhabilitation) sont présentés.
Le synoptique des procédés appliqués ainsi que les points de mesures et de prélèvements dans la station d'épuration Louis Fargue sont présentés en **Annexe 7**.
Lors de leur arrivée dans la station d'épuration LF, les eaux usées vont subir différents traitements.

- **Prétraitement**

Les effluents bruts vont passer dans un premier dégrillage de 40 mm puis dans un second de 18 mn. Par la suite, ils vont transiter vers un procédé de dessablage/dégraissage.
Une fois le prétraitement fini ces eaux sont dirigées vers les procédés de traitement primaire et secondaire.

Avant la réhabilitation de décembre 2011

- **Traitement primaire physico-chimique**

Après un processus de coagulation/floculation (le même que dans la STEP Clos de Hilde), les effluents vont traverser 3 décanteurs à ciel-ouvert. Dans le fond des décanteurs, les boues primaires sont récupérées et transportées vers la filière de traitement des boues de la station d'épuration.

- **Traitement secondaire biologique**

Les effluents passés dans les décanteurs sont ensuite transférés vers un procédé de boues activées. C'est un réacteur biologique où les bactéries libres vont dégrader la matière organique en suspension ou dissoute. Les bassins sont aérés continuellement afin de permettre l'activité des bactéries et la dégradation des matières. Par décantation, il y a formation de boues secondaires qui vont être aussi prises en charges par la filière de traitement des boues de la station.

Après la réhabilitation de décembre 2011

Un bassin tampon a été mis en place avant le prétraitement afin de stocker les eaux brutes et d'éviter les rejets d'eaux usées dans la Garonne lorsque la station a atteint sa capacité maximale.

- **Traitement primaire physico-chimique et secondaire biologique**

Les nouveaux traitements mis en place dans la station Louis Fargues sont les mêmes que ceux décrit pour la station d'épuration Clos de Hilde.

Une fois que les effluents sont traités, ils sont rejetés dans la Garonne (sur la rive gauche) à côté du Pont Chaban-Delmas (**Figure II-4**).

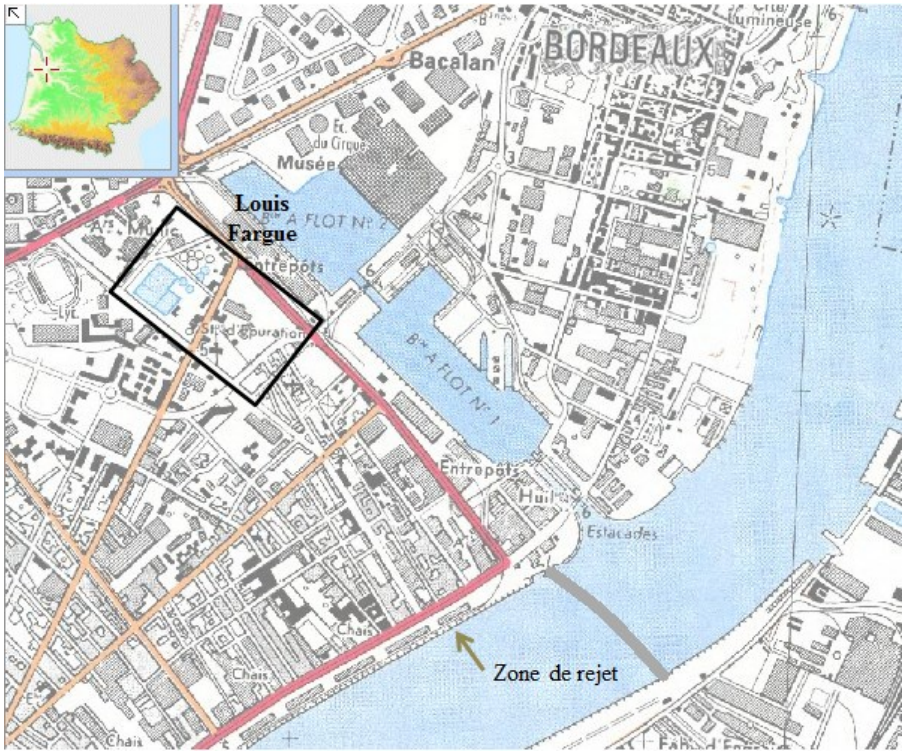


Figure II-4. Zone de rejet de la station d'épuration Louis Fargue (source : SIE Adour-Garonne : http://adour-garonne.eaufrance.fr/).

- Caractéristiques physico-chimique

Les valeurs moyennes de débit par temps de pluie et temps sec, les concentrations moyennes de MES, DCO (Demande Chimique en Oxygène) et DBO_5 (Demande Biologique en Oxygène pendant 5 jours) de la STEP Louis Fargue sont représentées dans le Erreur ! Source du renvoi ntrouvable. (les valeurs des paramètres sont données pour 2011 et 2012 car ce sont les années correspondantes à nos périodes d'échantillonnage).

Tableau II-6. Moyenne annuelle des paramètres classiques mesurés en 2011 et 2012 dans la STEP Louis Fargue (source : données d'autosurveillance de la Lyonnaise des Eaux).

Année	Caractéristiques	Eaux brutes (en entrée)	Eaux traitées (en sortie)
2011	**Débit journalier moyen** *Temps sec et de pluie* ($m^3.j^{-1}$)	87 641	82 283
	DBO_5 ($mg.L^{-1}$)	152	35
	DCO ($mg.L^{-1}$)	408	118
	MES ($mg.L^{-1}$)	220	38
2012	**Débit journalier moyen** *Temps sec et de pluie* ($m^3.j^{-1}$)	93 215	93 253
	DBO_5 ($mg.L^{-1}$)	157	15
	DCO ($mg.L^{-1}$)	380	69
	MES ($mg.L^{-1}$)	219	17

Le débit moyen en sortie de STEP observé par temps sec et de pluie en 2011 est de 82 283 $m^3.j^{-1}$ et de 93 253 $m^3.j^{-1}$ en 2012. Ainsi les effluents de sortie sont rejetés dans la Garonne avec un débit moyen sur les 2 années de 1,02 $m^3.s^{-1}$.

La station d'épuration Louis Fargue est aussi soumise aux problèmes d'infiltration d'eaux claires dans son réseau de collecte. Ainsi les effluents entrants sont composés à 34% des EU, 40% des ECPP et 26% des ECPM (**Figure II-5**).

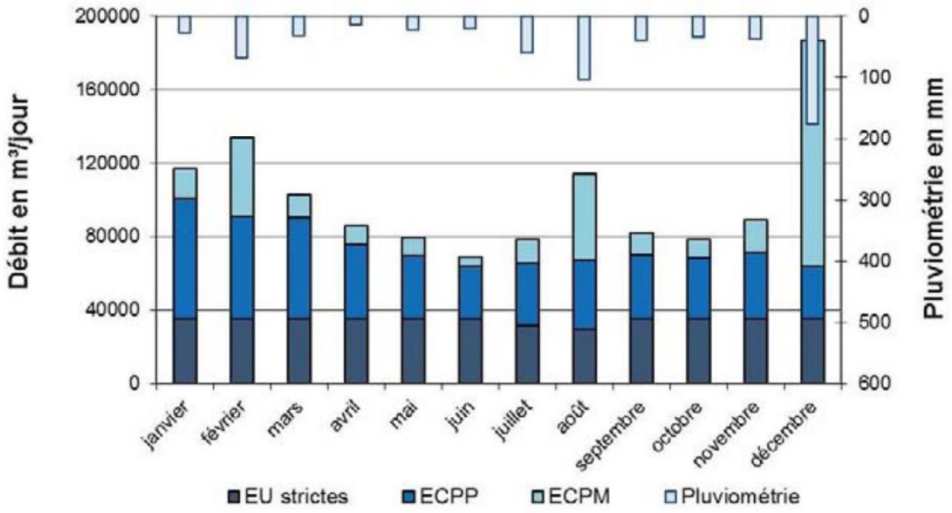


Figure II-5. Débits mensuels moyen des différentes eaux entrants dans la station d'épuration Louis Fargue en 2011 (source : Lyonnaise des eaux).

Les stations d'épuration de Louis Fargues et Clos de Hilde ont été échantillonnées de la même manière. La **Figure II-6** représente la localisation des deux stations d'épuration par rapport à la Gironde.

Figure II-6. Carte représentant les localisations des STEP Louis Fargue et Clos de Hilde (photos : Google Maps).

a) Description des points de prélèvement

Le matériel d'autosurveillance (tracé et contrôlé par les exploitants) mis en place sur les sites des stations d'épurations pour les mesures des paramètres physico-chimiques ont permis le prélèvement des échantillons au cours du suivi.

Chaque préleveur automatique est dédié à un point de prélèvement (voir les synoptiques **Annexe 6 et 7**) afin d'éviter les contaminations.

Le **Tableau II-7** regroupe les différents points échantillonnés dans les STEP Clos de Hilde et Louis Fargue au cours de ces travaux de recherche.

Tableau II-7. Liste des points de prélèvements des STEP étudiées.

	Code échantillon	
Type d'échantillon	**Clos de Hilde**	**Louis Fargue**
Eaux brutes	CHE	LFE
Eaux décantées	-	LFED
Eaux traitées	CHET1 CHET2	LFET

b) Stratégie d'échantillonnage

- Fréquence d'échantillonnage

Le suivi de ces deux stations a commencé en février 2011 et s'est terminé en décembre 2012. Ainsi des échantillons moyennés 24h ont été prélevés sur 3 jours consécutifs par mois. Ces trois échantillons ont été analysés séparément et sont alors considérés comme un triplicat. Cette méthode permet de diminuer les variabilités et donc avoir une meilleure caractérisation du mois échantillonné.

Le **Tableau II-8** recense le nombre de prélèvements effectués à CdH et LF pour chaque type d'échantillon.

Tableau II-8. Nombre d'échantillons moyennés 24h prélevés au cours du suivi des deux STEP de Bordeaux Métropole.

Clos de Hilde	Nombre d'échantillons	Louis Fargue	Nombre d'échantillons
CHE	37	LFE	38
CHET1	17	LFED	20
CHET2	38	LFET	40
TOTAL	92	**TOTAL**	98

- Prélèvement et conservation des échantillons

Dans les collecteurs automatiques, les eaux sont stockées pendant 24h dans un bidon en polyéthylène haute densité (PEHD) de 10 L qui est conservé à 4 °C dans une enceinte réfrigérée. Avant de prélever 500 mL de l'échantillon moyenné 24h dans un flacon PEHD celui-ci doit être homogénéisé manuellement. Pour assurer la stabilité du prélèvement, le flacon est conservé dans une glacière le temps du transport jusqu'au laboratoire afin de ralentir l'activité bactérienne et donc la dégradation des composés. A son arrivée au laboratoire, l'échantillon est filtré et conservé à -20°C en attendant d'être analysé (**Chapitre 2. Section 5.2**).

3.2. La Gironde

a) Description des points de prélèvement

Lors de ces travaux de recherches 6 points ont été étudiés sur l'estuaire de la Gironde : 1 dans l'estuaire amont (Pauillac) et 5 dans l'estuaire fluvial (Bordeaux, Libourne, Bègles, Cadaujac et Saint-Macaire). De plus, 3 points (Guîtres sur l'Isle, Pessac sur Dordogne sur la Dordogne et La Réole sur la Garonne) ont été aussi suivis sur la limite amont des remontées de la marée dynamique afin de calculer des données de flux. Enfin, un dernier point a été étudié à Blanquefort sur la Jalle de Blanquefort pour connaitre les apports que peut amener un affluent de la Garonne (**Figure II-7).**

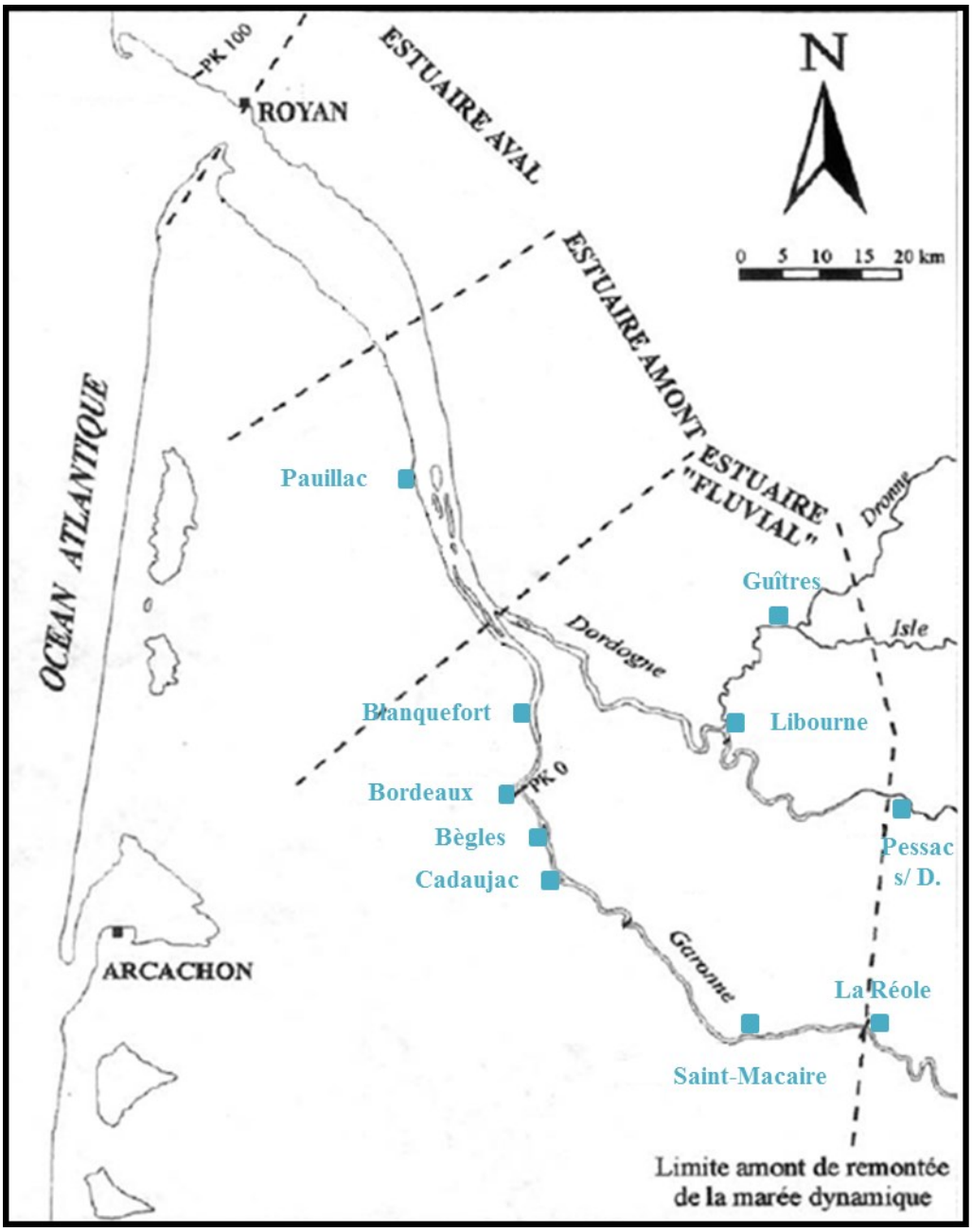


Figure II-7. Carte de l'estuaire de la Gironde regroupant les 10 points de prélèvements suivis pour ces travaux de thèse (adaptée de Allen, 1972).

Le **Tableau II-9** présente les points de prélèvement et leurs coordonnées GPS (photos en **Annexe 8**).

Tableau II-9. Noms, descriptions et coordonnées GPS des points échantillonnés sur l'estuaire de la Gironde.

Sites d'échantillonnage	Descriptif	Coordonnées GPS
Pauillac	Au niveau de l'installation air bus	45°13'4.62''N ; 0°44'46.12''O
Bordeaux	Sur les pontons du port autonome	44°51'51.23''N ; 0°32'44.04''O
Libourne	Sur un ponton de la ville de Libourne à côté du pont de pierre	44°54'50.1944''N ; 0°14'56.63''O
Bègles	Au bout du ponton du port Garonne	44°47'58.31''N ; 0°31'37.99''O
Cadaujac	Sur un ponton du port de l'Esquillot	44°44'26.85''N ; 0°30'23.13''O
Saint-Macaire	Sur un ponton flottant privé	44°33'51.80''N ; 0°13'21.15''O
La Réole	Sur un ponton privé	44°34'41.56''N ; 0°2'0.12''O
Pessac sur Dordogne	Depuis la berge	44°49'20,18''N ; 0°4'37,82''E
Guîtres	Sur un ponton privé	45°2'20.37''N ; 0°11'14.98''O
Blanquefort	Pont des religieuses	44°54'49.522''N ; 0°33'40.165''O

b) Stratégie d'échantillonnage

- Fréquence d'échantillonnage

Le suivi a débuté en novembre 2011 et s'est terminé en février 2013. Les sites de Pauillac, Bordeaux, Libourne, Bègles, Cadaujac et Saint-Macaire ont été échantillonnés approximativement tous les mois alors que les points de La Réole, Pessac sur Dordogne, Guîtres et Blanquefort ont fait l'objet d'études ponctuelles.

- Prélèvement et conservation des échantillons

Lors de ce suivi sur la Gironde deux types de prélèvement ont été effectués :

- le prélèvement ponctuel qui a pu se faire à l'aide d'une bouteille en verre ambré de 2,5 L et d'un préleveur manuel lesté (**Figure II-8**). Les échantillons d'eau ont été collectés à une profondeur de 0,5 m sous la surface.

Figure II-8. Préleveur manuel lesté contenant une bouteille de 2,5 L en verre ambré.

-L'échantillonnage passif a été effectué *via* des POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler, voir **Chapitre 2. Section 4**) montés sur des supports appelés « holders » et placés dans des cages (**Figure II-9**). Les cages de POCIS ont été fixées sur les pontons des sites étudiés et submergées dans l'eau durant 3 semaines à une profondeur entre 0,5 et 1 m sous la surface.

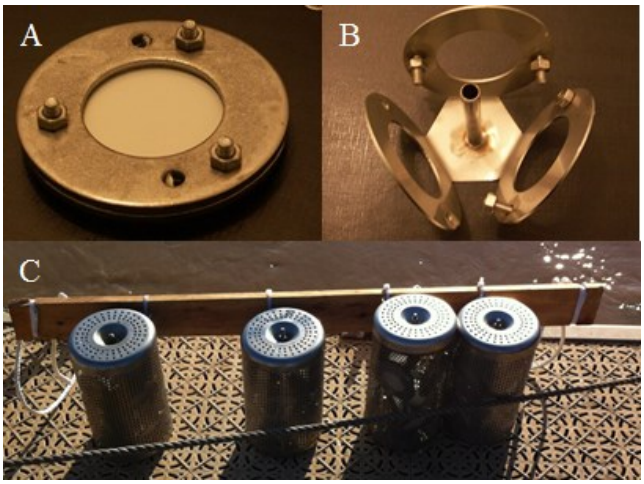


Figure II-9. POCIS (A), Holder (B) et cage contenant des POCIS monté sur des holders (C).

Une fois prélevés, les échantillons ponctuels et passifs sont ramenés au laboratoire. Les échantillons d'eau sont filtrés afin de ne conserver que la phase dissoute pour les analyses et sont stockés à -20°C. Les POCIS sont quant à eux rincés à l'eau ultra-pure (quelques millilitres), emballés dans du papier d'aluminium et conservé à -20°C jusqu'à leur analyse.

3.3. La Jalle de Blanquefort

La Jalle de Blanquefort est un affluent de la rive gauche de la Garonne. C'est une petite rivière de 32 km de long qui draine un bassin versant de 322 km^2 (SIE Adour-Garonne : http://adour-garonne.eaufrance.fr/coursdeau/O97-0400). Le débit moyen pour les années 2011-2012 est de 1,30 $m^3.s^{-1}$ (**Tableau II-10**, données Lyonnaise des eaux).

Tableau II-10. Débits mesurés sur la Jalle de Blanquefort de 2011 à 2012 (source : Lyonnaise des eaux).

	Jalle de Blanquefort
Débit moyens annuels (2011-2012)	1,30 $m^3.s^{-1}$
Variation des débits moyens annuels (2011-2012)	0,43 à 6,18 $m^3.s^{-1}$
Minimum journalier (de 2011 à 2012)	0,42 $m^3.s^{-1}$ (06-07-2011)
Maximum journalier (de 2011 à 2012)	19,82 $m^3.s^{-1}$ (29-04-2012)

La Jalle de Blanquefort reçoit les rejets de la station d'épuration Cantinolle (**Figure II-10**) qui a été mise en service en janvier 2005.

Figure II-10. Zone de rejet de la station d'épuration Cantinolle (source : http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr//).

Elle se situe dans la commune d'Eysines et sur les 28 communes appartenant à Bordeaux Métropole, 7 agglomérations situées sur la rive gauche de la Garonne sont raccordées à la STEP Cantinolle. Les villes du Haillan, du Taillan-Médoc, de Saint Aubin de Médoc et Saint Médard en Jalles y sont entièrement connectées alors que les villes de Bruges, Eysines et Mérignac ne le sont que partiellement. Le réseau de collecte de la station d'épuration Cantinolle est séparatif et le type d'habitat connecté est urbain avec la présence de 17 industriels dont l'aéroport international Bordeaux-Mérignac.

La STEP de Cantinolle a une capacité de 85 000 EH et a un procédé de traitement de type secondaire biologique équipé de biofiltres.

Le **Tableau II-11** regroupe les valeurs moyennes de débit par temps sec, les concentrations moyennes de MES, DCO et DBO_5 de la STEP Cantinolle.

Tableau II-11. Moyenne annuelle des paramètres classiques mesurés en 2012 dans la STEP Cantinolle (source : http://adour-garonne.eaufrance.fr/step/0533162V005).

	Débit journalier moyen en 2012 *Temps sec et de pluie* $m^3.j^{-1}$	**DBO_5** $mg.L^{-1}$	**DCO** $mg.L^{-1}$	**MES** $mg.L^{-1}$
Eaux traitées (en sortie)	11 922	6	48	7

Le débit moyen en sortie de STEP observé en 2012 par temps sec est de 11 922 $m^3.j^{-1}$. Ainsi les effluents de sortie sont rejetés dans la Jalle de Blanquefort avec un débit de 0,14 $m^3.s^{-1}$.

La **Figure II-11** représente la localisation de la STEP Cantinolle par rapport aux deux autres STEP étudiées dans Bordeaux Métropole.

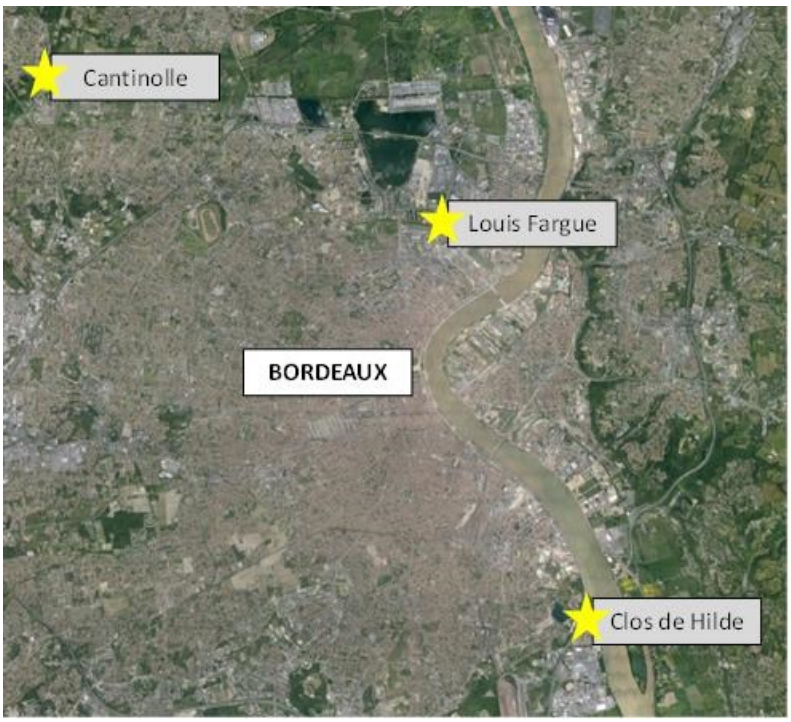


Figure II-11. Localisation de la STEP Cantinolle par rapport aux autres STEP étudiées (photo : Google Maps).

a) Description des points de prélèvement

La **Figure II-12** représente les 6 points échantillonnés sur la Jalle de Blanquefort et la localisation de la STEP de Cantinolle où l'effluent de sortie moyenné 24h a été obtenu pour chaque campagne. Les distances de chaque point de prélèvement sont mesurées à partir de la station d'épuration.

Les coordonnées GPS des points échantillonnés sont présentées dans le **Tableau II-12** (photos en **Annexe 9**).

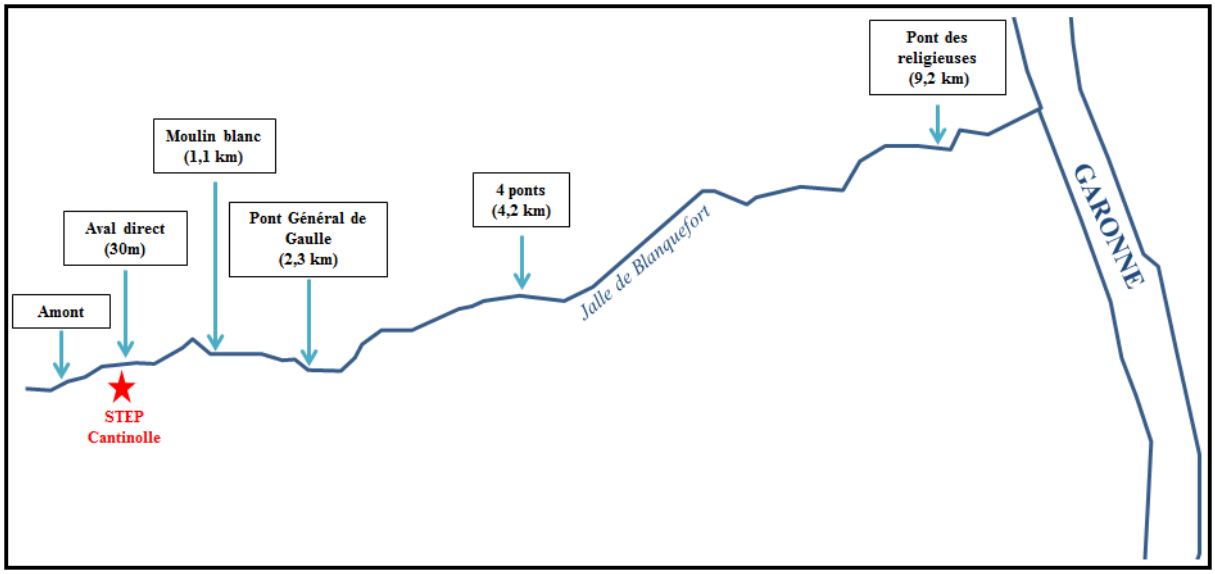


Figure II-12. Carte représentant les points de prélèvement pour l'étude sur la Jalle de Blanquefort.

Tableau II-12. Coordonnées GPS des sites échantillonnés sur la Jalle de Blanquefort.

Sites d'échantillonnage	Coordonnées GPS
Amont	44°53'41.32''N ; 0°40'15.47''O
STEP Cantinolle	44°53'40.84''N ; 0°40'1.92''O
Aval direct (30 m)	44°53'43.70''N ; 0°39'58.27''O
Moulin blanc (1,1 km)	44°53'45.55''N ; 0°39'12.31''O
Pont Général de Gaulle (2,3 km)	44°53'42.72''N ; 0°38'21.54''O
4 ponts (4,2 km)	44°54'1.90''N ; 0°37'3.13''O
Pont des religieuses (9,2 km)	44°54'49.522''N ; 0°33'40.165''O

b) Stratégie d'échantillonnage

- Fréquence d'échantillonnage

Sur la Jalle de Blanquefort, une étude ponctuelle a été réalisée dans le but d'évaluer le devenir des psychotropes dans une rivière avec un faible débit et qui reçoit les rejets d'une station d'épuration de type urbaine. Ainsi deux campagnes de prélèvement ont été menées le 12.12.2011 et le 23.07.2012.

- Prélèvement et conservation des échantillons

Lors des campagnes de prélèvement sur la Jalle de Blanquefort plusieurs types d'échantillons ont été prélevés :

- des échantillons ponctuels ont été prélevés à l'aide de bidon en PEHD (Nalgene®) de 10 L.

- des échantillons moyennés 24h ont été collectés dans des flacons en PEHD de 500 mL.

- des échantillons passifs ont été obtenus lors de la première campagne de prélèvement grâce à l'exposition de POCIS pendant 28 jours (du 12.12.2011 au 12.01.2012).

Après le prélèvement, les échantillons d'eau ont été ramenés au laboratoire pour être filtrés (échantillon ponctuel d'eau et échantillon moyenné 24h) et conservés à -20 °C (échantillons d'eau, de particules, de sédiment et POCIS) jusqu'à leur analyse.

3.4. Station de traitement des eaux usées du Québec

Au cours de cette étude, 3 stations d'épuration ont été étudiées (**Figure II-13) :**

-La STEP Jean Marcotte à Montréal

-La STEP de l'île Lebel à Repentigny

-Les étangs aérés Le Gardeur à Repentigny

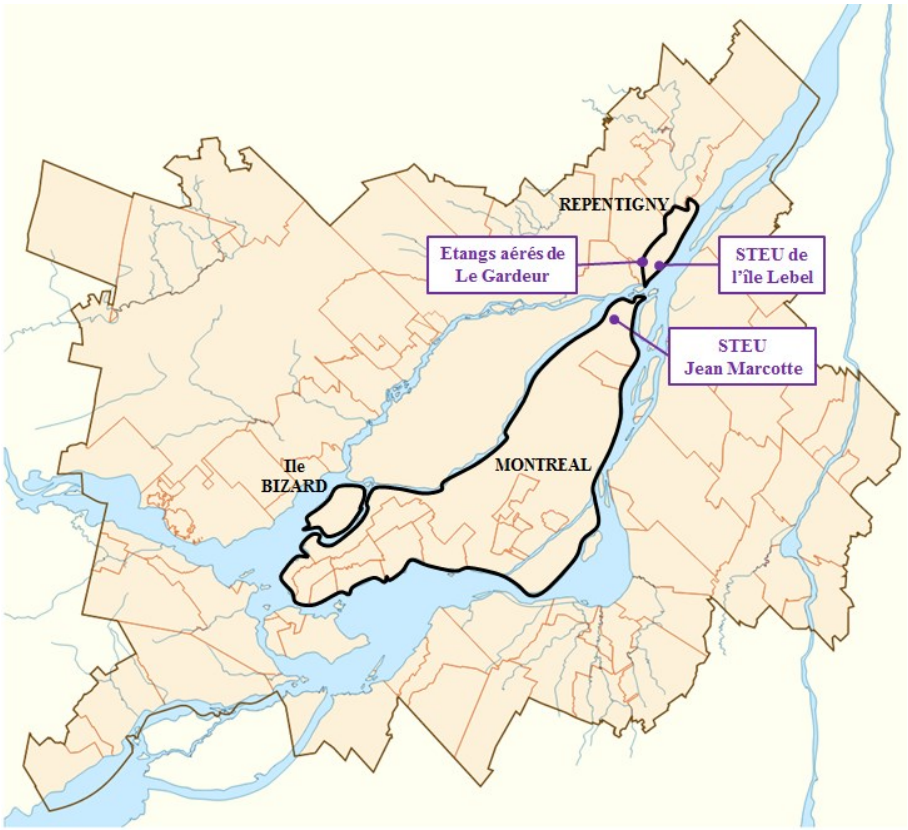


Figure II-13. Localisation des stations de traitement des eaux usées à Montréal et à Repentigny et les étangs aérés à Repentigny.

3.4.1. La STEP Jean Marcotte de Montréal

La station de traitement des eaux usées Jean Marcotte située à la pointe de l'île de Montréal a été construite de 1976 à 1984. Néanmoins ce n'est qu'à partir de 1996 qu'elle reçoit la totalité des eaux usées du territoire de l'île de Montréal et de l'île Bizard. Le réseau de collecte de la station de traitement des eaux usées Jean Marcotte est constituée à 63% par un réseau unitaire (3 590 km) et à 37% par un réseau séparatif (1 410 km pour les eaux pluviales et 1 440 km pour

les eaux usées). De plus, cette STEP possède deux réseaux d'intercepteur d'eaux brutes : (i) un couvre le nord et le sud-ouest de l'île et achemine principalement des eaux domestiques ; (ii) l'autre couvre le secteur sud-est et est caractérisé par un apport industriel important (industrie aérospatiale, pharmaceutique, pétrochimique, textile mais aussi des productions manufacturières) (Gesuale et *al*., 2010) (**Annexe 10**). Ainsi, la STEP Jean Marcotte traite des eaux usées urbaines de 2 000 000 de citoyens et 4 000 établissements industriels et commerciaux et a une capacité de 1 839 600 EH.

- Procédés de traitement de la station Jean Marcotte

L'ensemble des procédés de traitement de la station de traitement des eaux usées Jean Marcotte est présenté en **Annexe 11**.

Les eaux brutes transitent dans les intercepteurs jusqu'à la station de pompage de la STEP Jean Marcotte.

- **Prétraitement**

Les effluents bruts vont dans un premier temps passer dans 8 dégrilleurs qui vont permettre d'éliminer les résidus d'une dimension supérieure à 25 mm. Ensuite, les effluents sont dirigés vers 14 dessableurs aérés permettant d'éliminer les particules ayant un diamètre supérieur à 150 µm.

Une fois le prétraitement fini, ces eaux sont dirigées vers le procédé de traitement primaire.

- **Traitement primaire physico-chimique**

Après un processus de coagulation/ floculation par ajout de chlorure ferrique (ou alun) et d'un polymère anionique, les effluents vont traverser 21 décanteurs où s'effectue la décantation des flocs et l'écumage des graisses et des huiles présentes en surface.

Une fois les eaux traitées, elles sont acheminées vers le fleuve Saint Laurent au niveau de l'île aux vaches (**Figure II-14**). Le panache de la station d'épuration est perceptible sur des kilomètres et atteindrait le lac Saint-Pierre jusqu'à l'amont de la rivière Saint-Maurice (Boudreau et *al*., 2005).

Figure II-14. Panache de l'effluent traité de la station de traitement des eaux usées de Montréal (adaptée de Gagné et *al.*, 2004, Environnement Canada : www.ec.gc.ca).

- Caractéristiques physico-chimiques

Les valeurs moyennes de débit et les concentrations moyennes de MES, DBO_5 (Demande Biologique en Oxygène pendant 5 jours) et de phosphore total de la STEP Jean Marcotte sont représentées dans le **Tableau II-13**.

Tableau II-13. Moyenne annuelle des paramètres classiques mesurés en 2012 dans la STEP Jean Marcotte (source : mamrot, 2013).

	Débit journalier moyen en 2012 $m^3.j^{-1}$	**DBO_5** $mg.L^{-1}$	**MES** $mg.L^{-1}$	**Phosphore total** $mg.L^{-1}$
Eaux brutes (en entrée)	2 234 922	84	104	1,6
Eaux traitées (en sortie)	2 234 922	50	18	0,4

Le débit moyen en sortie de la STEP observé en 2012 est de 2 234 922 $m^3.j^{-1}$. Ainsi, les effluents de sortie sont rejetés dans le Saint Laurent avec un débit de 25,9 $m^3.s^{-1}$.

Le traitement primaire physico-chimique n'est pas assez efficace pour l'élimination des micro-organismes pathogènes et des virus. De plus, il est essentiel de désinfecter les effluents rejetés dans le Saint Laurent afin de garder l'usage des berges de celui-ci. C'est pourquoi, depuis 2005, la station de traitement des eaux usées de la Ville de Montréal en collaboration avec des institutions de recherche et des organismes gouvernementaux cherche à documenter, analyser et tester certaines technologies de désinfection des eaux usées (Bélanger, 2010).

3.4.2. La STEP de l'île Lebel et les étangs aérés de Le Gardeur à Repentigny

La ville de Repentigny comprend deux stations de traitement des eaux usées depuis sa fusion en 2002 avec la ville de Le Gardeur. La première STEP construite en 1996 est une station à traitement primaire physico-chimique qui est située sur l'île Lebel. La seconde construite en 2002 est une station à étang aérés qui est placée dans le secteur Le Gardeur et qui récolte les eaux usées de Le Gardeur et de Charlemagne. Les deux secteurs sont séparés par la rivière l'Assomption (**Figure II-15**).
Le réseau de collecte de ces stations est de type domestique (250 km de long), la STEP de l'île Lebel dessert près de 63 000 habitants et les étangs aérés plus de 27 000 citoyens.

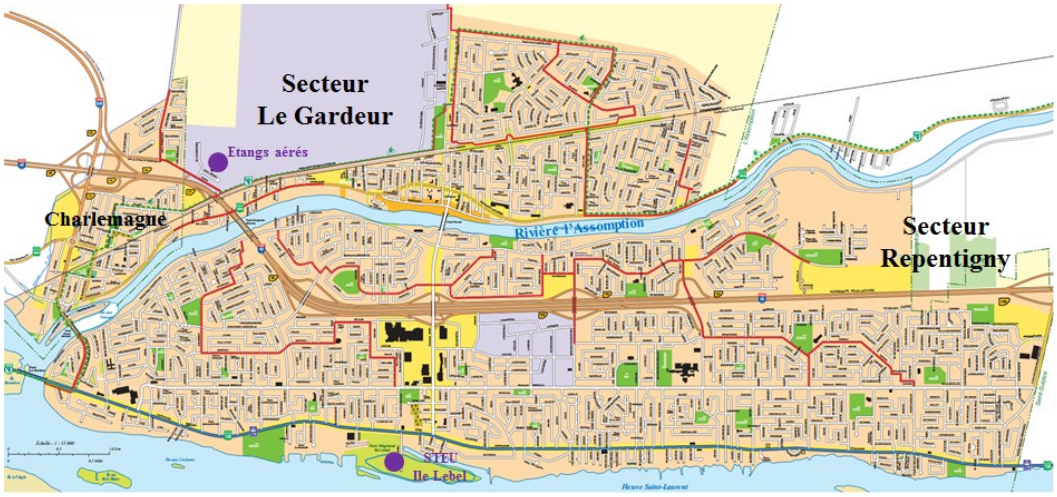


Figure II-15. Carte de la ville de Repentigny représentant la STEP de l'île Lebel dans le secteur Repentigny et les étangs aérés dans le secteur de Le Gardeur.

3.4.2.1 La STEP de l'île Lebel

- Procédés de traitement

La STEP de l'Ile Lebel a une capacité de 13 412 EH et l'ensemble des procédés de traitement de celle-ci est présenté en **Annexe 12**.

- **Prétraitement**

Les eaux brutes vont dans un premier temps passer dans 2 dégrilleurs afin d'éliminer tous les solides ayant un diamètre supérieur à 6 mm. Ensuite les eaux usées vont être dirigées vers 2 dessableurs/dégraisseurs afin d'enlever le sédiment, le sable, le gravier ainsi que les graisses. Une fois le prétraitement fini ces eaux vont transiter vers le procédé de traitement primaire.

- **Traitement primaire physico-chimique**

Les effluents vont traverser 2 décanteurs lamellaires où s'effectue la décantation des flocs (ajout de réactif chimique qui favorise le processus de coagulation/floculation).

Une fois les eaux traitées, elles sont acheminées vers le fleuve Saint Laurent à 150 m de la STEP (**Figure II-16**).

Figure II-16. Zone de rejet de la STEP de l'île Lebel.

- Caractéristiques physico-chimiques

Les valeurs moyennes de débit et les concentrations moyennes de MES, DBO_5 (Demande Biologique en Oxygène pendant 5 jours) et de phosphore total de la STEP Jean Marcotte sont représentées dans le **Tableau II-14**.

Tableau II-14. Moyenne annuelle des paramètres classiques mesurés en 2012 dans la STEP Ile Lebel (source : MAMROT, 2013).

	Débit journalier moyen en 2012 $m^3.j^{-1}$	**DBO_5** $mg.L^{-1}$	**MES** $mg.L^{-1}$	**Phosphore totale** $mg.L^{-1}$
Eaux brutes (en entrée)	24 328	128	219	3,4
Eaux traitées (en sortie)	25 332	41	23	0,5

Le débit moyen en sortie de cette STEP observé en 2012 est de 25 332 $m^3.j^{-1}$. Ainsi les effluents de sortie sont rejetés dans le Saint Laurent avec un débit de 0,29 $m^3.s^{-1}$.

Comme la station de traitement des eaux usées de Montréal, la station de l'île Lebel ne désinfecte pas ses eaux traitées avant de les rejeter dans le fleuve Saint Laurent. Ceci génère donc un apport important de coliformes fécaux engendrant une perte de l'usage des berges.

3.4.2.2 Les étangs aérés Le Gardeur

- Procédés de traitement

Les étangs aérés de Le Gardeurs ont une capacité de 1 627 EH. Les eaux brutes du secteur de Le Gardeur sont directement acheminées vers le premier étang aéré. Un prétraitement n'est pas obligatoire dans ce type de structure.

- **Traitement biologique**

Les effluents bruts vont passer (par gravitation) successivement dans les 4 étangs séparés par des digues. Les étangs sont oxygénés par des diffuseurs d'air situés au fond des bassins, favorisant ainsi l'activité des micro-organismes présents. Cette technologie utilise les micro-organismes présents naturellement dans les eaux usées pour dégrader la matière organique. Les matières en suspension présentes vont alors décanter au fond des bassins et former des boues.

L'aération dans les 4 bassins va être différente, le premier est le plus oxygéné afin de favoriser l'activité microbienne pour traiter les eaux entrantes qui sont les plus contaminées.

Une fois les eaux traitées, elles sont acheminées vers la rivière l'Assomption (**Figure II-17**).

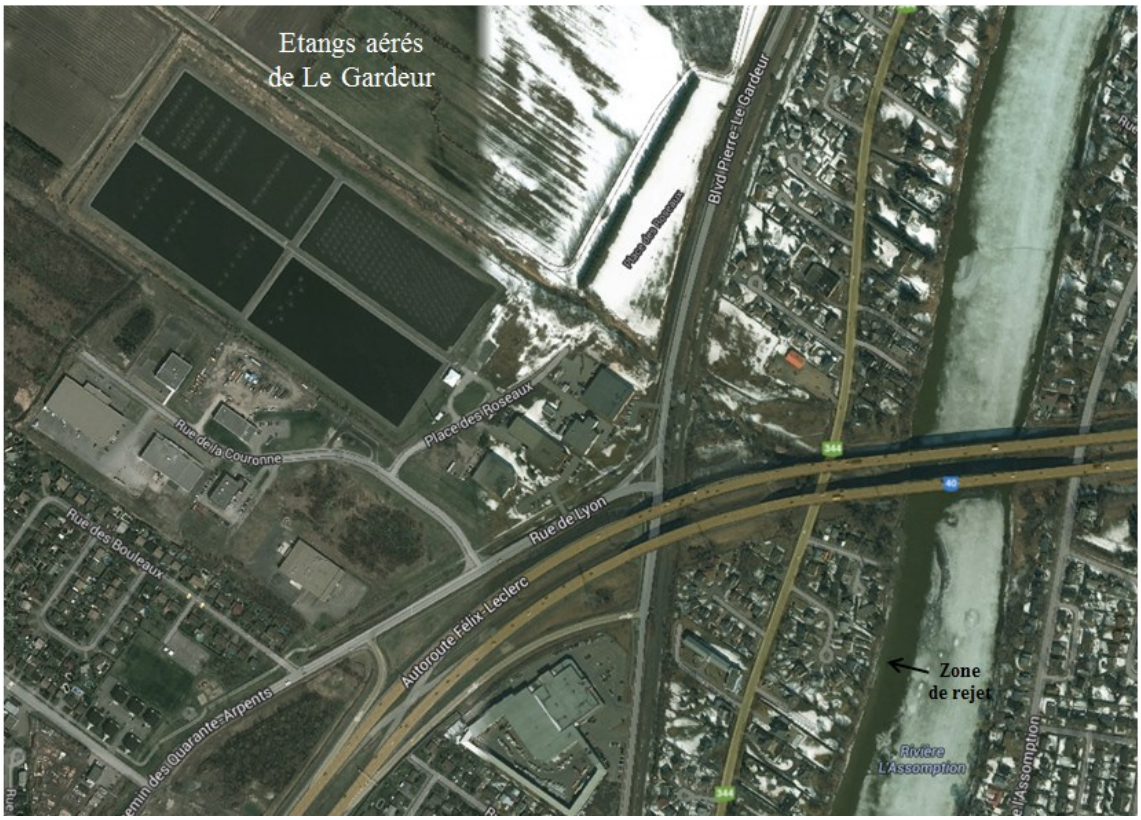


Figure II-17. Zone de rejet des étangs aérés de Le Gardeur.

- Caractéristiques physico-chimiques

Les valeurs moyennes de débit et les concentrations moyennes de MES, DBO_5 (Demande Biologique en Oxygène pendant 5 jours) et de phosphore total des étangs aérés de Le Gardeur sont représentées dans le **Tableau II-15**.

Tableau II-15. Moyenne annuelle des paramètres classiques mesurés en 2012 dans les étangs aérés de Le Gardeur (source : MAMROT, 2013).

		Débit journalier moyen en 2012 $m^3.j^{-1}$	DBO_5 $mg.L^{-1}$	MES $mg.L^{-1}$	Phosphore totale $mg.L^{-1}$
Eaux brutes (en entrée)	Entrée Le Gardeur	8 139	206	241	4,7
	Entrée Charlemagne	2 279			
Eaux traitées (en sortie)		10 418	11,5	15,3	0 ,6

Le débit moyen en sortie des étangs aérés observé en 2012 est de 10 418 $m^3.j^{-1}$. Ainsi les effluents de sortie sont rejetés dans la rivière Assomption avec un débit de 0,12 $m^3.s^{-1}$.

Le traitement des eaux usées par les étangs aérés est le procédé le plus répandu dans le domaine du traitement des eaux usées domestiques au Québec. Environ 400 stations d'épuration de ce type sont dénombrées dans cette province. Ce procédé est souvent utilisé dans les petites ou moyennes agglomérations.

a) Description des points de prélèvement

Les préleveurs automatiques servant à mesurer les paramètres physico-chimiques ont permis le prélèvement des échantillons au cours du suivi. Le **Tableau II-16** regroupe les différents points échantillonnés dans la STEP Jean Marcotte de Montréal au cours de ces travaux de recherche.

Tableau II-16. Liste des points de prélèvements des trois STEP étudiées.

	Code échantillon		
Type d'échantillon	**Jean Marcotte (Montréal)**	**Ile Lebel (Repentigny)**	**Le Gardeur (Repentigny)**
Eaux brutes	Montréal-R	IL-R	LG-R-Charlemagne LG-R-Le Gardeur
Eaux traitées	Montréal-E	IL-E	LG-E

b) Stratégie d'échantillonnage

- Fréquence d'échantillonnage

Le suivi de ces deux stations de Repentigny a commencé en juillet 2013 et s'est terminé en novembre 2013. Pour des raisons de logistique, seulement un échantillon moyenné 24h a été prélevé par mois.

Pour la station de Montréal, des prélèvements moyennés 24h ont été effectués sur 3 jours consécutifs en août 2013 et en mars 2014.

- Prélèvement et conservation des échantillons

Dans les collecteurs automatiques des STEP étudiées, les eaux sont stockées pendant 24h dans un bidon en PEHD de 10 L qui est conservé à 4 °C dans une enceinte réfrigérée. Avant de prélever 500 mL de l'échantillon moyenné 24h dans un flacon PEHD (Nalgene®) celui-ci doit être homogénéisé manuellement. Le flacon est conservé dans une glacière le temps du transport jusqu'au laboratoire. A son arrivée au laboratoire, l'échantillon est filtré et conservé à -20°C en attendant d'être analysé.

3.5. Le Fleuve Saint Laurent

a) Description des points de prélèvement

Pour le suivi terrain au Québec 10 points ont été étudiés : 6 dans le fleuve Saint Laurent, 2 dans la rivière l'Assomption et 2 dans la rivière des Prairies (**Figure II-18)**.

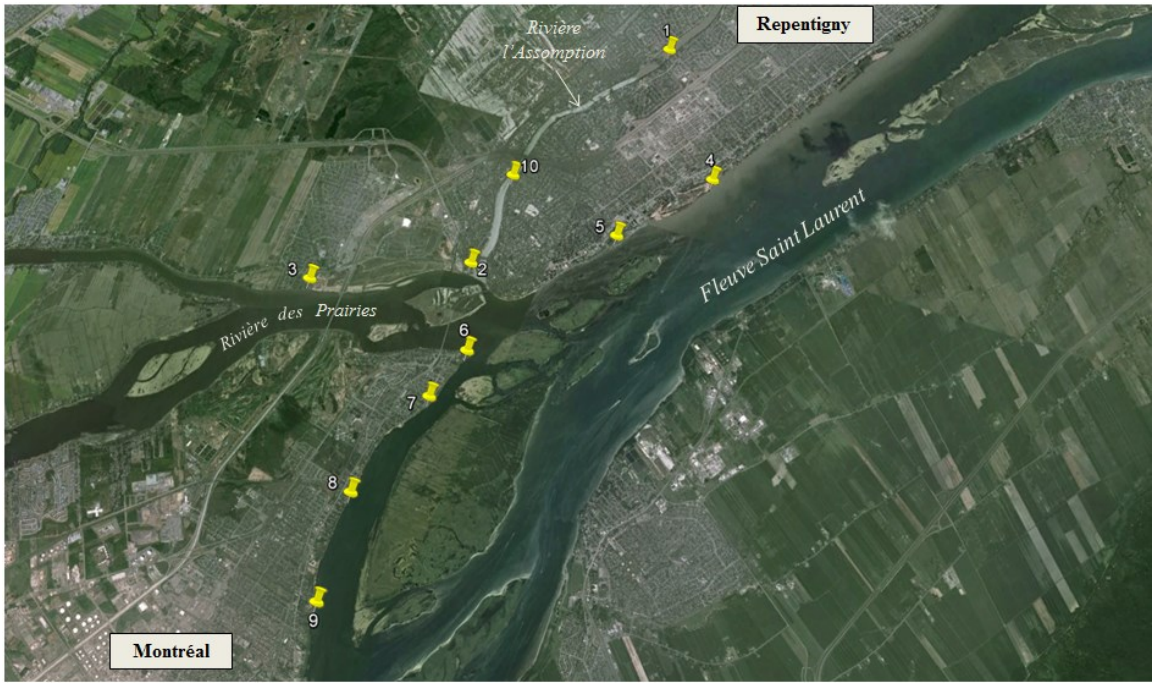


Figure II-18. Localisation des points échantillonnés sur le Saint Laurent (photo : Google Earth).

Les caractéristiques du fleuve Saint Laurent sont décrites dans le **Chapitre 1. Section 2.5**. D'après les données du centre d'expertise hydrique du Québec le débit moyen de la rivière des Prairies est de 1064,2 $m^3.s^{-1}$ (station : 043301, à la tête de la rapide du Cheval Blanc) et le débit moyen de la rivière l'Assomption est de 22,7 $m^3.s^{-1}$ (station : 052219, au pont route 158 joliette) (source : www.cehq.gouv.qc.ca/suivihydro/).

Le **Tableau II-17** présente les points de prélèvement et leurs coordonnées GPS.

Tableau II-17. Descriptifs et coordonnées GPS des points échantillonnés sur le Saint Laurent.

Sites d'échantillonnage	Descriptif	Coordonnées GPS
1	Rivière Assomption	45°45'31.63''N ; 73°27'28.51''O
2	Rivière des Prairies	45°42'50.96''N ; 73°29'2.36''O
3	Rivière des Prairies	45°42'13.72''N ; 73°30'59.69''O
4	Fleuve Saint Laurent	45°44'21.51''N ; 73°26'19.78''O
5	Fleuve Saint Laurent	45°43'32.37''N ; 73°27'18.83''O
6	Fleuve Saint Laurent	45°42'2.81''N ; 73°28'40.58''O
7	Fleuve Saint Laurent	45°41'32.11''N ; 73°28'55.87''O
8	Fleuve Saint Laurent	45°40'29.98''N ; 73°29'26.53''O
9	Fleuve Saint Laurent	45°39'31.21''N ; 73°29'20.69''O
10	Rivière Assomption	45°43'48.23''N ; 73°28'55.37''O

b) Stratégie d'échantillonnage

- Fréquence d'échantillonnage

Le suivi a débuté en juillet 2013 et s'est terminé en novembre 2013. Pour les sites de 1 à 9, quatre échantillons d'eau ont été prélevés et seulement 2 pour le site 10.

- Prélèvement et conservation des échantillons

Lors de ce suivi sur le Saint Laurent, deux types de prélèvement ont été effectués :

- le prélèvement ponctuel qui a été fait avec des flacons PEHD (Nalgene®) de 500 mL.
- l'échantillonnage passif a été effectué *via* des POCIS qui ont été fixés sur des pontons aux points 4 et 5. Sur les autres sites il n'existait pas d'aménagement permettant de fixer les POCIS.

Une fois prélevés les échantillons ponctuels et passifs sont ramenés au laboratoire. Les échantillons d'eau sont filtrés afin de conserver seulement la phase aqueuse pour les analyses et sont stockés à -20°C. Les POCIS sont rincés à l'eau ultra-pure et emballés dans du papier d'aluminium et conservés à -20°C jusqu'à leur analyse.

Les extractions des échantillons d'eau des STEP et du Saint Laurent ont été faites dans le laboratoire de Christian Gagnon au Centre Saint Laurent à Montréal, Québec (Canada).

4. Etude d'un échantillonneur passif : le POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler)

4.1. Généralité sur l'échantillonneur passif

L'échantillonnage passif est une technique basée sur un mécanisme de diffusion libre des contaminants du milieu collecteur vers le milieu récepteur de l'échantillonneur. La diffusion est basée sur la différence de potentiel chimique d'un composé entre les deux milieux et s'arrête lors de l'obtention d'un équilibre chimique ou jusqu'au retrait du dispositif (Gorecki et Namiesnik, 2002 ; Vrana et *al*., 2005). Ainsi, un échantillonneur passif est un outil capable d'accumuler des contaminants présents dans un milieu pendant une période de temps définie (de quelques heures à plusieurs semaines). Il rend compte alors de la concentration moyenne d'une molécule dans un milieu en lissant les variations naturelles et grâce à ses propriétés intégratives, il permet de baisser les limites de détection des molécules recherchées.

Ce sont dans les années 70 que les premiers échantillonneurs passifs sont apparus pour surveiller la qualité de l'air ambiant et pour mesurer les expositions dans le milieu du travail (Vrana et *al*., 2005 ; Seethapathy et *al*., 2008). C'est en 1987 qu'est apparu le premier échantillonneur passif pour analyser les contaminants. Södergren utilise alors un sac en cellulose rempli d'hexane pour échantillonner les composés organiques hydrophobes (Södergren, 1987).

Il existe plusieurs types d'échantillonneurs passifs selon les composés recherchés, cependant, ils ont une caractéristique commune : la présence d'une barrière entre le milieu échantillonné et la phase réceptrice. Souvent, cette barrière est une membrane contenant une phase réceptrice adsorbante (solvant, réactif chimique, adsorbant poreux, etc...) qui elle aussi est choisie selon les composés recherchés.
Le **Tableau II-18** présente quelques exemples d'échantillonneurs passifs (Vrana et *al*., 2005 ; Seethapathy et *al*., 2008).

Tableau II-18. Exemples d'échantillonneurs passifs existants (source : Vrana et al., 2005 ; Seethapathy, 2008).

Echantillonneur passif	Type de barrière	Phase réceptrice	Composés ciblés
Dosimètre en céramique	Tube en céramique scellé à chaque extrémité par une capsule polytétrafluoroéthylène (PTFE)	Adsorbant solide (ex. : résine échangeuse d'ion)	HAP, BTEX, chloroalcane
Chemcatcher® (Universal passive sampler using Empore disk)	Divers : acétate de cellulose, polysulfone, polyéthylène, etc…	Divers : disque Empore, barreau SBSE recouvert de PDMS, etc…	Composés organiques polaires et apolaires
MECSO (Membrane-Enclosed Sorptive Coating)	Cellulose ou polyéthylène basse densité (PEBD)	Barreau SBSE recouvert de PDMS (silicone)	HAP, PCB, pesticides organochlorés
SPMD (Semi-Permeable Membrane Device)	Membrane non poreuse de PEBD	Trioléine	Composés organiques hydrophobes (HAP, PC D, etc…)
POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler)	Membrane polyéthersulfone (PES)	Phase dite "Générique" : mélange de 3 sorbants. Phase dite "Pharmaceutique" : un copolymère de divinylbenzène et de N-vinylpyrrolidone (Oasis® HLB)	Composés organiques hydrophiles (herbicides, pesticides, hormones, pharmaceutiques, etc…)

Dans le cadre de ces travaux de recherche sur les psychotropes (composés organiques majoritairement hydrophiles) les échantillonneurs passifs de type POCIS « Pharmaceutique » ont été utilisés sur la Gironde et le fleuve Saint Laurent. En effet, d'après l'étude de Vrana et *al*., 2005 ce sont des outils adaptés aux molécules polaires ayant un log Kow < 3.
De plus, le POCIS a déjà été développé au LPTC pour les composés pharmaceutiques dont certains sont étudiés dans ces travaux de thèse (Togola et Budzinski, 2007 ; Belles, 2012 ; Aminot, 2013).

4.2. Le POCIS

a) Description
Le POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler), représenté dans la **Figure II-19**, est constitué de deux disques en inox renfermant deux membranes microporeuses en PolyEther-Sulfone (PES) qui elles-mêmes séquestrent une phase adsorbante.

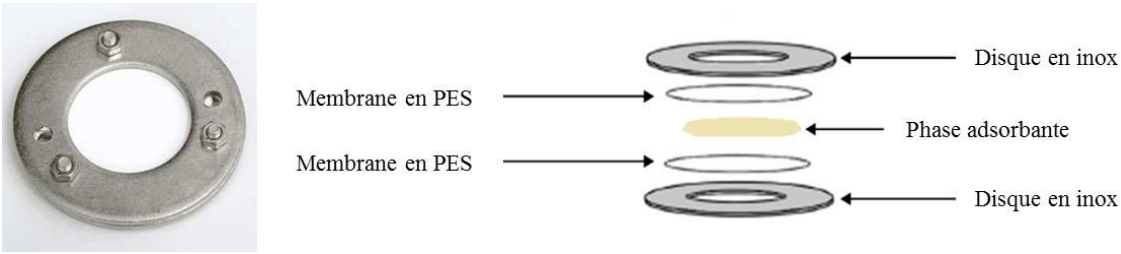


Figure II-19. Schéma d'un POCIS

Il existe deux types de configurations de POCIS (dépendant de la phase réceptrice) :

- le « Générique » qui est un mélange de 3 adsorbants : Isolute ENV+ (copolymère de styrène/divinylbenzène), Biobeads S-X3 et Ambersorb 1500 carbon (Alvarez, 1999).
- le « Pharmaceutique » qui est constitué d'un copolymère de divinylbenzène et de N-vinylpyrolidone (Oasis® HLB) (Alvarez et *al*., 2004).

b) Principe

Le profil d'accumulation d'un échantillonneur passif tel que le POCIS peut être décrit comme dans la **Figure II-20.**

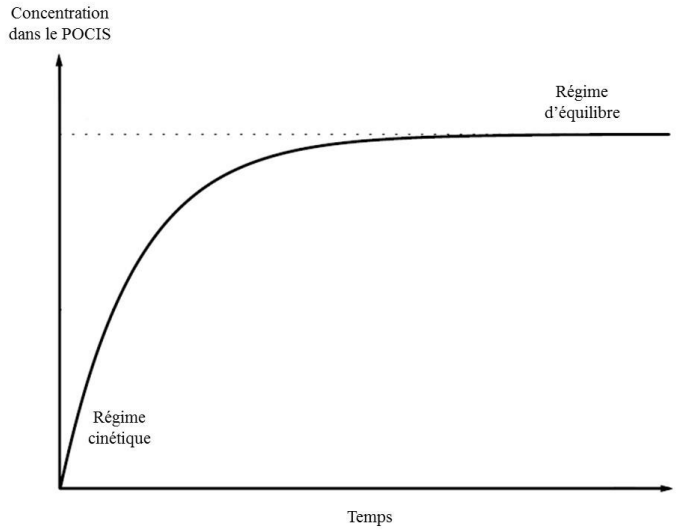


Figure II-20. Profil d'accumulation d'un composé dans un POCIS au cours du temps (adapté de Vrana et *al*., 2005).

Deux phases sont alors distinguées lors de l'accumulation d'un composé :

-une phase intégrative où la cinétique d'accumulation des composés est linéaire (régime cinétique).

-une phase de plateau où il y a un équilibre dans la distribution de la molécule entre le milieu échantillonné et le milieu récepteur (régime d'équilibre).

Cette accumulation peut être aussi décrite selon l'équation suivante :

$$C_s(t) = C_{eau}\ \frac{K_u}{K_e}\ (1 - e^{-K_e.t}) \qquad \textbf{Equation 1}$$

$C_s(t)$: concentration du composé dans l'échantillonneur passif à un temps donné ($\mu g.g^{-1}$)
C_{eau} : concentration du composé dans l'eau ($\mu g.L^{-1}$)
K_u : constante d'accumulation ($L.g^{-1}.j^{-1}$)
K_e : constante d'élimination ($L.j^{-1}$)
t : temps (j)

En régime d'équilibre lorsque le temps d'exposition est suffisamment long, l'équilibre thermodynamique entre le milieu aqueux et le milieu récepteur est établi. Ainsi l'équation 1 peut être réduite à :

$$\frac{K_u}{K_e} = \frac{C_s(t)}{C_{eau}} = Ksw \qquad \textbf{Equation 2}$$

K_{sw} : le coefficient de partage entre l'échantillonneur passif et l'eau ($L.g^{-1}$).

La connaissance de K et de C_S permet d'estimer la concentration de l'analyte dans l'eau.

En régime cinétique lorsque les composés sont accumulés linéairement dans l'échantillonneur passif, la constante d'élimination peut alors être considérée comme négligeable par rapport à la constante d'accumulation. Ainsi l'équation 1 peut s'écrire de la manière suivante :

$$C_s(t) = K_u \times C_{eau} \times t \qquad \textbf{Equation 3}$$

En introduisant la notion de taux d'échantillonnage (R_s) qui est le volume d'eau concentré par l'échantillonneur passif en fonction de temps, l'équation 3 peut s'écrire de la manière suivante :

$$C_s(t) \times m = R_s \times C_{eau} \times t \qquad \textbf{Equation 4}$$

m : masse de phase réceptrice présente dans l'échantillonneur passif (g)
Rs : taux d'échantillonnage ($L.j^{-1}$)

Le R_s est propre à un composé et est influencé par les conditions environnementales (salinité, turbulence, température, nature de la membrane). Cette constante est donc indispensable pour calculer la concentration moyenne d'un composé dans l'eau.

Ainsi, avec le POCIS, il est important de travailler en régime cinétique afin d'évaluer la concentration dans le POCIS qui est proportionnelle à la concentration dans l'eau. Ainsi l'équation 4 peut se traduire de la manière suivante :

$$C_{POCIS} = \frac{C_{eau} \times R_s \times t}{m_{POCIS}} \qquad \textbf{Equation 5}$$

C_{POCIS} : concentration du composé dans le POCIS à un temps donné ($\mu g.g^{-1}$)
m_{POCIS} : masse de phase réceptrice présente dans le POCIS (g)

Cet outil intégratif demande une calibration afin de connaitre le comportement des composés vis-à-vis de la phase réceptrice (Vrana et *al*., 2005 ;Miège et *al*., 2011). Ainsi, le développement et la validation du POCIS consistent dans un premier temps à déterminer en laboratoire les taux d'échantillonnages (R_s) pour chacune des molécules d'intérêt, puis dans un deuxième temps à valider les résultats expérimentaux par une calibration *in situ*.

De plus, les conditions d'exposition environnementales comme la température, la charge en matière en suspension et les conditions hydrodynamiques peuvent avoir un impact sur le taux d'échantillonnage. Ainsi, ce taux doit être d'abord déterminé en laboratoire afin de faire un lien entre la concentration des composés dans l'eau et leur accumulation dans le POCIS ($R_{s\ labo}$). Cependant, le $R_{s\ labo}$ est déterminé dans des conditions de température et d'agitation contrôlées alors que les conditions *in situ* peuvent être très variables (courant plus ou moins fort influencé par le débit, présence de biofilm, variation de la température, etc…) et jouer un rôle sur l'adsorption des composés sur la phase réceptrice. C'est pourquoi les $R_{s\ labo}$ ne peuvent être directement utilisés et doivent être corrigés ($R_{s\ corrigé}$).

Pour obtenir ce taux d'échantillonnage corrigé, il est possible d'utiliser des composés de référence et de performance, appelés PRC (Performance Reference Compounds) (Huckins et *al*., 2002 ; Mazzella et *al*., 2010) qui sont introduits dans la phase réceptrice des POCIS avant son exposition sur le terrain.
Les PRC doivent être absents du milieu échantillonné ; ce sont généralement des composés deutérés qui se comportent comme les composés étudiés. Ainsi la désorption des PRC durant une période d'exposition permet d'estimer une constante d'élimination en laboratoire ($K_{e\ labo}$) et sur le terrain ($K_{e\ in\ situ}$) d'après l'équation suivante :

$$K_{e\ PRC} = \frac{\ln(C_{PRC\ 0} | C_{PRC\ (t)})}{t} \qquad \textbf{Equation 6}$$

$K_{e\ PRC}$: constante d'élimination du PRC
$C_{PRC\ 0}$: concentration du PRC à t=0 ($\mu g.g^{-1}$)
$C_{PRC(t)}$: concentration du PRC à un temps donné ($\mu g.g^{-1}$)

Les constantes d'élimination du PRC au laboratoire et sur le terrain permettent alors d'obtenir un $R_{s\ corrigé}$ (Vrana et *al*., 2007 ; Mazzella et *al*., 2010) comme le décrit l'équation suivante :

$$R_{s\ corrigé} = R_{s\ labo} \times \left(\frac{K_{e\ in\ situ}}{K_{e\ labo}}\right) \qquad \textbf{Equation 7}$$

$R_{s\ labo}$: taux d'échantillonnage estimé en laboratoire
$R_{s\ corrigé}$: taux d'échantillonnage corrigé
$K_{e\ labo}$: constante d'élimination du PRC en laboratoire
$K_{e\ in\ situ}$: constante d'élimination du PRC sur le terrain
Ainsi la concentration moyenne dans l'eau pour un composé peut alors être calculée en fonction de la relation suivante :

$$C_{eau} = \frac{C_{POCIS} \times m_{POCIS}}{R_{s\ corrigé} \times t} \qquad \textbf{Equation 8}$$

Dans le cadre de ces travaux de thèse, des calibrations en laboratoire et sur le terrain ont été nécessaires pour utiliser le POCIS afin de suivre la contamination en psychotropes dans la Gironde et dans le fleuve Saint Laurent.

c) Montage du POCIS
Les POCIS sont montés en laboratoire avant d'être utilisés sur le terrain ou pour les calibrations. Les membranes utilisées sont en polyéthersulfone (PES) de diamètre de pore 0,1 µm et sont fournies par VWR (Strasbourg, France). Généralement 200 mg de phase adsorbante de type OASIS® HLB, achetées chez Waters (Saint Quentin en Yvelines, France), sont insérées entre les deux membranes PES. Avant d'être utilisées, la phase et les membranes sont nettoyées au méthanol à trois reprises pendant 10 minutes. Les membranes sont ensuite séchées dans une étuve à 50 °C et la phase est quant à elle séchée sous vide.

Dans ces travaux, des composés de performances de références sont utilisés ; la phase doit donc être préparée en conséquence. Ainsi, après nettoyage, la phase est enrobée de PRC qui

ont été sélectionnés d'après l'étude de Belles et *al*. (2013). La phase est alors dopée à une concentration d'environ 10 µg par gramme de phase avec une solution contenant de la Caféine 13C, du Salbutamol d3 et de la DIA d5.

Après montage, les POCIS sont conservés sous papier aluminium puis dans des sacs plastiques fermés et placés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Après exposition les POCIS sont nettoyés à l'eau ultra-pure et de nouveau conservés dans du papier aluminium et des sacs plastiques ; à -20°C jusqu'à leur analyse.

4.3. Calibration et validation du POCIS

Dans cette étude, deux calibrations en laboratoire ont été menées ainsi qu'une validation sur le terrain afin de déterminer les cinétiques d'accumulation dans les POCIS pour les psychotropes sélectionnés, permettant ainsi de déterminer un taux d'échantillonnage pour chaque composé.

4.3.1. Calibration en laboratoire

Afin d'avoir une concentration stable en contaminant dans l'eau d'exposition (où sont positionnés les POCIS) et pour s'affranchir des pertes de contaminants (adsorption, volatilisation ou encore dégradation), les calibrations ont été effectuées avec un système de flux continu et un système de renouvellement d'eau (**Figure II-21**).

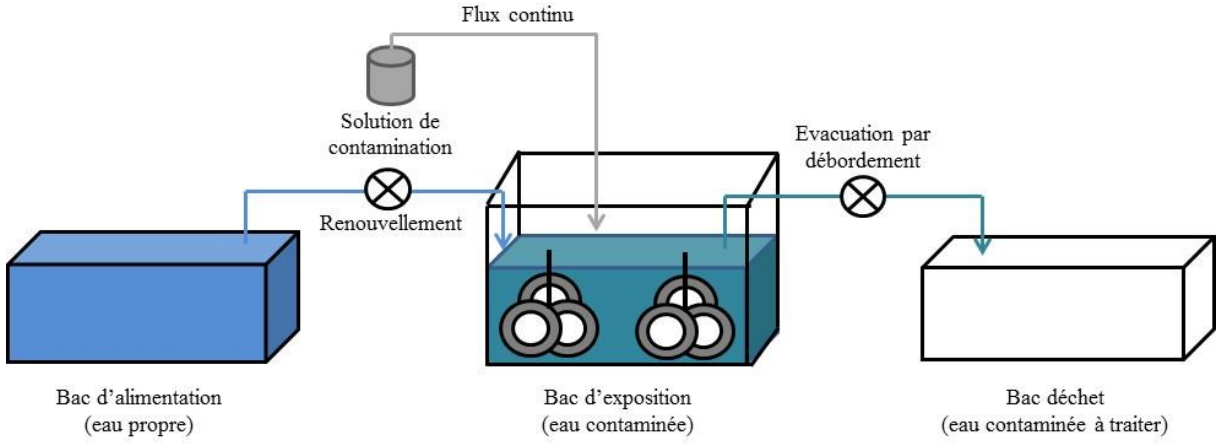


Figure II-21. Schéma du système expérimental en flux continu utilisé lors des calibrations des POCIS.

Ce système d'exposition est composé de plusieurs enceintes :

- un bac d'exposition qui est contaminé par un flux continu de solution concentrée en composés étudiés. Ce flux peut être apporté soit par une pompe péristaltique soit par un pousse-seringue. Ce bac est destiné à recevoir les POCIS le temps de l'exposition et est brassé à l'aide d'une pompe immergé ou de pales métalliques afin d'homogénéiser le milieu.

- un bac d'alimentation qui contient de l'eau propre (eau non contaminée provenant du robinet). Ce bac va permettre de renouveler l'eau du bac d'exposition à l'aide d'une pompe péristaltique.

- un bac déchet qui va recevoir les eaux contaminées du bac d'exposition par un système de débordement (*via* une pompe péristaltique). Ces eaux contaminées sont traitées par charbon actif avant d'être évacuées dans le réseau d'eaux usées.

a) Calibration 1

Dans cette calibration, les POCIS fixés sur des supports en plastique, ont été exposés à une concentration nominale de 150 ng.L^{-1} dans un bac d'exposition contenant 300 L d'eau contaminée pendant 30 jours. L'apport en contaminants a été réalisé par flux continu à l'aide d'un pousse-seringue. L'homogénéisation des composés dans l'eau s'est faite grâce à une pompe immergée.

L'eau non contaminée a été amenée par une pompe péristaltique à un débit d'environ 6,25 L.h^{-1}, ce qui équivaut à un taux de renouvellement de quasiment 50 % par jour. De plus, une autre pompe péristaltique a permis d'évacuer par débordement l'eau contaminée.

La **Figure II-22** représente le dispositif expérimental utilisé dans la première calibration.

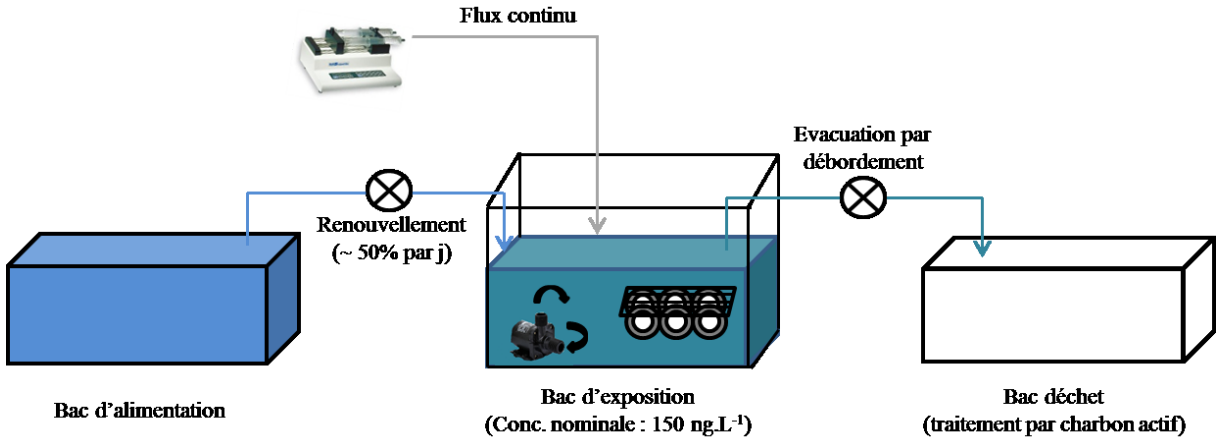


Figure II-22. Schéma du dispositif utilisé dans la calibration 1.

La solution de contamination a été préparée à l'avance à partir de cristaux de molécules à calibrer, qui ont été dissouts dans 1,5 L d'acétonitrile (solvant). Cette solution a été divisée en plusieurs aliquotes qui ont été conservées à -20°C. Tous les jours une aliquote a été décongelée et passée aux ultra-sons avant d'être mise dans le pousse-seringue (44 mL.j^{-1}).

A la mise en route du système, le bac d'exposition a été dopé, à la concentration nominale visée, en ajoutant 88 mL de la solution de contamination initiale (509 µg.L^{-1}) dans les 300 mL d'eau contenu dans l'aquarium. Enfin, le dispositif a été mis en stabulation pendant 7 jours.

Le **Tableau II-19** présente les temps de prélèvement des échantillons d'eau et des POCIS.

Tableau II-19. Temps de prélèvements d'eau et de POCIS lors de la calibration 1.

Date	J-6	J-6 à J0	J0
Prélèvement eau	Mise en route du système et dopage initial	Stabulation	X
Prélèvement POCIS			Exposition des POCIS

Date	J2	J4	J6	J8	J10	J12	J14	J16	J18	J20	J22	J24	J26	J28	J30
Prélèvement eau	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Prélèvement POCIS	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X			X

b) Calibration 2

Dans cette deuxième calibration les POCIS ont été fixés sur des holders et exposés à une concentration nominale de 300 ng.L^{-1} dans un bac d'exposition contenant 300 L d'eau contaminée pendant 20 jours.

Les systèmes d'exposition expérimentaux utilisés simulant une concentration nominale en contaminants de 300 ng.L^{-1} dans l'eau sont identiques à ceux utilisés au cours de la calibration 1.

La **Figure II-23** représente le dispositif expérimental utilisé dans la deuxième calibration.

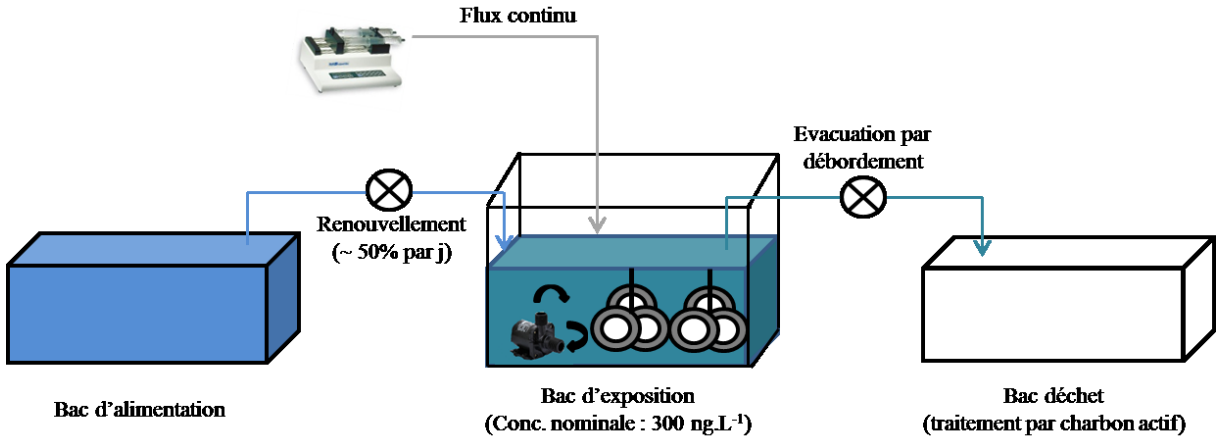


Figure II-23. Schéma du dispositif utilisé dans la calibration 2.

Pour cette calibration un prélèvement d'eau a été fait tous les jours et un prélèvement de POCIS tous les 5 jours.

4.3.2. *Calibration in situ*

Après les calibrations en laboratoire, il est nécessaire de valider l'utilisation des POCIS pour mesurer les psychotropes sur le terrain. Cette validation *in situ* permet alors d'obtenir un taux d'échantillonnage corrigé pour les molécules recherchées.

Pour cette validation, le site de Cadaujac (voir localisation **Figure 36**) a été choisi pour sa proximité avec le laboratoire. Ainsi, 4 jeux de POCIS en triplicats ont été exposés sur ce site pendant 28 jours (**Figure II-24**).
Des échantillons ponctuels d'eau ont été prélevés tous les jours de la période d'exposition (du 18.11.2011 au 15.12.2011) et un jeu de POCIS a été enlevé à J5, J10, J18 et J28.

Figure II-24. Jeux de POCIS exposés sur le site de Cadaujac pour la validation *in situ*.

4.4. Extraction du POCIS

a)Mise en cartouche
Pour pouvoir être extraits, les POCIS doivent être mis en cartouche. Ainsi, après exposition, les POCIS sont démontés et la phase réceptrice est transférée dans une cartouche SPE (Solid Phase Extraction) en verre de 6 mL achetée chez Sigma-Aldrish (Saint Quentin Fallavier, France). Chaque cartouche est munie de frittés en téflon qui ont été préalablement nettoyés au méthanol (3 fois 20 minutes) et séchés sous hotte.
Le transfert de la phase se fait à l'aide d'un entonnoir en verre, de quelques millilitres d'eau minérale Vittel et d'une pompe à vide. Pour finir les cartouches SPE contenant la phase humide sont séchées sous vide pendant environ 1 heure.

Les cartouches SPE en verre munies de leur frittés sont pesées avant et après le transfert de phase afin de connaitre la masse de celle-ci (**Figure II-25**).

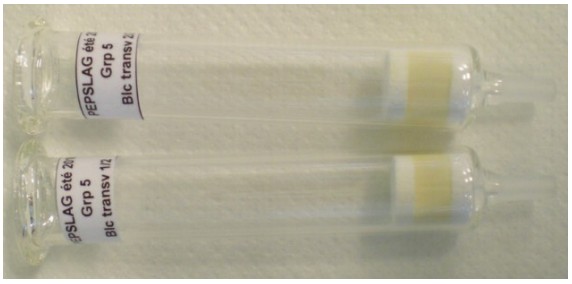


Figure II-25. Cartouche SPE en verre contenant deux frittés et de la phase OASIS HLB.

b) Extraction de la phase réceptrice

Le protocole d'extraction suivi pour les POCIS est adapté du protocole déjà utilisé pour les médicaments dans des travaux de thèse au LPTC (Belles, 2012 ; Aminot, 2013).

Avant d'extraire la phase, des étalons internes sélectionnés pour analyser les psychotropes étudiés sont introduits par contrôle gravimétrique dans les flacons en verre d'élution.

L'élution se fait par le passage successif dans chaque cartouche en verre de 3 solvants ou mélange de solvants : - 10 mL de méthanol

- 10 mL d'un mélange méthanol/dichlorométhane (50/50 ; v/v)
- 10 mL de dichlorométhane

Les solvants qui ont été sélectionnés pour cette extraction permettent d'éluer un large éventail de composés de la phase réceptrice des POCIS.

Les 30 mL d'éluât obtenus sont ensuite reconcentrés à sec sous vide (650 mbar) à l'aide d'un Rapidvap pendant 45 minutes à 80 °C. Le tout est repris dans 300 µL d'acétonitrile et transféré dans des flacons d'injection pour être analysé par UPLC-MS/MS.

5. Préparation et extraction des échantillons d'eau

5.1. Produits chimiques et solvants

Les composés natifs utilisés sont de haute pureté chimique > 95% et les composés deutérés ont une pureté > 90%. Les fournisseurs des 47 composés natifs et des 7 étalons internes utilisés sont présentés dans un tableau en **Annexe 13**.

Les solvants et les produits chimiques qui ont été utilisés pour l'ensemble des analyses sont présentés dans le **Tableau II-20**.

Tableau II-20. Solvants et produits chimiques utilisés lors des analyses de cette étude.

	Nom	Marque et fournisseurs
Solvants	Acétate d'éthyle	Scharlau ; ICS (Belin-Beliet, France)
	Acétone	Scharlau ; ICS (Belin-Beliet, France)
	Acétonitrile	Baker ; Atlantic labo (Eysines, France)
	Dichlorométhane	Scharlau ; ICS (Belin-Beliet, France)
	Méthanol	Baker ; Atlantic labo (Eysines, France)
Produits chimiques	Acide chlorhydrique (37%)	Scharlau ; Atlantic labo (Eysines, France)
	Acide formique (98%)	Baker ; Atlantic labo (Eysines, France)
	Hydroxyde d'ammonium (28-30%)	Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France)

L'eau minérale utilisée est de la marque Vittel et est fournie par France-Boisson (Lormont, France). L'eau ultra-pure (appelée eau MilliQ) est fabriquée en laboratoire par un système Milli-Q, Millipore (Molsheim, France). Les cartouches Oasis® MCX (3 cc, 60 mg) sont achetées chez Waters (St Quentin en Yvelines, France).

Tout le matériel (flacons, béchers, etc…) utilisé est lavé en machine au détergent (TFD 7, Franklab) et à l'acide (Neutrax, Franklab) puis calciné à 450 °C pendant 8h.

5.2. Filtration et conservation des échantillons

A leur arrivée au laboratoire, les échantillons d'eau sont filtrés à l'aide d'unité de filtration en polyéthylène haute densité (PEHD) (Nalgene®). Dans ces travaux de recherche, 3 types d'eau ont été étudiés : des eaux usées brutes, des eaux usées traitées et des eaux environnementales (ex : eaux de rivière).
Afin d'éviter les contaminations croisées dans cette étape de filtration, un jeu d'unités de filtration a donc été dédié à chaque type d'eau étudiée.

Les eaux usées traitées et les eaux environnementales sont directement filtrées sur des filtres en fibre de verre avec un seuil de coupure de 0,7 µm (GF/F, Whatman ; VWR, Fontenay-sous-bois, France). Les eaux brutes étant plus chargées en particules doivent subir deux filtrations afin d'éviter de colmater les filtres rapidement et ainsi réduire la consommation de filtres. Ainsi,

ces eaux doivent être une première fois filtrées sur des filtres en fibre de verre d'une porosité 1,6 µm (GF/A, Whatman ; VWR, Fontenay-sous-bois, France). Le filtrat obtenu subit alors une seconde filtration sur des filtres GF/F (0,7 µm).

Après filtration les échantillons sont conservés dans un flacon PEHD puis stockés à -20°C en attendant d'être extraits.

5.3. Méthode d'extraction

a) Généralité

La principale méthode d'extraction des produits pharmaceutiques dans les échantillons aqueux est celle sur phase solide, appelée SPE (Solid Phase Extraction). L'intérêt principal de cette méthode est de pouvoir concentrer des composés provenant d'un volume d'eau pouvant aller jusqu'à plusieurs litres, en un extrait organique de quelques microlitres de solvant.

Il existe plusieurs types de phases adsorbantes utilisées pour l'extraction par SPE des composés pharmaceutiques qui peuvent avoir des propriétés physico-chimiques très variées. Cette diversité conduit alors à l'utilisation de plusieurs phases hydrophiles, lipophiles ou mixtes.
Les phases adsorbantes les plus utilisées pour l'extraction des médicaments sont les Oasis® HLB et MCX :

- Les cartouches Oasis HLB sont constituées d'un groupement N-vinyl-pyrrolidone qui va interagir avec les groupements hydrophiles des molécules et d'un groupement divinyl-benzène qui va interagir avec les groupements hydrophobes des composés. Cette caractéristique mixte hydrophile/lipophile permet à ce type de phase d'interagir avec un large éventail de composés aussi bien basiques, qu'acides, ou neutres. Ces cartouches sont très utilisées dans les analyses multi-résidus et ont l'avantage de ne pas nécessiter l'ajustement du pH pour la rétention des produits pharmaceutiques acides (Weigel et *al.*, 2004 ; Bones et *al.*, 2006; Lajeunesse et *al.*, 2008).

- Les cartouches Oasis MCX (Mixed Cation eXchange) (N-vinylpyrolidone - divinylbenzène - SO_3^-) sont constituées d'une phase HLB à laquelle un groupement sulfonate a été greffé. Cette phase est de type mixte en phase inverse et échangeuse de cations pour les composés basiques ionisés à pH acide. Ces cartouches ont montré leur efficacité à extraire de très nombreux composés pharmaceutiques à pH acide mais aussi à pH neutre (Castiglioni et *al.*, 2005 ; Togola et Budzinski, 2008).

De même, plusieurs solvants peuvent être utilisés individuellement ou en mélange pour éluer les cartouches SPE. Le choix du solvant va être basé sur son affinité pour les molécules ciblées mais aussi sur sa capacité à éluer les composés d'intérêts sans décrocher les interférents présents dans la matrice et qui ont été retenus sur la cartouche.
Les solvants les plus utilisés dans l'extraction des composés pharmaceutiques sont : le méthanol, l'acétonitrile, le dichlorométhane ou encore l'acétate d'éthyle. De plus, l'ajout d'acide (ex : acide formique) ou de base (ex : hydroxyde d'ammonium) au solvant permet de modifier la

forme des molécules ciblées et ainsi de les éluer de manière spécifique par rapport aux interférents.

b) Principe

Cette méthode consiste dans un premier temps à percoler un échantillon aqueux sur une phase adsorbante contenue dans une cartouche. Les analytes présents dans les échantillons vont alors être retenus sur cette phase solide. Dans un deuxième temps, les analytes vont être élués de cette phase à l'aide d'un solvant ou d'un mélange de solvants. Ainsi l'échantillon d'eau est concentré dans un faible volume de solvants.

Néanmoins, certains composés très polaires ayant une affinité importante pour la phase aqueuse ne sont plus retenus à partir d'un volume d'eau maximal, appelé volume de fuite. Ce volume est spécifique d'un composé et d'une phase adsorbante.

c) Protocole d'extraction pour les psychotropes étudiés

Dans ces travaux sur les psychotropes, le protocole d'extraction sur phase solide utilisé est le même que celui développé par Togola et Budzinski (2008) car ce protocole a été validé pour des composés similaires aux deux études comme la Carbamazépine.

Cette extraction est constituée de 4 étapes :

1- Le conditionnement des cartouches Oasis MCX.

Cette étape est nécessaire pour activer et préparer la phase adsorbante, contenue dans chaque cartouche, à capter les analytes présents dans l'échantillon d'eau. Ainsi 3 mL d'acétate d'éthyle et 3 mL d'eau Vittel à pH 2 sont passés dans chaque cartouche.

2- Le dépôt des échantillons d'eau.

La prise d'essai est de 100 mL pour les eaux brutes et traitées et de 200 mL pour les eaux environnementales. Chaque prise d'essai est contrôlée par gravimétrie et est acidifiée à pH2 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (solution à 37% diluée au tiers). Après acidification, des étalons internes (EI) sont ajoutés (contrôle gravimétrique) dans chaque échantillon afin de pouvoir quantifier les psychotropes recherchés (**Chapitre 2. Section 5.3**). Les échantillons sont alors percolés sur les cartouches Oasis MCX à l'aide d'une cuve sous vide (**Figure II-26**).

Figure II-26. Photo du dispositif nécessaire pour l'extraction sur phase solide (cuve sous vide + cartouches SPE).

3- Le séchage des cartouches SPE.

Cette étape permet d'enlever les dernières traces d'eau qui pourraient être présentes dans la phase adsorbante. Pour cela, les cartouches SPE sont séchées sous vide pendant 1h.

4- L'élution des cartouches Oasis MCX.

Cette étape se fait par passage d'un solvant ou d'un mélange de solvants, permettant de récupérer les composés recherchés :

- 3 mL d'acétate d'éthyle.
- 3 mL d'un mélange acétate d'éthyle/acétone (50/50 ; v/v).
- 3 mL d'un mélange méthanol/dichlorométhane (50/50 ; v/v) + 5% (vol.) NH_4OH (solution d'hydroxyde d'ammonium à 28-30%).

L'éluât de 9 mL obtenu dans un flacon en verre est reconcentré à sec sous flux d'azote et sur une plaque chauffante à 40 °C afin de limiter les pertes de composés par dégradation ou évaporation. L'extrait sec est alors repris dans de l'acétonitrile (3 x 100 µL) et transféré dans un flacon d'injection (1,5 mL) contenant un insert. Les échantillons extraits sont alors conservés à -20 °C jusqu'à leur injection.

Dans le but d'une démarche qualité, lors de chaque série d'extractions deux points de contrôle sont effectués :

-**un blanc manipulation** qui permet d'évaluer la présence ou non d'une contamination lors de la manipulation. Ce blanc manipulation, aussi appelé « blanc cartouche », est une cartouche qui n'est percolée par aucune matrice mais qui est traitée comme un échantillon standard et donc subit les différentes étapes d'extraction et de reconcentration.

-**un échantillon dopé** qui permet d'évaluer une perte ou non d'un composé lors du protocole d'extraction. Cet échantillon dopé est fait à partir d'eau minérale Vittel avec une prise d'essai identique à celle des échantillons extraits et est dopé dans la même gamme de concentrations que les échantillons traités.

Cette méthode d'extraction doit être validée avant d'être utilisée en routine. Les différents paramètres testés pour valider la méthode sont décrits dans le **Chapitre 3. Section 1**.

6. Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

6.1. Technique analytique

Les premières méthodes analytiques pour les composés pharmaceutiques ont été conçues pour connaitre la pureté des composés lors de fabrication industrielle ou encore dans le domaine biomédical pour le suivi thérapeutique dans les matrices biologiques (Snow, 2000).
Des méthodes ont été par la suite développées pour doser les composés médicamenteux dans des matrices plus complexes telles que les matrices environnementales mais aussi pour avoir des techniques analytiques plus sensibles permettant de détecter des composés à l'état de traces dans différents compartiments aquatiques comme les eaux de surface, les eaux marines, les eaux souterraines ou encore les eaux de boissons (Togola et Budzinski, 2008 ; Loos et *al*., 2010 ; Metcalfe et *al*., 2011, Devier et *al*., 2013).

Les propriétés physico-chimiques des composés recherchées conditionnent le choix de la technique d'analyse. Ainsi les composés volatils et résistants à la chaleur vont plutôt être analysés par chromatographie en phase gazeuse (GC) et les composés polaires vont plutôt être analysés par chromatographie en phase liquide (LC). La chromatographie est une technique séparative basée sur les différences d'affinité entre les composés, la phase stationnaire (colonne chromatographique) et la phase mobile (solvants ou gaz).
A la sortie de la colonne, les composés séparés vont être dirigés vers une source d'ionisation. La plus répandue pour l'analyse des composés médicamenteux dans les matrices environnementales est l'ionisation par électronébulisation aussi connue par son acronyme anglais ESI (ElectroSpray Ionization).
Après être ionisées, les molécules sont entrainées vers un détecteur, le spectromètre de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS). Un spectromètre de masse en tandem de type triple quadripôle est constitué de deux analyseurs de masse quadripolaires. Le premier laisse passer un ion précurseur par composé qui est formé dans la source. Cet ion va vers la cellule de collision où il va être fragmenté. Les ions fragmentés obtenus vont alors être dirigés vers le second quadrupôle qui laisse passer sélectivement les ions produits associés au composé. Ainsi à chaque composé est associé une ou plusieurs transitions de type « ion précurseur → ion produit ».

La LC-MS/MS est une technique sélective et sensible, c'est pourquoi elle est largement utilisée dans les analyses multi-résidus des composés pharmaceutiques (Gros et *al*., 2006 ; Kasprzyk-Hordern et *al*., 2007 ; Baker et *al*., 2011).

6.2. Méthode analytique développée pour les psychotropes

La méthode pour analyser les psychotropes a été développée sur un UPLC Acquity (Ultra Performance Liquid Chromatography) connecté à un spectromètre de masse Quattro Premier XE triple quadrupôle de chez Waters (St Quentin en Yvelines, France) (**Figure II-27**). Cette tech-

nique est utilisée car elle emploie des colonnes plus courtes et de diamètre de particules plus petit de façon à réduire le temps d'analyse, augmenter la résolution et diminuer les volumes morts ce qui permet aussi de diminuer la consommation de solvant.
Les composés sont ionisés par électrospray en mode positif et le mode d'acquisition est le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring).

Figure II-27. Photo de l'UPLC-MS/MS utilisé lors de ces travaux de thèse.

Le **Tableau II-21** présente les détails de la méthode analytique.

Tableau II-21. Paramètres chromatographiques et de spectrométrie de masse pour l'analyse des psychotropes sur l'UPLC-MS/MS.

Mode d'ionisation	ESI +	
Phase mobile	A : Eau MilliQ + 0,1% (vol.) acide formique B : Acétonitrile + 0,1% (vol.) acide formique	
Colonne	Kinetex C18 100A (100 x 2,1 mm) (1,7 µm)	
Température colonne	35°C	
Volume d'injection	5 µL	
Débit	0,5 ml/min	
Température de la source	120 °C	
Gradient	Temps (min)	% A
	0	100
	4,5	80
	13	60
	13,5	0
	14,5	0
	17	100
Durée d'analyse	17 minutes	
Gaz	Azote	
Débit du gaz de désolvatation	1000 L/h	
Température du gaz de désolvatation	400 °C	
Tension de capillaire	3 000 V	

Avant d'être injectés, les échantillons sont repris à 90% dans de l'eau MilliQ afin que le solvant de reprise soit proche du solvant d'injection (Eau MilliQ/ Acétonitrile : 90/10 ; v/v).

D'après la décision de la commission européenne 2002/657/EC, 4 critères sont recommandés pour confirmer et identifier des composés lors d'analyse par LC-MS/MS : le temps de rétention, une transition en spectrométrie de masse (MRM) de quantification, une autre de confirmation et le rapport entre les deux transitions.
Ainsi le **Tableau II-22**
présente pour chaque composé, la transition de quantification et la transition de confirmation. Les étalons internes ont seulement la transition de quantification (**Annexe 14**).

Tableau II-22. Transitions et paramètres associés pour l'analyse des psychotropes sur l'UPLC-MS/MS.

Composés	Transition quantification				Transition confirmation			
	Ion précurseur (*m/z*)	Ion produit I (*m/z*)	Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)	Ion précurseur (*m/z*)	Ion produit II (*m/z*)	Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)
Benzodiazépines								
Zopiclone	389,1	245,1	15	15	389,1	345,2	15	10
Zolpidem	308,2	235,3	35	37	308,2	263,2	35	27
Nordiazépam	271,2	140,0	40	32	271,2	165,1	40	30
Oxazépam	287,1	241,1	30	23	287,1	104,2	30	33
Alprazolam	309,0	281,1	40	27	309,0	205,1	40	42
Bromazépam	318,2	182,1	35	32	318,2	209,4	35	30
Clobazam	301,2	259,2	30	22	301,2	224,3	30	30
Clonazépam	316,1	270,1	40	25	316,1	214,0	40	40
Clorazépate	271,2	140,3	40	28	271,2	165,2	40	27
Diazépam	285,1	193,1	40	32	285,1	154,1	40	28
Lorazépam	321,3	275,1	30	17	321,3	303,1	30	15
Flunitrazépam	314,1	268,2	40	27	314,1	239,3	40	35
Témazépam	301,2	255,2	30	22	301,2	283,0	30	13
Prazépam	325,2	271,1	35	23	325,2	140,1	35	37
Antidépresseurs								
Mirtazapine	266,2	195,1	35	27	266,2	72,3	35	20
Milnacipran	247,1	230,4	15	12	247,1	100,1	15	10
Venlafaxine	278,2	58,3	20	18	278,2	260,7	20	13
Miansérine	265,2	208,1	35	20	265,2	58,3	35	25
Amoxapine	314,1	271,2	40	25	314,1	193,0	40	42
Citalopram	325,2	109,0	35	20	325,2	262,2	35	20
Tianeptine	437,1	292,1	25	18	437,1	228,2	25	37
Paroxétine	330,1	70,4	40	30	330,1	44,5	40	25
Imipramine	281,2	86,2	25	18	281,2	58,3	25	35
Maprotiline	278,2	250,2	35	18	278,2	191,1	35	37
Duloxétine	298,2	44,4	15	10	298,2	154,0	15	5
Amitriptyline	278,2	105,1	30	23	278,2	91,1	30	25
Fluoxétine	310,2	44,4	20	12	310,2	148,0	25	14
Sertraline	306,1	159,1	20	30	306,1	275,1	20	13
Doxépine	280,2	107,0	30	23	280,2	84,2	30	25
Norfluoxétine	296,1	134,0	15	8	296,1	-	-	-
Antipsychotiques - Neuroleptiques								
Clomipramine	315,2	86,1	25	18	315,2	58,3	25	35
Sulpiride	342,1	112,1	40	25	342,1	58,3	40	28
Cyamémazine	324,2	100,1	30	20	324,2	58,3	30	30
Chlorpromazine	319,1	86,1	30	20	319,1	58,3	30	30
Tiapride	329,1	256,1	30	22	329,1	213,1	30	35
Amisulpride	370,4	242,1	40	25	370,4	196,0	40	42
Pimozide	462,2	109,2	40	52	462,2	328,3	40	32
Antiépileptiques								
Gabapentine	172,1	154,1	20	15	172,1	137,2	20	15
Valpromide	144,1	57,4	30	15	144,1	43,5	30	20
Carbamazépine	237,2	194,1	25	20	237,2	179,1	25	35
Lévétiracétam	171,2	126,2	10	15	171,2	154,0	10	10
Lamotrigine	256,0	145,0	40	40	256,0	43,4	40	32
Primidone	219,2	162,1	20	12	219,2	91,1	20	23
Anxiolytiques								
Méprobamate	219,3	158,2	15	10	219,3	97,2	15	15
Buspirone	386,2	122,2	35	32	386,2	109,2	35	42
Hydroxyzine	375,2	201,1	25	18	375,2	166,0	25	42
Substituts aux opiacés								
Méthadone	310,3	265,3	25	15	310,3	105,1	25	30
Etalons internes								
Amitriptyline D6	284,3	90,9	30	25	-	-	-	-
Bromazépam D4	320,2	186,3	40	35	-	-	-	-
Carbamazépine D10	247,3	204,2	30	20	-	-	-	-
Diazépam D5	290,1	154,0	40	30	-	-	-	-
Fluoxétine D5	315,2	44,5	20	13	-	-	-	-
Nordiazépam D5	276,1	165,1	40	30	-	-	-	-
Oxazépam D5	292,1	246,1	30	22	-	-	-	-

Lors de l'injection, deux points de contrôle sont effectués en vue d'une démarche qualité :

- **une carte de contrôle** qui permet d'avoir des informations sur l'état du système analytique et des solutions standards utilisées. Elle permet donc de savoir s'il y a des variabilités ou non entre chaque analyse. Elle est constituée des coefficients de réponse, des aires et des limites de quantifications instrumentales de la gamme de concentration (faite à partir des solutions standards) injectée en début et en fin de séquence analytique.

- **un blanc d'injection** qui est un flacon d'injection contenant uniquement du solvant d'injection et qui est injecté plusieurs fois dans la séquence. Il permet de repérer une éventuelle contamination lors de l'injection mais aussi de nettoyer le système analytique.

Pour que cette méthode analytique développée pour les psychotropes soit validée, plusieurs paramètres doivent être évalués :

- la linéarité qui correspond à la variation du signal en fonction de la quantité de composé injectée. Quand la réponse est linéaire, on obtient une droite de l'ordre $y = ax+b$ et la linéarité est évaluée par un coefficient de corrélation R^2 qui doit être proche de 1.

- les limites de détection et de quantification instrumentales (LDI et LQI) qui sont déterminées à partir de l'injection d'une solution mélange de standards.

- les limites de détection et de quantification méthodologiques (LDM et LQM) qui sont obtenues à partir de l'injection d'un extrait d'échantillon d'eau minérale dopée à une concentration connue.

- la répétabilité qui est évaluée avec les variations intra-jour et inter-jour d'une réponse analytique obtenue avec la même solution, injectée dans les mêmes conditions et avec la même méthode. Ces variations doivent être suffisamment faibles pour affirmer que la méthode est précise.

Ces validations sont présentées dans le **Chapitre 3. Section 1**.

Enfin, le dernier paramètre à étudier pour valider la méthode est les effets de matrice.
Ce sont des phénomènes dus à la matrice de l'échantillon qui peuvent perturber l'analyse et la quantification des composés soit lors de l'étape de séparation chromatographique soit lors de la détection.
Au niveau chromatographique, ils peuvent jouer sur les temps de rétention des composés et les décaler parce qu'ils empêchent soit leur élution par la phase mobile soit leur adsorption sur la phase stationnaire. Au niveau spectrométrique, la matrice peut être responsable d'une extinction plus ou moins intense du signal affectant par conséquent la sensibilité. Trois raisons peuvent engendrer cette extinction de signal (Gómez et *al*., 2006) :

1- l'augmentation du bruit de fond par l'ionisation d'un grand nombre d'interférents.

2- la non détection des molécules en raison de leur association avec de la matière organique, diminuant ainsi la part des composés sous forme libre.

3- l'ionisation préférentielle de molécules de la matrice, appelée compétition à l'ionisation.

6.3. Quantification

a) Etalon interne

Cette technique repose sur la possibilité de quantifier un composé dans un échantillon à partir d'un autre composé appelé étalon interne. Il est nécessaire que le composé et l'étalon interne associé aient des propriétés physico-chimiques similaires et que l'EI soit absent de l'échantillon traité. Idéalement, l'étalon interne est un analogue isotopique du composé recherché. Ainsi, certains hydrogènes du composé natif sont remplacés par des deutériums dans l'EI. Cependant, il n'est pas toujours possible d'obtenir l'analogue isotopique de chacun des composés recherchés par conséquent un même étalon interne peut être utilisé pour quantifier différents composés appartenant à la même famille thérapeutique et possédant des propriétés physico-chimiques proches.

Cet étalon interne est ajouté en quantité connue et dans le même ordre de concentration que son analyte dans l'échantillon. De plus, il est intégré au début du traitement afin qu'il subisse les mêmes pertes potentielles liées au protocole analytique (extraction, évaporation, injection, etc…).

Le **Tableau II-23** présente les étalons internes utilisés pour quantifier les psychotropes étudiés.

Tableau II-23. Composés étudiés et étalons internes associés.

Composés	Etalon interne associé
Amitriptyline Doxépine Maprotiline Miansérine Sertraline Tianeptine	Amitriptyline d6
Bromazépam	Bromazépam d4
Amoxapine Carbamazépine Duloxétine Gabapentine Lévétiracétam Zopiclone	Carbamazépine d10
Alprazolam Clobazam Clonazépam Clorazépate Diazépam Flunitrazépam Lamotrigine Méprobamate Norfluoxétine Paroxétine Pimozide Prazépam Témazépam Valpromide Nordiazépam	Diazépam d5
Amisulpride Buspirone Chlorpromazine Citalopram Clomipramine Cyamémazine Fluoxétine Hydroxyzine Imipramine Méthadone Milnacipran Mirtazapine Sulpiride Tiapride Venlafaxine Zolpidem	Fluoxétine d5
Primidone	Nordiazépam d5
Lorazépam Oxazépam	Oxazépam d5

Des solutions mères individuelles à des concentrations de 100 µg.g^{-1} ont été préparées à partir de cristaux de chaque composé (natif et étalon interne) qui ont été dissous dans de l'acétonitrile. A partir de ces solutions mères, des solutions de travail concentrées à 2 µg.g^{-1} ont été préparées pour être utilisé lors des extractions sur phase solide et lors des analyses. Toutes ces solutions sont stockées à -20 °C, à l'obscurité.

b) Quantification

La quantification des composés s'effectue par la détermination du coefficient de réponse de chaque molécule. Pour cela, des solutions standards qui sont constituées des composés recherchés et des étalons internes associés sont injectées en quantité connue, sous forme de gamme de concentrations (10 pg injecté ; 50 pg injecté ; 100 pg injecté et 200 pg injecté), en début et fin de séquence. Le signal affiché par l'appareil est un pic chromatographique dont l'aire est proportionnelle à la masse de composé injectée.

$$A_i = k_i \times m_i \qquad \textbf{Equation 9}$$

$$A_e = k_e \times m_e \qquad \textbf{Equation 10}$$

A_i : Aire du composé natif (i)
A_e : Aire de l'étalon interne associé (e)
k_i : Coefficient du composé natif (i)
k_e : Coefficient de l'étalon interne associé (e)
m_i : masse injectée du composé natif (i)
m_e : masse injectée de l'étalon interna associé (e)

Le coefficient de réponse (noté K) pour le couple « analyte/étalon interne » est alors défini par l'équation suivante :

$$K = \frac{k_i}{k_e} = \frac{A_e \times m_i}{A_i \times m_e} \qquad \textbf{Equation 11}$$

Ce coefficient de réponse est spécifique à chaque couple « analyte/étalon internée » et est proche de 1 quand le composé natif et son étalon interne associé ont des propriétés physico-chimiques proches.

A partir de l'équation 11, la masse injectée d'un composé dans un échantillon inconnu peut alors être retrouvée avec la relation suivante :

$$m_i = K \times m_e \times \frac{A_i}{A_e} \qquad \textbf{Equation 12}$$

Le retraitement des données brutes a été fait avec le logiciel Masslynx V4.1 (Waters, St Quentin en Yvelines, France).

7. Modèles biologiques et biomarqueurs étudiés

Généralement, les bivalves sont utilisés comme bio-indicateurs de la pollution aquatique grâce à leur capacité à accumuler et concentrer les contaminants. L'ingestion de polluant se fait sous forme dissoute (voie directe) ou par absorption de particules nutritives (voie trophique).
Lors de ces travaux de thèse, deux espèces de bivalves ont été étudiées *Elliptio complanata* et *Corbicula fluminea*.

7.1. La moule d'eau douce *Elliptio complanata*

7.1.1. Généralités

a) Systématique
Elliptio complanata aussi appelée la moule d'eau douce ou la mullette d'eau douce est un mollusque bivalve faisant partie de l'ordre des *Unionoida* et appartenant à la famille des *Unionidae* (**Figure II-28**).

Figure II-28. Photographie d'*Elliptio complanata*.

b) Origine et aire de répartition
La moule d'eau douce est originaire de l'Est de l'Amérique du Nord, son aire de répartition se trouve le long de la pente atlantique, du bassin de la rivière Altamaha (Géorgie) jusqu'au nord du bassin du fleuve Saint Laurent (Canada). Sa distribution est aussi répartie à l'ouest du bassin des Grands lacs et dans une partie du bassin de la Baie d'Hudson. Elle vit dans les eaux permanentes non asséchées, ayant peu de courant et peu de matières en suspension comme les lacs et les rivières à faible courant (**Figure II-29**).

Il existe près de 1000 espèces de moules d'eau douce, 304 sont présentes aux Etats-Unis et 54 au Canada dont 23 au Québec.

Cependant, ces espèces de moules d'eau douce sont en déclin car elles sont exposées à certains nombre de menace :

- Destruction de l'habitat
- Faible qualité de l'eau
- Construction de barrage et de canaux dans les cours d'eau
- Introduction d'espèce exotique (ex : la moule zébrée)
- Pollution organique (lessivages des terres cultivées, effluents de station d'épuration, etc…)

Ainsi, ces menaces affectent les populations de moules directement mais aussi indirectement en affectant certaines espèces de poissons qui sont essentielles pour leur cycle biologique.

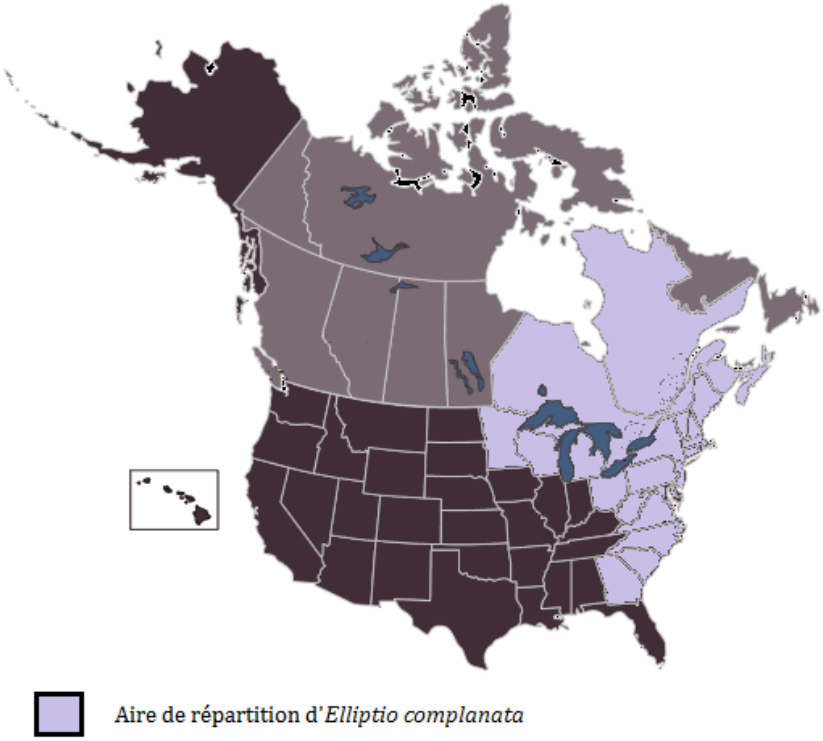


Figure II-29. Aire de répartition d'*Elliptio complanata.*

c) Biologie et écologie

Comme tous les bivalves, *Elliptio complanata* est dotée d'une paire de coquilles (reliées par une charnière) qui renferment le corps mou. Ce corps simple est constitué d'un manteau attaché à la coquille par deux muscles adducteurs, d'un pied musculaire pour son déplacement dans le sédiment et des branchies qui servent à absorber l'oxygène et filtrer le plancton en suspension (à l'aide du siphon inhalant) (**Figure II-30**).

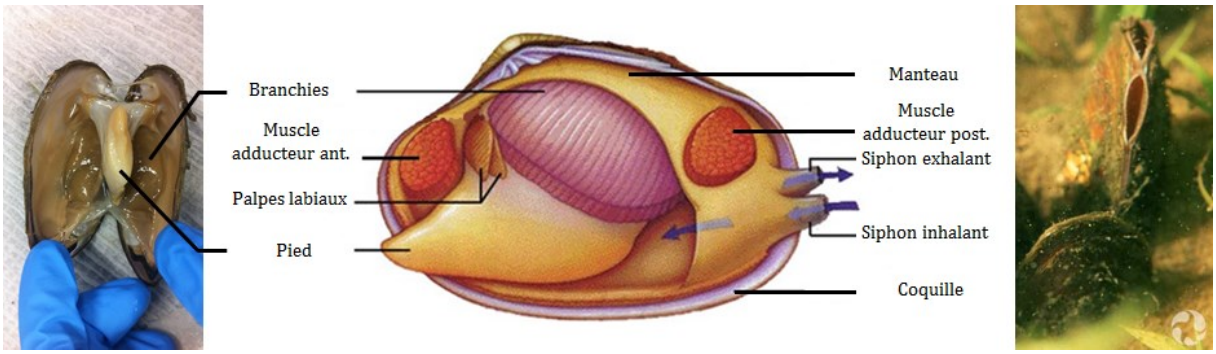


Figure II-30. Schéma de l'anatomie d'*Elliptio complanata.*

Cette espèce peut vivre dans des habitats très variés mais qui doivent être stables sur le long terme car elle a une longévité élevée qui peut aller jusqu'à 30 ans. Cependant *Elliptio complanata* a une préférence pour les cours d'eau à faible niveau d'eau (1 à 2 m de profondeur), elle aime vivre dans les fonds, enfouie dans un substrat type sable, gravier, argile ou encore vase.

Cette moule d'eau douce filtre en moyenne 1L d'eau/h, elle intègre des algues planctoniques et autres micro-organismes en suspension. Elle rejette ses déchets sur le substrat à l'aide de son siphon exhalant. Ses détritus fournissent ainsi de la nourriture aux poissons et aux invertébrés qui s'alimentent sur le fond, elle participe alors au cycle de la matière organique de la colonne d'eau. En filtrant les algues et les bactéries de l'eau pour se nourrir, les moules d'eau douce en améliorent la clarté et la qualité. De plus, la moule d'eau douce est un maillon important de la chaine trophique étant une proie pour la loutre, le raton laveur et certains poissons. Donc elle joue un rôle essentiel dans les cycles nutritifs, les réseaux alimentaires ainsi que dans l'oxygénation mécanique des sédiments dans lesquels elle vit. C'est pourquoi cette espèce constitue une composante importante des écosystèmes d'eau douce.

Durant les 6 premières années de sa vie, la moule d'eau douce a une croissance relativement rapide. Le développement commence par la coquille, qui est sa seule protection contre son environnement, puis s'en suivent des tissus internes comme les organes reproducteurs. Les individus atteignent leur maturité sexuelle après ces 6 années. L'espérance de vie de la moule d'eau douce est environ une vingtaine d'années (McMahon, 1991).

-Leur cycle de vie :

Le cycle de vie complexe d'*Elliptio complanata* nécessite un écosystème stable et sain (**Figure II-31**). Les individus mâles et les individus femelles sont séparés. La femelle filtre le sperme des mâles dans l'eau. Ainsi l'organogénèse des embryons a lieu dans le marsupium (au niveau des branchies) à l'intérieur de la femelle. Les embryons se développent en jeune larve appelé glochidies (copie miniature de l'adulte).

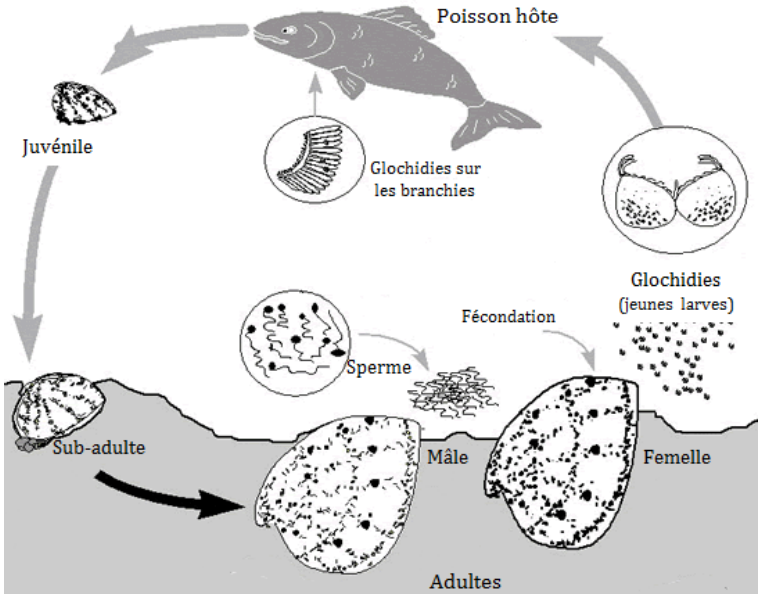


Figure II-31. Schéma du cycle de vie d'*Elliptio complanata*.

La particularité du cycle reproducteur chez les moules d'eau douce est que les glochidies doivent parasiter les branchies d'un poisson afin de compléter leur développement. Chaque espèce de moule d'eau douce a un poisson hôte unique qui est aussi sensible aux variations des facteurs environnementaux (Haag et Warren, 1999). A l'approche du poisson, la femelle est soumise à un stimulus et expulse les glochidies dans les branchies du poisson par ses siphons.

A la fin de ce stade parasite obligatoire de 1 à 6 mois, les juvéniles autonomes tombent sur le sédiment pour finir leur croissance et devenir des adultes (Metcalfe-Smith et *al*., 1997 ; Watters et O'Dee, 1999). Seulement 0,007 % des glochidies parmi des millions expulsés parasiteront avec succès un poisson hôte et seulement 9 à 18 % (des 0,007 %) parviendront à maturité (Jansen et Hanson, 1991 ; McMahon, 1991). Ce faible taux de reproduction est donc compensé par une forte production d'œufs mais aussi par la longévité des individus qui leur permet de se reproduire un grand nombre de fois.

-Leur système immunitaire :

Le système immunitaire des vertébrés a pour fonction de préserver l'organisme des dysfonctionnements internes et des agressions externes.

Pour protéger l'organisme, le système immunitaire a une double fonction :

- reconnaitre et contrôler ce qui appartient à l'organisme, le « soi »
- lutter contre les agressions extérieures, le « non-soi »

Contrairement aux vertébrés, chez les invertébrés il n'existe pas de réponse adaptative dans leur système immunitaire. Ainsi, ce système ne leur permet pas d'avoir une mémoire immunologique. Cependant, ils ont un mécanisme de défense assez complexe, efficace et hautement développé pour identifier et éliminer des agents pathogènes potentiels. Leur immunité est donc basée sur la reconnaissance du « non-soi » et des processus de réponse cellulaire et humorale (Galloway et Depledge, 2001).
Les défenses immunitaires non spécifiques à médiation humorale sont exécutées par les agglutinines, **les espèces réactives de l'oxygène (ERO)**, **les oxydes nitriques (NO)**, les peptides antimicrobiens et **les lysozymes** (Canesi et *al*., 2002).
Les lysozymes sont des enzymes qui vont jouer un rôle dans la dégradation des pathogènes phagocytés (Grundy et *al*., 1996 ; Wootton et *al*., 2003).
Les espèces réactives de l'oxygènes sont quant à elles libérées lorsque les cellules sont en présence de pathogènes. La stimulation membranaire par le pathogène engendre une augmentation de la consommation en oxygène (flambée oxydative). L'oxygène va être réduit en anion superoxyde par l'activité de la NADPH oxydase membranaire, enzyme présente à la surface des hémocytes, ce qui va provoquer un « choc respiratoire » (« burst oxydatif ») et donc la production de plusieurs ERO (l'oxygène singulet, le radical hydroxyde et le peroxyde d'hydrogène) qui sont antimicrobiens (Beby, 1991) mais aussi des espèces réactives azotées (NO, NO_2^-, NO_3^-) (Pipe et al., 1992 ; Toreilles et al., 1996 ; Beck et al., 2001).
Les oxydes nitriques (NO) sont des molécules réactives qui interviennent dans la régulation des systèmes nerveux, cardiovasculaire et immunitaire, et sont utilisés en tant qu'agents antibactériens chez les mollusques (Franchini et *al*., 1995). Leur production va être régulée par l'enzyme oxyde nitrique synthétase qui constitue une voie secondaire à la phagocytose dans l'élimination des organismes pathogènes (Ottaviani et *al*., 1993).

Cependant, la défense immunitaire à réponse cellulaire n'est effectuée que par les hémocytes, seules cellules circulantes présentes dans l'hémolymphe.
Les hémocytes doivent assumer toutes les fonctions des cellules circulantes : défendre l'organisme et assurer le transport et la digestion des nutriments. Ces cellules ont un rôle primordial dans ce système de défense, elles peuvent s'agréger sous l'effet d'un stress mécanique ou chimique et former un clou homéostatique en cas d'inflammation (Auffret et Oubella, 1997).
Chez les bivalves, la fonction majeure de la défense immunitaire exécutée par les hémocytes est **la phagocytose**. Elle se fait en plusieurs étapes: (i) la reconnaissance, (ii) l'attachement, (iii) l'ingestion, (iv) la digestion et (v) l'élimination (**Figure II-32**).

Le système immunitaire des bivalves est sensible, il peut être perturbé par différents facteurs comme le stress, le dérèglement nutritionnel ou encore les effets immunotoxiques de certains contaminants. L'immunotoxicologie est l'étude du disfonctionnement immunitaire d'un organisme provoqué par un xénobiotique. Il existe plusieurs effets immunotoxiques : l'immunosuppression, l'immunodépression et l'immunostimulation.

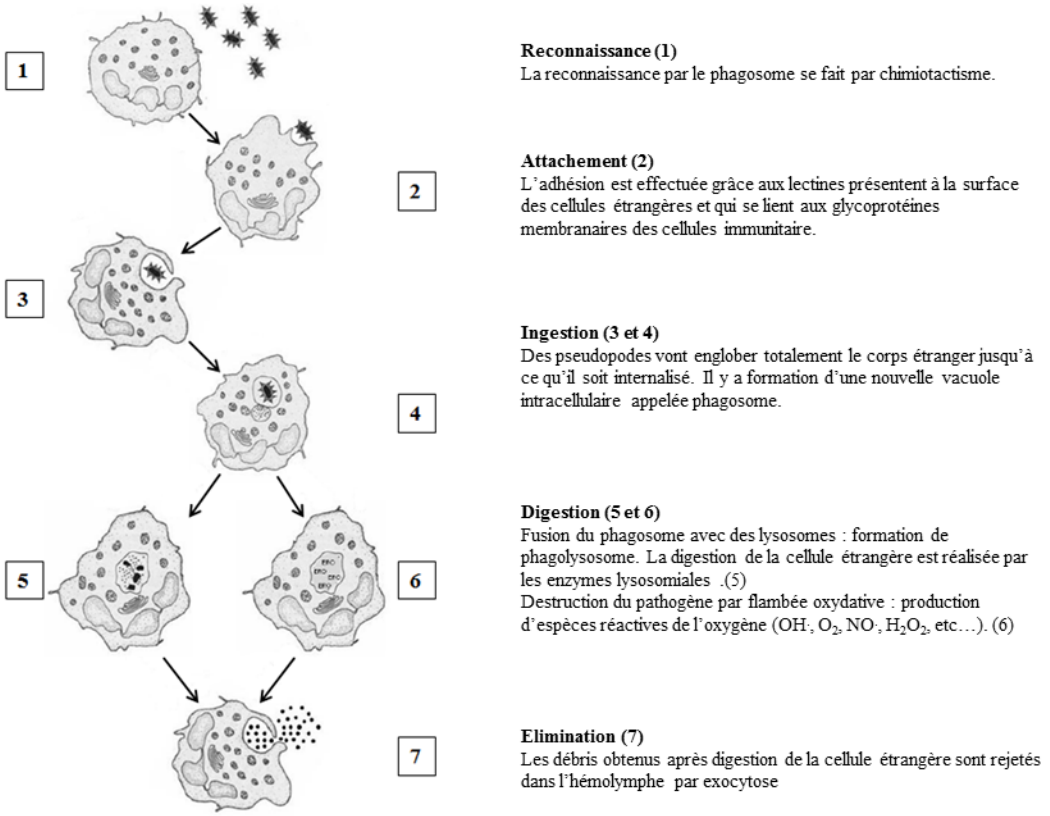


Figure II-32. Les différentes étapes de la phagocytose (adaptée de Paul-Pont, 2010).

Depuis plusieurs années, des études ont montré que les polluants chimiques pouvaient perturber l'immunité. Ainsi, les mécanismes impliqués dans l'immunité sont devenus des biomarqueurs permettant de détecter des effets toxiques précoces. La présence de nombreux contaminants dans l'environnement étant reconnu, des modèles biologiques aquatiques comme les bivalves ont alors été utilisés pour évaluer la perturbation sur le système immunitaire (Galloway et Depledge, 2001).

Les contaminants organiques comme les hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP), vont altérer la fonction de phagocytose et détériorent la stabilité de la membrane des lysosomes, qui jouent un rôle important dans la dégradation des organismes phagocytés (Grundy et *al*., 1996 ; Wootton et *al*., 2003). Des effets ont été observés avec d'autre contaminants comme les médicaments (Gust et *al*., 2012), les pesticides (Patetsini et *al*., 2013) et les métaux (Dechemin et *al*., 2008). Les défenses humorales, comme la sécrétion des lysozymes et d'oxyde nitrique peuvent également être altérées par la présence de contaminants.

d) Utilisation en écotoxicologie

Cet organisme représente un bon indicateur de contamination du milieu car sa longévité, sa croissance et sa reproduction le rendent sensible aux différents stress provoqués par les pollutions ou les variations des conditions environnementales. De plus, son mode d'alimentation par filtration lui permet de de bio-accumuler les contaminants par diffusion directe ou par ingestion des particules (voie trophique).

Elliptio complanata est alors souvent utilisée comme bio-indicateur dans des études d'impacts sur les polychlorobiphényles (PCB) (Drouillard et *al*., 2007), les polybromodiphényléthers (PBDE) (Richman et *al*., 2013), les métaux (Gagné et *al*., 2008 ; Peyrot et *al*., 2009), les pesticides (Cheney et *al*., 1997) ou encore les médicaments (Gagné et *al*., 2004 ; Gust et *al*., 2012).

7.1.2. Analyses sur Elliptio complanata

Toutes les expériences menées sur la moule d'eau douce (*Elliptio complanata*) ont été faites à l'INRS-Institut Armand-Frappier à Laval au Québec (Canada) dans le laboratoire d'Immunotoxicologie.

7.1.2.1 Technique d'analyse des paramètres hémocytaires

7.1.2.1.1 Prélèvement de l'hémolymphe

Le prélèvement de l'hémolymphe s'effectue à travers la charnière dans le muscle adducteur postérieur à l'aide d'une seringue de 3 mL surmontée d'une aiguille de calibre 23G. La concentration hémocytaire, la viabilité, l'activité de phagocytose et la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) sont mesurées sur l'hémolymphe entière. Une partie de l'hémolymphe doit être centrifugée afin d'utiliser le plasma (surnageant) pour déterminer la production d'oxyde nitrique et de lysozymes ; le culot est utilisé pour mesurer l'inflammation dans les hémocytes (activité de la Cyclooxygénase).

7.1.2.1.2 Mesure par cytométrie en flux

La cytométrie en flux consiste à étudier des caractéristiques physiques et chimiques de particules (cellules). Dans l'appareil, les cellules sont excitées par un laser et émettent un rayonnement qui permet d'obtenir de nombreuses informations obtenues directement (autofluorescence des cellules) ou indirectement par l'intermédiaire de fluorochrome (marqueur cellulaire).
Une mesure directe (sur les cellules non marquées) peut être effectuée sur rayons diffractés (modification de la direction, sans modification de la longueur d'onde). Les paramètres mesurés sur les cellules étudiées sont alors la taille (FSC, Forward Scatter Height) et la complexité (SSC, Size Scatter Height).
Une mesure indirecte (cellule marquées avec un fluorochrome) se base sur la capacité des composés marqueurs à absorber l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée, puis de la réémettre à une longueur d'onde différente après excitation. Généralement les cytomètres de flux possèdent quatre lentilles permettant de recueillir plusieurs intervalles de longueurs d'ondes différentes; le vert de 500 à 550 nm (détecteur FL1), le jaune de 550 à 600 nm (détecteur FL2), l'orange et le rouge de 560 à 670 nm (détecteur FL3), et le rouge uniquement de 640 à 700 nm (détecteur FL4).

L'appareil utilisé dans ces travaux de recherche est le FACScalibur (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) (**Figure II-33**) et les résultats sont analysés avec le logiciel CellQuest Pro version 4.0.1.

Figure II-33. Photo du cytomètre de flux (FACScalibur) utilisé lors de ces travaux de thèse.

Pour chaque paramètre cellulaire étudié en cytométrie en flux, le nombre d'événements analysés a été fixé à 5 000. Les résultats ont été exprimés sous forme de cytogramme indiquant la taille (FSC), la complexité (SSC) ainsi que le canal de fluorescence correspondant à l'activité testée.

a) Viabilité

Afin d'évaluer la viabilité cellulaire, une aliquote de suspension d'hémolymphe de 500 µL est mélangée avec 4 µL d'une solution de iodure de propidium (IP) à 100 µg/mL (Sigma-Aldrich, ON, Canada). L'IP est un agent intercalant (fluorochrome) qui rentre dans les cellules mortes car elles ont perdu leur intégrité membranaire. La lecture s'effectue sur le cytomètre de flux FACScalibur qui est équipé d'un laser d'argon (λ = 488 nm).

Les hémocytes morts contenant l'IP émettent une fluorescence de 620 nm et sont décelés par le détecteur FL3 (**Annexe 15**). La lecture de chaque suspension cellulaire donne le pourcentage de cellules mortes ce qui permet d'en déduire le pourcentage d'hémocytes vivants dans l'échantillon.

b) Concentration hémocytaire

Lors de l'analyse de la viabilité hémocytaire, la concentration en hémocytes (exprimée en nombre de cellule par mL) a aussi été mesurée en prenant en compte le débit du fluide passant dans le capillaire et le temps d'acquisition des 5 000 évènements.

Exemple : Débit de passage : 60 µL/min
Temps d'acquisition des 5000 évènements : 20s
Volume totale d'hémolymphe prélevée : 3 mL

Il a fallu 20s pour lire 5 000 évènements avec un débit de 60 µL/min alors il a fallu 20 µL pour avoir 5 000 évènements. S'il y a 5 000 évènements dans 20 µL alors dans 3 mL il y a 750 000 hémocytes soit 250 000 cellules/mL.

Pour les deux autres paramètres hémocytaires mesurés en cytométrie en flux, l'hémolymphe prélevée est diluée avec un tampon phosphate salin dilué au quart (PBS ¼ = Phosphate Buffered Saline ¼) afin d'avoir une concentration cellulaire de 200 000 hémocytes par mL dans chaque tube.

c) Activité de phagocytose

La méthode de Brousseau et *al*. (1998) a été utilisée pour déterminer l'activité de phagocytose des hémocytes de moules d'eau douce. Pour cela, des billes de latex fluorescentes (jaune-vert Fluoresbrite, 1,75 µm de diamètre, Polyscience®, Etobicoke, ON) sont ensuite ajoutées dans une aliquote de 500 µL de suspension cellulaire en respectant le ratio 100 :1 (billes : cellules). Les cellules sont incubées à 15 °C pendant 18 heures puis sont fixées. Les hémocytes sont alors déposés dans 4 ml de gradient composé d'un milieu RPMI 1640 complémenté de 3% d'albumine de sérum bovin (BSA, Bovin Serum Albumin). Les tubes sont ensuite centrifugés à 150xg pendant 8 min à 4°C afin d'éliminer les billes libres et les billes attachées aux parois cellulaires. Après la centrifugation, les culots cellulaires sont remis en suspension et fixés dans 0,5 ml de PBS ¼ supplémenté de 0,5% de formaldéhyde et de 0,2% de sodium azide.
Lors de la lecture par cytomètre de flux, les cellules contenant des billes émettent une fluorescence de 530 nm détectée en FL1.
Cette analyse permet de discriminer deux paramètres : (**Annexe 15**)

- l'immunocapacité soit la capacité des hémocytes à phagocyter 1 bille et plus.
- l'immunoefficacité soit la capacité des hémocytes à phagocyter 3 billes et plus.

Les résultats sont exprimés en % de différence par rapport à la valeur du témoin.

d) Production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)

La production d'ERO par les hémocytes de moule d'eau douce a été analysée selon la méthode de Brousseau et *al*. (1998). Cette méthode permet d'estimer la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en utilisant le 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). Cette sonde pénètre dans les cellules sous forme de DCFH et est oxydée par les ERO sous forme de 2,7-dichlorofluorescein (DCF) qui est une molécule hautement fluorescente.
Pour cette méthode, une aliquote de 500 µL d'hémolymphe est centrifugée. Le culot obtenu est resuspendu dans 400 µL d'une solution de PBS ¼ complémentée de 0,1 % de glucose et de 0,01 $g.mL^{-1}$ de la sonde DCFH-DA et est incubé à l'obscurité à 15 °C pendant 3h.
Sur le cytomètre en flux, l'intensité de la fluorescence est détectée par le capteur FL1 et est proportionnelle à la production d'ERO. Les résultats sont aussi exprimés en % de différence par rapport à la valeur du témoin.

7.1.2.2 Mesure par spectrophotométrie

Lors du prélèvement d'hémolymphe dans chaque moule d'eau douce exposée, 2 aliquotes de 1 mL de suspensions cellulaire sont faites. L'une pour la mesure de l'activité de la Cyclooxygénase (COX) et la production d'oxyde nitrique (NO) et l'autre pour l'analyse de l'activité des lysozymes.

Les deux aliquotes sont centrifugées :

- le 1er pendant 10 minutes à 10 000xg. Le surnageant permet de mesurer la production de NO et le culot est remis en suspension avec 150 µL de PBS ¼ pour l'analyse de l'activité de la COX.
- le 2ème pendant 10 minutes à 1000xg. Le surnageant sert à analyser l'activité des lysozymes et le culot est conservé à -80 °C.

La totalité des échantillons est conservé à -80 °C jusqu'à l'analyse de ces derniers.

La mesure des protéines totales, nécessaire pour l'expression des résultats des 3 biomarqueurs suivant, est faite sur le plasma (surnageant utilisé pour l'activité des lysozymes) selon le protocole de Bradford, 1976.

Le spectrophotomètre utilisé dans ces travaux de thèse est le Spectra Max M5 (VWR, Canada).

a) Activité de la Cyclooxygénase

L'activité de la cyclooxygenase dans les hémocytes de *Elliptio complanata* est déterminée par l'oxydation du 2,7-dichlorofluorescein en présence d'acide arachidonique (Fujimoto *et al.*, 2002). Ce dosage s'effectue à l'aide de microplaques transparentes de 96 puits. Chaque puit contient 25 µL du culot resuspendu dans du PBS ¼ mélangé avec 150 µL d'un tampon 50 mM Tris-HCl (contenant 0,1% de Tween-20, 0,5 mM EDTA et 10 µM d'hématine ; à pH 8), 4 µL d'acide arachidonique à 6,04 mM et 20 µL d'un mélange de DCFD (dichlorofluorescein diacétate) à 100 µM et de la peroxydase à 10 µg.mL^{-1}. La plaque est placée dans le spectrophotomètre où la fluorescence est mesurée à 485 nm (excitation) et 520 nm (émission) toutes les 5 min pendant 30 min. Les données sont exprimées en unités de fluorescence (RFU)/min/mg protéines.

b) Production d'oxyde nitrique

La production d'oxyde nitrique (NO) est estimée en mesurant les nitrites totaux présents dans le plasma. Le NO se transforme facilement en nitrite (NO_2^-) et en nitrate (NO_3^-) en présence d'oxygène ainsi la nitrate réductase est utilisée pour obtenir le niveau de concentration totale en nitrite dans le plasma (Verdon et *al.*, 1995). Dans des microplaques transparentes de 96 puits sont alors déposés 50 µL de plasma, 25 µL de nitrate réductase à 80 UN/L et 25 µL de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) à 3 µM. Ensuite la microplaque est mise à incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Après l'incubation 100 µL de réactif de Griess sont déposés dans chaque puit et la microplaque est de nouveau mise à incuber pendant 30 min. Après la deuxième incubation, elle est placée dans le spectrophotomètre où s'effectuent les mesures d'absorbance à 450 nm de chaque puit.

Des standards de nitrite sont placés en début de plaque afin d'obtenir une gamme étalon permettant de convertir l'absorbance de chaque puit en une concentration de NO. Les résultats finaux sont exprimés en µM NO/mg protéines.

c) Activité des lysozymes

Le protocole pour déterminer l'activité des lysozymes dans les hémocytes de moules d'eau douce est adapté de la méthode de Lee et Yang (2002). Dans des microplaques opaques de 96 puits sont déposés 100 µL de plasma et 100µL d'une suspension de bactérie *Micrococcus lysodeikticus* à 0,4 $mg.mL^{-1}$. La microplaque est placée dans le spectrophotomètre où la mesure de l'absorbance à 450 nm se fait toutes les minutes pendant 20 min.

Des concentrations standards de lysozymes d'œufs de poulet placés en début de plaque permettent d'exprimer les résultats en ng de lysozymes/mL de plasma. Les résultats sont ensuite normalisés par la concentration en protéines dans le plasma.

7.1.2.3 L'essai des comètes

Tous les tests des comètes pratiqués sur les différentes expériences ont été réalisés par Emilie Lacaze, post-doctorante à l'institut Armand-Frappier dans le laboratoire d'immunotoxicologie de Michel Fournier (Laval, Québec, Canada).

La méthode utilisée est un test des comètes en condition alcaline adaptée de l'étude de Singh et *al*. (1988). Sur les prélèvements d'hémolymphe effectués sur les moules d'eau douce (exposées à différentes conditions) 20 µL d'hémolymphe sont consacrés au test des comètes. Ce volume d'hémolymphe est mélangé avec 20 µL de gel d'agarose à bas point de fusion à 1% préparé dans du tampon phosphate salin (PBS) (maintenu à 37 °C au bain-marie). Ce mélange est déposé sur une lame de microscope recouverte préalablement d'agarose normal à haut point de fusion à 1% (aussi préparé dans du PBS). Le tout est recouvert par une lamelle 22x22 mm et placé dans l'obscurité à 4 °C pendant 10 minutes.

Après cette étape de polymérisation de l'agarose, la lamelle est retirée et la lame de microscope est incubée dans une solution de lyse (2,5 M de NaCl, 0,1 M de Na_2EDTA, 10 mM de Tris, 10% de DMSO et 1% de Triton X100; à pH 10) à 4 °C dans l'obscurité pendant 90 minutes.

La lame est ensuite placée dans un tampon d'électrophorèse (0,3 M de NaOH et 1 mM de Na_2EDTA ; à pH> 13) pendant 30 minutes pour permettre le déroulement de l'ADN. L'électrophorèse est réalisée sous un champ électrique de 0,61 V/cm (25 V) et 300 mA pendant 24 min. Ainsi les molécules d'ADN chargées négativement vont migrer vers l'anode, permettant aux fragments libres de se détacher du nucléoïde et de donner la forme caractéristique d'une comète.

La lame est ensuite lavée 3 fois 5 minutes avec un tampon de neutralisation (0,4 M de Tris-HCl ; à pH 7,5) et est séchée dans de l'éthanol absolu.

La lecture de la lame se fait par microscopie à fluorescence (x 400) et nécessite préalablement une coloration avec une solution de SYBR Green diluée (1/10000). Les résultats sont acquis par un système de notation visuelle où chaque gel subit une lecture aléatoire de 100 cellules qui sont alors classées comme appartenant à une des cinq catégories de comètes décrites par Azqueta et *al*. (2011) (**Annexe 16**).

7.2. La palourde asiatique *Corbicula fluminea*

7.2.1. Généralités

a) Systématique

Corbicula fluminea (**Figure II-34**) communément appelée la palourde asiatique (Asian clam) ou Corbicule est un mollusque bivalve lamellibranche appartenant à la famille des hétérodontes. Elle fait partie de l'ordre des *Veneroida*, comprenant la famille des *Corbiculoidea* auquel il appartient dans le genre *Corbicula*.

Le genre *Corbicula* comprend des espèces présentant une large variation de morphologie rendant leur identification difficile. Deux espèces sont présentes dans le réseau hydrographique européen : *Corbicula fluminalis* (Müller, 1774) vivant dans les estuaires et *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) vivant préférentiellement en eau douce et qui incube ses larves contrairement à *Corbicula fluminalis*.

Figure II-34. Photographie de *Corbicula fluminea* (source : doris.ffessm.fr).

b) Origine et aire de répartition

Corbicula fluminea est originaire de Chine et est introduite pour la première fois dans les années 1930 dans le Nord-Ouest des Amériques comme source de nourriture pour les immigrants chinois. Elle fût détectée pour la première fois en 1938 aux Etats-Unis, dans la rivière Columbia dans l'état de Washington. Son fort dynamisme de colonisation, les activités humaines et les phénomènes naturels lui ont permis de progresser géographiquement.

Ainsi, à la fin des années 80, les espèces du genre *Corbicula* se sont répandues vers l'Europe (Mouthon, 2001) **(Figure II-35)**. Elles auraient pénétré en France par au moins sept axes différents en commençant par l'estuaire de la Gironde. En vingt ans, l'espèce *Corbicula* a colonisé la totalité des bassins hydrographiques français et est présente dans la majorité des cours d'eau, quelques lacs et certains canaux de navigation (Brancotte et Vincent, 2002).

Figure II-35. Aire de répartition de *Corbicula fluminea* en Europe (source : www.europe-aliens.org).

Même si les activités humaines ont joué un rôle important dans son introduction, les phénomènes naturels ont aussi contribué à son expansion géographique (Mouthon, 1981). De plus, son développement invasif est accentué par son potentiel biotique, son cycle de développement et par une très faible pression de prédation. En 1993, la densité de l'espèce a atteint 200 à 400 individus/m^2 dans le canal latéral de la Garonne. *Corbicula fluminea* a alors colonisé de manière très dense la plupart des cours d'eau du Sud-Ouest de la France (Dubois, 1995).

c) Biologie et écologie

La *Corbicula fluminea* est constituée de deux parties (**Figure II-36**) :

- la coquille : munie de deux valves qui renferment le corps mou.
- le corps mou : constitué de 4 principaux ensembles tissulaires (le manteau et les muscles, les hémibranchies, la masse viscérale et le pied).

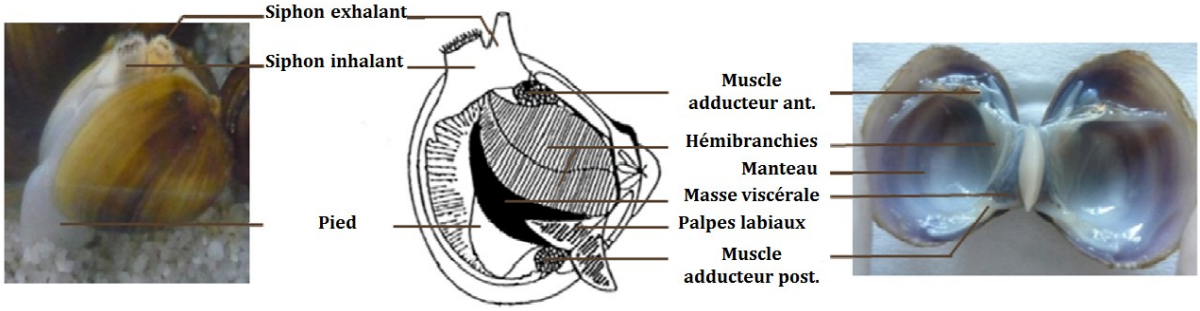


Figure II-36. Schéma des principaux organes de *Corbicula fluminea* (source : Arini, 2011)

Ce bivalve est retrouvé dans les milieux dulçaquicoles, saumâtres et eurythermes, comme les lacs, les rivières ou encore les estuaires. Déposé sur des substrats variés (gravier, sable, argile, vase, etc…), c'est un filtreur microphage actif se nourrissant de micro-algues, d'organismes zooplanctoniques et de détritus organiques. Bien que ce soit une espèce opportuniste possédant de fortes capacités d'adaptation face aux multiples facteurs environnementaux (naturels ou anthropiques), elle reste sensible à l'oxygène, à la variation du niveau en nutriments et aux fortes fluctuations de température. La température optimale de croissance et de reproduction est comprise entre 15 et 20 °C.

La palourde asiatique adulte est hermaphrodite (présence des deux sexes), elle peut donc s'autoféconder. Ainsi un seul individu est nécessaire pour commencer une population. Cette palourde peut vivre entre 3 et 4 ans et se reproduit deux fois par an. Donc un seul adulte peut produire entre 1 000 et 100 000 juvéniles par an.
La fécondation des œufs est interne et les larves restent couvées dans les branchies pendant 4-5 jours où elles se transforment en juvéniles. Le petit juvénile de 0,25 mm est capable d'être transporté sur de longues distances grâce aux courants ou en se fixant à l'aide d'un byssus sur des animaux ou des objets flottants. Ensuite, le juvénile va se transformer en pédivéligère (muni d'un pied et mesure 1-1,5 mm de diamètre) et va être capable de se déplacer en rampant sur les substrats fermes. Les juvéniles atteignent alors leur maturité en 3 à 6 mois. La première année, ils peuvent mesurer entre 10 et 30 mm dépendamment des ressources en nourriture et de la température de leur habitat.

Bien que cette espèce se multiplie très rapidement, elle peut aussi à l'inverse disparaitre rapidement lorsque les conditions de leur milieu de vie sont extrêmes (températures extrêmes ou encore faible teneur en oxygène).
Cependant, la maturité rapide et la fécondité élevée des individus leur confèrent un fort potentiel de colonisation, même dans des habitats qui ne conviennent pas aux moules indigènes.

d) Utilisation en écotoxicologie
Habituellement, les réponses biochimiques aux contaminants sont étudiées chez la moule (*Dreissena polymorpha*, *Mytulis edulis*, *Elliptio complanata*) utilisée comme bio-indicateur de pollution. Par évolution, *Corbicula fluminea* a été utilisée comme espèce modèle de par sa forte capacité d'adaptation aux variations des facteurs écologiques, permettant de maintenir cette espèce en condition de laboratoire ou de la transplanter *in situ* (Inza et *al*., 1997).
Son mode de vie à l'interface eau-sédiment et sa forte capacité à filtrer en moyenne 10L d'eau/j (à des fins respiratoires et nutritionnelles) lui permette d'accumuler d'importantes quantités de contaminant. De plus, sa reproduction importante et sa croissance rapide permettent de collecter des lots homogènes et abondants d'individus. Enfin, la longueur de ses valves, allant de 10 à 50 mm (Baudrimont, 1997) chez les individus adultes, permet de réaliser la dissection des différents organes nécessaires aux analyses.

Corbicula fluminea est ainsi devenue une espèce bio-indicatrice intéressante qui a déjà été utilisée comme biomarqueur de pollution dans des études d'impact sur les métaux (Achard et *al*., 2004 ; Arini et *al*., 2014 ; Baudrimont et *al*., 2003), les pesticides (Dos Santos et Martinez, 2014 ; Naomi et Bidwell, 2006), les solvants (Vidal et *al*., 2001) ou encore les médicaments (Chen et *al*., 2014 ; Géret et *al*., 2010).

7.2.2. Analyses sur Corbicula fluminea

L'expérience menée sur la palourde asiatique (*Corbicula fluminea*) a été effectuée par Charlotte Tissandier (stagiaire de Master 2), à la Station Marine d'Arcachon, en France dans l'équipe d'Ecotoxicologie Aquatique de l'UMR EPOC.
Les analyses des gènes d'intérêts et des métallothionéines (MT) ont été faites sur les branchies et sur les glandes digestives des palourdes asiatiques exposées. Chaque organe a donc été divisé en 2 aliquotes :

-pour les analyses de biologie moléculaire, les morceaux de tissus sont déposés dans des microtubes en polypropylène RNAse-free remplis de RNA-latter et sont conservés à -80 °C jusqu'à l'extraction de l'ARN.

-pour le dosage des MT, les morceaux de tissus sont placés dans des sacs « whirl-pack » qui sont remplis d'azote avant d'être scellés et sont conservés à -80 °C jusqu'à l'extraction des MT.

7.2.2.1 Technique transcriptomique : expression de gènes d'intérêts

Lors d'une contamination, les cellules mettent en place un mécanisme de défense afin de se protéger et de s'adapter à cette nouvelle situation. Cette modification est considérée comme une réponse précoce de l'organisme soumis à un stress souvent causé par nombreux facteurs environnementaux (Nikinmaa et Rytkönen, 2011). Ainsi, en présence de polluants, l'expression de certains gènes va être modifiée afin de mettre en place un mécanisme de défense.

La technique utilisée dans cette étude est la quantative Polymerase Chain Reaction (qPCR) en temps réel.

Cette méthode est constituée de deux étapes (**Annexe 17**) :

- L'extraction des ARN totaux et la synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

Dans cette première phase, les ARN de *Corbicula fluminea* sont extraits sur 20 à 40 mg de tissus (branchies ou glande digestive) à l'aide du kit « Absolutely RNA RT-PCR minirep » (Agilent, La Jolla, Californie, USA) selon les instructions du fournisseur.
Une fois les ARN totaux extraits, ils sont transformés en ADNc par rétro-transcription. Ceci est réalisable avec le kit « Stratascript first strand synthesis system » (Agilent, La Jolla, Californie, USA) selon les recommandations du fournisseur. Les ADNc ainsi obtenus sont plus stables et indispensables pour l'étape suivante de qPCR.

- Amplification des gènes d'intérêts par qPCR en temps réel

Cette deuxième étape est réalisée dans des microplaques transparentes de 96 puits à l'aide du kit « Brillant III Ultra-fast SYBR green QPCR Master Mix » (Agilent, La Jolla, Californie, USA) contenant un mélange réactionnel (avec de la Taq polymérase, du dNTP, du Mg^{2+}, du SYBR Green et un tampon d'activité). Dans chaque puit sont déposés 1 µL d'ADNc, 2 µL du mix d'amorce pour chaque gène étudié (2 µM d'amorce sens et de 2µM de l'amorce anti-sens) et 17 µL du mélange réactionnel.

Dans ces travaux, sept gènes ont été étudiés sur *Corbicula fluminea* qui auparavant avaient été clonés et séquencés lors des travaux de recherche de Renault et *al*. (2008) (**Tableau II-24**).

Tableau II-24. Gènes étudiés et amorces correspondantes (source : Renault et al., 2008).

Gènes	Nom	Numéro d'accession	Amorces
Référence			
act	β-actine	EF4608	CCTTTACCACAACAGCCGA[a] AGCATAGCCTCAGGGCA[b]
Métabolisme mitochondrial			
cox1	Cytochrome C oxydase (sous-unité 1)	AF120666	GTTGAGATGGTGCTGGG[a] TGTAGTCCGAATTAGCTTTTGCG[b]
12 S	ARN ribosomique mitochondrial (Small)	EF446612	AGCATTACTATGTTACGACTTACCTC A[a] AGTTCAGGTAGACGTGTAGGG[b]
Réponse au stress oxydant			
cat	Catalase	EF446609	CCTTCAGTGCGTAGTCTGG[a] CCTGTTCTCTGACCGTGG[b]
sod	Superoxide dismutase	EF446611	CTGTAGGTAGTAAGCGTGCTCC[a] GGATCATTTGACGAGATGAAGGC[b]
Système de détoxication			
mt	Métallothionéine (isoforme 1)	EF185126	CGGCTATCTCCCGCGA[a] AGCTTTTACCAGAACCAAACAGT[b]
gst	Glutathion-s-transférase	EF446610	GCCAGGCTATCCGCTATCT[a] TGTCCACCTTTAGGGCCTC[b]

Les gènes sélectionnés codent pour des protéines impliquées dans les réponses au stress environnemental. Le gène de la β-actine (*act*), impliqué dans la constitution du cytosquelette cellulaire a été choisi comme gène de référence. Deux gènes codent pour des protéines représentatives du métabolisme mitochondrial, l'ARN ribosomique 12 S (*12 S*) qui permet la quantification des mitochondries dans la cellule et la sous-unité 1 de la Cytochrome C oxydase (*cox1*) qui est impliquée dans le transfert d'électron de la chaine respiratoire mitochondriale.
Les gènes de la catalase (*cat*) et de la superoxyde dismutase (*sod*) ont été choisis car ils interviennent dans les mécanismes de défense contre le stress oxydant. Enfin les deux derniers gènes étudiés sont impliqués dans le système de détoxication cellulaire : le gène de la glutathion-S-transferase (*gst*) et le gène de l'isoforme 1de la métallothionéine (*mt*).

La réaction de PCR est réalisée dans un thermocycleur Mx3000P (Agilent, La Jolla, Californie, USA) qui permet de suivre en temps réel l'amplification des ADNc grâce à l'agent intercalant

fluorescent (SYBR Green) présent dans le milieu réactionnel. La fluorescence détectée à 530 nm est mesurée à la fin de chaque cycle. Ainsi, l'intensité de la lumière émise est directement proportionnelle au nombre de copies du fragment amplifié.

Le niveau d'expression de chaque gène est déterminé selon la méthode décrite par Livak et Schmittgen (2001). Cette méthode appelée méthode du ΔCt ($\Delta Ct = Ct_{\text{gène ciblé}} - Ct_{\text{gène de référence}}$) permet d'évaluer l'expression d'un gène par rapport à un gène de référence (β-actine).

7.2.2.2 Quantification des métallothionéines

Les métallothionéines sont des protéines de défense qui témoignent d'une réponse globale de « stress ». Ce sont des protéines de faible poids moléculaire, riches en cystéines (**Figure II-37**).

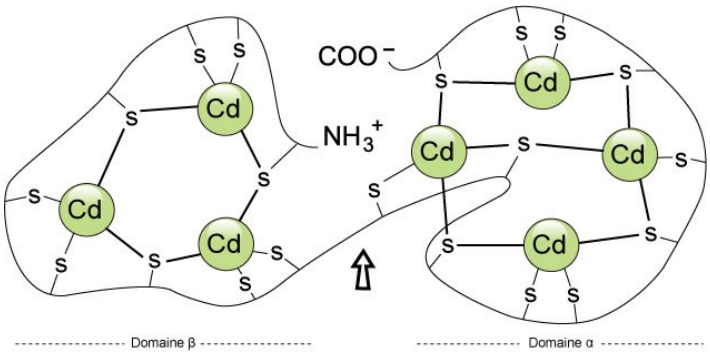


Figure II-37. Structure de métallothionéines (dans le cas de la molécule représentée les groupements thiols des cystéines sont saturés par des atomes de cadmium).

Leur groupement thiol (SH) leur permet de séquestrer jusqu'à sept cations métalliques divalents. Ainsi Vasák *et al.* (1991) ont établi une échelle d'affinité des métaux pour les résidus SH des métallothionéines selon l'ordre suivant : Hg(II)>>Cu(I), Ag(I), Bi (III)>>Cd(III)>Pb(II)>Zn(I)>Co(II)>Fe(II).

Elles ont historiquement été découvertes en 1957 dans le rein du cheval (Margoshes et Vallee, 1957) et ont depuis été le centre d'attention de nombreux travaux chez les vertébrés comme les invertébrés (Capdevila et *al*., 2012).

Les propriétés biochimiques des MT leur donnent une grande réactivité à l'égard des métaux et des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Ruttkay-Nedecky et *al*., 2013).

Ainsi, l'étude de Quinn et *al*. (2011) montre qu'en présence de produits pharmaceutiques (Gemfibrozile et Diclofénac) il y a induction des métallothionéines chez la moule zébrée.

Il existe plusieurs techniques de quantification des métallothionéines par électrochimie, colorimétrie (Western Blot) ou encore spectroscopie mais la méthode utilisée dans ces travaux est celle par saturation au mercure inorganique (Hg) selon Baudrimont et *al*. (1997). Cette méthode est basée sur l'affinité préférentielle des sites de fixation des métaux (groupements thiol) des MT pour le mercure inorganique. En effet les MT ont un degré d'affinité plus important à l'égard de certains métaux (Hg >Cu>Ag>Bi>Cd>Pb>ZN>Co>Fe). La quantification des MT est donc estimée à partir du dosage du mercure qu'elles séquestrent.

Cette méthode de quantification des MT est constituée de deux étapes :

- Extraction des MT par saturation au mercure inorganique (**Annexe 18**)

Cette étape débute par le broyage de 50 à 150 mg de branchies ou de glande digestive dans 1 mL de tampon Tris-HCl 25 mM (pH 7,2 à 20 °C). Le broyage est réalisé sur glace et sous atmosphère d'azote (pour éviter l'oxydation des groupements thiols des cystéines R–SH en ponts disulfures R-S-S-R) et à l'aide d'un broyeur mécanique T10-IKA Ultra-Turrax. Les échantillons biologiques sont ensuite centrifugés à 20 000xg pendant 1h à 4°C afin de séparer la fraction cytosolique contenant les MT (surnageant) des débris cellulaires (culot).
Par la suite, 2 aliquotes de 200 µL de surnageants sont prélevées et mises en contact pendant 10 minutes avec une solution constituée de Hg inorganique ($HgCl_2$ à 50 $mg.L^{-1}$) et d'acide trichloracétique (TCA à 10%).
Le mercure ajouté en excès va se substituer aux autres métaux présents sur les MT et saturer l'ensemble des sites de fixation des MT. L'acide trichloracétique va abaisser le pH de l'échantillon et entraîner la précipitation des protéines de haut poids moléculaire.
Le métal en excès (non fixé aux MT) est récupéré en ajoutant 400 µL d'une solution d'hémoglobine (40 mL de tampon Tris-HCl 30 mM mélangé à 1 g d'hémoglobine porcine lyophilisée (Sigma-Aldrish, Saint Louis, Missouri, USA)). Ainsi cette protéine ayant une forte affinité pour le mercure permet de récupérer le métal en excès sans décrocher celui déjà séquestré par les MT.
Une deuxième centrifugation de 20 minutes à 20 000xg à température ambiante est réalisée pour séparer l'hémoglobine chargée en mercure (culot) des MT saturées en mercure (surnageant).
Pour finir, les surnageants sont récupérés dans des microtubes, pesés et stockés à 4 °C jusqu'à l'étape du dosage du mercure par spectrophotométrie d'absorption atomique.

Afin de valider la méthode, lors de chaque extraction, 3 blancs (3 fois 200 µL de tampon Tris-HCl 25 mM) et 3 échantillons de références (3 fois 200 µL d'une solution diluée à 10 µg MT/mL de MT de foie de lapin (Sigma-Aldrish, Saint Louis, Missouri, USA)) sont préparés et dosés en même temps que les autres échantillons.

- Dosage du mercure par spectrométrie d'absorption atomique (**Annexe 18**)

Ce dosage est réalisé par spectrométrie d'absorption atomique sous flux d'oxygène (LECO AMA 254, ALTEC Prague, République Tchèque ; LD = 0,1 ng - 500 ng). Ainsi 100 µL des surnageants obtenus à l'étape précédente sont déposés sur des nacelles en nickel sur le carrousel de l'appareil. Lors de chaque dosage, des échantillons certifiés (50 mg Tort-2 – Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metal, National Research Council, Canada) sont analysés régulièrement afin de calculer l'efficacité de l'appareil.

Les résultats sont exprimés en nmoles de sites de fixation de Hg par gramme de poids frais (nmols Hg/g pf).

CHAPITRE III. DEVELOPPEMENT, VALIDATION ET APPLICATIONS DES METHODES

1. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE MULTI-RESIDUS POUR L'ANALYSE DES PSYCHOTROPES DANS LES EAUX USEES ET LES EAUX DE SURFACE. 165
1.1. Introduction *165*
1.2. Validation des méthodes développées *166*
1.2.1. Performance de la méthode d'analyse et de l'instrument 166
a) Linéarité 166
b) Répétabilité et reproductibilité 168
c) Sensibilité 170
1.2.2. Protocole de préparation d'échantillon 172
a) Rendement d'extraction 172
b) Rendement de quantification et usage d'étalon interne 174
c) Volume de fuite 180
d) Sensibilité 183
1.3. Application sur la Jalle de Blanquefort et discussion *186*
2. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ECHANTILLONNAGE POUR LES PSYCHOTROPES : LE POCIS. 191
2.1. Introduction *191*
2.2. Contrôle qualité *193*
2.3. Calibrations en laboratoire et in situ *199*
2.3.1. Comportement d'accumulation dans le POCIS 199
2.3.2. Taux d'échantillonnage 202
2.3.3. Constante d'élimination des PRC 203
2.4. Application de l'outil sur la Jalle de Blanquefort *205*
3. CONCLUSION 210

1. Développement d'une méthode multi-résidus pour l'analyse des psychotropes dans les eaux usées et les eaux de surface.

1.1. Introduction

Au cours des dernières années, les produits pharmaceutiques ont été décrits comme étant des contaminants émergents pouvant être problématiques pour l'environnement. Ils sont retrouvés dans plusieurs environnements aqueux à différents niveaux de concentrations (du $ng.L^{-1}$ au $\mu g.L^{-1}$) (Sacher et *al*., 2001 ; Hernando et *al*., 2004 ; Togola et Budzinski, 2008 ; Loos et *al*., 2010). C'est pourquoi, de nos jours, les chercheurs développent des méthodes analytiques de plus en plus sensibles et sélectives, permettant de détecter plusieurs composés ayant des caractéristiques physico-chimiques diverses.
Parmi les familles thérapeutiques présentes dans l'environnement, cette étude s'est focalisée sur les psychotropes. Ce sont des molécules qui vont agir sur le système nerveux central, qui sont très consommées et que l'on retrouve dans l'environnement. Les psychotropes les plus étudiés et trouvés dans le milieu aquatique sont la Carbamazépine, le Citalopram, le Diazépam, la Fluoxétine, la Paroxétine et la Venlafaxine (Togola et Budzinski, 2007 ; Lajeunesse et *al*., 2008 ; Giebultowicz et *al*., 2014). De plus, certains de ces composés ont un potentiel toxique à des concentrations environnementales reconnues (Boxall et *al*., 2012).

La première partie de ces travaux de thèse a donc consisté à développer une méthode analytique permettant de détecter 47 psychotropes dans les eaux usées et les eaux de surface.
Les objectifs de cette étude étaient de :

- développer une méthode analytique sur l'UPLC-MS/MS pour les 47 composés choisis.
- développer une méthode d'extraction sur phase solide pour les 47 composés sélectionnés.
- valider les méthodes à l'aide de plusieurs paramètres.
- appliquer la méthode sur des prélèvements d'eau. Les échantillons utilisés proviennent de la Jalle de Blanquefort (petite rivière située en Aquitaine dans le sud-ouest de la France) et ont permis d'appréhender la présence et les niveaux de concentrations en psychotropes.

Initialement, une première liste de 61 composés avait été établie pour le développement de cette méthode multi-résidus, cependant dès les premières validations sur l'UPLC-MS/MS, 11 composés (Fluvoxamine, Escitalopram, Trimipramine, Topiramate, Prégabaline, Loxapine, Lévomépromazine, Rispéridone, Pipotiazine, Alimémazine et Loprazolam) ont été enlevés. Les temps de rétention de ces molécules fluctuaient à chaque injection, les faisant sortir de leur fenêtre de coupure d'ion, ne permettant pas ainsi leur détection dans une logique multi-résidu.
L'acide valproïque a lui aussi été enlevé de l'étude pour cause de présence d'un interférant majeur dans le système analytique engendrant des blancs d'injection contaminés et ne rendant pas possible sa quantification.

Pour finir la Vigabatrine et l'Olanzapine ont été aussi exclus de la liste car leur rendement d'extraction étaient trop faible en raison d'un volume de fuite très bas ne permettant pas leur détection en machine à des concentrations < µg.L^{-1}.
Pour ces travaux, la méthode d'extraction choisie est présentée dans le **Chapitre 2. Section 5.3** et la méthode d'analyse dans le **Chapitre 2. Section 6.2.**

1.2. Validation des méthodes développées

Pour s'assurer de la validité de la méthode d'analyse et de la méthode d'extraction, divers paramètres doivent être évalués. Ce contrôle permet de s'assurer que les différentes étapes des protocoles d'extraction et d'analyse ne vont pas introduire de biais.

L'ensemble des validations a été fait sur de l'eau Vittel qui est l'eau minérale la plus complexe à extraire. Ainsi, nous pouvons supposer que si les paramètres sont validés sur l'eau Vittel, ils le seront aussi sur les eaux de surface et les eaux de STEP étudiées. De plus, l'eau Vittel a été utilisée car elle est dépourvue de toute contamination, nous permettant alors de la doper artificiellemnt avec nos solutions de psychotropes.

1.2.1. Performance de la méthode d'analyse et de l'instrument

La validation de la méthode d'analyse s'effectue par l'évaluation de la linéarité, de la sensibilité ainsi que de la répétabilité et reproductibilité des injections pour les 47 psychotropes sélectionnés.

a) Linéarité
Ce paramètre permet de montrer que le signal d'un composé va varier dans les mêmes proportions que la quantité injectée. La linéarité de la réponse analytique a été évaluée à partir d'une analyse de régression linéaire à l'aide d'une gamme de concentration de 0,1 à 100 ng.g^{-1} de solvant, soit une masse injectée de 0,5 à 500 pg. Sept points d'étalonnage ont été effectués pour chaque analyte en triplicat. Pour l'ensemble des composés, la valeur du coefficient de corrélation (R^2) est supérieure à 0,99 (**Tableau III-1**) ; ce qui indique une bonne linéarité sur l'intégralité de la gamme testée.

Tableau III-1. Bilan des coefficients de corrélation (R2) des psychotropes étudiés.

Classes thérapeutiques	Composés	Coef. de corrélation (R^2)
Benzodiazépines	Zopiclone	0,998
	Zolpidem	0,996
	Nordiazépam	0,993
	Oxazépam	0,998
	Alprazolam	0,995
	Bromazépam	0,997
	Clobazam	0,995
	Clonazépam	0,996
	Clorazépate	0,998
	Diazépam	0,995
	Lorazépam	0,994
	Flunitrazépam	0,991
	Témazépam	0,995
	Prazépam	0,995
Antidépresseurs	Mirtazapine	0,993
	Milnacipran	0,999
	Venlafaxine	0,999
	Miansérine	0,997
	Amoxapine	0,997
	Citalopram	0,998
	Tianeptine	0,996
	Paroxétine	0,996
	Imipramine	0,995
	Maprotiline	0,996
	Duloxetine	0,998
	Amitriptyline	0,997
	Fluoxétine	0,993
	Sertraline	0,998
	Doxépine	0,995
	Norfluoxétine	0,997
	Clomipramine	0,994
Antipsychotiques - Neuroleptiques	Sulpiride	0,999
	Cyamémazine	0,991
	Chlorpromazine	0,992
	Tiapride	0,997
	Amisulpuride	0,996
	Pimozide	0,990
Antiépileptiques	Gabapentine	0,998
	Valpromide	0,999
	Carbamazépine	0,999
	Lévétiracétam	0,999
	Lamotrigine	0,996
	Primidone	1,000
Anxiolytiques	Méprobamate	0,999
	Buspirone	0,997
	Hydroxyzine	0,998
Substituts aux opiacés	Méthadone	0,997

b) Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité correspond à la variation intra-jour et la reproductibilité à la variation inter-jour de la réponse analytique d'une même solution ou d'un même échantillon (eau Vittel de 100 mL dopée artificiellement à une concentration de 150 ng.L^{-1}) injecté dans les mêmes conditions avec la même méthode. Ces variations sont obtenues en calculant l'écart-type relatif entre les réponses et sont exprimées en pourcentage de variations (**Tableau III-2**).

Pour la répétabilité, l'écart-type relatif le plus élevé est de 17% pour la Lamotrigine et le plus faible est de 1% pour le Flunitrazépam. Ainsi la totalité des composés analysés ont une bonne répétabilité.

Pour la reproductibilité, plus des deux tiers des composés ont un écart-type relatif inférieur à 20% et seulement 14 psychotropes ont un écart-type relatif compris entre 21% et 25% (**Figure III-1**).

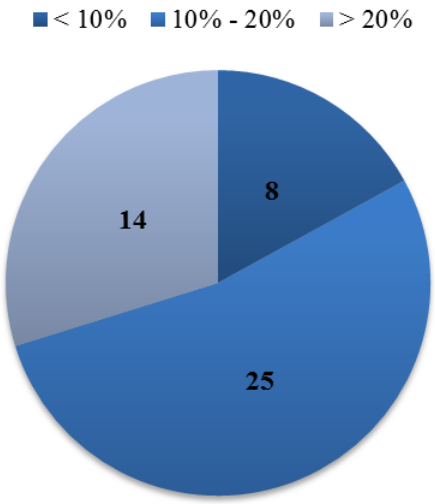


Figure III-1. Répartition des molécules par gamme d'écart-type relatif représentant la reproductibilité.

Tableau III-2. Ecart-type relatif (RSD en %) pour chaque composé représentant les variations intra-jours (n=5) et inter-jours (n=20).

Classes thérapeutiques	Composés	Repétabilité (intra-jour) % (n=5)	Reproductibilité (inter-jour) % (n=20)
Benzodiazépines	Zopiclone	4	25
	Zolpidem	7	23
	Nordiazépam	4	7
	Oxazépam	4	7
	Alprazolam	8	8
	Bromazépam	7	16
	Clobazam	4	10
	Clonazépam	3	12
	Clorazépate	5	11
	Diazépam	2	8
	Lorazépam	3	12
	Flunitrazépam	1	11
	Témazépam	2	14
	Prazépam	9	7
Antidépresseurs	Mirtazapine	7	24
	Milnacipran	6	21
	Venlafaxine	5	18
	Miansérine	8	12
	Amoxapine	8	23
	Citalopram	6	9
	Tianeptine	6	24
	Paroxétine	8	21
	Imipramine	7	11
	Maprotiline	7	14
	Duloxetine	11	16
	Amitriptyline	2	16
	Fluoxétine	5	23
	Sertraline	8	12
	Doxépine	6	5
	Norfluoxétine	6	21
	Clomipramine	4	11
Antipsychotiques - Neuroleptiques	Sulpiride	10	19
	Cyamémazine	14	17
	Chlorpromazine	9	24
	Tiapride	10	21
	Amisulpuride	9	12
	Pimozide	14	18
Antiépileptiques	Gabapentine	12	15
	Valpromide	3	12
	Carbamazépine	3	6
	Lévétiracétam	13	16
	Lamotrigine	17	24
	Primidone	13	18
Anxiolytiques	Méprobamate	8	16
	Buspirone	10	20
	Hydroxyzine	6	21
Substituts aux opiacés	Méthadone	8	15

c) Sensibilité

La limite de détection est la plus petite quantité injectée d'un composé pouvant être détectée par le système analytique et la limite de quantification est la plus petite quantité d'un composé pouvant être quantifiée avec justesse.

Ces limites de détection et de quantification instrumentales (LDI et LQI) ont été obtenues par l'injection d'une gamme de dilution de solutions standards (10 à 100 pg injecté) et sont exprimées en pg injectés. Elles sont calculées par extrapolation à partir du point le plus bas de la gamme testée pour lequel on a un signal. La limite de détection correspond à un rapport signal sur bruit de 3 et la limite de quantification correspond à un rapport de 10. Les données sont présentées dans le **Tableau III-3**.

Les LQ instrumentales vont de 0,1 à 7,3 pg injectés. Seulement 9 molécules sur les 47 étudiées ont une LQ supérieure à 3 pg injectés. La Fluoxétine est le psychotrope ayant la LQ maximale de 7,3 pg injectés.

Tableau III-3. Limites de détection et de quantifications instrumentales obtenues pour les psychotropes étudiés (en picogrammes injectés).

Classes thérapeutiques	Composés	LDI pg injectés	LQI pg injectés
Benzodiazépines	Zopiclone	0,6	1,9
	Zolpidem	0,02	0,1
	Nordiazépam	0,4	1,3
	Oxazépam	0,2	0,6
	Alprazolam	0,7	2,4
	Bromazépam	1,1	3,6
	Clobazam	0,5	1,6
	Clonazépam	0,4	1,2
	Clorazépate	0,1	0,3
	Diazépam	0,2	0,6
	Lorazépam	0,7	2,3
	Flunitrazépam	0,6	1,9
	Témazépam	0,2	0,5
	Prazépam	0,04	0,1
Antidépresseurs	Mirtazapine	0,3	1,0
	Milnacipran	0,02	0,1
	Venlafaxine	0,03	0,1
	Miansérine	0,5	1,6
	Amoxapine	0,3	0,9
	Citalopram	0,1	0,4
	Tianeptine	0,1	0,2
	Paroxétine	0,4	1,4
	Imipramine	0,1	0,2
	Maprotiline	0,1	0,4
	Duloxetine	0,4	1,3
	Amitriptyline	0,4	1,4
	Fluoxétine	2,2	7,3
	Sertraline	1,2	4,0
	Doxépine	0,1	0,3
	Norfluoxétine	0,9	3,0
	Clomipramine	0,1	0,2
Antipsychotiques - Neuroleptiques	Sulpiride	0,0	0,1
	Cyamémazine	0,1	0,3
	Chlorpromazine	0,2	0,7
	Tiapride	0,04	0,1
	Amisulpuride	0,2	0,6
	Pimozide	0,4	1,3
Antiépileptiques	Gabapentine	0,1	0,4
	Valpromide	0,9	2,9
	Carbamazépine	0,1	0,4
	Lévétiracétam	0,3	1,1
	Lamotrigine	1,1	3,5
	Primidone	0,2	0,7
Anxiolytiques	Méprobamate	1,1	3,5
	Buspirone	0,05	0,2
	Hydroxyzine	0,1	0,3
Substituts aux opiacés	Méthadone	0,1	0,5

1.2.2. Protocole de préparation d'échantillon

La validation de la méthode d'extraction est déterminée par le contrôle du rendement d'extraction et de quantification ainsi que du volume de fuite de chacun des composés étudiés. De plus des limites de détection et de quantification dites de méthode sont calculées à partir d'un échantillon d'eau ayant subi les méthodes d'extraction et d'analyse.

a) Rendement d'extraction

Les rendements de chaque composé sont calculés à partir d'un échantillon d'eau Vittel de 100 mL dopé artificiellement à une concentration de 150 $ng.L^{-1}$. Les rendements d'extraction sont exprimés en % et sont déterminés en comparant la concentration obtenue calculée à la concentration initiale calculée. Le calcul de la concentration obtenue se fait avec une quantification par gamme externe (faite de 6 points de gamme : 1 $ng.g^{-1}$, 5 $ng.g^{-1}$, 10 $ng.g^{-1}$, 25 $ng.g^{-1}$, 50 $ng.g^{-1}$ et 100 $ng.g^{-1}$) injectée en début de séquence.

Le **Tableau III-4** présente l'ensemble des rendements d'extraction obtenus pour les 47 psychotropes étudiés qui sont compris entre 5 et 901%.

Généralement, les rendements sont considérés comme acceptables quand ils sont compris entre 70 et 120%. Cependant cette méthode de quantification par gamme externe ne permet qu'à 12 molécules sur les 47 étudiées d'obtenir un rendement d'extraction convenable.

C'est pourquoi nous avons choisi d'adopter la quantification par dilution isotopique avec l'utilisation d'étalons internes qui sont introduits dans l'échantillon au début du protocole d'extraction (détail du protocole SPE pour les 47 psychotropes étudiés en **Annexe 19**).

Tableau III-4. Rendements d'extraction des 47 psychotropes étudiés.

Classes thérapeutiques	Composés	Rendement d'extraction en % (± E.T) *n=10*
Benzodiazépines	Zopiclone	190 ± 28
	Zolpidem	59 ± 9
	Nordiazépam	121 ± 20
	Oxazépam	235 ± 41
	Alprazolam	318 ± 45
	Bromazépam	22 ± 3
	Clobazam	76 ± 9
	Clonazépam	282 ± 48
	Clorazépate	37 ± 12
	Diazépam	211 ± 29
	Lorazépam	21 ± 3
	Flunitrazépam	277 ± 51
	Témazépam	84 ± 11
	Prazépam	113 ± 15
Antidépresseurs	Mirtazapine	65 ± 11
	Milnacipran	22 ± 4
	Venlafaxine	73 ± 17
	Miansérine	66 ± 8
	Amoxapine	49 ± 7
	Citalopram	52 ± 7
	Tianeptine	45 ± 7
	Paroxétine	54 ± 6
	Imipramine	70 ± 9
	Maprotiline	51 ± 7
	Duloxetine	37 ± 6
	Amitriptyline	65 ± 13
	Fluoxétine	901 ± 182
	Sertraline	156 ± 41
	Doxépine	62 ± 7
	Norfluoxétine	83 ± 21
	Clomipramine	83 ± 15
Antipsychotiques - Neuroleptiques	Sulpiride	45 ± 7
	Cyamémazine	69 ± 8
	Chlorpromazine	86 ± 17
	Tiapride	74 ± 13
	Amisulpuride	30 ± 4
	Pimozide	151 ± 37
Antiépileptiques	Gabapentine	123 ± 25
	Valpromide	251 ± 53
	Carbamazépine	178 ± 22
	Lévétiracétam	5 ± 2
	Lamotrigine	145 ± 31
	Primidone	98 ± 25
Anxiolytiques	Méprobamate	31 ± 6
	Buspirone	102 ± 23
	Hydroxyzine	75 ± 14
Substituts aux opiacés	Méthadone	27 ± 3

b) Rendement de quantification et usage d'étalon interne

Les rendements de chaque composé sont calculés à partir d'un échantillon d'eau Vittel de 100 mL dopé artificiellement à une concentration de 150 ng.L^{-1}. Les rendements de quantification sont exprimés en % et sont déterminés en comparant la concentration obtenue calculée à la concentration initiale calculée.

Sur l'ensemble des molécules, 34 ont des rendements de quantification compris entre 70% et 120% (**Tableau III-5** et **Figure III-2**). Ainsi nous constatons que l'utilisation d'étalon interne permet une meilleure quantification des molécules étudiées (**Figure III-3**).

Tableau III-5. Rendements de quantification des 47 psychotropes étudiés.

Classes thérapeutiques	Composés	Rendement de quantification en % (± E.T) *n=62*
Benzodiazépines	Zopiclone	156 ± 60
	Zolpidem	128 ± 56
	Nordiazépam	111 ± 22
	Oxazépam	106 ± 18
	Alprazolam	99 ± 22
	Bromazépam	135 ± 46
	Clobazam	100 ± 18
	Clonazépam	101 ± 20
	Clorazépate	91 ± 15
	Diazépam	108 ± 13
	Lorazépam	90 ± 35
	Flunitrazépam	86 ± 18
	Témazépam	91 ± 23
	Prazépam	109 ± 14
Antidépresseurs	Mirtazapine	87 ± 43
	Milnacipran	69 ± 28
	Venlafaxine	91 ± 33
	Miansérine	102 ± 29
	Amoxapine	136 ± 66
	Citalopram	75 ± 19
	Tianeptine	138 ± 60
	Paroxétine	106 ± 45
	Imipramine	90 ± 31
	Maprotiline	99 ± 35
	Duloxetine	120 ± 44
	Amitriptyline	122 ± 51
	Fluoxétine	113 ± 52
	Sertraline	105 ± 26
	Doxépine	99 ± 23
	Norfluoxétine	124 ± 66
	Clomipramine	91 ± 27
Antipsychotiques - Neuroleptiques	Sulpiride	52 ± 28
	Cyamémazine	75 ± 22
	Chlorpromazine	92 ± 56
	Tiapride	77 ± 39
	Amisulpuride	88 ± 35
	Pimozide	135 ± 59
Antiépileptiques	Gabapentine	39 ± 10
	Valpromide	61 ± 15
	Carbamazépine	109 ± 13
	Lévétiracétam	8 ± 2
	Lamotrigine	142 ± 63
	Primidone	61 ± 21
Anxiolytiques	Méprobamate	80 ± 24
	Buspirone	107 ± 45
	Hydroxyzine	101 ± 37
Substituts aux opiacés	Méthadone	89 ± 30

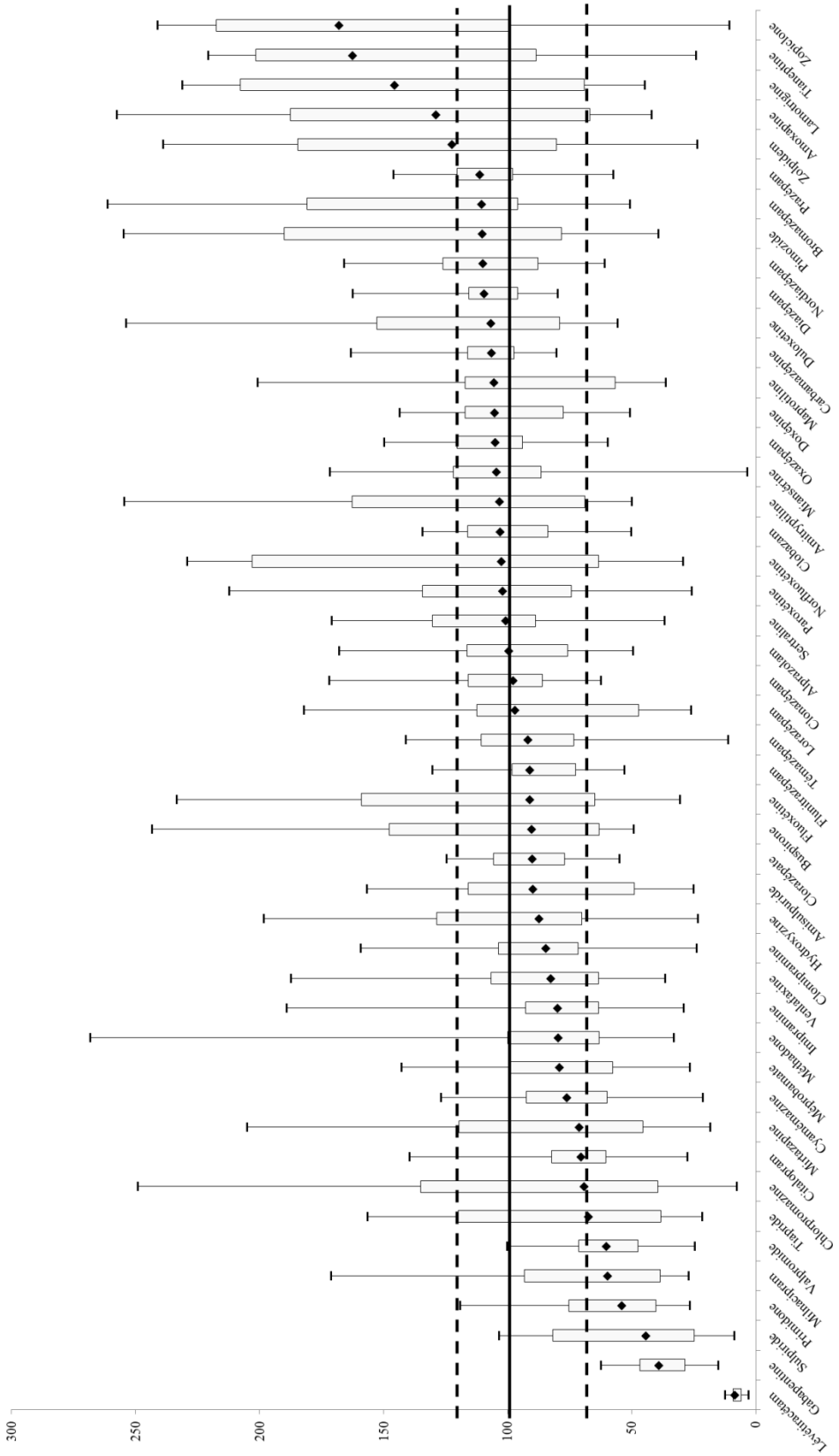


Figure III-2. Rendements (%) des 47 psychotropes obtenus pour l'ensemble des analyses de ces travaux de thèse avec une quantification par étalonnage interne (*n*=62).

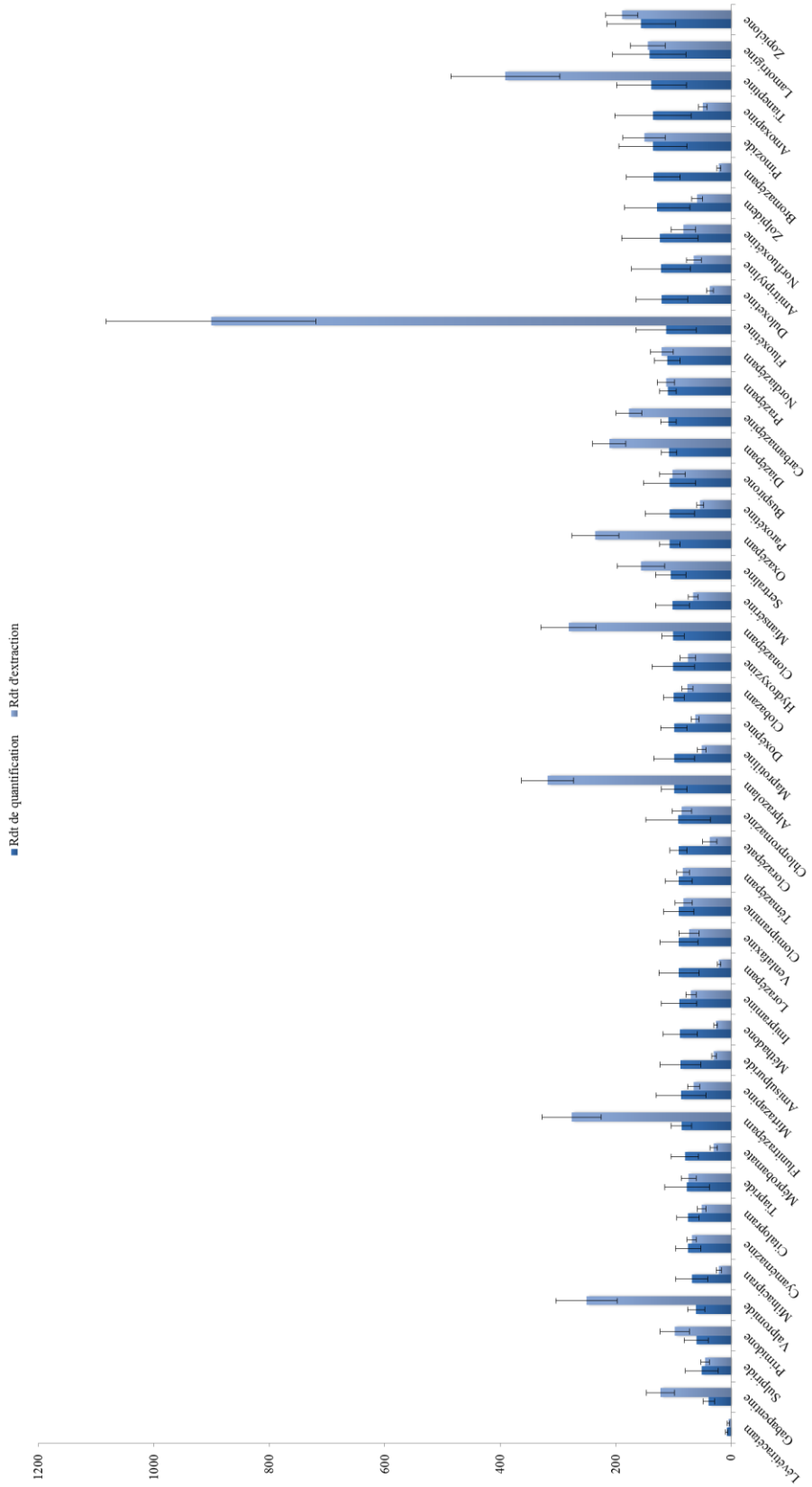


Figure III-3. Comparaison de la quantification par gamme externe et par dilution isotopique pour les 47 psychotropes étudiés.

Néanmoins, nous pouvons constater que pour certains composés la quantification par étalonnage interne ne permet pas d'obtenir des rendements de quantification convenables. L'utilisation de seulement 7 étalons internes pour l'ensemble des psychotropes étudiés peut expliquer que certains composés aient des rendements de quantification inférieurs à 70% et supérieurs à 120%, ce qui est le cas pour la Gabapentine (39 ± 10 %), le Lévétiracétam (8 ± 2 %), la Tianeptine (138 ± 60 %) ou encore le Zopiclone (156 ± 60 %) (**Figure III-2**).

D'après Aminot (2013), il est préférable de multiplier les étalons internes dans une méthode pour permettre de compenser les pertes dues aux étapes de préparation des échantillons, aux extinctions de signal ou encore aux effets de matrices.
Cependant dans ces travaux de thèse, ceci n'a pu être réalisable car nous étions dans un objectif de screening moléculaire large (47 psychotropes à rechercher) ainsi des compromis ont été nécessaires. Malgré cela, les 7 EI utilisés dans ces travaux de thèses ont tout de même permis de quantifier de manière convenable 34 molécules sur les 47 choisies.

Pour les 13 psychotropes ayant des rendements de quantification en dehors de l'intervalle 70%-120%, il est possible de calculer un facteur de correction moyen qui sera appliqué à l'ensemble des valeurs obtenues pour ces composés. Le **Tableau III-6** présente les facteurs de corrections pour ces 13 molécules, les concentrations quantifiées en STEP dans ces travaux de thèse, les concentrations corrigées par le F de correction et les concentrations en STEP trouvées dans la littérature (**Chapitre 2, Tableau II-3**).

Tableau III-6. Facteurs de correction, concentrations quantifiées en STEP (entrée et sortie) obtenues dans ces travaux de thèse, dans la littérature et concentrations corrigées.

Composés	Facteur de correction (F)	Concentractions quantifiées dans les STEP étudiées ($ng.L^{-1}$)		Concentractions de la littérature quantifiées en STEP ($ng.L^{-1}$)		Concentractions quantifiées dans les STEP étudiées corrigées par F ($ng.L^{-1}$)	
		Min	*Max*	*Min*	*Max*	*Min*	*Max*
Lévétiracétam	12,77	23,2	735,3	8157,2	10 825	296,3	9389,9
Gabapentine	2,57	587,4	7 420,7	1786	42 611	1508,3	19 054,8
Sulpiride	1,93	0,6	180,5	7	135	1,2	349,2
Primidone	1,65	3,4	98,4	120	710	5,6	162,2
Valpromide	1,65	5,9	412,9	-	-	9,7	679,4
Milnacipran	1,46	0,6	182,7	-	-	0,9	266,6
Norfluoxétine	0,81	-	-	1,7	25,2	-	-
Zolpidem	0,78	0,2	37,3	1,5	3,9	0,2	29,1
Pimozide	0,74	-	-	-	-	-	-
Amoxapine	0,74	-	-	-	-	-	-
Tianeptine	0,72	-	-	-	-	-	-
Lamotrigine	0,71	51,0	1245,7	56	4 120	36,0	879,3
Zopiclone	0,64	2,7	234,2	-	-	1,7	150,1

D'après les données du **Tableau III-6**, nous pouvons constater qu'avec ou sans le facteur de correction nous sommes toujours dans la gamme de concentration de la littérature. Cependant, pour le Lévétiracétam qui a un facteur de correction supérieur à 10, nous constatons que les concentrations quantifiées en STEP sont vraiment sous-estimées. Ainsi le Lévétiracétam est un

des psychotropes les plus concentrés dans les STEP. Ce résultat est en accord avec les données de consommation de MEDIC'AM qui montrent que le Lévétiracétam est l'un des psychotropes le plus consommé avec la Gabapentine (**Annexe 5**).
Pour la Gabapentine, même si les concentrations retrouvées sont sous-évaluées d'un facteur 2,57, cette molécule recense tout de même les concentrations les plus élevées.

De plus, à la fin de ces travaux de thèse, l'étalon intene de la Gabapentine, la Gabapentine D4, a été acheté afin d'obtenir une meilleure quantification de ce composé.
Les données du **Tableau III-7** montrent, effectivement, que le rendement de quantification est meilleur lorsque la Gabapentine est quantifiée avec son homologue marqué (93%) qu'avec la Carbamazépine D10 (39%). Cependant, nous constatons que les concentrations qui sont obtenus avec ces deux étalons internes sont du même ordre de grandeur, aux alentour de 3 000 – 4 000 $ng.L^{-1}$.

Tableau III-7. Concentration en ng.L-1 de la Gabapentine mesurée dans un effluent d'entrée de STEP quantifié à partir de la Carbamazépine D10, d'un facteur de correction moyen et de la Gabapentine D4.

Composé	Étalon interne	Rendement de quantification	Facteur de correction moyen	Conc. effluent entrée STEP ($ng.L^{-1}$)
Gabapentine	Carbamazépine D10	39%	-	2969,5
	-	-	2,5	7631,6
	Gabapentine D4	93%	-	4144,9

De plus, les résultats dans le **Tableau III-7** montrent également que l'utilisation du facteur de correction surévalue la concentration en Gabapentine dans les effluents d'entrée de STEP. Effectivement, il n'est pas pertinent d'utiliser un facteur de correction moyen sur les différentes matrices utilisées car les effluents d'entrée de STEP sont des matrices conplexes pouvant engendrer des effets sur l'analyse (extinction de signal, modification du temps de rétention, ect…).

Au regard des résultats du Tableau 44 et Tableau 45, nous avons fait le choix de ne pas appliquer ce facteur de correction moyen sur nos données car sur l'ensemble des valeurs obtenues (**Chapitre 4**) nous avons pu constater que les concentrations quantifiées étaient dans les ordres de grandeur de celles retrouvées dans la littérature. De plus, nous avons aussi constaté que pour la Gabapentine l'utilisation de la Carbamazépine D10 nous permettait d'obtenir des valeurs de concentrations en STEP du même ordre de grandeur que si elle était quantifiée avec son homologue deutéré.
Ainsi, pour ces 13 composés (Lévétiracétam, Gabapentine, Sulpiride, Primidone, Valpromide, Milnacipran, Norfluoxétine, Zolpidem, Pimozide, Amoxapine, Tianeptine, Lamotrigine et Zopiclone) nous avons une analyse semi-quantitative qui nous permet d'identifier leur présence ou non dans les milieux étudiés et d'estimer un ordre de grandeur sur les niveaux de concentrations retrouvés dans les différents milieux étudiés.

Pour finir, dans le cas de la Gabapentine et du Lévétiracétam, leur forte hydrophilie (respectivement log Kow = -1,3 et log Kow = -0,6) peut aussi expliquer leurs rendements de quantification

inférieurs à 50% (Gomez et *al*., 2006). Ce résultat est aussi en lien avec leur faible volume de fuite (**Tableau III-8**).

c) Volume de fuite

Le volume de fuite est le volume maximum qui peut être percolé sur une cartouche SPE sans modifier les rendements d'extraction. Au-delà de ce volume de fuite, les composés ne sont plus retenus sur la cartouche SPE et sont élués au fur et à mesure que l'échantillon percole.

Ce paramètre a été évalué à différents volumes d'eau minérale Vittel (10 mL, 20 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL et 500 mL) auxquels ont été ajoutés une masse identique et connue de natifs. Un témoin cartouche (ajout des natifs directement sur la cartouche) sert de référence. Les échantillons et la référence ont été faits en triplicat. L'ensemble des résultats sont présentés dans le **Tableau III-8**.

Tableau III-8. Répartition des 47 psychotropes selon leur volume de fuite.

Volume de fuite > 500 mL	Volume de fuite 200 mL	Volume de fuite 20 mL	Volume de fuite 10 mL
Zopiclone	Flunitrazépam	Lamotrigine	Lévétiracétam
Zolpidem	Méprobamate	Gabapentine	
Nordiazépam	Primidone	Pimozide	
Oxazépam	Bromazépam		
Alprazolam	Norfluoxétine		
Duloxetine	Fluoxétine		
Clobazam	Chlorpromazine		
Clonazépam	Clomipramine		
Clorazépate	Sulpiride		
Diazépam			
Lorazépam			
Témazépam			
Prazépam			
Mirtazapine			
Milnacipran			
Venlafaxine			
Miansérine			
Amoxapine			
Citalopram			
Tianeptine			
Paroxétine			
Imipramine			
Maprotiline			
Amitriptyline			
Sertraline			
Doxépine			
Cyamémazine			
Tiapride			
Amisulpuride			
Carbamazépine			
Buspirone			
Hydroxyzine			
Méthadone			
Valpromide			

Sur les 47 psychotropes étudiés, 34 ont un volume de fuite supérieur à 500 mL (exemple de la Carbamazépine **Figure III-4**), 9 ont un volume de fuite de 200 mL (exemple du Méprobamate **Figure III-5**), 3 de 20 mL et 1 de 10 mL (exemple du Lévétiracétam **Figure III-6**).

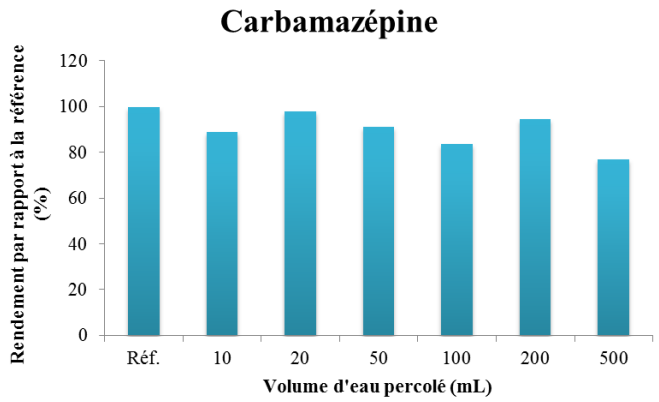


Figure III-4. Diagramme représentant les données de volume de fuite pour la Carbamazépine.

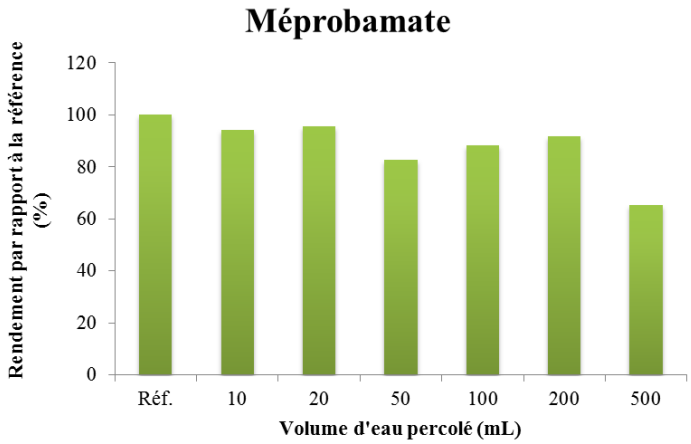


Figure III-5. Diagramme représentant les données de volume de fuite pour le Méprobamate.

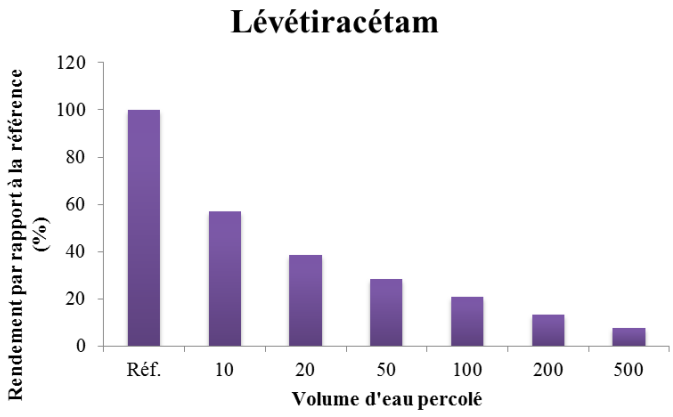


Figure III-6. Diagramme représentant les données de volume de fuite pour le Lévétiracétam.

Cette étude ayant pour objectif de développer une méthode multi-résidus, des compromis ont été nécessaires ainsi le volume de prise d'essai maximal choisi est de 200 mL dans ce protocole d'extraction sur phase solide.

d) Sensibilité

Les limites de détections et de quantification méthodologiques (LDM et LQM) ont été déterminées en analysant un échantillon d'eau Vittel de 100 mL dopé artificiellement à 1 et 10 ng.L^{-1} avec des solutions standards, qui a suivi toutes les étapes d'extraction et de reconcentration (**Tableau III-9**).

Sur l'ensemble des molécules étudiées, 32 ont une LQM inférieure à 1 ng.L^{-1}, 13 ont une LQM comprise entre 1 et 3 ng.L^{-1} et 2 composés ont une LQM supérieure à 3 ng.L^{-1}. Les psychotropes qui ont la limite de quantification méthodologique la plus basse avec 0,1 ng.L^{-1} sont le Milnacipran, le Clomipramine, le Sulpiride et le Buspirone. La limite de quantification méthodologique la plus élevée est celle de la Lamotrigine avec 3,3 ng.L^{-1}.

Tableau III-9. Limites de détection et de quantification méthodologiques pour les 47 psychotropes sélectionnés.

Classes thérapeutiques	Composés	LDM ng.L^{-1}	LQM ng.L^{-1}
Benzodiazépines	Zopiclone	0,6	1,9
	Zolpidem	0,1	0,2
	Nordiazépam	0,2	0,5
	Oxazépam	0,1	0,4
	Alprazolam	0,6	1,9
	Bromazépam	0,6	1,8
	Clobazam	0,4	1,1
	Clonazépam	0,2	0,7
	Clorazépate	0,1	0,3
	Diazépam	0,1	0,3
	Lorazépam	0,6	1,8
	Flunitrazépam	0,4	1,3
	Témazépam	0,1	0,4
	Prazépam	0,1	0,3
Antidépresseurs	Mirtazapine	0,2	0,7
	Milnacipran	0,03	0,1
	Venlafaxine	0,1	0,2
	Miansérine	0,3	0,8
	Amoxapine	0,3	0,8
	Citalopram	0,1	0,4
	Tianeptine	0,2	0,7
	Paroxétine	0,4	1,3
	Imipramine	0,1	0,2
	Maprotiline	0,2	0,5
	Duloxetine	0,2	0,6
	Amitriptyline	0,4	1,1
	Fluoxétine	1,1	3,2
	Sertraline	1,0	3,0
	Doxépine	0,2	0,5
	Norfluoxétine	0,3	1,0
	Clomipramine	0,1	0,1
Antipsychotiques - Neuroleptiques	Sulpiride	0,02	0,1
	Cyamémazine	0,1	0,3
	Chlorpromazine	0,1	0,2
	Tiapride	0,1	0,2
	Amisulpuride	0,1	0,3
	Pimozide	0,4	1,1
Antiépileptiques	Gabapentine	0,2	0,6
	Valpromide	0,4	1,2
	Carbamazépine	0,1	0,3
	Lévétiracétam	0,1	0,4
	Lamotrigine	1,1	3,3
	Primidone	0,2	0,5
Anxiolytiques	Méprobamate	0,7	2,2
	Buspirone	0,02	0,1
	Hydroxyzine	0,1	0,4
Substituts aux opiacés	Méthadone	0,1	0,3

e) Effet de matrice

Nous sommes partis du postulat qu'en diluant tous nos extraits au dixième dans le solvant d'injection, nous minimisons les effets de matrice.

Effectivement, une étude des effets de matrice sur l'analyse des médicaments a été menée au laboratoire dans les travaux de thèse d'Aminot (2013).

Ce travail a été effectué sur 4 critères : 1) le temps de rétention ; 2) l'extinction de signal ; 3) l'élargissement des pics et 4) l'augmentation du bruit de fond. Et sur 4 types de matrices : i) l'eau Vittel ; ii) l'eau de Garonne ; iii) l'eau d'effluent de sortie de STEP et iv) l'eau d'effluent d'entrée de STEP.

Les tests ont été faits sur des extraits bruts et sur des extraits dilués au dixième avec le solvant d'injection.

Les résultats de ces test ont montré qu'aucune extinction de signal, modification du temps de rétention et aucun élargissement du pic chromatographique ont été observé sur les matrice d'eau Vittel, d'eau de Garonne et d'eau d'effluent de sortie de STEP que ce soit dans les extraits bruts ou dans les extraits dilué au dixième. Seuls l'extrait brut des eaux d'effluent d'entrée de STEP a engendré une modification de ces 3 critères ; cependant, lorsque l'extrait est dilué par 10 dans le solvant d'injection, il n'y a plus d'effet de la matrice sur ces 3 paramètres.

Pour le quatrième critère, le bruit de fond, une augmentation de la hauteur du bruit est observée dans les extraits bruts des matrices de plus en plus chargées. Cependant, lorsque les extraits sont de nouveau dilués au dixième avec le solvant d'injection, la hauteur moyenne du bruit de fond est indépendante de la matrice.

Les résultats d'Aminot (2013) montrent bien que la dilution 1/10 des extraits de matrices chargés permet de minimiser les effets de matrice.

1.3. Application sur la Jalle de Blanquefort et discussion

La description de la Jalle de Blanquefort et la localisation des points de prélèvements ont été présentées dans le **Chapitre 2. Section 3.3**.

Sur les 47 psychotropes étudiés, plus de la moitié sont quantifiés dans l'ensemble des échantillons analysés (**Figure III-4**) et 9 molécules ne sont jamais détectées : Clonazépam, Diazépam, Flunitrazépam, Tianeptine, Doxépine, Norfluoxétine, Chlorpromazine, Pimozide et Buspirone.

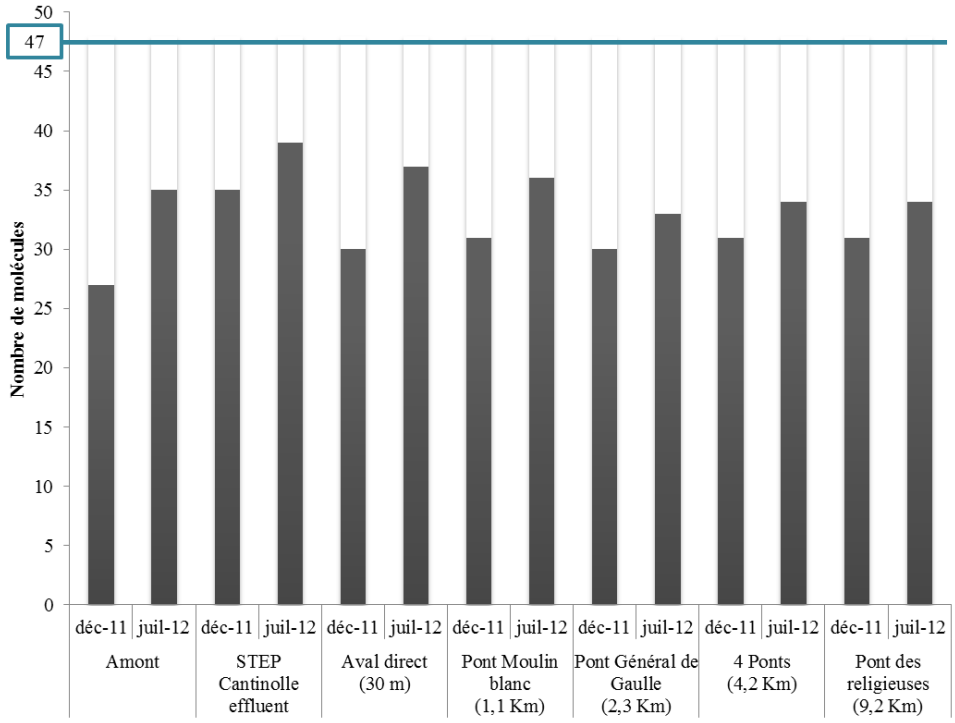


Figure III-7. Nombre de molécules quantifiées par sites et par campagne de prélèvements.

La **Figure III-7** montre que dans les échantillons du site en amont de la STEP, 27 et 35 composés sont respectivement quantifiés en décembre 2011 et juillet 2012. Cette observation montre qu'il existe un apport en psychotrope de l'amont de la rivière en plus des rejets de la STEP Cantinolle (Aminot et *al*., 2015).

Sur les 47 molécules analysées dans ce travail, 6 n'ont jamais été étudiées dans la littérature et 19 sont peu, voire pas détectées dans les publications trouvées (**Chapitre 2. Section 1.3**).
Le **Tableau III-10** présente les concentrations minimales et maximales détectées dans la Jalle de Blanquefort et dans la STEP Cantinolle pour ces 24 composés.

Tableau III-10. Concentrations maximales et minimales retrouvées dans la Jalle de Blanquefort et dans la STEP de Cantinolle pour les 22 composés peu ou pas étudiés dans la littérature.

	Composés	Concentration dans effluent de STEP ($ng.L^{-1}$)		Concentration dans l'eau de surface ($ng.L^{-1}$)	
		Min	Max	Min	Max
6 composés jamais étudiés	Zopiclone	40,4	47,9	3,2	14,1
	Amoxapine	-	-	1,4	4,7
	Cyamémazine	7,3	7,7	0,5	3,2
	Pimozide	-	-	-	-
	Valpromide	29,7	32,2	0,7	7,0
	Buspirone	-	-	-	-
19 composés peu voire pas détectés	Zolpidem	3,3	7,0	0,2	2,0
	Clobazam	-	1,8	-	-
	Clonazépam	-	-	-	-
	Clorazépate	14,9	20,3	0,7	3,5
	Flubitrazépam	-	-	-	-
	Prazépam	3,3	4,7	0,5	1,3
	Milnacipran	95,0	101,0	1,7	24,8
	Miansérine	6,3	10,2	0,7	12,3
	Tianeptine	-	-	-	-
	Maprotiline	-	-	1,2	5,5
	Duloxétine	-	2,7	1,1	2,9
	Clomipramine	1,9	6,8	0,1	1,6
	Sulpiride	76,0	116,3	1,1	22,2
	Chlorpromazine	-	-	-	-
	Tiapride	68,7	82,0	0,3	18,1
	Amisulpride	903,8	914,1	3,8	206,3
	Lévétiracétam	44,6	100,9	1,3	15,9
	Lamotrigine	469,6	1020,6	11,3	221,0
	Hydroxyzine	2,2	7,1	0,5	2,2

Sur les 6 composés jamais étudiés, 3 (Zopiclone, Cyamémazine et Valpromide) sont détectés dans la STEP Cantinolle et 4 (Zopiclone, Amoxapine, Cyamémazine et Valpromide) dans la Jalle de Blanquefort. Dans l'effluent de sortie de STEP et dans le milieu, le psychotrope de ce groupe ayant les concentrations les plus élevées est le Zopiclone.

Sur les 19 composés peu ou pas détectés, 14 sont détectés en sortie de STEP (Zolpidem, Clobazam, Clorazépate, Prazépam, Milnacipran, Miansérine, Duloxétine, Clomipramine, Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Lévétiracétam, Lamotrigine et Hydroxyzine) et 14 dans l'eau de surface (Zolpidem, Clorazépate, Prazépam, Milnacipran, Miansérine, Maprotiline, Duloxétine, Clomipramine, Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Lévétiracétam, Lamotrigine et Hydroxyzine). Le psychotrope dans ce groupe ayant les concentrations les plus élevées est la Lamotrigine avec 1020,6 $ng.L^{-1}$ dans l'effluent de STEP et 221,0 $ng.L^{-1}$ dans la Jalle Blanquefort.

Le **Tableau III-11** présente les concentrations pour les psychotropes quantifiés lors des 2 campagnes de prélèvements sur la Jalle de Blanquefort.

Tableau III-11. Concentrations des composés quantifiés lors des 2 campagnes de prélèvements dans la Jalle de Blanquefort.

	Amont		Sortie STEP Cantinolle		Aval		Pont Moulin blanc		Pont Général de Gaulle		4 Ponts		Pont des religieuses	
Campagnes	déc-11	juil-12	déc-11	juil-12	déc-11	juil-12	déc-11	juil-12	déc-11	juil-12	déc-11	juil-12	déc-11	juil-12
	Conc. ($ng.L^{-1}$)													
Benzodiazépines														
Zopiclone	<LQM	<LQM	47,9	40,4	5,5	3,2	10,2	<LQM	13,5	3,2	14,1	3,4	10,2	<LDM
Zolpidem	<LDM	0,4	7,0	3,3	<LDM	0,8	2,0	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,2
Nordiazépam	<LQM	<LDM	9,8	14,9	1,0	4,1	2,10	1,8	1,4	3,7	1,8	3,3	1,5	2,7
Oxazépam	22,1	25,4	972	1296	119,2	317,1	149,3	131,8	152,3	286,3	180,4	265,4	139,1	152,1
Alprazolam	<LDM	<LDM	<LQM	7,3	<LDM	<LQM	<LDM	<LQM	<LDM	3,1	<LDM	<LQM	<LDM	<LDM
Bromazépam	<LDM	<LDM	<LQM	18,6	<LDM	6,5	<LDM	1,8	<LDM	<LDM	<LDM	3,2	<LDM	<LQM
Clobazam	<LDM	<LDM	<LDM	1,8	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Clonazépam	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Clorazepate	1,0	0,7	14,9	20,3	0,7	3,3	0,9	1,7	2,4	3,5	1,7	3,2	1,3	2,5
Diazépam	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Lorazépam	48,7	18,0	29,6	24,9	39,5	42,4	31,4	10,5	74,9	31,4	51,7	29,5	47,8	57,6
Flunitrazépam	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Témazépam	<LDM	<LDM	10,4	20,9	2,3	2,6	3,0	1,8	4,1	4,7	4,5	4,4	2,2	2,5
Prazépam	<LQM	<LQM	3,3	4,7	0,6	0,7	0,8	0,5	0,9	1,2	0,9	0,6	1,3	0,5
Antidépresseurs														
Mirtazapine	3,2	2,1	12,3	7,4	8,0	5,4	1,2	1,7	4,8	1,4	3,8	2,7	3,5	3,2
Milnacipran	1,7	3,5	95,0	101,0	11,2	24,8	5,4	8,4	5,9	9,0	7,4	17,2	5,7	10,6
Venlafaxine	4,0	5,6	317,5	297,6	39,4	83,8	16,8	20,4	16,4	24,8	22,1	44,4	16,1	27,8
Miansérine	<LQM	5,0	10,2	6,3	12,3	3,0	1,3	2,9	0,7	1,2	1,1	<LDM	<LQM	<LDM
Amoxapine	<LDM	4,7	<LDM	<LDM	<LDM	1,5	<LDM	<LQM	<LDM	<LDM	<LDM	1,4	<LDM	<LQM
Citalopram	1,3	3,4	99,2	115,1	15,5	23,7	11,6	7,2	7,0	7,9	14,4	8,6	11,9	4,5
Tianeptine	<LDM	<LQM	<LDM	<LQM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Paroxétine	<LQM	2,7	4,9	9,5	1,6	3,4	4,4	2,0	<LDM	1,5	1,8	<LDM	3,5	<MDL
Imipramine	<LQM	2,6	1,1	0,7	0,3	0,7	0,2	0,2	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM
Maprotiline	<LDM	5,5	<LDM	<LQM	<LDM	1,8	<LDM	4,6	<LDM	1,2	<LDM	3,8	<LDM	4,6
Duloxétine	<LDM	2,9	<LDM	2,7	<LDM	1,1	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Amitriptyline	<LQM	2,5	20,0	22,0	3,4	6,9	3,4	3,5	2,1	2,7	4,0	2,6	3,1	2,0
Fluoxétine	<LDM	<LDM	21,3	19,0	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Sertraline	<LDM	<LDM	8,9	6,6	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Doxépine	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Norfluoxétine	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Clomipramine	0,2	1,1	1,9	6,8	0,8	1,6	0,6	0,9	0,1	0,3	0,4	0,4	0,4	<LDM
Antipsychotiques - Neuroleptiques														
Sulpiride	1,1	2,0	116,3	76	11,9	22,2	5,5	6,1	7,3	8,7	7,6	15,3	5,2	12,6
Cyamémazine	<LDM	3,2	7,3	7,7	0,5	0,8	0,7	0,5	0,6	0,8	1,1	0,5	0,8	0,5
Chlorpromazine	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Tiapride	0,3	2,1	82	68,7	9,8	18,1	2,9	4,7	3,9	6,9	4,6	13,9	2,7	10,3
Amisulpride	3,8	3,9	903,8	914,1	97,0	206,3	37,9	59,0	39,4	79,9	53,7	137,4	41,4	70,0
Pimozide	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Antiépileptiques														
Gabapentine	206,7	143	4267,5	5918,8	472,5	668,2	338,8	505,8	437,9	839,7	452,5	1157,9	311,2	449,7
Valpromide	4,1	5,4	29,7	32,2	0,7	5,9	6,2	5,6	6,3	6,0	5,6	7,0	2,7	5,0
Carbamazépine	12,6	16	758	1121,5	83,3	181,4	112,2	75,3	99,9	174,6	145,2	145,5	107,1	96,7
Lévétiracetam	1,3	4,4	44,6	100,9	4,6	4,3	5,3	3,0	2,9	12,9	6,3	15,9	3,2	2,5
Lamotrigine	16,3	11,3	469,6	1020,6	52,1	146,8	158,2	49,7	221	174,2	160,2	142,2	110,4	73,2
Primidone	0,5	0,9	41,8	91,4	4,6	15,8	8,1	6,8	7,1	12,1	5,7	18,3	5,7	4,2
Anxiolytiques														
Méprobamate	33,8	49,5	301,8	119,6	49,1	61,4	63,8	39,3	71,9	54,7	70	49,3	63,5	52,8
Buspirone	<LDM	<LQM	<LDM	<LDM	<LDM	<LQM	<LDM	<LQM	<LDM	<LDM	<LDM	<LQM	<LDM	<LDM
Hydroxyzine	<LQM	2,2	7,1	2,2	1,2	0,7	0,7	0,5	<LQM	<LQM	0,8	<LQM	0,5	<LQM
Substitues aux opiacés														
Méthadone	<LQM	2,3	8,4	7,1	1,7	2,3	0,8	0,5	<LQM	0,7	1,0	0,8	0,5	0,7

Les concentrations quantifiées pour l'ensemble des molécules retrouvées sont en accord avec la littérature (Lajeunesse et *al*., 2012 ; Ratola et *al*., 2012 ; Racamonde et *al*., 2014) et particulièrement avec l'étude d'Aminot et *al*. (2015) qui a été faite sur le même site d'étude et sur des molécules communes.

Sur la totalité des molécules et des échantillons analysés, la concentration maximale obtenue dans les effluents de la STEP Cantinolle est pour la Gabapentine avec 5918,8 ng.L^{-1} (en juillet 2012) et la concentration maximale dans le milieu est aussi pour la Gabapentine avec 1157,9 ng.L^{-1} au site « 4 ponts » (en juillet 2012) (**Figure III-8**).

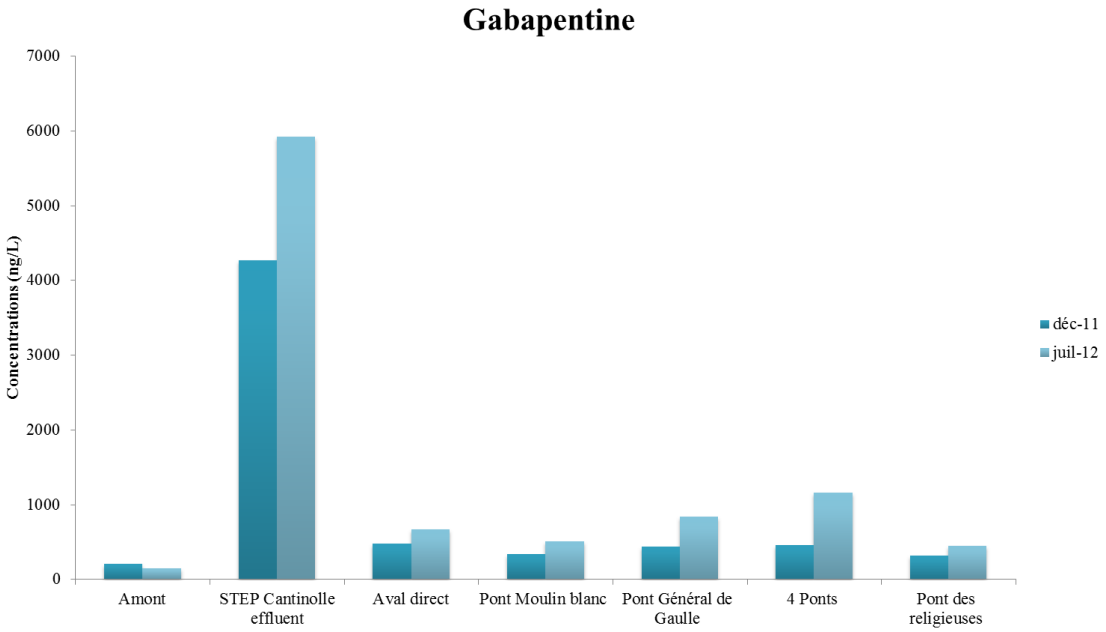


Figure III-8. Concentrations de la Gabapentine quantifiées dans la STEP Cantinolle et la Jalle de Blanquefort en décembre 2011 et juillet 2012.

La concentration minimale détectée dans les effluents de la STEP Cantinolle est pour l'Imipramine avec 0,7 ng.L^{-1} (en juillet 2012) et la concentration minimale dans le milieu est pour la Clomipramine avec 0,1 ng.L^{-1} au site « Pont Général de Gaulle » (en décembre 2011).

De façon générale, le nombre de composés et les concentrations sont plus élevés en été 2012 qu'en hiver 2011. Ceci est corrélé au débit de la Jalle de Blanquefort qui est plus faible en été. Effectivement à cette époque de l'année, cette petite rivière est presque à sec, ce qui explique l'augmentation des concentrations en juillet 2011.

Dans cette étude sur la Jalle de Blanquefort, nous avons aussi constaté que le retrait de la mise sur le marché du Méprobamate en Avril 2012 (Décision, 2012) était observable sur les niveaux de concentrations de cette molécule en sortie de STEP et dans la rivière (**Figure III-9**). Effectivement une diminution des concentrations est observable en juillet 2012 par rapport à celles mesurées en décembre 2011 (conc. en sortie de STEP en décembre 2011 : 301,76 ng.L^{-1} ; conc. en sortie de STEP en juillet 2012 : 119,58 ng.L^{-1}).

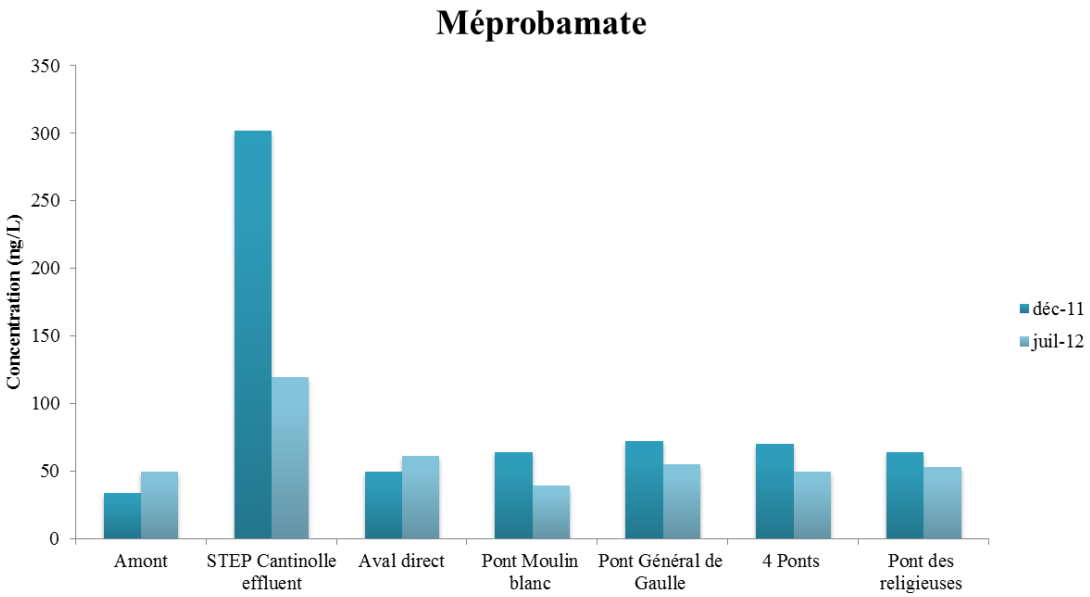


Figure III-9. Concentrations du Méprobamate quantifiées dans la STEP Cantinolle et la Jalle de Blanquefort en décembre 2011 et juillet 2012.

Pour conclure, ce travail a permis de mettre en place une méthode multi-résidus permettant de quantifier 47 psychotropes dans différents échantillons d'eau (STEP et environnement). Cette méthode n'utilise qu'une extraction sur cartouches Oasis MCX, suivie d'une analyse sur UPLC-MS/MS la rendant rapide et sensible. De plus, cette sensibilité permet de détecter des composés à l'état de trace dans le milieu (quelques $ng.L^{-1}$).
Cette étude a aussi permis de retrouver des molécules qui n'avaient jamais été étudiées comme le Valpromide, la Cyamémazine ou encore le Zopiclone. Mais aussi de quantifier à des concentrations non négligeables des composés peu étudiés comme l'Amisulpride ou la Lamotrigine.

Pour finir nous avons trouvé pour la première fois en France la Gabapentine qui est un antiépileptique quantifié à des concentrations plus importantes que la Carbamazépine. Nos résultats sont en accord avec l'étude de Kasprzyk-Hordern et *al*. (2009) qui détecte ce composé dans des effluents urbains du sud-ouest du Royaume-Uni, à des concentrations comprises entre 2592 et 15747 $ng.L^{-1}$.

La Gabapentine est un antiépileptique, l'un des psychotropes les plus consommé en France (680 mg/an/hab en 2012 et 723 mg/an/hab en 2015) avec le Lévétiracétam et la Carbamazépine. La forte consommation de la Gabapentine peut être expliquée par sa multiple utilisation en traitement seul ou en complément d'autre traitement, pour : l'épilepsie, les douleurs neuropathiques, les zona, les migraines ou encore les bouffées de chaleur lors de la ménopause (Loprinzi et *al*., 2007 ; Toulis et *al*., 2009 ;Vukovic et *al*., 2009). Ce psychotrope est aussi utilisé lors de traitement pour le cancer du sein (Pandya et *al*., 2005 ; Bordeleau et *al*., 2010) et en prise unique en préopératoire pour réduire l'anxiété avant une opération et pour limiter l'intensité de la douleur et donc la consommation d'opioïde ou d'analgésique en postopératoire (Bossard et Bouhassira, 2006 ; Roosebeke, 2014).

2. Développement d'une méthode d'échantillonnage pour les psychotropes : le POCIS.

2.1. Introduction

Depuis quelques années, plusieurs échantillonneurs passifs ont été mis en place afin d'évaluer la contamination du milieu aquatique en composés organiques et inorganiques. Ces outils ont été développés afin d'abaisser les seuils de détection des polluants mais aussi pour obtenir une concentration moyenne pondérée par le temps des contaminants.
Parmi ces dispositifs, il existe le POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) qui est généralement utilisé pour les molécules hydrophiles (log Kow entre 1 et 4) comme les médicaments et certains pesticides comme les triazines (Alvarez et *al*., 2005 ; Vrana et *al*., 2005 ; Mazzella et *al*., 2007 ; Togola & Budzinski, 2007 ; Miège et *al*., 2012). Le caractère intégratif du POCIS lui permet de détecter des composés présents à des concentrations inférieures aux limites de détection obtenues par prélèvements ponctuels (Petty et *al*., 2004 ; Alvarez et *al*., 2005). Même si cet outil est souvent utilisé à des fins qualitatives, il peut aussi être employé pour quantifier la contamination du milieu d'exposition. Pour cela, un paramètre important est nécessaire, le taux d'échantillonnage qui est obtenu lors de calibrations en laboratoire et/ou sur le terrain et selon l'équation suivante :

$$R_s = \frac{C_{POCIS} \times m_{POCIS}}{C_{eau} \times t} \qquad \textbf{Equation 5}$$

Où R_s : taux d'échantillonnage ($L.j^{-1}$) ; C_{POCIS} : concentration du composé dans le POCIS à un temps donné ($\mu g.g^{-1}$) ; m_{POCIS} : masse de phase réceptrice présente dans le POCIS (g) ; C_{eau} : concentration du composé dans l'eau ($ng.L^{-1}$) ; t : temps (j).

Cependant cet élément peut être affecté par les variations d'exposition expérimentales et environnementales (débit, température, salinité, biofouling, etc…) (Huckins et *al*., 1999 ; Mazzella et *al*., 2010). Ainsi des composés de référence et de performance communément appelés PRC sont ajoutés à la phase réceptrice contenue dans les POCIS avant exposition (Huckins et *al*., 2002). La dissipation des PRC et l'accumulation des contaminants sont alors théoriquement affectées de la même façon par les conditions d'exposition, ce qui permet de corriger les R_s selon les équations ci-dessous, et de pallier les différentes fluctuations.

$$K_{e\ PRC} = \frac{\ln\left(C_{PRC\ 0} \middle| C_{PRC\ (t)}\right)}{t} \qquad \textbf{Equation 6}$$

Où $K_{e\ PRC}$: constante d'élimination du PRC ; C_{PRC0} : concentration du PRC à t=0 ($\mu g.g^{-1}$) ; $C_{PRC(t)}$: concentration du PRC à un temps donné ($\mu g.g^{-1}$).

$$R_{s\ \text{corrigé}} = R_{s\ \text{labo}} \times \left(\frac{K_{e\ in\ situ}}{K_{e\ labo}}\right)$$ **Equation 7**

Où $R_{s\ labo}$: taux d'échantillonnage estimé en laboratoire ; $R_{s\ corrigé}$: taux d'échantillonnage corrigé ; $K_{e\ labo}$: constante d'élimination du PRC en laboratoire ; $K_{e\ in\ situ}$: constante d'élimination du PRC sur le terrain.

In fine une concentration moyenne pondérée par le temps des contaminants peut être obtenue à partir de l'équation suivante :

$$C_{eau} = \frac{C_{POCIS} \times m_{POCIS}}{R_{s\ \text{corrigé}} \times t}$$ **Equation 8**

La famille des psychotropes est de plus en plus étudiée car sa consommation ne diminue pas, surtout pour les classes des antidépresseurs, des anxiolytiques et des benzodiazépines.
De plus, peu d'études ont été menées sur l'utilisation du POCIS pour détecter les psychotropes (Togola et Budzinski, 2007 ; Belles, 2012 ; Aminot, 2013 ; Brieudes, 2014 ; Fedorova et *al.*, 2014).
Ainsi, la seconde partie de ces travaux de recherche a consisté à calibrer le POCIS afin de qualifier et quantifier la contamination en psychotropes dans les eaux de surface.
Les objectifs de cette étude étaient de :

- calibrer le POCIS en laboratoire afin d'obtenir des taux d'échantillonnage (calibration décrite dans le **Chapitre 2. Section 4.3.1**).
- calibrer le POCIS sur le terrain afin d'essayer de corriger les R_s obtenus en laboratoire (calibration décrite dans le **Chapitre 2. Section 4.3.2**) mais aussi de vérifier l'adéquation entre les concentrations moyennes données par les POCIS et celles obtenues par échantillonnage ponctuel.
- utiliser les PRC pour corriger les R_s obtenus lors des calibrations.
- appliquer le POCIS sur la Jalle de Blanquefort pour examiner la concentration en psychotropes sur 28 jours d'exposition (prélèvement décrit dans le **Chapitre 2. Section 3.3 b**).

Le protocole d'extraction des POCIS est décrit dans le **Chapitre 2.Section 4.4**.

Le **Tableau III-12** présente la liste des composés qui ont été étudiés lors des différentes calibrations et le log Kow de chaque molécule.

Tableau III-12. Liste des psychotropes calibrés avec les POCIS et leur log Kow.

Composés	N° CAS	Log Kow	Composés	N° CAS	Log Kow
Zopiclone	43200-80-2	0,81	Maprotiline	10262-69-8	4,37
Nordiazépam	1088-11-5	3,21	Duloxétine	136434-34-9	4,2
Oxazépam	604-75-1	2,92	Amitriptyline	50-48-6	4,81
Alprazolam	28981-97-7	2,37	Fluoxétine	54910-89-3	4,17
Bromazépam	1812-30-2	2,54	Doxépine	1668-19-5	3,84
Clobazam	22316-47-8	2,55	Clomipramine	303-49-1	4,88
Clonazépam	1622-61-3	3,15	Sulpiride	15676-16-1	0,22
Clorazépate	23887-31-2	3,21	Cyamémazine	3546-03-0	4,27
Diazépam	439-14-5	3,08	Tiapride	51012-32-2	0,53
Lorazépam	846-49-1	3,53	Amisulpride	53583-79-2	0,25
Flunitrazépam	1622-62-4	2,55	Pimozide	2062-78-4	5,83
Témazépam	846-50-4	2,79	Gabapentine	60142-96-3	-1,3
Prazépam	2955-38-6	3,86	Valpromide	2430-27-5	1,99
Mirtazapine	61337-67-5	3,21	Carbamazépine	298-46-4	2,77
Milnacipran	92623-85-3	1,42	Lévétiracétam	102767-28-2	-0,6
Venlafaxine	93413-69-5	2,74	Lamotrigine	84057-84-1	1,93
Miansérine	24219-97-4	3,83	Primidone	125-33-7	1,12
Amoxapine	14028-44-5	3,08	Méprobamate	57-53-4	0,93
Citalopram	59729-33-8	3,76	Buspirone	36505-84-7	1,78
Tianeptine	66981-73-5	1,53	Hydroxyzine	68-88-2	3,41
Paroxétine	61869-08-7	3,15	Méthadone	76-99-3	5,01
Imipramine	50-49-7	4,28			

2.2. Contrôle qualité

Le contrôle qualité s'effectue par l'évaluation des rendements de quantification pour chacun des composés étudiés avec les POCIS. Ces rendements sont obtenus à partir d'un extrait de POCIS dopé artificiellement à une concentration connue. Les rendement de quantification sont exprimés en % et sont déterminés en comparant la concentration obtenue calculée à la concentration initiale calculée.
Ce contrôle est aussi effectué par l'examen des limites de détection et de quantification méthodologique (LDM et LQM) calculées à partir des extraits de POCIS.

Ces paramètres sont obtenus en dopant directement en composés d'intérêts la phase réceptrice du POCIS, contenue dans une cartouche en verre entre 2 frittés. Les étalons internes choisis sont quant à eux introduits directement dans le flacon d'élution.

Le **Tableau III-13** présente les données des rendements de quantification, des limites de détection et de quantification des composés étudiés avec les POCIS.

Sur l'ensemble des molécules étudiées, 25 ont des rendements d'extraction compris entre 70 et 120% (**Figure III-10**). L'utilisation de 7 étalons internes pour les 43 molécules étudiées avec le POCIS peut expliquer que certains d'entre eux aient des rendements de quantification inférieurs à 70% et supérieurs à 120%. De plus, l'hydrophilie de certains composés avec des coefficients

de partage octanol/eau inférieurs à 0 et aux alentours de 1 peuvent aussi expliquer les faibles rendements de quantification.

La Gabapentine et le Lévétiracétam ont été mis dans les calibrations laboratoires et ont été détectés sur le terrain (échantillon ponctuel), cependant ils n'ont jamais été accumulés par les POCIS. Ce phénomène est sûrement en lien avec leur très faible log Kow (inférieur à 0) et leur très faible volume de fuite. Ainsi aucune donnée de R_s n'a pu être générée pour ces deux composés.

Tableau III-13. Rendements de quantification et limites de détection et de quantification des composés étudiés.

Classes thérapeutiques	Composés	Rendement de quantification % (± E-T) (n=24)	LDM ($ng.g^{-1}$)	LQM ($ng.g^{-1}$)
Benzodiazépines	Zopiclone	97 ± 24	0,17	0,55
	Nordiazépam	62 ± 14	0,01	0,04
	Oxazépam	81 ± 7	0,01	0,04
	Alprazolam	78 ± 18	0,05	0,16
	Bromazépam	85 ± 14	0,12	0,40
	Clobazam	95 ± 39	0,03	0,10
	Clonazépam	73 ± 17	0,06	0,20
	Clorazépate	72 ± 17	0,005	0,02
	Diazépam	88 ± 10	0,04	0,12
	Lorazépam	71 ± 33	0,10	0,32
	Flunitrazépam	84 ± 6	0,01	0,04
	Témazépam	87 ± 13	0,06	0,20
	Prazépam	83 ± 12	0,004	0,01
Antidépresseurs	Mirtazapine	47 ± 16	0,04	0,12
	Milnacipran	31 ± 13	0,01	0,04
	Venlafaxine	99 ± 31	0,01	0,04
	Miansérine	37 ± 18	0,04	0,15
	Amoxapine	35 ± 15	0,03	0,11
	Citalopram	74 ± 13	0,02	0,08
	Tianeptine	30 ± 13	0,02	0,05
	Paroxétine	55 ± 16	0,02	0,08
	Imipramine	89 ± 14	0,01	0,04
	Maprotiline	32 ± 10	0,01	0,02
	Duloxetine	113 ± 64	0,05	0,15
	Amitriptyline	68 ± 22	0,02	0,07
	Fluoxétine	102 ± 32	0,19	0,65
	Doxépine	63 ± 13	0,02	0,08
	Clomipramine	92 ± 15	0,02	0,08
Antipsychotiques - Neuroleptiques	Sulpiride	62 ± 35	0,002	0,01
	Cyamémazine	54 ± 16	0,002	0,01
	Tiapride	71 ± 43	0,01	0,02
	Amisulpuride	66 ± 35	0,01	0,03
	Pimozide	83 ± 5	0,11	0,35
Antiépileptiques	Gabapentine	40 ± 31	0,16	0,52
	Valpromide	55 ± 19	0,01	0,04
	Carbamazépine	103 ± 15	0,01	0,03
	Lévétiracétam	88 ± 7	0,07	0,23
	Lamotrigine	142 ± 59	0,08	0,27
	Primidone	95 ± 45	0,01	0,04
Anxiolytiques	Méprobamate	110 ± 24	0,20	0,66
	Buspirone	60 ± 37	0,004	0,01
	Hydroxyzine	62 ± 6	0,03	0,09
Substituts aux opiacés	Méthadone	87 ± 16	0,01	0,02

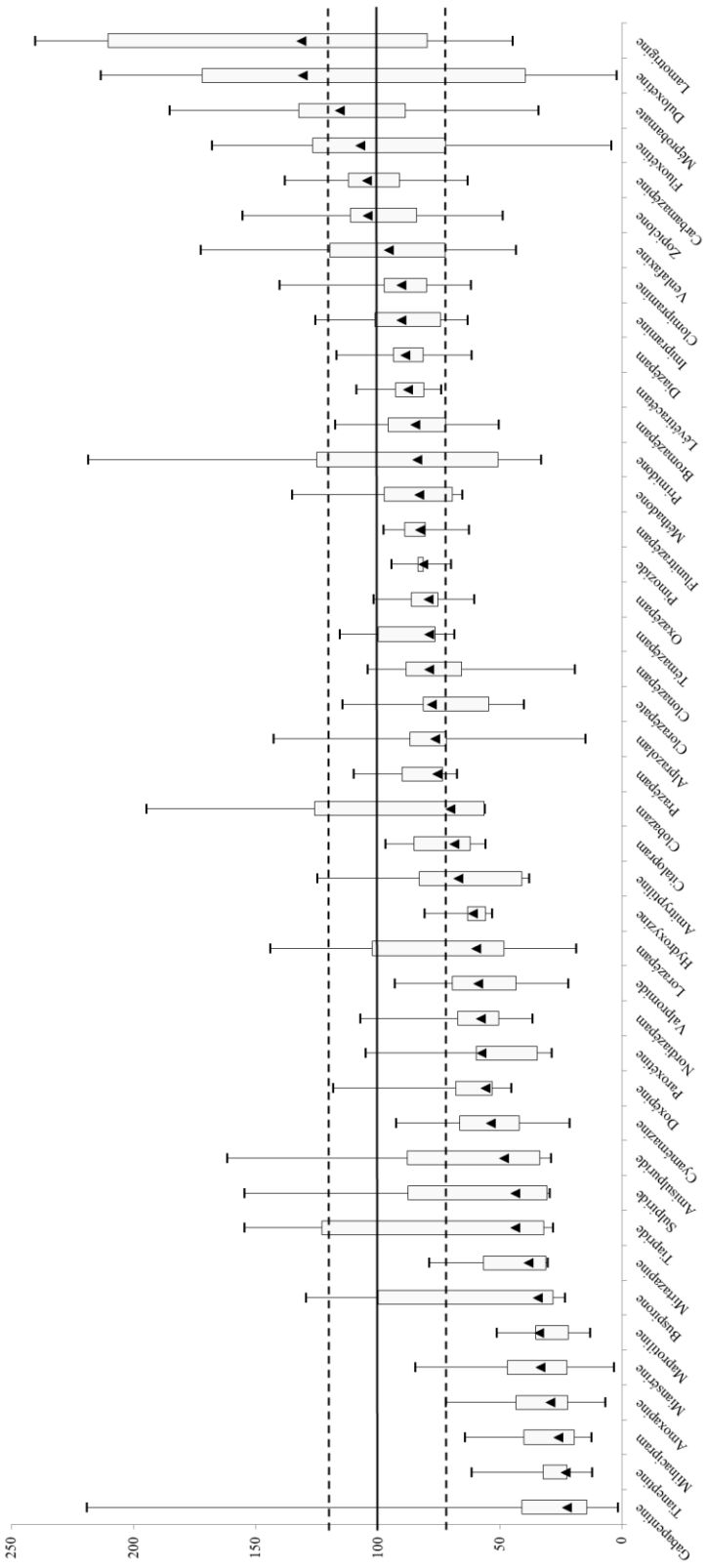


Figure III-10. Rendements (%) des 43 psychotropes obtenus pour l'ensemble des analyses de ces travaux de thèse avec une quantification par étalonnage interne (*n=24*).

Les limites de détection méthodologiques sont comprises entre 0,002 et 0,20 ng.g^{-1} et les limites de quantification méthodologiques sont comprises entre 0,01 et 0,66 ng.g^{-1}. Sur les 41 molécules étudiées, 25 ont une LQM inférieure à 0,1 ng.g^{-1}, 14 ont une LQM comprise entre 0,1 et 0,5 ng.g^{-1} et 4 ont une LQM supérieure à 0,5 ng.g^{-1}. Les psychotropes qui ont la limite de quantification méthodologique la plus basse avec 0,01 ng.g^{-1} sont le Sulpiride, le Buspirone, la Cyamémazine et le Prazépam. La limite de quantification méthodologique la plus élevée est celle du Méprobamate avec 0,66 ng.g^{-1}.

Les limites de quantification atteintes par les POCIS exprimées en ng.g^{-1} de phase peuvent être extrapolées en une LQ en ng.L^{-1} en utilisant la formule suivante :

$$LQ_{extrapolée} = \frac{LQ_{POCIS} \times m_{Phase}}{R_s \times t} \qquad \textbf{Equation 13}$$

Où $LQ_{extrapolée}$: limite de quantification extrapolée (ng.L^{-1}) ; LQ_{Phase} : limite de quantification obtenue avec le POCIS (ng.g^{-1}) ; m_{Phase} : masse de phase réceptrice présente dans le POCIS (0,2g) ; Rs : taux d'échantillonnage moyen (L.j^{-1}) ; t : temps d'exposition du POCIS (j).

Le **Tableau III-14** présente les LQ $_{POCIS}$ et les LQ $_{extrapolées}$ pour une exposition de 10 jours et de 30 jours selon les composés (liée au taux d'échantillonnage et au régime d'accumulation de chacun des composés, voir **Tableau III-15**) et les LQ obtenues avec un échantillon d'eau.

La comparaison des LQ obtenues à partir des échantillons d'eau avec les LQ $_{extrapolée}$ en ng.L^{-1}, calculées à partir des LQ POCIS en ng.g^{-1}, montre que le caractère intégratif du POCIS permet d'abaisser les limites de quantification et donc de trouver des composés à l'état de trace dans le milieu aquatique et qui ne peuvent pas être retrouvés par échantillonnage ponctuel (exemples dans le **Tableau III-22**).

Tableau III-14. Limites de quantification POCIS, taux d'échantillonnage (Rs), limites de quantification extrapolée et limites de quantification eau pour les psychotropes étudiés.

Classes thérapeutiques	Composés	LQ $_{POCIS}$ (ng.g^{-1})	R_s (L.j^{-1})		LQ $_{extrapolée}$ (ng.L^{-1})	LQ eau (ng.L^{-1})
Benzodiazépines	Zopiclone	0,55	0,80	(30 j)	0,005	1,9
	Nordiazépam	0,04	0,18	(10 j)	0,004	0,5
	Oxazépam	0,04	0,29	(30 j)	0,001	0,4
	Alprazolam	0,16	0,24	(30 j)	0,004	1,9
	Bromazépam	0,40	0,09	(30 j)	0,029	1,8
	Clobazam	0,10	0,16	(10 j)	0,013	1,1
	Clonazépam	0,20	0,28	(30 j)	0,005	0,7
	Clorazépate	0,02	0,09	(30 j)	0,001	0,3
	Diazépam	0,12	0,14	(30 j)	0,006	0,3
	Lorazépam	0,32	0,17	(10 j)	0,039	1,8
	Flunitrazépam	0,04	0,20	(30 j)	0,001	1,3
	Témazépam	0,20	0,16	(30 j)	0,008	0,4
	Prazépam	0,01	0,12	(30 j)	0,001	0,3
Antidépresseurs	Mirtazapine	0,12	0,13	(30 j)	0,006	0,7
	Milnacipran	0,04	0,03	(30 j)	0,008	0,1
	Venlafaxine	0,04	0,12	(30 j)	0,002	0,2
	Miansérine	0,15	-	-	-	0,8
	Amoxapine	0,11	-	-	-	0,8
	Citalopram	0,08	0,15	(10 j)	0,011	0,4
	Tianeptine	0,05	-	-	-	0,7
	Paroxétine	0,08	0,25	(30 j)	0,002	1,3
	Imipramine	0,04	0,18	(30 j)	0,001	0,2
	Maprotiline	0,02	0,33	(10 j)	0,001	0,5
	Duloxétine	0,15	-	-	-	0,6
	Amitriptyline	0,07	0,19	(30 j)	0,002	1,1
	Fluoxétine	0,65	0,17	(30 j)	0,026	3,2
	Doxépine	0,08	-	-	-	0,5
	Clomipramine	0,08	1,04	(10 j)	0,001	0,1
Antipsychotiques - Neuroleptiques	Sulpiride	0,01	0,15	(30 j)	0,0003	0,1
	Cyamémazine	0,01	0,07	(30 j)	0,001	0,3
	Tiapride	0,02	0,14	(30 j)	0,001	0,2
	Amisulpuride	0,03	0,11	(10 j)	0,006	0,3
	Pimozide	0,35	-	-	-	1,1
Antiépileptiques	Gabapentine	0,52	-	-	-	0,6
	Valpromide	0,04	0,21	(10 j)	0,004	1,2
	Carbamazépine	0,03	0,15	(30 j)	0,001	0,3
	Lévétiracétam	0,23	-	-	-	0,4
	Lamotrigine	0,27	0,11	(10 j)	0,049	3,3
	Primidone	0,04	0,18	(10 j)	0,005	0,5
Anxiolytiques	Méprobamate	0,66	0,17	(30 j)	0,026	2,2
	Buspirone	0,01	0,11	(30 j)	0,001	0,1
	Hydroxyzine	0,09	0,03	(30 j)	0,018	0,4
Substituts aux opiacés	Méthadone	0,02	0,36	(30 j)	0,0005	0,3

2.3. Calibrations en laboratoire et *in situ*

Ces 3 calibrations ont permis d'observer le comportement d'accumulation des psychotropes étudiés dans le POCIS, d'obtenir leur taux d'échantillonnage et les constantes d'élimination pour les 3 PRC utilisés (Caféine 13C, Salbutamol d3 et DIA d5).

2.3.1. Comportement d'accumulation dans le POCIS

Plusieurs profils d'accumulation ont été observés au cours de cette étude (**Figure III-11**) :

1- Accumulation linéaire
2- Accumulation linéaire + point d'inflexion (*burst effect*)
3- Retard d'accumulation (*lag effect*)
4- Accumulation aléatoire ou aucune accumulation

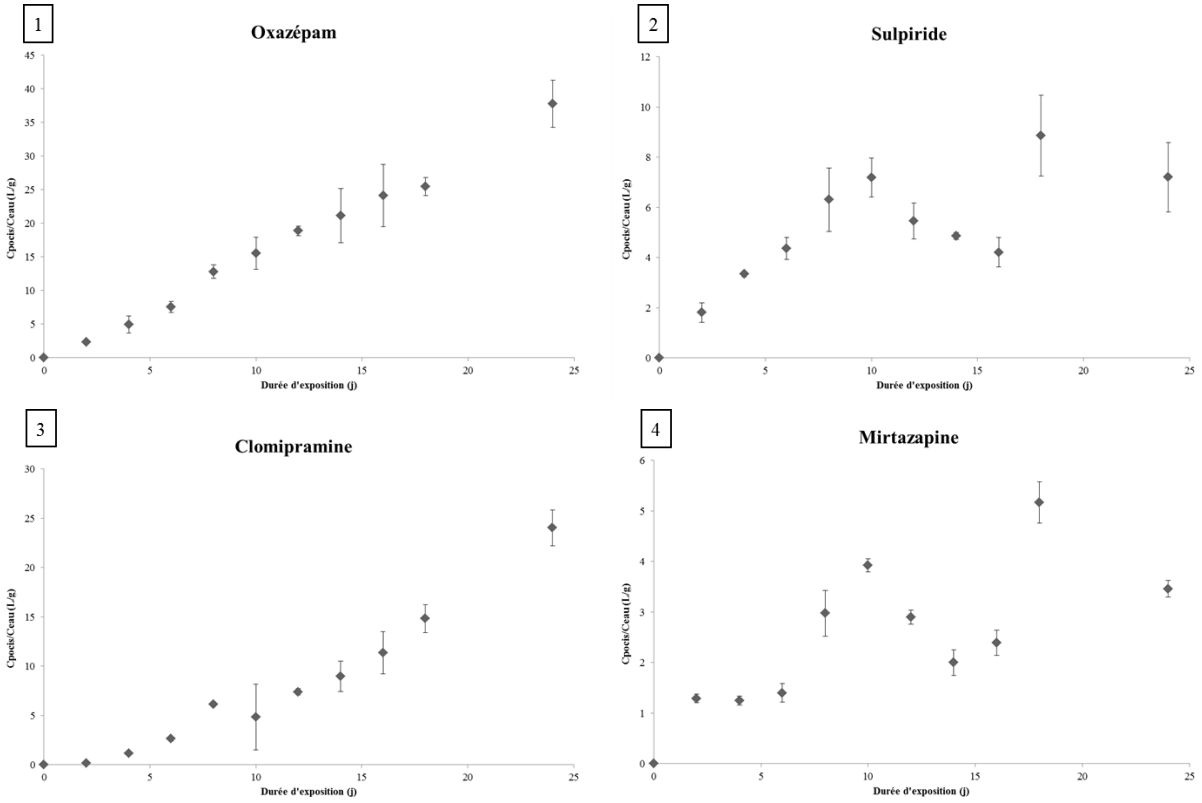


Figure III-11. Exemple des 4 profils (1 : linéaire ; 2 : *brust effect* ; 3 : *lag effect* et 4 : aléatoire) d'accumulation dans les POCIS observé lors dans la calibration laboratoire 1.

Le profil linéaire (ou curvilinéaire) est l'accumulation qui est décrite dans les travaux de thèse d'Alvarez, 1999 et qui suit l'équation suivante :

$$C_{POCIS}(t) = C_{eau} \times \frac{K_u}{K_e} \times (1 - e^{-K_e.t}) \qquad \textbf{Equation 14}$$

Un taux d'échantillonnage peut être alors obtenu pour les molécules qui ont ce type de profil d'accumulation, ainsi une concentration pondérée par le temps peut être évaluée.

Les phénomènes de *burst effect* et d'accumulation aléatoire ont aussi été observés dans les travaux de Belles (2012) et Morin et *al*. (2013). Alvarez, 1999 explique que l'accumulation rapide lors des premiers jours d'exposition du POCIS observée dans le profil *burst effect* serait due à un mouillage initial des membranes et de la phase réceptrice du POCIS en début d'exposition.
Ce profil est généralement observé chez des molécules relativement polaires (log Kow < 3), elles vont avoir une accumulation rapide lors des premiers jours de l'exposition du POCIS (Morin et *al*., 2013). Un taux d'échantillonnage peut être obtenu dans la gamme de temps où il y a une linéarité ($R^2 > 0,9$).
Exemple : un R_s peut être calculé pour la Sulpiride entre 0 et 10 jours d'exposition (**Figure III-11 profil 2**).

Le profil d'accumulation aléatoire de certains composés dans le POCIS ne permet pas de donner un taux d'échantillonnage. Ainsi le POCIS a seulement un caractère qualitatif pour ces molécules (Morin et *al*., 2013).

Enfin, certains composés présentent un retard d'accumulation ou *lag effect* en début d'exposition du POCIS, ce sont généralement des composés hydrophobes avec un log Kow > 3 (Harman et *al*., 2008). Plusieurs études ont montré que ce phénomène était dû à une affinité des composés pour les membranes en PES des POCIS. Ainsi avant d'être accumulées par la phase réceptrice les molécules seraient retenues par les membranes (Lardy-Fontan, 2008 ; Soulier, 2011 ; Harman et *al*., 2012 ; Miège et *al*., 2012 ; Vermeirssen et *al*., 2012 ; Wund, 2013).

Le **Tableau III-15** regroupe tous les comportements des molécules testées lors des calibrations (en laboratoire et sur le terrain) et leurs paramètres cinétiques.

Lors de la calibration laboratoire 1, un problème est survenu au point 30 jours donc la gamme de cinétique s'arrête au 24ème jour. De plus sur les 41 molécules qui ont été étudiées, 2 (Gabapentine et Lévétiracétam) ne se sont pas accumulées dans le POCIS, 15 ont eu une accumulation linéaire sur 24 jours d'exposition, 2 ont eu un retard d'accumulation (*lag effect*), 11 se sont accumulées aléatoirement et 11ont eu un *burst effect*.

Dans la calibration laboratoire 2, 21 molécules ont été étudiées, la Gabapentine et le Lévétiracétam ne se sont pas accumulés dans le POCIS, 4 molécules ont eu un *lag effect*, 8 ont eu une accumulation linéaire suivie d'une inflexion (*burst effect*) et 9 composés ont eu une accumulation linéaire.

Dans la calibration *in situ*, 13 molécules ont été détectées dans le POCIS, 3 ont eu une accumulation linéaire et 10 un *burst effect*.

Tableau III-15. Régime d'accumulation et paramètres cinétiques des composés étudiés dans le POCIS.

Composés	Calibration laboratoire 1					Calibration laboratoire 2					Calibration *in situ*				
	Comportement d'accumulation sur 24j	Gamme de linéarité (j)	R^2	Rs labo ($L.j^{-1}$)	Ke (j^{-1})	$T_{1/2}$ (j)	Comportement d'accumulation sur 20j	Gamme de linéarité (j)	R^2	Rs labo ($L.j^{-1}$)	Ke (j^{-1})	$T_{1/2}$ (j)	Comportement d'accumulation sur 28j	Gamme de linéarité (j)	R^2	Rs *in situ* ($L.j^{-1}$)	Ke (j^{-1})	$T_{1/2}$ (j)
Sulpiride	*Burst effect*	0-10	0,9884	0,15	0,16	4	Linéaire	0-20	0,98	0,15	0,09	8	*Burst effect*	0-10	0,91	0,38	0,13	5
Gabapentine	Ne s'accumule pas dans le POCIS						Ne s'accumule pas dans le POCIS						Ne s'accumule pas dans le POCIS					
Lévétiracétam	Ne s'accumule pas dans le POCIS						Ne s'accumule pas dans le POCIS						Ne s'accumule pas dans le POCIS					
Mirtazapine	Accumulation aléatoire	-	-	-	-	-	Linéaire	0-20	1,00	0,13	0,07	10	*Burst effect*	0-18	0,98	0,04	0,08	8
Tiapride	Accumulation aléatoire	-	-	-	-	-	Linéaire	0-20	0,96	0,14	0,09	8	*Burst effect*	0-10	0,97	0,48	0,13	5
Amisulpiride	Accumulation aléatoire	-	-	-	-	-	*Burst effect*	0-11	1,00	0,11	0,12	6	*Burst effect*	0-10	1,00	0,47	0,13	6
Lamotrigine	*Burst effect*	0-14	0,90	0,11	0,12	6	*Burst effect*	0-11	1,00	0,11	0,12	6	*Burst effect*	0-10	0,92	0,08	0,12	6
Primidone	-	-	-	-	-	-	*Burst effect*	0-11	0,99	0,19	0,12	6	*Burst effect*	0-10	0,98	0,16	0,13	5
Zopiclone	Linéaire	0-24	0,98	0,80	0,09	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Milnacipran	Accumulation aléatoire	-	-	-	-	-	Linéaire	0-20	1,00	0,03	0,07	10	*Burst effect*	0-10	0,99	0,10	0,13	5
Venlafaxine	*Burst effect*	0-8	1,00	0,28	0,20	3	Linéaire	0-20	1,00	0,12	0,07	10	*Burst effect*	0-10	1,00	0,78	0,12	6
Méprobamate	*Burst effect*	0-6	0,99	0,49	0,25	3	*Burst effect*	0-16	0,99	0,23	0,10	7	Linéaire	0-28	0,94	0,07	0,06	11
Valpromide	*Burst effect*	0-12	0,92	0,21	0,14	5	*Burst effect*	0-16	0,97	0,21	0,10	7	*Burst effect*	0-10	0,99	0,05	0,13	6
Buspirone	*Burst effect*	0-10	0,95	0,03	0,18	4	Linéaire	0-20	0,99	0,11	0,08	9	-	-	-	-	-	-
Bromazépam	Linéaire	0-24	0,98	0,09	0,09	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Miansérine	Accumulation aléatoire	-	-	-	-	-	*Lag effect*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amoxapine	*Lag effect*	-	-	-	-	-	*Lag effect*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doxépine	Accumulation aléatoire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citalopram	*Burst effect*	0-10	0,97	0,10	0,17	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tianeptine	Accumulation aléatoire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbamazépine	Linéaire	0-24	0,97	0,15	0,08	8	-	-	-	-	-	-	Linéaire	0-28	0,95	0,12	0,06	12
Paroxétine	Linéaire	0-24	0,93	0,19	0,09	7	Linéaire	0-20	0,97	0,30	0,07	9	-	-	-	-	-	-
Imipramine	Linéaire	0-24	0,95	0,18	0,09	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyamémazine	Linéaire	0-24	0,92	0,07	0,09	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydroxyzine	Linéaire	0-24	0,92	0,03	0,09	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maprotiline	Accumulation aléatoire	-	-	-	-	-	*Burst effect*	0-11	1,00	0,33	0,12	6	-	-	-	-	-	-
Duloxetine	Accumulation aléatoire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorazépate	Linéaire	0-24	0,91	0,09	0,08	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nordiazépam	*Burst effect*	0-18	0,91	0,12	0,10	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amitriptyline	Accumulation aléatoire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxazépam	Linéaire	0-24	0,99	0,30	0,09	8	Linéaire	0-20	0,99	0,29	0,08	9	*Burst effect*	0-10	0,99	0,14	0,12	6
Méthadone	Accumulation aléatoire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clonazépam	Linéaire	0-24	0,93	0,14	0,09	8	Linéaire	0-20	0,99	0,42	0,08	9	-	-	-	-	-	-
Lorazépam	*Burst effect*	0-18	0,92	0,15	0,10	7	*Burst effect*	0-11	1,00	0,18	0,12	6	-	-	-	-	-	-
Fluoxétine	*Burst effect*	0-18	0,94	0,22	0,10	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alprazolam	Linéaire	0-24	0,95	0,25	0,08	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clomipramine	*Lag effect*	-	-	-	-	-	*Burst effect*	0-11	0,97	1,04	0,14	5	-	-	-	-	-	-
Flunitrazépam	Linéaire	0-24	0,99	0,20	0,09	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Témazépam	Linéaire	0-24	0,94	0,16	0,09	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clobazam	*Burst effect*	0-18	0,91	0,16	0,10	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diazépam	Linéaire	0-24	0,99	0,14	0,09	8	*Lag effect*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pimozide	-	-	-	-	-	-	*Lag effect*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prazépam	Linéaire	0-24	0,98	0,12	0,09	8	-	-	-	-	-	-	Linéaire	0-28	1,00	0,05	0,06	11

« - » signifie que les molécules n'ont pas été testées dans les calibrations laboratoire ou qu'elles n'ont pas été détectées dans la calibration *in situ*.

2.3.2. Taux d'échantillonnage

Les taux d'échantillonnage obtenus lors des calibrations en laboratoire et sur le terrain sont présentés dans le **Tableau III-16**.

Les valeurs de $R_{s\ labo}$ obtenues au cours des deux calibrations sont comprises 0,03 et 1,04 $L.j^{-1}$ et sont en accord avec les données trouvées dans la littérature (**Tableau III-15**). De plus, sur les 34 molécules ayant obtenu un taux d'échantillonnage, 17 n'ont jamais été étudiées.

Tableau III-16. Taux d'échantillonnage obtenus en laboratoire, sur le terrain et dans la littérature pour les psychotropes étudiés.

Composés	$R_{s\ labo}$	$R_{s\ in\ situ}$	R_s Réf.	Composés	$R_{s\ labo}$	$R_{s\ in\ situ}$	R_s Réf.
	($L.j^{-1}$)				($L.j^{-1}$)		
Sulpiride	0,15 - 0,15	0,38	-	Maprotiline	0,33	-	-
Mirtazapine	0,13	0,04	-	Clorazépate	0,09	-	-
Tiapride	0,14	0,48	-	Nordiazépam	0,12	-	0,30 (1) 0,16 - 0,22 (5) 0,19 -0,18 (4)
Amisulpuride	0,11	0,47	-				
Lamotrigine	0,11 - 0,11	-	-				
Primidone	0,19	0,16	0,18 - 0,36 (1)	Amitriptyline	0,27	-	0,41 (3) 0,22 - 0,53 (5) 0,25 - 0,25 (1) 0,11 - 0,12 (4)
Zopiclone	0,80	-	-				
Milnacipran	0,03	0,10	-				
Venlafaxine	0,28 - 0,12	0,78	0,23 (2)				
Méprobamate	0,49 - 0,23	0,07	0,10 - 0,24 - 0,37 (1)	Oxazépam	0,30 - 0,29	0,14	0,19 - 0,34 - 0,34 (1) 0,17 (2)
Valpromide	0,21 - 0,21	0,05	-				
Buspirone	0,03 - 0,11	-	-	Clonazépam	0,14 - 0,42	-	0,19 - 0,45 - 0,38 (1)
Bromazépam	0,09	-	0,40 (3) 0,28 (1) 0,03 - 0,18 (4)	Lorazépam	0,15 - 0,18	-	0,18 - 0,37 - 037 (1)
				Fluoxétine	0,22	-	0,24 (3) 0,18 - 0,35 (1) 0,15 (4)
Citalopram	0,10	-	0,37 (2)				
Carbamazépine	0,15	0,12	0,26 (2) 0,33 (3) 0,72 - 0,68 (5) 0,16 - 0,48 (1) 0,09 - 0,14 (2)	Alprazolam	0,25	-	0,50 (3) 0,22 - 0,35 (1) 0,18 - 0,20 (4)
				Clomipramine	1,04	-	-
				Flunitrazépam	0,20	-	-
Paroxétine	0,19 - 0,30	-	0,88 (6)	Témazépam	0,16	-	0,13 - 0,42 (6)
Imipramine	0,18	-	0,35 - 0,56 (5) 0,3 (3) 0,23 - 0,30 (1) 0,08 - 0,18 (4)	Clobazam	0,16	-	-
				Diazépam	0,14	-	0,19 - 0,32 (5) 0,40 (3) 0,18 - 0,25 (1) 0,10 - 0,16 (4)
Cyamémazine	0,07	-	-				
Hydroxyzine	0,03	-	-	Prazépam	0,12	0,05	-

Les « - » signifie qu'aucune donnée n'est disponible. (1) Aminot, 2013, (2) Fedorova et *al*., 2014, (3) Miège et *al*., 2011, (4) Belles, 2012, (5) Togola & Budzinski, 2007 et (6) Macleod et *al*., 2007.

Sur l'ensemble des psychotropes analysés lors de la calibration *in situ*, 19 composés ont été détectés dans les POCIS, 14 dans les échantillons ponctuels et un $R_{s\ in\ situ}$ n'a pu être généré que pour 13 molécules. Ceci peut s'expliquer par la non présence de certains composés dans l'environnement, par la non accumulation d'autres composés dans les POCIS comme la Gabapentine, mais aussi par la non détection de certaines molécules par échantillonnage ponctuel (comme pour les molécules suivantes : Zolpidem, Citalopram, Clorazépate, Nordiazépam, Mé-

thadone et Témazépam). Hors la concentration en composé dans le POCIS et dans l'eau du milieu d'exposition sont nécessaires pour calculer un taux d'échantillonnage.

Des différences de valeurs de R_s sont observées entre les calibrations en laboratoire mais aussi sur le terrain, pouvant aller jusqu'à un facteur 4. Ces fluctuations peuvent être attribuées aux différentes conditions d'expositions expérimentales et environnementales des POCIS (Belles, 2012). Afin de diminuer ces fluctuations, 3 composés de référence et de performance ont été utilisés pour corriger les $R_{s\ labo}$ par l'intermédiaire de leur constante d'élimination.

2.3.3. Constante d'élimination des PRC

La dissipation des 3 PRC étudiés dans ces travaux calibration est présentée dans la **Figure III-12**.

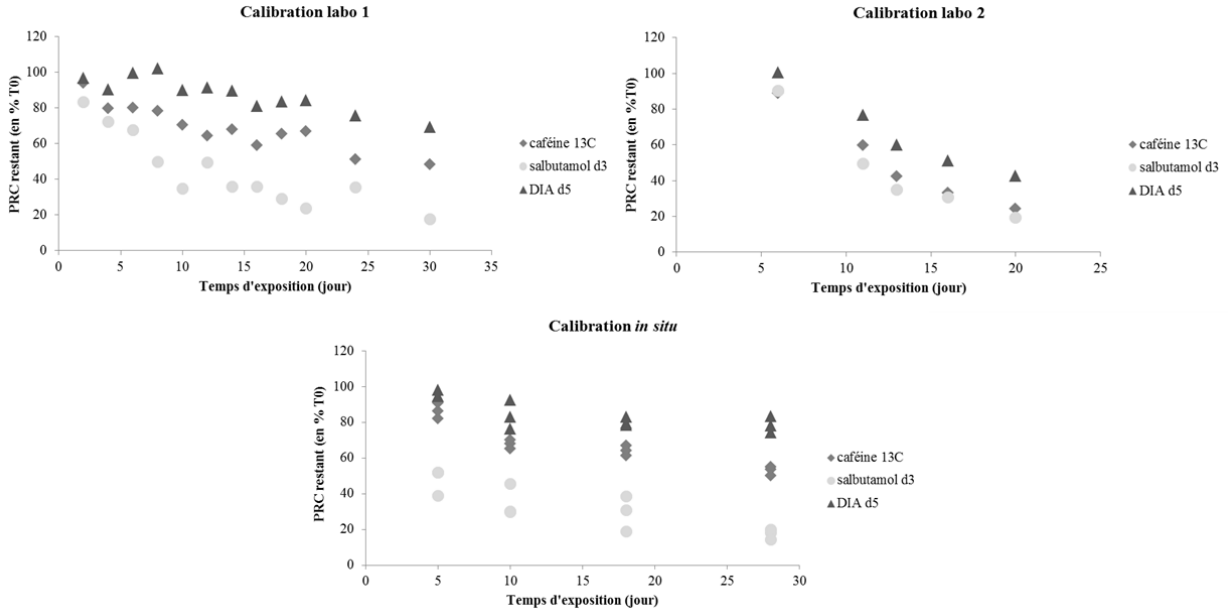


Figure III-12. Dissipation des 3 PRC au cours du temps lors des 3 calibrations.

Le PRC qui se dissipe le plus lentement au cours des 3 calibrations est la DIA d5 et celui qui a la cinétique d'élimination la plus rapide est le Salbutamol d3. Ceci est aussi observable au niveau des constantes d'élimination de chaque PRC (**Tableau III-17**).

Tableau III-17. Constantes d'élimination (Ke) des 3 PRC étudiés lors des 3 calibrations.

Composés PRC	Constante d'élimination (j^{-1})	
	labo	*in situ*
Caféine ^{13}C	0,032 - 0,062	0,025
Salbutamol d3	0,075 - 0,072	0,070
DIA d5	0,010 - 0,036	0,010

Le Salbutamol d3 a une constante d'élimination identique pour les trois calibrations, environ 0,07 j^{-1} alors que les deux autres PRC ont des K_e qui différent en fonction des calibrations. Les différences de K_e entre les calibrations en laboratoire peuvent être expliquées par le montage expérimental et la position des échantillonneurs par rapport au brassage de l'eau.
Néanmoins, les K_e des 3 PRC de la première calibration en laboratoire semblent être dans le même ordre de la grandeur que celles obtenues lors de la calibration *in situ*. Ainsi les PRC se seraient dissipés de la même manière, alors que dans la calibration labo 2, ils se seraient éliminés beaucoup moins rapidement.
Comme les taux d'échantillonnage, les K_e des PRC vont aussi être sensibles aux conditions expérimentales et environnementales, ce qui engendre des fluctuations dans les données.
A travers ces différentes variations, il a été choisi dans cette étude de moyenner pour chaque PRC les constantes d'élimination obtenues lors des deux calibrations en laboratoire mais aussi de compiler les constantes de dissipation des 3 PRC en une valeur unique selon la méthode décrite dans les travaux de Belles (2012) afin de pallier les différents comportements des psychotropes étudiés. Ainsi il est considéré que les constantes d'élimination de la DIA d5, du Salbutamol d3 et de la Caféine 13C ont un lien de proportionnalité qui se décrit de la manière suivante :

$$K_{e\ compilée} = \frac{K_{e\ DIA\ d5} + (a \times K_{e\ caféine\ 13C}) + (b \times K_{e\ salbutamol\ d3})}{3} \qquad \textbf{Equation 15}$$

Où le coefficient ***a*** correspond à la pente de la droite $K_{e\ DIA\ d5} = f(K_{e\ caféine\ 13C})$ et ***b*** à celle de la droite $K_{e\ DIA\ d5} = f(K_{e\ salbutamol\ d3})$.

Le **Tableau III-18** présente les K_e compilées des calibrations labo et *in situ*.

Tableau III-18. Constantes d'élimination compilée des calibrations laboratoire et in situ.

	Calibration labo	Calibration *in situ*
$K_{e\ compilée}$ (j^{-1})	0,033	0,022

Ces constantes d'élimination compilées vont alors servir à calculer les $R_{s\ corrigé}$ qui d'après Mazzella et *al*. (2010) permettront une meilleure estimation de la concentration des composés étudiés dans le milieu qu'avec les $R_{s\ labo}$. Le **Tableau III-19** présente quelques concentrations de psychotropes obtenues avec l'échantillonnage ponctuel (Conc. Eau), estimées avec les $R_{s\ labo}$ (Conc. Estimée avec $R_{s\ labo}$) et avec les $R_{s\ corrigé}$ (Conc. Estimée avec $R_{s\ corrigé}$).

Tableau III-19. Concentrations de quelques psychotropes détectées dans l'eau à Cadaujac, mesurées à partir de l'échantillonnage ponctuel et estimées à partir des POCIS avec les Rs labo et Rs corrigé.

Composés	Conc. Estimée avec Rs labo	Conc. Eau	Conc. Estimée avec Rs corrigé
		ng.L^{-1}	
Sulpiride	4,1 ± 1,2	1,8 ± 0,02	6,1 ± 1,8
Primidone	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Tiapride	28,1 ± 6,4	8,2 ± 0,6	43,8 ± 10
Amisulpuride	28,7 ± 6,7	6,3 ± 1,3	45,1 ± 10,6
Oxazépam	11,7 ± 0,9	22,7 ± 0,7	17,5 ± 1,4
Carbamazépine	15,3 ± 2	11,7 ± 0,1	20,3 ± 2,9
Prazépam	0,08 ± 0	0,15 ± 0,02	0,12 ± 0,01

Ces données montrent que pour certains composés, le taux d'échantillonnage corrigé permet d'estimer une concentration dans l'eau proche de celle mesurée par échantillonnage ponctuel comme le Prazépam, l'Oxazépam ou encore la Primidone. Cependant pour d'autres composés les $R_{s\ corrigé}$ et même les $R_{s\ labo}$ surévaluent la concentration dans l'eau, pouvant aller jusqu'à un facteur 7 comme pour l'Amisulpride. Les 3 composés (Sulpiride, Tiapride et Amisulpride) pour lesquels cet effet est observé sont très polaires (log Kow de 0,22, 0,53 et 0,25, respectivement) et ont un profil de *burst effect* avec une accumulation qui atteint un équilibre au bout de 10 jours d'exposition du POCIS. Le caractère hydrophile de ces composés et leur comportement dans le POCIS permettent de poser des bémols quant à l'utilisation de cet échantillonneur passif pour ces molécules dans une logique quantitative. Le POCIS mériterait de subir des développements supplémentaires sur la phase, les membranes, le temps d'exposition ou encore les PRC afin d'obtenir un outil plus performant pour ce type de molécules. Cependant cet échantillonneur passif a été conçu pour détecter un large spectre de composés le rendant très performant qualitativement mais son utilisation pour du quantitatif doit rester borné aux molécules ayant un comportement linéaire et robuste pendant la durée d'exposition.

2.4. Application de l'outil sur la Jalle de Blanquefort

Les constantes d'élimination des 3 PRC et le $K_{e\ compilée}$ pour les 3 points échantillonnés sur la Jalle de Blanquefort sont présentées dans le **Tableau III-20**.

Tableau III-20. Constantes d'élimination des 3 PRC et compilée obtenues sur les 3 sites d'étude de la Jalle de Blanquefort.

	Constantes d'élimination (j^{-1})		
	Amont	1,1 km	9,2 km
Caféine ^{13}C	0,025	0,058	0,036
Salbutamol d3	0,057	0,092	0,080
DIA d5	0,008	0,025	0,015
$K_{e\ compilée}$	0,019	0,039	0,028

L'examen des données indique une cinétique de désorption assez différente entre les 3 sites échantillonnés qui peut être expliquée par une différence de débit entre les sites. Le point d'échantillonnage situé à 1,1 km en aval de la STEP Cantinolle a les K_e PRC les plus élevées et les K_e obtenues pour le point Amont et 9,2 km sont équivalentes à celles observées dans la calibration *in situ* sur la Gironde qui traduit une cinétique de désorption relativement lente. Les mêmes observations peuvent être faites avec les $K_{e\ compilée}$.

Les POCIS positionnés sur la Jalle de Blanquefort ont permis de trouver au site Amont des molécules non détectables dans l'eau (Zopiclone, Nordiazépam, Témazépam, Prazépam, Miansérine, Paroxétine, Imipramine, Amitriptyline, Fluoxétine, Cyamémazine, Hydroxyzine et Méthadone). Les données présentées dans le **Tableau III-21** montrent que la plus grande différence de détection de molécules entre l'eau et les POCIS est dans le site Amont.

Tableau III-21. Nombre de molécules détectées et quantifiées dans la Jalle de Blanquefort selon l'échantillonnage utilisé.

	Nbre de molécules détectées		Nbre de molécules quantifiées
	Eau	POCIS	POCIS
Amont	18	27	26
1,1 km	30	28	27
9,2 km	28	28	27

Ces données sont en accord avec la littérature (Alvarez et *al*., 2005 ; Mazzella et *al*., 2010) et montrent bien que le POCIS a effectivement un pouvoir accumulatif, lui permettant de détecter des composés à l'état de trace qui ne sont donc pas mis en évidence par l'échantillonnage ponctuel. Cependant sur les sites situés à 1,1 km et 9,2 km en aval de la STEP Cantinolle, la différence de détection est beaucoup moins marquée. Ceci peut traduire un apport important en psychotropes de la station d'épuration située à Eysines, le jour du prélèvement ponctuel (12.12.2012), en plus du faible débit de la Jalle de Blanquefort qui ne permet pas une forte dilution des composés, ni une forte accumulation dans le POCIS.

Les POCIS positionnés sur les trois sites d'étude ont donc permis d'estimer une concentration moyenne pondérée par le temps de la contamination en psychotropes. Pour ce calcul les $R_{s\ labo}$ utilisés sont ceux des composés ayant eu une linéarité sur plus de 20 jours d'exposition. Ces $R_{s\ labo}$ ont été corrigés à l'aide de la compilation des constantes d'élimination des 3 PRC étudiés.

Le **Tableau III-22** présente les concentrations en psychotropes mesurées dans les échantillons ponctuels et passifs.

La **Figure III-13** présente les concentrations qui ont été obtenues par échantillonnage ponctuel fait le 12.12.2011 et passif exposé du 12.12.2011 au 12.01.2011 pour une sélection de psychotropes (l'ensemble des résultats sont présentés en **Annexe 20**) sur les 3 sites d'étude (Amont, 1,1 Km et 9,2 Km) de la Jalle de Blanquefort.

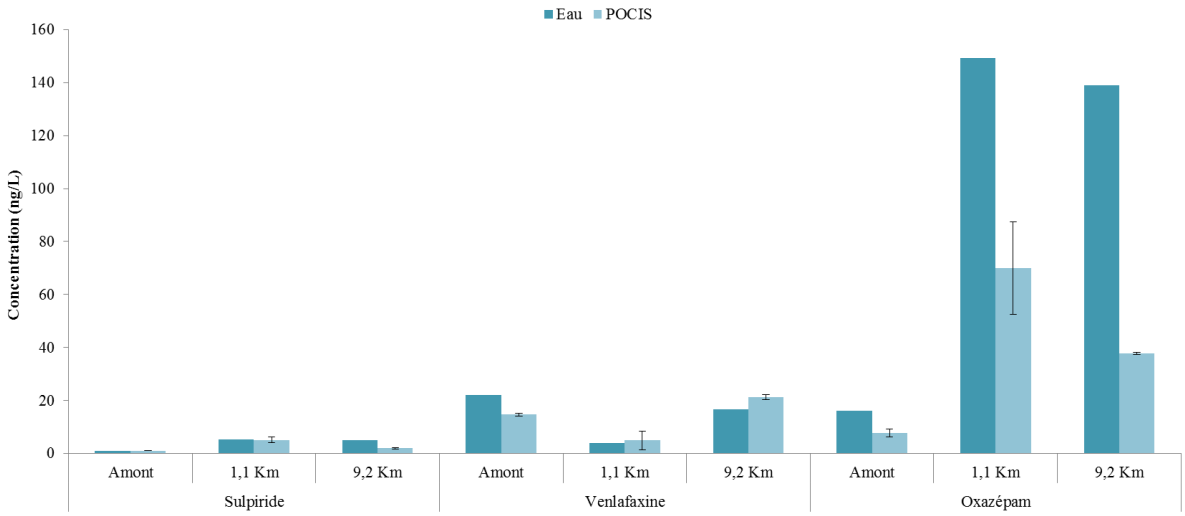


Figure III-13. Concentrations dans l'eau du Sulpiride, la Venlafaxine et de l'Oxazépam mesurées par échantillonnage ponctuel et estimées dans le POCIS (*n=3*) sur les 3 sites d'étude de la Jalle de Blanquefort.

Cette figure montre que les concentrations obtenues pour le Sulpiride, la Venlafaxine et l'Oxazépam par échantillonnages ponctuels et passifs sont plus faibles dans le site Amont que dans les sites 1,1 Km et 9,2km qui sont situés en aval de la STEP Cantinolle. Ces résultats peuvent traduire une contribution des rejets de la STEP d'Eysines sur la contamination en psychotropes de la Jalle de Blanquefort. De plus, il est observable que les concentrations diminuent plus on s'éloigne de la station d'épuration donc cela valide son influence sur l'apport en psychotropes dans cette rivière à faible débit.

Pour certains des composés comme l'Oxazépam, la concentration mesurée par échantillonnage ponctuel est plus élevée que la concentration estimée avec le POCIS, surtout au niveau des sites 1,1 Km et 9,2 Km en aval de la STEP. Cela peut être dû à un apport important de l'effluent de sortie de la STEP Cantinolle lors du prélèvement ponctuel le 12.12.2011 par rapport à l'apport moyenné d'un mois qu'a détecté l'échantillonneur passif. Le POCIS a donc permis de lisser la concentration en psychotropes sur le mois d'échantillonnage et a donc évité une surévaluation des concentrations pouvant aller jusqu'à un facteur 2 pour l'Oxazépam.

Tableau III-22. Récapitulatif des concentrations en psychotropes retrouvés dans les échantillons ponctuels et passifs prélevés dans les 3 sites sur la Jalle de Blanquefort.

Composés	Amont		Moulin blanc (1,1 km)		Pont des religieuses (9,2 km)	
	Eau (ng.L^{-1})	POCIS (ng.L^{-1})	Eau (ng.L^{-1})	POCIS (ng.L^{-1})	Eau (ng.L^{-1})	POCIS (ng.L^{-1})
Benzodiazépines						
Zopiclone	< LQM	0,2	10,2	0,4	10,2	0,3
Zolpidem	< LDM	-	2,0	-	0,2	-
Nordiazépam	< LQM	0,6	2,1	2,3	1,5	1,3
Oxazépam	22,1	20,7	149,3	80,3	139,1	53,3
Alprazolam	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Bromazépam	< LDM	< LDM	< LDM	0,9	< LDM	1,2
Clobazam	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Clonazépam	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Clorazépate	1,0	0,7	0,9	3,4	1,3	1,6
Diazépam	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Lorazépam	48,7	-	31,4	-	47,8	-
Flunitrazépam	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Témazépam	< LDM	0,3	3,0	2,6	2,2	0,7
Prazépam	< LQM	0,2	0,8	0,4	1,3	0,4
Antidépresseurs						
Mirtazapine	3,2	0,8	1,2	1,1	3,5	1,0
Milnacipran	1,7	6,8	5,4	35,4	5,7	11,6
Venlafaxine	4,0	4,6	16,8	22,0	16,0	7,1
Miansérine	< LQM	0,2	1,3	0,9	< LQM	0,3
Amoxapine	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Citalopram	1,3	3,4	11,6	4,4	11,9	4,6
Tianeptine	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Paroxétine	< LQM	0,6	4,4	0,8	3,5	0,4
Imipramine	< LQM	0,1	0,2	0,1	< LQM	0,1
Maprotiline	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Duloxétine	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Amitriptyline	< LQM	0,7	3,4	2,1	3,1	0,8
Fluoxétine	< LDM	0,2	< LDM	0,1	< LDM	0,2
Sertraline	< LDM	-	< LDM	-	< LDM	-
Norfluoxétine	< LDM	-	< LDM	-	< LDM	-
Doxépine	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Clomipramine	0,2	0,1	0,6	0,5	0,4	0,1
Antipsychotiques - Neuroleptiques						
Sulpiride	1,1	1,5	5,5	8,8	5,2	3,0
Cyamémazine	< LDM	0,5	0,7	0,8	0,8	0,8
Chlorpromazine	< LDM	-	< LDM	-	< LDM	-
Tiapride	0,3	0,8	2,9	8,4	2,7	2,6
Amisulpuride	3,8	17,4	37,9	116,7	41,4	48,0
Pimozide	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Antiépileptiques						
Gabapentine	206,7	-	338,8	-	311,2	-
Valpromide	4,1	0,6	6,2	4,1	2,7	1,0
Carbamazépine	12,6	15,9	112,2	72,5	107,1	51,2
Lévétiracétam	1,3	-	5,3	-	3,2	-
Lamotrigine	16,3	12,5	158,2	53,2	110,4	45,1
Primidone	0,5	0,9	8,1	6,5	5,7	2,7
Anxiolytiques						
Méprobamate	33,8	18,4	63,8	61,4	63,5	16,1
Buspirone	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Hydroxyzine	< LQM	1,1	0,7	0,8	0,5	0,8
Substituts aux opiacés						
Méthadone	< LQM	0,4	0,8	0,3	0,5	0,4

Pour conclure, ce travail a permis de mettre en place une méthode d'échantillonnage à l'aide du POCIS afin de détecter des psychotropes dans les eaux de surfaces.
Les calibrations en laboratoire et sur le terrain ont permis d'étudier différents comportements d'accumulation de plusieurs psychotropes dans le POCIS : linéaire, aléatoire, avec un *burst effect* ou encore avec un *lag effect*, ce qui avait déjà été observé sur d'autres composés dans les travaux de Belles (2012) et Morin et *al*. (2013).
Les calibrations ont aussi permis d'obtenir des taux d'échantillonnage pour 34 molécules dont 17 qui n'avaient jamais été étudiées auparavant. La calibration *in situ* a permis de montrer que les facteurs environnementaux jouaient un rôle dans l'accumulation des composés dans le POCIS et donc de donner des taux d'échantillonnage différents de ceux obtenus en laboratoire (Mazzella et *al*., 2010 ; Ibrahim et *al*., 2013).Pour atténuer les variations expérimentales et environnementales, 3 PRC ont été utilisés afin de calculer des taux d'échantillonnage corrigés qui vont permettre d'avoir une meilleure estimation de la concentration en psychotropes dans le milieu (Mazzella et *al*., 2010). Cependant pour le Sulpiride, le Tiapride et l'Amisulpride la correction par les PRC ne permet pas une bonne estimation de la concentration dans le milieu. Ces 3 molécules ont une importante hydrophilie et ont une accumulation avec un *burst effect* au bout de 10 jours. Ces caractéristiques permettent de supposer que le POCIS « pharmaceutique » utilisé n'est pas adéquat pour ce type de molécules et nécessiterait un développement plus poussé en testant de nouvelles phases (Oasis MCX, etc…), de nouvelles membranes (diamètre de porosité plus gros), des temps d'exposition plus courts (15 jours ou moins) voire même de nouveaux PRC (de la famille des psychotropes). Néanmoins le POCIS a été conçu pour être un outil universel permettant de détecter un large panel de composés lui valant une bonne approche qualitative mais son utilisation quantitative est encore à améliorer.

L'application des POCIS sur le terrain (dans la Jalle de Blanquefort) a permis de montrer que le POCIS avait effectivement un pouvoir intégratif, lui permettant de détecter des composés à l'état de trace non détectables par échantillonnage ponctuel mais aussi de leur prédire une concentration moyenne dans le milieu : exemple pour le Citalopram, le Clorazépate ou encore le Témazépam.
De plus, le déploiement sur la Jalle de Blanquefort a montré que l'échantillonnage passif permettait de lisser les évènements de pollution sur les 28 jours d'exposition du dispositif et donc de ne pas surévaluer la concentration en contaminants du milieu, comme ce qui a pu être observé avec l'échantillonnage ponctuel du 12-12-2011 sur la Jalle de Blanquefort.

Pour finir, cette étude a permis d'obtenir pour la première fois des taux d'échantillonnage pour le Sulpiride, la Mirtazapine, le Tiapride, l'Amisulpride, la Lamotrigine, le Zopiclone, le Milnacipran, le Valpromide, le Buspirone, la Cyamémazine, l'Hydroxyzine, la Maprotiline, le Clorazépate, la Clomipramine, le Flunitrazépam, le Clobazam et le Prazépam.

3. Conclusion

Méthode multi-résidus pour l'analyse des psychotropes

Ce développement analytique a permis de créer une méthode multi-résidus pouvant détecter et quantifier 47 psychotropes dans les eaux usées brutes, les eaux usées traitées et les eaux de surface.
La sensibilité de celle-ci est largement compatible avec les niveaux de concentrations retrouvés dans l'environnement et permet également de quantifier des composés présents à l'état de trace (quelques $ng.L^{-1}$).

Cette méthode analytique a permis de trouver pour la première fois en France la Gabapentine dans les eaux de STEP avec des concentrations de l'ordre de la dizaine de µg.L-1 et de la centaine de ng.L-1 dans les eaux de surface. Cet antiépileptique est l'un des psychotropes les plus consommé en France, sa forte consommation peut être expliquée par sa multiple utilisation en traitement seul ou en complément d'autre traitement, pour : l'épilepsie, les douleurs neuropathiques, les zona, les migraines, les bouffées de chaleur lors de la ménopause, les traitements pour le cancer du sein ou encore en prise unique en préopératoire pour réduire l'anxiété avant et après une opération.

Cependant, cette méthode ne permet d'extraire de façon convenable que 33 psychotropes sur 47 étudiés. Etant dans un objectif de screening moléculaire large, des compromis ont été nécessaires, c'est pourquoi, seulement 7 étalons internes ont été utilisés pour quantifier l'ensemble des molécules choisies. Ainsi, pour les 13 psychotropes qui ont des rendements de quantification en dehors de l'intervalle 70%-120%, il est possible de calculer un facteur de correction moyen à appliquer à l'ensemble des valeurs obtenues pour ces molécules. Nous avons fait le choix de ne pas appliquer ce facteur sur nos données car les concentrations quantifiées dans notre étude sont dans les ordres de grandeur de celles retrouvées dans la littérature. Ainsi, pour ces 13 composés (Lévétiracétam, Gabapentine, Sulpiride, Primidone, Valpromide, Milnacipran, Norfluoxétine, Zolpidem, Pimozide, Amoxapine, Tianeptine, Lamotrigine et Zopiclone) nous avons une analyse semi-quantitative qui nous permet d'estimer un ordre de grandeur sur les niveaux de concentrations retrouvés dans les compartiments étudiés.

Pour finir, grâce à cette méthode multi-résidus, le Zopiclone, la Cyamémazine et le Valpromide ont été détectés et quantifiés pour la première fois dans des eaux usées et dans des eaux de surface. De plus, 15 autres psychotropes (Zolpidem, Clobazam, Clorazépate, Prazépam, Milnacipran, Miansérine, Duloxétine, Maprotiline) ont été quantifiés pour la première fois en France avec des niveaux de concentrations compris entre $ng.L^{-1}$ et la centaine de $ng.L^{-1}$ dans les eaux de surface et entre le $ng.L^{-1}$ et le $\mu g.L^{-1}$ dans les eaux usées.

Méthode d'échantillonnage avec le POCIS

Ce développement a permis d'utiliser le POCIS pour détecter les psychotropes sélectionnés dans les eaux de surface. Le caractère intégratif de cet outil permet d'abaisser les limites de détection et de détecter des molécules qui ne l'étaient pas par échantillonnage ponctuel.

Les calibrations en laboratoire et *in situ* ont permis d'observer les différents comportements d'accumulation des psychotropes étudiés, dans le POCIS : linéaire, aléatoire, avec un *burst effect* ou encore avec un *lag effect*. Ces calibrations ont aussi permis d'obtenir des taux d'échantillonnage pour 34 molécules dont 17 (Sulpiride, Mirtazapine, Tiapride, Amisulpride, Lamotrigine, Zopiclone, Milnacipran, Valpromide, Buspirone, Cyamémazine, Hydroxyzine, Maprotiline, Clorazépate, Clomipramine, Flunitrazépam, Clobazam et Prazépam) qui n'avaient jamais été étudiées auparavant. Sur le terrain, les POCIS sont soumis à des facteurs environnementaux qui modifient l'accumulation des composés dans ces capteurs passifs, et par conséquent les taux d'échantillonnage. L'utilisation de 3 PRC a permis d'atténuer les variations environnementales et de corriger les taux d'échantillonnage, pour une meilleure estimation de la concentration en psychotropes dans le milieu.
Malgré la correction avec les PRC, la concentration en Sulpiride, Tiapride et Amisulpride est encore surestimée car ce sont des molécules avec une importante hydrophilie et une accumulation avec un *burst effect* au bout de 10 jours. De même, la Gabapentine et le Lévétiracétam sont aussi des composés très hydrophiles, qui n'arrivent pas à s'accumuler dans la phase du POCIS. Ainsi, le POCIS « pharmaceutique » utilisé n'est pas adéquat pour ce type de molécules et nécessiterait d'être encore développé. Néanmoins le POCIS a été conçu pour détecter un large panel de composés lui valant une bonne approche qualitative, mais son utilisation quantitative est encore à améliorer.

Pour finir, grâce au caractère intégratif du POCIS, il a été possible de détecter et prédire une concentration pour le Citalopram, le Clorazépate ou encore le Témazépam, présents à l'état de trace dans le milieu et non détectables par échantillonnage ponctuel.

CHAPITRE IV. SUIVI DE LA CONTAMINATION EN PSYCHOTROPES DANS LES EAUX USEES ET LES EAUX DE SURFACES FRANÇAISES ET QUEBECOISES.

A. ETUDE DE LA CONTAMINATION EN PSYCHOTROPES DANS LES STEP BORDELAISES ET DANS LA GARONNE. 215

1. PRESENCE ET DEVENIR DES PSYCHOTROPES DANS LES STEP DE BORDEAUX 215
1.1. Etude des effluents d'entrée 215
1.1.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentration 215
1.1.2. Comparaison des apports calculés à la consommation en psychotropes 220
1.2. Etude des effluents de sortie 225
1.2.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentration 225
a) LFED-LFET 226
b) CHET1-CHET2 230
c) Comparaison CHET2-LFET 233
1.3. Etude des variabilités en entrée et en sortie de STEP 235
a) Variabilités inter-journalières 235
b) Variabilités saisonnières 237
1.4. Rendement d'épuration 246
1.4.1. Méthodologie 246
1.4.2. Rendement moyenné par molécules 247
2. ETUDE DE LA CONTAMINATION EN PSYCHOTROPES DE LA GIRONDE 251
2.1. Suivi de la contamination par prélèvement ponctuel 251
2.1.1. Fréquence de quantification, occurrence et gammes de concentrations 251
2.1.2. Etudes des variabilités par point et saisonnières 254
2.2. Suivi de la contamination par échantillonnage passif 260
2.2.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentration 260
2.2.2. Comparaison avec l'échantillonnage ponctuel 263
2.2.3. Etude des variabilités par point et saisonnières 264
2.3. Caractérisation des apports 270
2.4. Estimation du risque environnemental 275
3. CONCLUSION 278

B. ETUDE DE LA CONTAMINATION EN PSYCHOTROPES DANS LES STEP QUEBECOISES ET DANS LE SAINT LAURENT. 280

1. 1. PRESENCE ET DEVENIR DES PSYCHOTROPES DANS LES STEP QUEBECOISES 280
1.1. Etude des eaux d'entrée de STEP 280
1.1.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentrations 280
a) Les deux entrées des étangs aérés de Le Gardeur (Le Gardeur et Charlemagne) 280
b) Comparaison des STEP de Repentigny : Le Gardeur et Ile Lebel 285
c) Comparaison des STEP de Ile Lebel et de Montréal 288
1.2. Etude des eaux de sortie de STEP 293
1.2.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentration 293
a) Comparaison Le Gardeur et Ile Lebel 293
b) Comparaison Ile Lebel et Jean Marcotte de Montréal 297
1.3. Rendement d'épuration 299

2. ETUDE DE LA CONTAMINATION EN PSYCHOTROPES DU SAINT LAURENT 303
2.1. Suivi de la contamination par prélèvement ponctuel 303
2.1.1. Fréquence de quantification, occurrence et gammes de concentrations 303
2.1.2. Etude des variabilités par point et saisonnières 304
2.2. Suivi de la contamination par échantillonnage passif 307
2.2.1. Concentrations POCIS, taux d'échantillonnage et concentrations estimées 308
2.2.2. Comparaison avec l'échantillonnage ponctuel 309
2.3. Caractérisation des apports 311
2.4. Risque environnemental 314
3. CONCLUSION 316
C. COMPARAISON FRANCE – QUEBEC 318

A. ETUDE DE LA CONTAMINATION EN PSYCHOTROPES DANS LES STEP BORDELAISES ET DANS LA GARONNE.

1. Présence et devenir des psychotropes dans les STEP de Bordeaux

Les deux stations d'épuration étudiées dans cette partie sont Clos de Hilde (CdH) et Louis Fargue (LF) (description **Chapitre 2. Section 3.1**). Le but de cette partie est de faire un inventaire sur la présence et le devenir des psychotropes dans ces deux STEP, de connaitre les niveaux de contamination de ces composés dans les effluents d'entrée et de sortie mais aussi l'efficacité épuratoire de ces STEP face à cette famille thérapeutique.

1.1. Etude des effluents d'entrée

1.1.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentration

Les fréquences de quantification, les concentrations moyennes, minimales et maximales (en $ng.L^{-1}$) des psychotropes étudiés dans les effluents d'entrée de deux STEP de l'agglomération bordelaise (LFE et CHE) sont présentées dans le **Tableau IV-1**.

Sur les 40 échantillons de LFE analysés, 12 psychotropes (Gabapentine, Oxazépam, Carbamazépine, Lamotrigine, Lévétiracétam, Amisulpride, Valpromide, Témazépam, Clorazépate, Nordiazépam, Sulpiride et Prazépam) sont systématiquement quantifiés, 18 (Venlafaxine, Primidone, Milnacipran, Tiapride, Diazépam, Zolpidem, Méprobamate, Lorazépam, Cyamémazine, Zopiclone, Paroxétine, Hydroxyzine, Clomipramine, Citalopram, Méthadone, Fluoxétine, Bromazépam et Amitriptyline) ont une fréquence de quantification comprise entre 60% et 98% et 17 (Mirtazapine, Buspirone, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Imipramine, Maprotiline, Duloxétine, Norfluoxétine, Clonazépam, Chlorpromazine, Sertraline, Alprazolam, Flunitrazépam, Clobazam et Pimozide) n'ont jamais été quantifiés.

Sur les 39 échantillons de CHE étudiés, 11 psychotropes (Gabapentine, Oxazépam, Carbamazépine, Lévétiracétam, Méprobamate, Témazépam, Clorazépate, Nordiazépam, Milnacipran, Prazépam et Sulpiride) sont toujours quantifiés, 19 (Lamotrigine, Amisulpride, Valpromide, Venlafaxine, Primidone, Tiapride, Zolpidem, Diazépam, Lorazépam, Zopiclone, Fluoxétine, Cyamémazine, Hydroxyzine, Clomipramine, Paroxétine, Citalopram, Bromazépam, Amitriptyline et Méthadone) ont une fréquence de quantification comprise entre 62% et 97% et 17 molécules (Mirtazapine, Buspirone, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Imipramine, Maprotiline, Duloxétine, Norfluoxétine, Clonazépam, Chlorpromazine, Sertraline, Alprazolam, Flunitrazépam, Clobazam et Pimozide) ne sont jamais quantifiées.
Nous pouvons observer que les mêmes psychotropes sont retrouvés dans les effluents d'entrée de Louis Fargue et de Clos de Hilde.

Tableau IV-1. Fréquences de quantification et concentrations des psychotropes quantifiés dans les effluents d'entrée de 2 STEP de l'agglomération bordelaise (LFE et CHE).

	LFE						CHE					
Composés	Moyenne ng/L	E-T	Nombre échantillon	Fréquence %	Min ng/L	Max ng/L	Composés	Moyenne ng/L	E-T	Nombre échantillon	Fréquence %	Min ng/L	Max ng/L
Gabapentine	2786,2	1429,1	38	100	587,4	7420,6	Gabapentine	3372,7	1320,2	37	100	849,1	6884,9
Oxazépam	1177,9	521,7	38	100	226,0	2577,1	Oxazépam	1432,8	461,0	37	100	132,9	2738,7
Carbamazépine	518,7	211,0	38	100	82,4	1028,8	Carbamazépine	762,3	287,8	37	100	163,2	1744,1
Lamotrigine	287,6	177,8	38	100	51,0	881,5	Lamotrigine	368,2	176,6	36	97	120,1	842,3
Méprobamate	274,9	274,4	36	95	3,6	1662,6	Lévétiracétam	268,9	139,0	37	100	78,9	735,3
Lévétiracétam	252,8	114,3	38	100	83,3	615,3	Méprobamate	196,8	181,5	37	100	7,1	632,2
Amisulpride	244,8	180,7	38	100	12,0	1270,3	Amisulpride	181,8	83,9	36	97	27,8	414,2
Lorazépam	158,6	122,2	35	92	9,0	550,4	Lorazépam	169,9	142,0	32	86	13,7	1052,7
Paroxétine	89,7	53,9	33	87	8,2	427,5	Paroxétine	125,3	80,6	29	78	22,2	454,2
Valpromide	70,5	51,3	38	100	10,8	412,9	Zopiclone	64,6	35,9	33	89	2,7	234,2
Venlafaxine	42,5	21,6	37	97	6,4	172,5	Valpromide	57,2	28,8	36	97	5,9	247,6
Témazépam	38,6	21,1	38	100	3,9	153,4	Venlafaxine	54,4	25,0	36	97	0,4	131,3
Citalopram	35,9	23,0	32	84	2,4	98,7	Citalopram	46,3	24,5	28	76	0,5	102,0
Amitriptyline	34,5	25,0	22	58	3,9	225,1	Témazépam	38,5	18,7	37	100	14,3	160,0
Zopiclone	32,9	18,8	34	89	5,1	93,4	Amitriptyline	36,3	13,4	23	62	16,2	76,5
Fluoxétine	28,9	19,6	31	82	0,5	87,7	Fluoxétine	34,1	20,4	32	86	2,5	141,6
Cyamémazine	24,0	16,7	35	92	2,1	74,7	Cyamémazine	29,2	17,8	30	81	5,4	87,1
Clorazépate	23,3	13,9	38	100	2,0	74,0	Primidone	26,0	8,5	36	97	3,8	44,9
Primidone	21,5	10,6	38	100	3,4	74,2	Clorazépate	23,7	9,6	37	100	3,9	75,7
Nordiazépam	17,2	8,9	38	100	1,8	50,7	Bromazépam	20,4	11,3	26	70	5,5	92,3
Bromazépam	17,0	9,7	26	68	3,1	58,8	Méthadone	20,2	11,0	23	62	2,5	72,0
Milnacipran	14,2	8,0	37	97	1,6	37,1	Nordiazépam	18,6	6,3	37	100	4,2	37,7
Tiapride	12,7	10,4	37	97	1,1	48,9	Milnacipran	18,3	7,2	37	100	0,6	36,1
Méthadone	10,8	8,6	31	82	0,8	50,5	Tiapride	15,4	8,4	36	97	1,8	49,7
Sulpiride	10,6	9,7	38	100	0,6	51,8	Hydroxyzine	14,7	7,4	31	84	2,5	57,4
Clomipramine	8,4	5,6	33	87	0,2	43,3	Clomipramine	11,9	7,4	29	78	0,5	51,5
Hydroxyzine	8,4	6,2	33	87	0,9	25,9	Prazépam	9,7	4,3	37	100	2,6	30,4
Prazépam	7,3	4,5	38	100	2,0	24,7	Diazépam	7,5	5,0	34	92	0,6	27,7
Diazépam	6,4	4,0	36	95	0,4	22,4	Sulpiride	7,4	4,5	37	100	0,7	19,5
Zolpidem	1,6	1,1	36	95	0,2	8,8	Zolpidem	1,9	1,0	36	97	0,3	6,9

Sur l'ensemble des composés détectés et quantifiés dans les effluents d'entrée des STEP Louis Fargue et Clos de Hilde, la Gabapentine a la concentration moyenne la plus élevée (LFE : 2786,2 ± 1429,1 ng.L^{-1} et CHE : 3372,7 ± 1320,2 ng.L^{-1}) et le Zolpidem a la concentration moyenne la plus faible (LFE : 1,6 ± 1,1 ng.L^{-1} et CHE : 1,9 ± 1,0 ng.L^{-1}).

Même si les concentrations de Gabapentine trouvées dans les 2 STEP étudiées sont élevées, elles sont en accord avec la littérature. Notamment avec les valeurs retrouvées dans les travaux de Kasprzyk-Horden (2009) qui mesurent, dans deux STEP du Royaume-Uni, des concentrations en Gabapentine comprises entre 2059 ng.L^{-1} et 37 426 ng.L^{-1}.

Le **Tableau IV-2** présente le classement des molécules détectées et quantifiées dans les échantillons LFE et CHE par gamme de concentrations, à partir des concentrations moyennes obtenues.

Tableau IV-2. Classement des psychotropes quantifiés dans les échantillons LFE et CHE par gamme de concentrations.

LFE				CHE			
> 1000 ng.L^{-1}	1000 - 100 ng.L^{-1}	100 - 10 ng.L^{-1}	< 10 ng.L^{-1}	> 1000 ng.L^{-1}	1000 - 100 ng.L^{-1}	100 - 10 ng.L^{-1}	< 10 ng.L^{-1}
Gabapentine	Carbamazépine	Paroxétine	Clomipramine	Gabapentine	Carbamazépine	Zopiclone	Prazépam
Oxazépam	Lamotrigine	Valpromide	Hydroxyzine	Oxazépam	Lamotrigine	Valpromide	Diazépam
	Méprobamate	Venlafaxine	Prazépam		Lévétiracétam	Venlafaxine	Sulpiride
	Lévétiracétam	Témazépam	Diazépam		Méprobamate	Citalopram	Zolpidem
	Amisulpride	Citalopram	Zolpidem		Amisulpride	Témazépam	
	Lorazépam	Amitriptyline			Lorazépam	Amitriptyline	
		Zopiclone			Paroxétine	Fluoxétine	
		Fluoxétine				Cyamémazine	
		Cyamémazine				Primidone	
		Clorazépate				Clorazépate	
		Primidone				Bromazépam	
		Nordiazépam				Méthadone	
		Bromazépam				Nordiazépam	
		Milnacipran				Milnacipran	
		Tiapride				Tiapride	
		Méthadone				Hydroxyzine	
		Sulpiride				Clomipramine	

Dans le **Chapitre 2. Section 1.3** nous avions montré que sur la liste des 47 psychotropes étudiés dans ces travaux de recherche, 6 molécules (Zopiclone, Amoxapine, Cyamémazine, Pimozide, Valpromide, et Buspirone) n'avaient jamais été recherchées dans la littérature dans les eaux usées ni dans les eaux de surface. Parmi ces 6 molécules, le Zopiclone, la Cyamémazine et le Valpromide ont été quantifiées dans les effluents d'entrée des STEP Clos de Hilde et Louis Fargue, à des concentrations moyennes comprises entre 24,0 ± 16,7 et 70,5 ± 51,3 ng.L^{-1}.
De même 19 autres psychotropes (Zolpidem, Clobazam, Clonazépam, Clorazépate, Flunitrazépam, Prazépam, Milnacipran, Miansérine, Tianeptine, Maprotiline, Duloxétine, Clomipramine, Sulpiride, Chlorpromazine, Tiapride, Amisulpride, Lévétiracétam, Lamotrigine et Hydroxyzine) de la liste étudiée avaient déjà été recherchés dans les eaux usées et/ou les eaux de surface mais avaient été peu ou pas retrouvés. Parmi ces molécules, le Zolpidem, le Clorazépate, le Prazé-

pam, le Milnacipran, la Clomipramine, le Sulpiride, le Tiapride, l'Amisulpride, la Lamotrigine, le Lévétiracétam et l'Hydroxyzine ont été quantifiés dans les échantillons LFE et CHE à des fréquences de quantification comprises entre 78% et 100% et à des concentrations comprises entre 1,6 ± 1,0 et 368,2 ± 176,6 $ng.L^{-1}$.
Ainsi pour ces 14 composés, les concentrations obtenues sont plus élevées que celles de la littérature (**Tableau II-3, Chapitre 2. Section 1.3**).

Concernant les 19 autres composés quantifiés dans les effluents d'entrée de STEP de Clos de Hilde et Louis Fargue, les niveaux de concentrations sont globalement dans le même ordre de grandeur que les valeurs retrouvées dans la littérature. Cependant, nous remarquons que les concentrations maximales mesurées de l'Oxazépam, le Zolpidem, le Nordiazépam, le Lorazépam, le Témazépam, la Paroxétine et le Méprobamate sont plus élevées que celles relevées dans la littérature (**Tableau II-3, Chapitre 2. Section 1.3**).
Prenons l'exemple de l'Oxazépam, les concentrations maximales mesurées dans les deux STEP bordelaises sont 50 à 200 fois supérieures à celles trouvées dans les 3 STEP du Royaume-Uni étudiées par Baker et Kasprzyk-Horder (2011) ou encore 2 à 120 fois supérieures de celles mesurées dans les 6 STEP étudiées en Espagne par Huerta-Fontela (2010). A l'inverse, les concentrations moyennes du Bromazépam mesurées dans les échantillons LFE (16,8 ± 9,7 $ng.L^{-1}$) et CHE (20,4 ± 11,3 $ng.L^{-1}$) sont inférieures à celles retrouvées dans la littérature (Huerta-Fontela et *al*., 2010 ; Racamonde et *al*., 2014).

Cette variabilité de concentrations dans les effluents d'entrée de STEP montre que les niveaux de concentrations des psychotropes vont être influencés par la zone géographique étudiée (pays ou même régions), par les habitudes de prescription et de consommation de la population étudiée mais aussi par les procédés épuratoires utilisés par les STEP.

Les campagnes de prélèvements des deux stations d'épuration bordelaises ont été effectuées de 2011 à 2012 (15 mois) sur 3 jours consécutifs par mois de prélèvement. Il est donc intéressant de voir s'il existe une variabilité des concentrations des composés étudiés entre les jours et entre les saisons de prélèvements (**Section 1.3** de ce chapitre).

Même si les niveaux de concentrations des deux stations bordelaises sont du même ordre de grandeur, les concentrations quantifiées dans les effluents d'entrée de la STEP Clos de Hilde sont 1,2 fois supérieurs à celles de Louis Fargue. En termes de flux, ceux de Louis Fargue sont 1,3 fois supérieurs à ceux de Clos de Hilde dans les effluents d'entrée (**Tableau IV-3**) pour les deux années étudiées (2011-2012). Ceci est dû au fait que la STEP de Louis Fargue a un nombre d'habitants connectés (305 814 hab. en 2010) et un débit d'entrée moyen sur 2011-2012 (90 428 $m^3.j^{-1}$) supérieurs à ceux de Clos de Hilde (nombre d'habitants connectés en 2010 : 264 600 ; débit d'entrée moyen : 62 729, 5 $m^3.j^{-1}$).

Tableau IV-3. Flux d'entrée moyen des STEP Louis Fargue et Clos de Hilde pour 2011-2012.

Composés	Flux d'entrée moyen ± E-T en 2011-2012 ($g.j^{-1}$)	
	Louis Fargue	**Clos de hilde**
Gabapentine	254,8 ± 95,5	203,6 ± 55,7
Oxazépam	107,1 ± 33,0	81,8 ±19,4
Carbamazépine	45,9 ±12,7	44,7 ±10,9
Lamotrigine	25,9 ± 10,9	21,5 ± 7,9
Lévétiracétam	22,3 ± 7,3	15,4 ± 6,4
Méprobamate	21,1 ±19,9	13,8 ± 11,6
Amisulpride	21,1 ± 13,9	11,6 ± 5,0
Lorazépam	14,3 ± 9,8	11,6 ± 9,6
Paroxétine	9,2 ± 5,6	6,9 ± 4,9
Valpromide	6,4 ± 4,1	3,5 ± 1,4
Venlafaxine	3,8 ± 1,7	3,4 ± 1,2
Témazépam	3,6 ± 1,6	2,4 ± 1,1
Citalopram	3,4 ± 1,9	2,8 ± 1,4
Amitriptyline	2,6 ± 1,2	2,1 ± 0,7
Zopiclone	2,6 ± 1,2	3,6 ± 1,5
Fluoxétine	2,5 ± 1,6	2,2 ± 1,2
Cyamémazine	2,2 ± 1,6	1,6 ± 0,9
Clorazépate	2,1 ± 1,0	1,5 ±0,5
Primidone	1,9 ± 0,8	1,7 ± 0,5
Nordiazépam	1,6 ± 0,7	1,1 ± 0,3
Bromazépam	1,4 ± 0,7	1,2 ± 0,6
Milnacipran	1,3 ± 0,6	1,2 ± 0,4
Tiapride	1,1 ± 0,8	1,0 ± 0,5
Clomipramine	1,0 ± 0,6	0,7 ± 0,5
Sulpiride	0,9 ± 0,8	0,5 ± 0,3
Méthadone	0,9 ± 0,6	1,2 ± 0,7
Hydroxyzine	0,8 ± 0,4	0,9 ± 0,5
Prazépam	0,7 ± 0,4	0,6 ± 0,2
Diazépam	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,3
Zolpidem	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1

1.1.2. Comparaison des apports calculés à la consommation en psychotropes

Les apports annuels d'un habitant relié aux STEP Louis Fargue et Clos de Hilde sont calculés à partir des flux d'entrée de chaque molécule trouvée et à partir du nombre d'habitants connectés aux deux STEP (**Tableau IV-3**).

Ainsi un habitant connecté à Louis Fargue apporte en moyenne 304,1 $mg.an^{-1}$ de Gabapentine et 280,8 $mg.an^{-1}$ à Clos de Hilde. Ces données ont été comparées aux valeurs de consommation MEDIC'AM 2012, pour les psychotropes quantifiés dans les deux STEP étudiées (**Tableau IV-4**). Il est important de convertir l'unité des valeurs de consommation MEDIC'AM de nombre de boîtes remboursées en mg/an/hab car le classement des molécules en fonction de leur consommation est alors différent. Ainsi le Zolpidem qui est l'un des psychotropes le plus consommé en nombre de boîtes remboursées (ANSM, 2013b) passe très largement derrière la Gabapentine, le Lévétiracétam, la Carbamazépine ou encore le Valpromide lorsque les valeurs sont converties en mg/an/hab (**Annexe 5**).

Tableau IV-4. Apport moyen annuel en psychotropes d'un habitant connecté à Louis Fargue ou Clos de Hilde et consommation moyenne annuelle en psychotropes d'un habitant en France, pour 2012.

Composés	Apport moyen en 2011-2012 (mg/an/hab)		Consommation moyenne en 2012 (mg/an/hab)
	Louis Fargue	Clos de Hilde	en France
Gabapentine	304,1	280,8	680,5
Oxazépam	127,8	112,8	120,2
Carbamazépine	54,7	61,7	368,0
Lamotrigine	30,9	29,7	94,5
Lévétiracétam	26,6	21,3	644,3
Méprobamate	25,2	19,0	13,3
Amisulpride	25,2	16,0	178,3
Lorazépam	17,1	16,0	5,9
Paroxétine	10,9	9,5	59,5
Valpromide	7,7	4,8	320,6
Venlafaxine	4,5	4,7	181,8
Témazépam	4,3	3,4	0,4
Citalopram	4,1	3,8	22,8
Amitriptyline	3,2	2,9	237,1
Zopiclone	3,1	5,0	25,0
Fluoxétine	3,0	3,0	34,0
Cyamémazine	2,6	2,2	71,1
Clorazépate	2,5	2,0	12,6
Primidone	2,2	2,3	18,5
Nordiazépam	1,9	1,6	2,4
Bromazépam	1,7	1,7	29,9
Milnacipran	1,5	1,6	17,4
Tiapride	1,3	1,3	49,7
Clomipramine	1,2	1,0	36,4
Sulpiride	1,1	0,7	20,9
Méthadone	1,1	1,7	11,3
Hydroxyzine	0,9	1,3	85,8
Prazépam	0,8	0,8	155,2
Diazépam	0,6	0,6	9,0
Zolpidem	0,2	0,2	45,5

En comparant, les apports moyens des STEP Louis Fargue et Clos de Hilde avec les données de consommations MEDIC'AM, on s'aperçoit qu'il y a de grandes différences entre les valeurs.

Après leur passage dans le corps humain, les composés peuvent être excrétés sous forme inchangée, sous forme de métabolites ou encore conjuguée (**Tableau IV-5**). Ainsi, il est important de corriger les données de consommation MEDIC'AM à l'aide des taux d'excrétion sous forme inchangée de chacun des composés (**Tableau IV-5**) afin de les comparer au mieux avec les flux d'entrée calculés.

Tableau IV-5. Taux d'excrétion sous forme inchangée, excrétion sous forme conjuguée et noms des métabolites pour les 30 composés qui ont été trouvés à Louis Fargue et Clos de Hilde.

Composés	Taux d'excrétion sous forme inchangée	Excrétion sous forme conjuguée	Nom des métabolites
Gabapentine	1,00		
Oxazépam	0,75	X	Oxazépam glucuroconjugué
Carbamazépine	0,01	X	10,11-dihydroxy-carbamazépine, carbamazépine-10,11-époxy
Lamotrigine	0,10	X	2-N-glucuronide, 5-N-glucuronide, 2-N-méthyl
Lévétiracétam	0,66	X	UCB-L057
Méprobamate	0,10	X	Hydroxyméprobamate
Amisulpride	0,70		Amisulpride hydroxylé, amisulpride N-déalcoylé, 5-oxypyrrolidinylsulpiride
Lorazépam	0,85	X	Produits polaires et conjugués d'oxydation et de méthylation
Paroxétine	0,03	X	(3S,4R)-4-(4-fluorophenyl)-3-(3,4-dihydroxyphenoxymethyl)piperidine, (3S, 4R)-4-(4-fluorophenyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenoxymethyl)piperidine
Valpromide	0,53		Acide valproïque et autres métabolites
Venlafaxine	0,10		O-déméthylvenlafaxine, N-déméthylvenlafaxine
Témazépam	0,02	X	Oxazépam, Oxazépam glucuroconjugué
Citalopram	0,26	X	N-desméthylcitalopram, didéméthylcitalopram
Amitriptyline	0,01		10-hydroxynortriptyline, nortryptiline
Zopiclone	0,04		N-oxyde- zopiclone, N-desméthyl-zopiclone
Fluoxétine	0,10	X	Norfluoxétine
Cyamémazine	-	-	Dérivés déméthylé et surtout sulfoxyde
Clorazépate	0,06	X	Nordiazépam, Oxazépam, Oxazépam glucuronide
Primidone	0,40		Phényléthylmalonamide (PEMA), phénobarbital
Nordiazépam	0,01	X	Oxazépam, Oxazépam glucuroconjugué
Bromazépam	0,03		3-hydroxy-bromazépam
Milnacipran	0,50	X	l-milnacipran carbamoyl-O-glucuronide, d-milnacipran carbamoyl-O-glucuronide, N-desethyl milnacipran
Tiapride	0,70		N-desethyl tiapride, N-oxide tiapride
Clomipramine	0,01		desmethylclomipramine
Sulpiride	0,30		5-oxypyrrolidinylsulpiride
Méthadone	0,35		2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine (EDDP)
Hydroxyzine	0,01	X	Oxazépam, Oxazépam glucuroconjugué, nordiazépam, témazépam glucuronide, 4'-hydroxydiazépam
Prazépam	0,03		2 principaux métabolites (dérivés déméthylé et surtout sulfoxyde), Cétirizine
Diazépam	0,01	X	N-désalkylprazépam, 3-hydroxyprazépam,
Zolpidem	0,01	X	zolpidem phenyl-4-carboxylic acid (Z4CA)

Sources : Besse et Garric, 2008 ; Lardy-Fontan, et Brieudes, 2011; http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/ ; http://compendium.ch/search/fr.

Nous pouvons observer que la Gabapentine est un bon traceur de consommation car son taux d'excrétion sous forme inchangée est de 1 ; ainsi la quantité de Gabapentine consommée par un français devrait être le même que celle retrouvée dans les entrée des deux STEP étudiées. Hors, il existe un rapport de 2,2 - 2,4 entre la donnée de consommation MEDIC'AM et les apports moyens des deux STEP. Cependant, nous avons montré dans le **Chapitre 3. Section 1.2.2** que pour la Gabapentine, nos rendements d'extraction sont inférieurs à 50 % et qu'il est possible d'appliquer un facteur de corrections à nos données pour les corriger. En appliquant le facteur de 2,57 pour la Gabapentine à nos valeurs, nous trouvons alors des données cohérentes entre les apports des deux STEP et la consommation des français (Figure IV-1).
Si nous utilisons le même raisonnement pour le Lévétiracétam pour lequel nous avons estimé le facteur de correction le plus élevé avec 12,77, nous observons dans la **Figure IV-1** que les apports moyens corrigés des deux STEP étudiées se rapprochent des quantités consommées mais ils restent tout de même plus faibles.

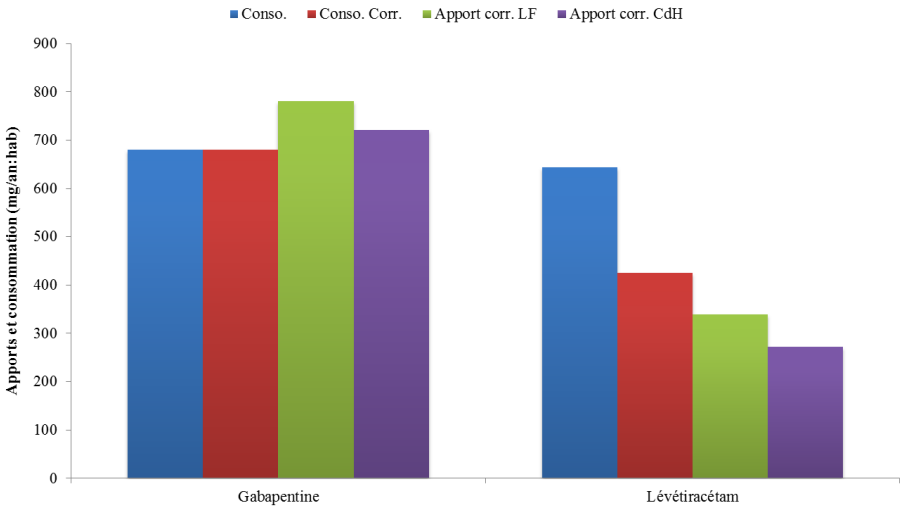


Figure IV-1. Quantité de Gabapentine et Lévétiracétam en mg/an/hab dans les données de consommation MEDIC'AM, après correction par le taux d'excrétion sous forme inchangée et dans les flux d'entrée de Louis Fargue et de Clos de Hilde corrigés par le facteur de correction.

Nous pouvons supposer que le transport dans le réseau en amont des STEP modifie les composés et donc les concentrations retrouvées dans les effluents d'entrée.

Dans le cas de l'Oxazépam, les données de consommation et de consommation corrigée par le taux d'excrétion sous forme inchangée sont plus faibles que les apports moyens qui ont été calculés à Louis Fargue et à Clos de Hilde (**Figure IV-2**). Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'Oxazépam est le métabolite de plusieurs molécules telles que le Clorazépate, le Nordiazépam, le Prazépam ou encore le Diazépam (Besse et Garric, 2008). Ainsi ces composés sont excrétés dans les urines ou les fèces sous forme d'Oxazépam, augmentant les concentrations de cette molécule dans les effluents d'entrée de STEP.

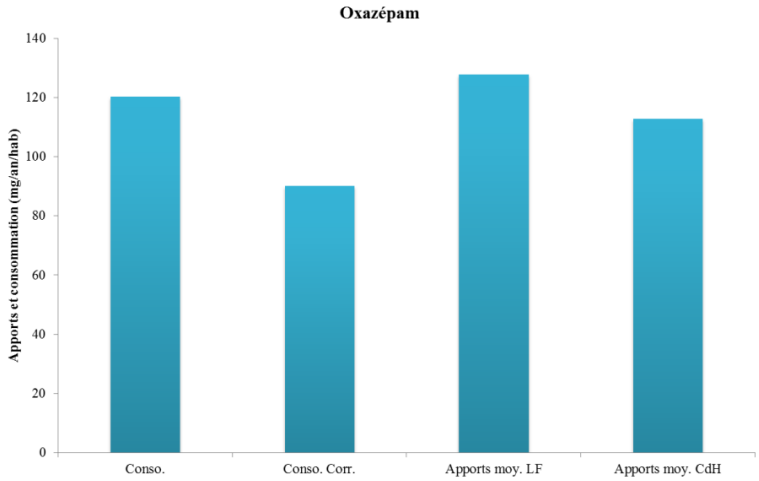


Figure IV-2. Quantité d'Oxazépam en mg/an/hab dans les données de consommation MEDIC'AM, après correction par le taux d'excrétion sous forme inchangée et dans les flux d'entrée de Louis Fargue et de Clos de Hilde.

Néanmoins, la correction des données de consommation MEDIC'AM par le taux d'excrétion sous forme inchangée permet d'être en accord avec les valeurs obtenues dans les deux STEP étudiées pour certaines molécules (Citalopram, Fluoxétine, Hydroxyzine et Zolpidem) (**Figure IV-3**).

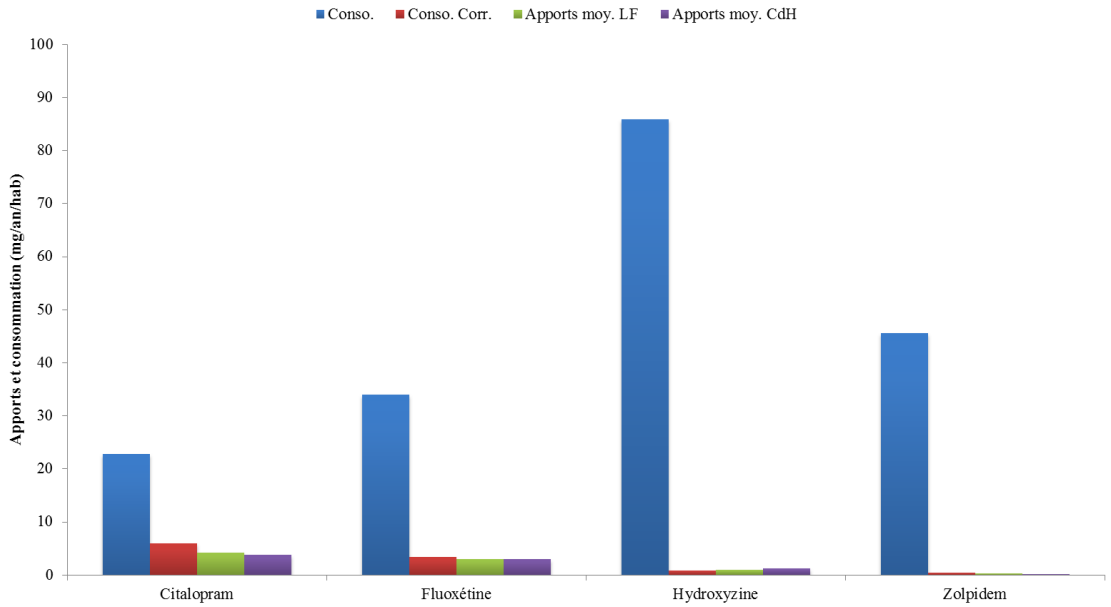


Figure IV-3. Quantité de Citalopram, Fluoxétine, Hydroxyzine et Zolpidem en mg/an/hab dans les données de consommation MEDIC'AM, après correction par le taux d'excrétion sous forme inchangée et dans les STEP de Louis Fargue et de Clos de Hilde.

Cependant sur les 30 molécules quantifiées, la plupart ont des valeurs de flux d'entrée en STEP différentes des données de consommation corrigées. Plusieurs facteurs peuvent jouer dans la diminution ou l'augmentation du flux d'entrée des STEP :

- une modification dans le réseau en amont de la STEP.
- le nombre d'équivalent habitant par STEP n'est pas très précis.
- la déconjugaison des composés excrétés sous forme conjuguée.
- la prise de médicaments en dehors des prescriptions médicales, automédication.
- l'utilisation de données de consommation nationales.
- l'inexactutide de l'analyse des eaux d'entrée de STEP qui sont des matrices complexes.

1.2. Etude des effluents de sortie

1.2.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentration

Deux prélèvements ont été faits dans les effluents de sortie des STEP Clos de Hilde et Louis Fargue :

- pour Clos de Hilde, CHET1 et CHET2 sont équivalents au niveau du traitement (traitement secondaire par biofiltre) cependant le nombre de décanteurs lamellaires et de biofors entre ces deux voies de traitements est différent (**Annexe 6**).

- pour Louis Fargue, LFED et LFET correspondent à deux traitements différents. LFED est prélevé après les décanteurs lamellaires (traitement primaire) et LFET est prélevé après les décanteurs lamellaires et les biofiltres (traitement secondaire) (**Annexe 7**).

Dans un premier temps, les deux prélèvements faits dans les effluents de sortie de chaque STEP vont être analysés, LFED-LFET et CHET1-CHET2, puis dans un deuxième temps les prélèvements dans les effluents de sortie de chacune des STEP correspondantes seront comparés LFET-CHET2.

a) LFED-LFET

Les fréquences de quantification, les concentrations moyennes, minimales et maximales (en $ng.L^{-1}$) des psychotropes trouvés dans les échantillons LFED et LFET sont présentées dans le **Tableau IV-6**.

Sur les 20 échantillons LFED analysés, 16 psychotropes (Gabapentine, Oxazépam, Carbamazépine, Méprobamate, Amisulpride, Lamotrigine, Lévétiracétam, Témazépam, Valpromide, Primidone, Milnacipran, Clorazépate, Tiapride, Nordiazépam, Sulpiride et Prazépam) sont systématiquement quantifiés, 14 (Paroxétine, Venlafaxine, Zopiclone, Citalopram, Bromazépam, Fluoxétine, Cyamémazine, Amitriptyline, Méthadone, Hydroxyzine, Diazépam, Clomipramine et Zolpidem) ont une fréquence de quantification comprise entre 55% et 95% et 17 molécules (Mirtazapine, Buspirone, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Imipramine, Maprotiline, Duloxétine, Norfluoxétine, Clonazépam, Chlorpromazine, Sertraline, Alprazolam, Flunitrazépam, Clobazam et Pimozide) ne sont jamais détectées.

Sur les 40 échantillons LFET prélevés, 10 psychotropes (Gabapentine, Oxazépam, Carbamazépine, Lamotrigine, Méprobamate, Lévétiracétam, Venlafaxine, Témazépam, Primidone et Nordiazépam) sont systématiquement quantifiés, 20 (Amisulpride, Lorazépam, Valpromide, Citalopram, Tiapride, Milnacipran, Sulpiride, Zopiclone, Paroxétine, Fluoxétine, Amitriptyline, Clorazépate, Bromazépam, Méthadone, Cyamémazine, Hydroxyzine, Prazépam, Zolpidem, Clomipramine et Diazépam) ont une fréquence de quantification comprise entre 63% et 98% et 17 composés (Mirtazapine, Buspirone, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Imipramine, Maprotiline, Duloxétine, Norfluoxétine, Clonazépam, Chlorpromazine, Sertraline, Alprazolam, Flunitrazépam, Clobazam et Pimozide) ne sont jamais détectés.

Sur les 30 psychotropes quantifiés dans les échantillons LFED, la concentration moyenne la plus élevée est mesurée pour la Gabapentine (2808,6 $ng.L^{-1}$) et la concentration moyenne la plus faible est quantifiée pour le Zolpidem (2,0 $ng.L^{-1}$). Dans les échantillons LFET, la Gabapentine a la concentration moyenne la plus haute avec 2272,1 $ng.L^{-1}$ et le Diazépam a la concentration moyenne la plus basse avec 4,7 $ng.L^{-1}$.

Tableau IV-6. Fréquences de quantification et concentrations des psychotropes quantifiés dans les effluents de sortie de la STEP Louis Fargue (LFED et LFET).

	LFED						LFET					
Composés	Moyenne ng/L	E-T	Nombre échantillon	Fréquence %	Min ng/L	Max ng/L	Composés	Moyenne ng/L	E-T	Nombre échantillon	Fréquence %	Min ng/L	Max ng/L
Gabapentine	2272,1	1120,9	40	100	626,9	5136,7	Gabapentine	2808,6	1169,5	20	100	1179,8	6121,1
Oxazépam	1169,7	433,7	40	100	245,0	2161,7	Oxazépam	984,0	317,0	20	100	84,7	1580,7
Amisulpride	683,4	590,9	38	95	13,9	2259,7	Carbamazépine	435,2	139,9	20	100	75,3	752,4
Carbamazépine	485,0	185,2	40	100	125,6	1033,6	Méprobamate	369,6	180,0	20	100	24,2	727,6
Lamotrigine	357,8	183,1	40	100	87,0	1245,7	Amisulpride	288,3	152,8	20	100	10,1	635,8
Méprobamate	257,9	236,4	40	100	14,2	1085,3	Lamotrigine	252,0	133,7	20	100	56,6	718,7
Lorazépam	173,6	160,8	34	85	14,9	1060,6	Lorazépam	219,0	193,7	17	85	9,2	1163,1
Lévétiracétam	153,7	72,9	40	100	23,2	383,1	Lévétiracétam	212,4	83,1	20	100	45,5	442,0
Venlafaxine	141,5	78,3	40	100	18,6	429,4	Témazépam	51,4	36,2	20	100	7,6	218,2
Valpromide	73,4	44,3	39	98	13,3	326,6	Valpromide	48,0	22,2	20	100	4,0	119,3
Citalopram	60,8	34,5	39	98	5,5	188,3	Paroxétine	47,4	33,6	15	75	3,2	124,5
Tiapride	52,1	33,7	38	95	6,3	155,9	Venlafaxine	46,7	19,0	19	95	7,3	97,6
Milnacipran	42,7	27,4	39	98	6,7	126,8	Zopiclone	37,0	17,0	19	95	7,2	76,0
Sulpiride	41,2	29,8	38	95	3,6	139,9	Citalopram	35,4	13,8	18	90	6,2	71,8
Zopiclone	34,3	15,6	34	85	9,8	99,3	Bromazépam	25,1	14,9	14	70	2,9	64,5
Témazépam	27,9	11,7	40	100	2,4	77,9	Fluoxétine	22,5	8,6	18	90	6,7	52,1
Paroxétine	27,2	13,8	32	80	5,4	104,1	Primidone	22,1	9,0	20	100	2,5	41,6
Fluoxétine	26,5	13,0	36	90	2,2	74,6	Cyamémazine	21,3	10,9	18	90	1,4	52,5
Primidone	26,2	12,5	40	100	5,5	60,2	Milnacipran	18,0	7,0	20	100	1,5	36,3
Amitriptyline	17,7	8,1	32	80	5,8	65,5	Clorazépate	17,2	7,4	20	100	2,8	34,2
Clorazépate	17,7	8,1	39	98	3,5	47,2	Tiapride	16,7	10,3	20	100	1,5	41,7
Bromazépam	17,5	8,2	25	63	7,4	65,2	Amitriptyline	16,1	3,5	11	55	8,1	26,5
Méthadone	17,1	14,1	39	98	0,4	83,6	Nordiazépam	13,7	6,2	20	100	0,8	28,4
Cyamémazine	17,0	12,1	38	95	1,9	67,8	Méthadone	12,9	8,0	16	80	0,5	34,6
Nordiazépam	15,3	6,9	40	100	2,3	44,8	Sulpiride	12,4	7,2	20	100	0,9	31,9
Hydroxyzine	11,1	6,3	38	95	0,3	32,0	Hydroxyzine	9,6	3,7	17	85	0,6	23,5
Prazépam	7,2	3,6	39	98	1,6	19,7	Prazépam	8,2	5,0	20	100	0,8	19,6
Zolpidem	5,1	3,5	38	95	0,3	22,0	Diazépam	6,6	4,2	19	95	0,7	16,7
Clomipramine	4,8	2,9	28	70	0,3	11,0	Clomipramine	6,2	2,9	14	70	0,7	14,0
Diazépam	4,7	2,0	37	93	1,2	13,1	Zolpidem	2,0	0,9	17	85	0,5	5,7

Sur les 30 psychotropes quantifiés dans les échantillons LFED, la concentration moyenne la plus élevée est mesurée pour la Gabapentine (2808,6 ± 1168,5 ng.L^{-1}) et la concentration moyenne la plus faible est quantifiée pour le Zolpidem (2,0 ± 0,9 ng.L^{-1}). Dans les échantillons LFET, la Gabapentine a la concentration moyenne la plus haute avec 2272,1 ± 1120,9 ng.L^{-1} et le Diazépam a la concentration moyenne la plus basse avec 4,7 ± 2,0 ng.L^{-1}.

Le **Tableau IV-7** présente le classement des molécules détectées et quantifiées dans les échantillons LFED et LFET par gamme de concentrations, à partir des concentrations moyennes obtenues.

Tableau IV-7. Classement des psychotropes quantifiés dans les échantillons LFED et LFET par gamme de concentrations.

LFED				LFET			
> 1000 ng.L^{-1}	1000 - 100 ng.L^{-1}	100 - 10 ng.L^{-1}	< 10 ng.L^{-1}	> 1000 ng.L^{-1}	1000 - 100 ng.L^{-1}	100 - 10 ng.L^{-1}	< 10 ng.L^{-1}
Gabapentine	Oxazépam	Témazépam	Hydroxyzine	Gabapentine	Amisulpride	Valpromide	Prazépam
	Carbamazépine	Valpromide	Prazépam	Oxazépam	Carbamazépine	Citalopram	Zolpidem
	Méprobamate	Paroxétine	Diazépam		Lamotrigine	Tiapride	Clomipramine
	Amisulpride	Venlafaxine	Clomipramine		Méprobamate	Milnacipran	Diazépam
	Lamotrigine	Zopiclone	Zolpidem		Lorazépam	Sulpiride	
	Lorazépam	Citalopram			Lévétiracétam	Zopiclone	
	Lévétiracétam	Bromazépam			Venlafaxine	Témazépam	
		Fluoxétine				Paroxétine	
		Primidone				Fluoxétine	
		Cyamémazine				Primidone	
		Milnacipran				Amitriptyline	
		Clorazépate				Clorazépate	
		Tiapride				Bromazépam	
		Amitriptyline				Méthadone	
		Nordiazépam				Cyamémazine	
		Méthadone				Nordiazépam	
		Sulpiride				Hydroxyzine	

Les concentrations mesurées pour les psychotropes retrouvés dans les effluents de sortie après un traitement primaire (LFED) et après un traitement secondaire (LFET) sont en accord avec la littérature (**Tableau II-3, Chapitre 2. Section 1.3**).
Même si les concentrations de la Gabapentine sont élevées dans les effluents de sortie, malgré un traitement secondaire par biofiltre, elles sont dans le même ordre de grandeurs que celles mesurées dans l'étude de Kasprzyk-Hordern et *al*. (2009) et sont cinq fois moins élevées que celles obtenues par Gurke et *al*. (2015) dans les effluents de sortie d'une STEP allemande.

Les rapports de concentration moyens, pour chaque psychotrope quantifié, entre l'effluent décanté (LFED) et l'effluent traité biologiquement (LFET) sont présentés dans la **Figure IV-4**.

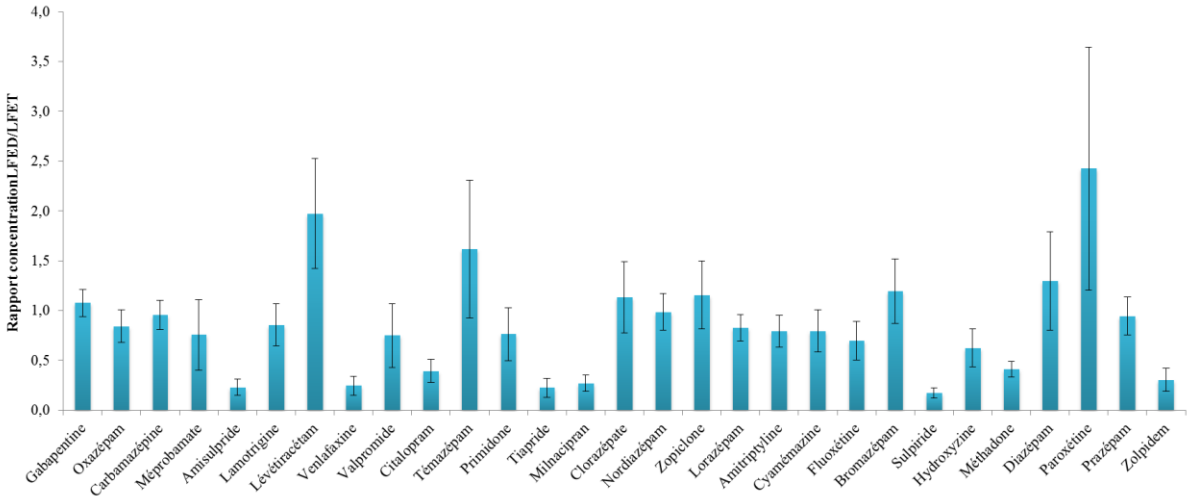


Figure IV-4. Rapport de concentrations moyen entre LFED et LFET pour les psychotropes quantifiés.

Les rapports de concentrations LFED/LFET varient de 0,2 ± 0,1 à 2,4 ± 1,2. La contamination des eaux décantées n'est pas globalement supérieure à celle des eaux traitées biologiquement. La plupart des composés ont une concentration en LFET quasiment identique à celle de LFED. L'étude de Subedi & Kannan (2015) confirme ce résultat en montrant que la Carbamazépine n'est pas éliminée lors du traitement primaire et que ce traitement a une faible efficacité d'élimination sur d'autres psychotropes comme le Citalopram (15%) et l'Oxazépam (10%).

De plus, nous pouvons observer que quelques composés (Amisulpride, Venlafaxine, Citalopram, Tiapride, Milnacipran, Sulpiride, Méthadone et Zolpidem) ont un rapport LFED/LFET inférieur à 0,5. Ceci peut être dû à plusieurs phénomènes :

- la présence de métabolites humains ou produits de transformation en entrée de STEP qui vont être transformés en composés parents lors du traitement biologique.
- l'emprisonnement de composés dans les particules de matière fécale qui sont libérés lors du traitement biologique (Göbel et *al*., 2007 ; Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009).
- la déconjugaison de composés qui ont été métabolisés dans le foie (Ternes, 1998 ; Calisto et Esteves, 2009).
- la désorption des composés enfermé dans les boues ou les particules en suspension (Clara et *al*., 2004 ; Kasprzyk-Hordern et *al*., 2007 ; Durán-Álvarez et *al*., 2012).
- l'effet de matrice dû à l'association des composés à de la matière organique, qui est non compensée par les EI car ces composés n'ont pas leur homologue marqué (Gomez et al., 2006 ; Aminot, 2013).

b) CHET1-CHET2

Le **Tableau IV-8** présente les fréquences de quantifications, les concentrations moyennes, minimales et maximales (en $ng.L^{-1}$) des psychotropes trouvés dans les échantillons CHET1 et CHET2.

Sur les 17 prélèvements CHET1 analysés, 22 psychotropes (Gabapentine, Oxazépam, Carbamazépine, Lamotrigine, Méprobamate, Amisulpride, Lévétiracétam, Venlafaxine, Citalopram, Valpromide, Primidone, Tiapride, Milnacipran, Clorazépate, Témazépam, Nordiazépam, Sulpiride, Méthadone, Hydroxyzine, Prazépam et Zolpidem) sont systématiquement quantifiés, 8 (Lorazépam, Zopiclone, Fluoxétine, Paroxétine, Amitriptyline, Bromazépam, Cyamémazine et Clomipramine) ont une fréquence de quantification comprise entre 47% et 94% et 17 molécules (Mirtazapine, Buspirone, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Imipramine, Maprotiline, Duloxétine, Norfluoxétine, Clonazépam, Chlorpromazine, Sertraline, Alprazolam, Flunitrazépam, Clobazam et Pimozide) ne sont jamais détectées.
Sur les 38 échantillons CHET2 prélevés, 19 psychotropes (Gabapentine, Oxazépam, Carbamazépine, Lamotrigine, Méprobamate, Venlafaxine, Lévétiracétam, Citalopram, Tiapride, Milnacipran, Primidone, Témazépam, Clorazépate, Hydroxyzine, Nordiazépam, Méthadone, Cyamémazine, Prazépam et Zolpidem) sont systématiquement quantifiés, 11 (Amisulpride, Lorazépam, Valpromide, Zopiclone, Sulpiride, Paroxétine, Fluoxétine, Bromazépam, Amitriptyline, Clomipramine et diazépam) ont une fréquence de quantification comprise entre 63% et 97% et 17 composés (Mirtazapine, Buspirone, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Imipramine, Maprotiline, Duloxétine, Norfluoxétine, Clonazépam, Chlorpromazine, Sertraline, Alprazolam, Flunitrazépam, Clobazam et Pimozide) ne sont jamais détectés.

Sur les 30 psychotropes quantifiés dans les échantillons CHET1, la concentration moyenne la plus élevée est mesurée pour la Gabapentine (1528,2 ± 411,2 $ng.L^{-1}$) et la concentration moyenne la plus faible est quantifiée pour la Clomipramine (3,0 ± 2,1 $ng.L^{-1}$). Dans les échantillons CHET2, la Gabapentine a la concentration moyenne maximale avec 2968,5 ± 1019,0 $ng.L^{-1}$ et le Diazépam a la concentration moyenne minimale avec 4,0 ± 2,0 $ng.L^{-1}$.

Tableau IV-8. Fréquences de quantification et concentrations des psychotropes quantifiés dans les effluents de sortie de la STEP Clos de Hilde (CHET1 et CHET2).

CHET1							CHET2						
Composés	Moyenne ng/L	E-T	Nombre échantillon	Fréquence %	Min ng/L	Max ng/L	Composés	Moyenne ng/L	E-T	Nombre échantillon	Fréquence %	Min ng/L	Max ng/L
Gabapentine	1528,2	411,2	17	100	858,2	2510,8	Gabapentine	2968,5	1019,0	38	100	592,5	6051,9
Oxazépam	1125,3	411,1	17	100	494,3	2228,9	Oxazépam	1569,9	461,4	38	100	713,0	2956,2
Carbamazépine	495,5	214,0	17	100	178,3	909,0	Carbamazépine	715,8	246,8	38	100	202,9	1406,0
Lamotrigine	459,7	256,9	17	100	78,9	935,2	Lamotrigine	520,8	269,3	38	100	96,1	1547,1
Lorazépam	133,3	119,5	16	94	26,7	901,2	Amisulpride	505,1	423,9	37	97	11,6	2408,7
Méprobamate	112,6	81,7	17	100	14,8	299,5	Méprobamate	393,7	405,9	38	100	14,1	1918,5
Amisulpride	106,8	90,2	17	100	13,4	424,8	Venlafaxine	200,6	102,8	38	100	15,6	602,7
Lévétiracétam	96,0	42,4	17	100	32,4	194,8	Lorazépam	171,6	165,6	32	84	22,5	735,7
Venlafaxine	80,2	32,5	17	100	15,6	135,9	Lévétiracétam	146,4	59,8	38	100	31,4	376,3
Citalopram	50,9	30,0	17	100	4,7	131,6	Citalopram	92,2	47,4	38	100	6,3	322,5
Zopiclone	38,3	16,0	15	88	17,5	77,5	Tiapride	90,0	56,7	38	100	4,7	297,9
Valpromide	34,9	14,2	17	100	11,0	70,0	Valpromide	68,2	38,7	37	97	11,1	254,3
Primidone	29,8	15,7	17	100	6,8	73,3	Mirtacipran	62,1	35,6	38	100	2,0	182,7
Tiapride	28,9	16,3	17	100	5,9	78,4	Zopiclone	56,7	32,8	35	92	4,1	216,2
Mirtacipran	28,9	14,6	17	100	5,1	60,5	Sulpiride	47,4	33,2	37	97	1,8	180,5
Clorazépate	24,4	16,2	17	100	5,8	79,7	Primidone	41,3	19,3	38	100	10,9	98,4
Témazépam	21,3	5,8	17	100	9,7	31,9	Témazépam	30,1	15,5	38	100	13,2	142,7
Fluoxétine	19,3	11,3	14	82	3,9	56,3	Paroxétine	27,0	17,1	34	89	4,7	96,4
Paroxétine	18,1	11,4	14	82	2,0	47,1	Fluoxétine	21,8	12,6	35	92	1,1	92,5
Amitriptyline	17,2	6,5	12	71	9,0	44,9	Clorazépate	21,1	9,0	38	100	2,9	56,1
Nordiazépam	14,2	6,5	17	100	2,6	35,1	Bromazépam	21,0	12,9	24	63	6,3	88,5
Sulpiride	13,4	8,2	17	100	2,4	29,2	Hydroxyzine	20,4	11,3	38	100	2,4	59,4
Méthadone	10,6	6,0	17	100	1,2	21,5	Amitriptyline	19,9	10,7	35	92	5,0	72,8
Hydroxyzine	10,3	6,8	17	100	0,7	34,3	Nordiazépam	19,9	7,2	38	100	4,5	59,8
Bromazépam	8,5	2,8	8	47	3,3	13,5	Méthadone	17,5	11,5	38	100	1,7	74,7
Prazépam	8,3	3,9	17	100	2,2	17,3	Cyamémazine	12,5	7,0	38	100	1,9	51,9
Cyamémazine	5,3	2,8	14	82	0,7	10,4	Prazépam	11,0	4,8	38	100	2,3	32,9
Zolpidem	4,0	3,1	17	100	0,3	12,1	Zolpidem	8,2	5,7	38	100	0,7	37,3
Diazépam	3,7	1,7	17	100	1,0	7,8	Clomipramine	4,2	2,9	28	74	0,2	15,6
Clomipramine	3,0	2,1	14	82	0,2	8,9	Diazépam	4,0	2,0	34	89	0,4	8,5

Le **Tableau IV-9** présente le classement des molécules détectées et quantifiées dans les échantillons CHET1 et CHET2 par gamme de concentrations, à partir des concentrations moyennes obtenues.

Tableau IV-9. Classement des psychotropes quantifiés dans les échantillons CHET1 et CHET2 par gamme de concentrations.

CHET1				CHET2			
> 1000 ng.L^{-1}	1000 - 100 ng.L^{-1}	100 - 10 ng.L^{-1}	< 10 ng.L^{-1}	> 1000 ng.L^{-1}	1000 - 100 ng.L^{-1}	100 - 10 ng.L^{-1}	< 10 ng.L^{-1}
Gabapentine	Carbamazépine	Lévétiracétam	Bromazépam	Gabapentine	Carbamazépine	Citalopram	Zolpidem
Oxazépam	Lamotrigine	Venlafaxine	Prazépam	Oxazépam	Lamotrigine	Tiapride	Clomipramine
	Lorazépam	Citalopram	Cyamémazine		Amisulpride	Valpromide	Diazépam
	Méprobamate	Zopiclone	Zolpidem		Méprobamate	Milnacipran	
	Amisulpride	Valpromide	Diazépam		Venlafaxine	Zopiclone	
		Primidone	Clomipramine		Lorazépam	Sulpiride	
		Taipride			Lévétiracétam	Primidone	
		Milnacipran				Témazépam	
		Clorazépate				Paroxétine	
		Témazépam				Fluoxétine	
		Fluoxétine				Clorazépate	
		Paroxétine				Bromazépam	
		Amitriptyline				Hydroxyzine	
		Nordiazépam				Amitriptyline	
		Sulpiride				Nordiazépam	
		Méthadone				Méthadone	
		Hydrxyzine				Cyamémazine	
						Prazépam	

Les concentrations mesurées pour les 30 psychotropes retrouvés dans les effluents de sortie de Clos de Hilde sont en accord avec la littérature, comme pour les effluents de sortie de Louis Fargue.

Les concentrations mesurées dans la filière CHET2 ont été comparées à celles analysées dans la filière CHET1, pour chaque psychotrope quantifié (**Figure IV-5**).

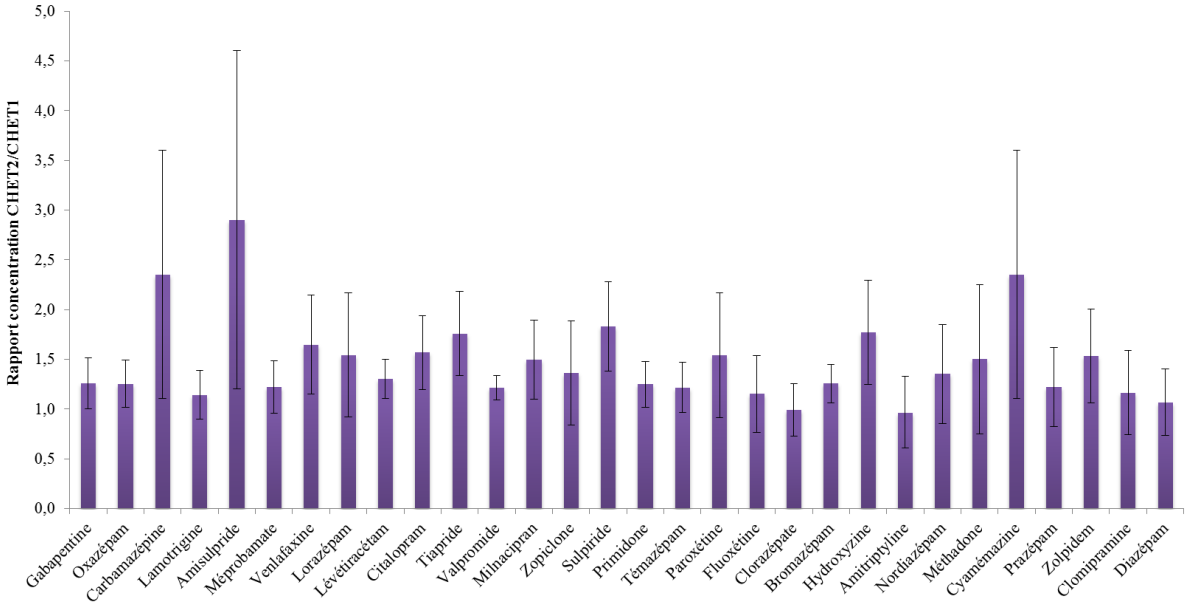


Figure IV-5. Rapports de concentrations moyens entre CHET2 et CHET1 pour les psychotropes quantifiés.

L'ensemble des rapports CHET2/CHET1 est compris entre 1,0 ± 0,4 et 2,9 ± 1,7 donc globalement la contamination des eaux traitées en CHET2 est la même que celle des eaux traitées en CHET1.

c) Comparaison CHET2-LFET

Les procédés de traitement secondaire de Clos de Hilde (CHET2) sont les mêmes que ceux de Louis Fargue (LFET) ainsi le rapport de concentration moyen pour chacun des composés quantifiés a été évalué (**Figure IV-6**).

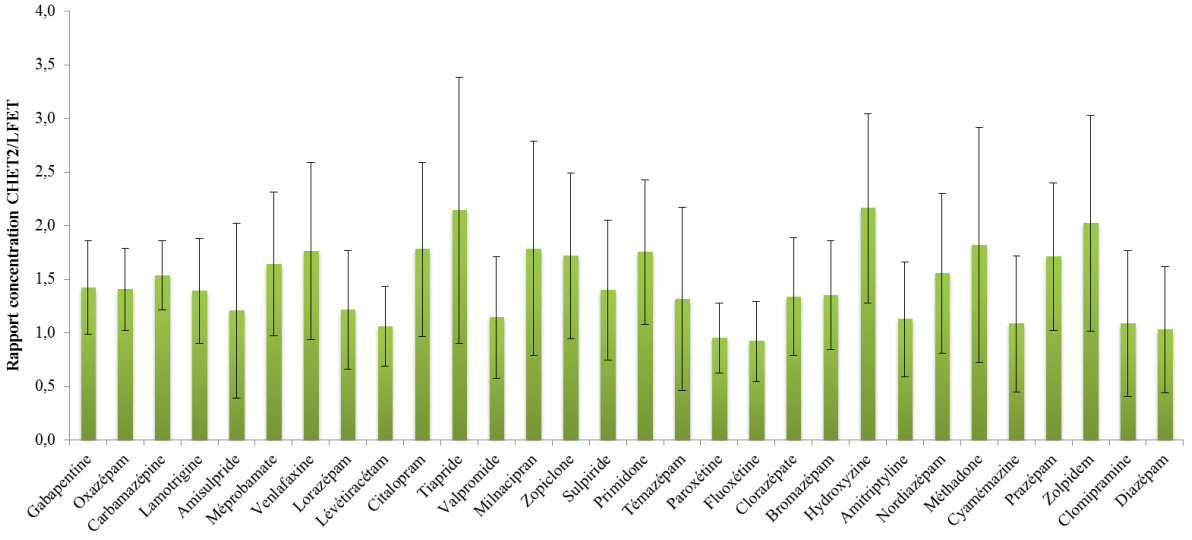


Figure IV-6. Rapport de concentrations moyen entre CHET2 et LFET, pour les 30 psychotropes retrouvés.

En moyenne, les concentrations en psychotropes mesurées dans les effluents de sortie de Clos de Hilde (CHET2) sont 1,5 fois plus élevées que dans ceux de Louis Fargue (LFET). Ce résultat est en accord avec l'observation qui a été faite sur les effluents d'entrée de ces deux STEP (CHE et LFE).
Au niveau des flux de sortie, ceux de Louis Fargue sont en moyenne 1,2 fois plus élevés que ceux de Clos de Hilde (**Tableau IV-10**). Ce résultat est de nouveau en accord avec ce qui a été trouvé dans les effluents d'entrée de ces deux STEP.

Tableau IV-10. Flux de sortie moyen des STEP Louis et Fargue et Clos de Hilde pour 2011-2012.

Composés	Flux de sortie moyen ± E-T en 2011-2012 ($g.j^{-1}$)	
	Louis Fargue	Clos de hilde
Gabapentine	194,8 ± 53,6	184,2 ± 55,0
Oxazépam	107,4 ± 32,0	98,0 ± 21,2
Amisulpride	59,7 ± 45,5	32,2 ± 23,7
Carbamazépine	43,1 ± 11,4	44,5 ± 9,5
Lamotrigine	32,9 ± 14,2	32,7 ± 16,9
Méprobamate	23,6 ± 20,1	26,9 ± 23,8
Lorazépam	14,2 ± 11,3	11,4 ± 11,2
Venlafaxine	13,9 ± 8,0	12,9 ± 5,7
Lévétiracétam	13,6 ± 4,6	9,1 ± 2,9
Valpromide	6,8 ± 3,3	4,3 ± 1,5
Citalopram	5,7 ± 2,9	6,3 ± 3,6
Tiapride	4,5 ± 2,2	5,6 ± 3,3
Milnacipran	4,0 ±2,1	4,1 ± 2,1
Sulpiride	3,3 ± 2,0	3,1 ± 2,0
Zopiclone	3,0 ± 0,9	3,5 ± 1,5
Paroxétine	2,9 ± 1,8	2,1 ± 1,4
Témazépam	2,6 ± 0,9	2,0 ± 1,1
Primidone	2,5 ± 1,2	2,7 ± 1,2
Fluoxétine	2,4 ± 0,9	1,4 ± 0,8
Clorazépate	1,7 ± 0,7	1,4 ± 0,5
Cyamémazine	1,6 ± 0,9	0,9 ± 0,5
Amitriptyline	1,6 ± 0,5	1,3 ± 0,7
Bromazépam	1,5 ± 0,5	1,4 ± 0,9
Nordiazépam	1,4 ± 0,5	1,3 ± 0,5
Méthadone	1,3 ± 0,9	1,2 ± 0,7
Hydroxyzine	1,0 ± 0,6	1,4 ± 0,7
Prazépam	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,2
Clomipramine	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,2
Diazépam	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1
Zolpidem	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,3

1.3. Etude des variabilités en entrée et en sortie de STEP

a) Variabilités inter-journalières

La variabilité inter-journalière des psychotropes étudiés a été calculée à partir de l'écart-type relatif (RSD) associé aux 3 jours de prélèvements dans les effluents d'entrée et de sortie des STEP Clos de Hilde et Louis Fargue (**Figure IV-7** et **Figure IV-8**).

Les écart-types relatifs des 30 psychotropes quantifiés dans les deux stations d'épuration étudiées sont compris entre 9% et 31% dans les effluents d'entrée et entre 6% et 34% dans les effluents de sortie des deux STEP. Les molécules qui ont les écart-types relatifs les plus élevés (> 20 %) sont généralement celles qui sont mesurées à de faible niveaux de concentrations (proches de la LQ), comme le Diazépam ou encore le Zolpidem. Inversement les molécules avec les plus faible RSD sont celles qui sont retrouvées à de fortes concentrations comme l'Oxazépam, la Carbamazépine ou encore le Lévétiracétam (Nelson et *al*., 2011). Cependant les variabilités inter-journalières sur les 3 jours consécutifs de prélèvements sont relativement faibles pour Clos de Hilde et Louis Fargue.

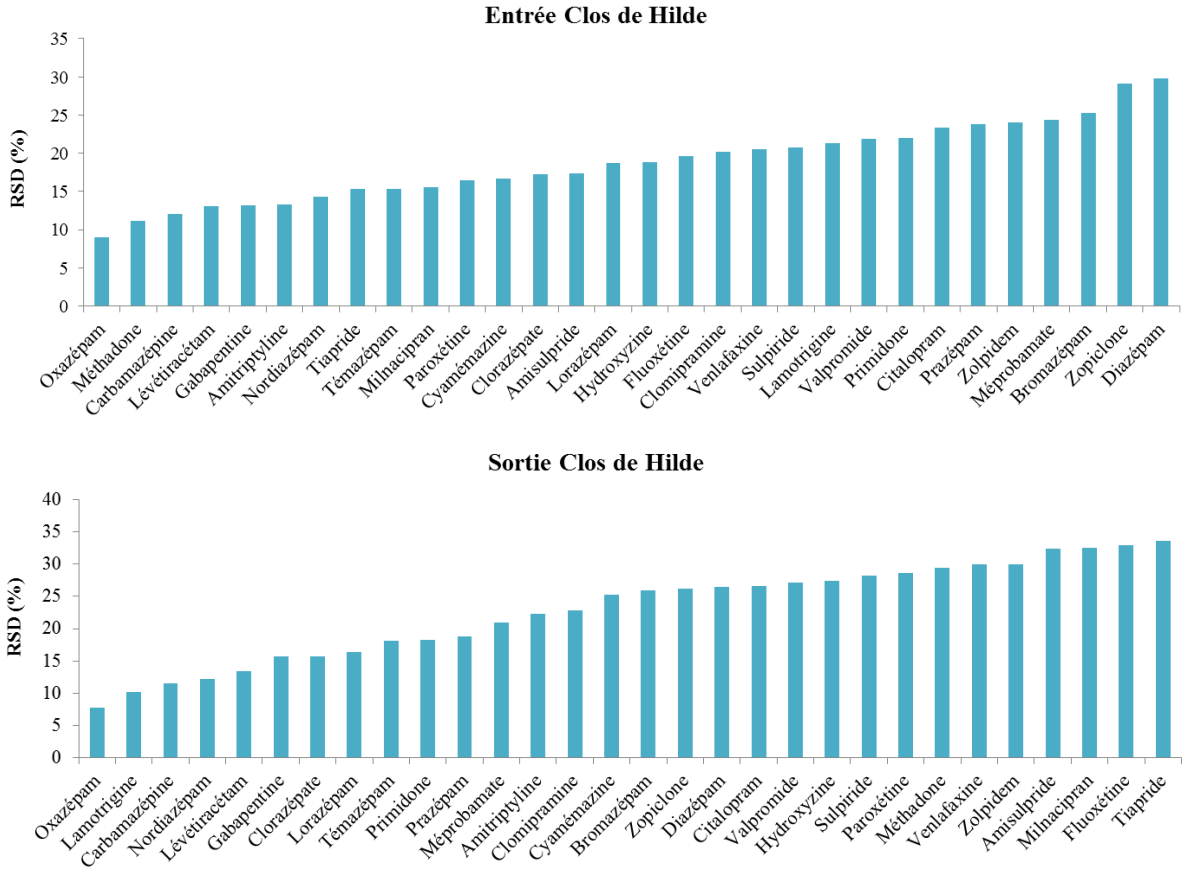


Figure IV-7. Moyenne des écart-types relatifs calculée sur les 3 jours consécutifs de prélèvements dans les effluents d'entrées et de sortie de Clos de Hilde.

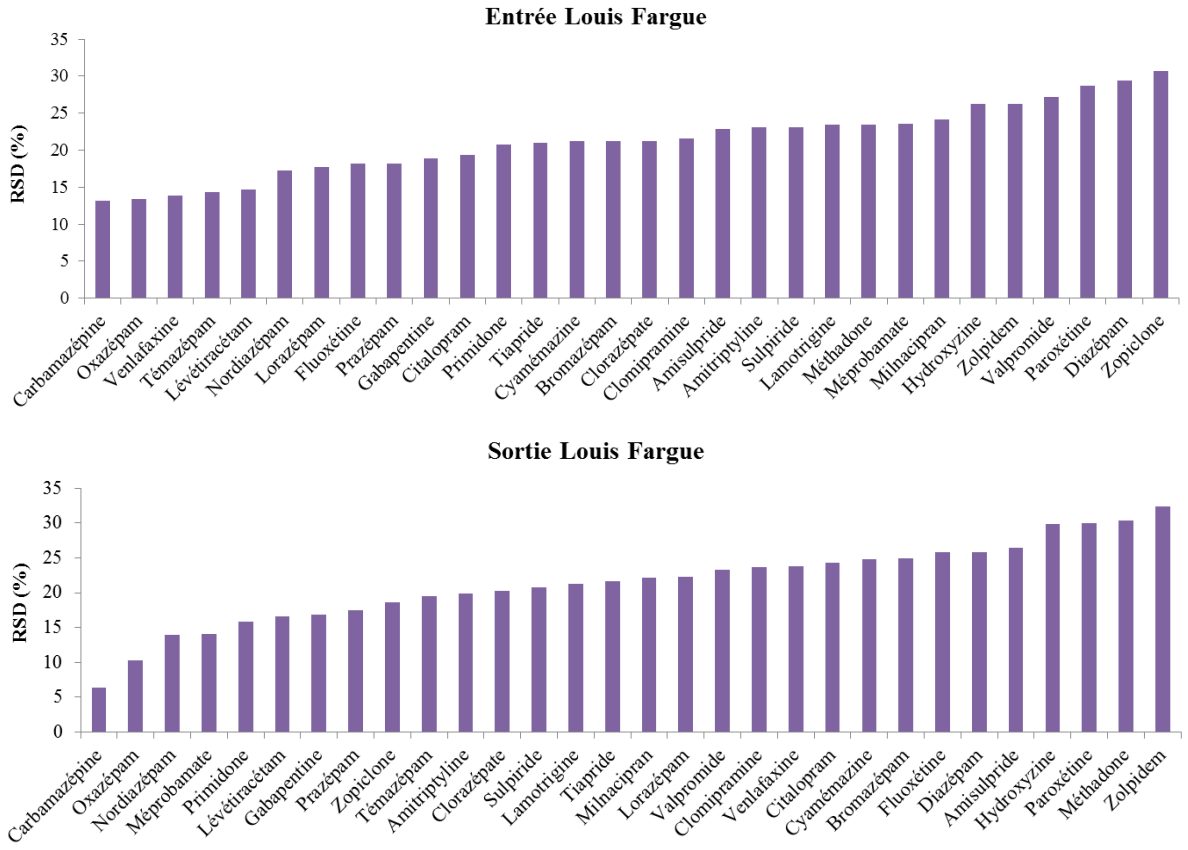


Figure IV-8. Moyenne des écart-types relatifs calculée sur les 3 jours consécutifs de prélèvements dans les effluents d'entrées et de sortie de Louis Fargue.

Les prélèvements moyennés 24h effectués chaque jour par un préleveur automatique (réglés par rapport au débit des eaux d'entrée) dans les stations d'épuration permet : (i) dans un premier temps de s'affranchir des variations intra-journalières et (ii) dans un deuxième temps, de ne pas passer à côté d'un composé qui pourrait être consommé qu'à un certain moment de la journée. L'étude de Ort et *al*. (2010) montre qu'effectivement le prélèvement automatique moyenné 24h des eaux usées est le plus approprié pour éviter une mauvaise évaluation de la concentration des composés détectés. De même, Gurke et *al*. (2015b) expliquent que ce type de prélèvement garantit une fiabilité élevée pour les concentrations mesurées dans les eaux usées.

De plus, les auteurs de Gurke et *al*. (2015b) montrent que sur 10 jours consécutifs de prélèvements en station d'épuration, le débit des eaux usées fluctue significativement les 2 premiers jours de prélèvement et reste constant du jour 3 au jour 10. De même, les auteurs constatent que les concentrations du Bézafibrate et de l'Oxcarbazépine ne restent constantes qu'à partir du quatrième jour de prélèvement. Cette étude montre alors que pour diminuer les variations inter-journalières, il est nécessaire de faire des prélèvements au moins sur 3 jours consécutifs.

b) Variabilités saisonnières

Lors de cette étude, 30 psychotropes ont été trouvés dans les effluents d'entrée et de sortie des STEP Clos de Hilde et Louis Fargue, dans cette partie seulement quelques molécules seront présentées.

L'évolution des concentrations et des flux est présentée pour seulement 4 composés : la Carbamazépine, la Gabapentine, l'Oxazépam et le Lévétiracétam. Le choix s'est porté sur des molécules qui ont des concentrations et des flux non négligeables tout au long du suivi dans les effluents d'entrée et de sortie des deux STEP étudiées.

Le détail des comportements des 30 psychotropes retrouvés dans les eaux usées et les eaux traitées de Clos de Hilde et de Louis Fargue est présenté en **Annexe 21** et **Annexe 22**.

Les **Figure IV-9** et **Figure IV-10** présentent les concentrations moyennes de la Carbamazépine, la Gabapentine, l'Oxazépam et le Lévétiracétam, pour 2011 et 2012, dans les effluents d'entrée et de sortie de CdH et LF.

Pour ces 4 composés, les concentrations les plus élevées dans les effluents d'entrée et les effluents de sortie sont mesurées en 2012 surtout entre les mois de juillet et octobre. L'analyse statistique (analyse de variance à un facteur suivi d'un test apostériori de Bonferroni) de ces données montre qu'il existe une influence significative du mois sur les concentrations de ces 4 psychotropes dans les deux STEP bordelaises étudiées. Une augmentation des niveaux de concentrations est donc observée en fin d'été et en automne.
Pour chacune des 4 molécules présentées, le profil de concentration en entrée de STEP est identique à celui en sortie de STEP. Ainsi les variations observées dans les effluents d'entrée sont reproduites dans les effluents de sortie.

Plusieurs travaux de recherche ont été menés sur les changements saisonniers des concentrations des médicaments dans les effluents d'entrée et de sortie de STEP (Santos et *al*., 2009 ; Coutu et *al*., 2013 ; Petrie et *al*., 2014 ; Pereira et *al*., 2015). L'étude de Golovko et *al*. (2014) sur une station d'épuration en République Tchèque, montre qu'il n'y a pas de saisonnalité au niveau des concentrations en Carbamazépine et en Oxazépam dans les eaux de l'effluent d'entrée. Cependant une augmentation des niveaux de concentrations pour ces deux composés est observé dans la saison d'hiver (novembre-décembre 2011 et janvier-février 2012) dans les eaux de l'effluent de sortie. Nos résultats sur ces deux composés ne montrent pas une augmentation des concentrations à la même période et ni de différence entre les effluents d'entrée et de sortie de STEP. Donc la variation inter-mensuelle dépend de la prescription et de la consommation en psychotropes du pays mais aussi de l'efficacité des traitements des stations d'épuration. Les travaux de Silva et *al*. (2014) montrent qu'il existe une variation géographique sur la consommation et la présence des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) dans les effluents d'entrée des STEP du Portugal. Ainsi, le flux de ISRS est plus important à Lisbonne que dans les autres régions du Portugal (région du centre, du nord et de l'Alentejo). Dans cette même étude, les auteurs montrent que les flux dans les effluents d'entrée de Citalopram, Fluoxétine, Paroxétine et Sertraline sont plus importants en automne, ce qui traduit une con-

sommation plus élevée de ces composés à cette période. Cette observation est en accord avec nos résultats et elle est aussi constatée dans l'étude Golovko et *al*. (2014). Les auteurs remarquent que l'automne et l'hiver sont des périodes où l'augmentation des concentrations en STEP et de la consommation en psychotropes est associé à l'augmentation des troubles psychiques (dépressions, anxiétés, phobies, etc…) (Lam et Levitan, 2000).

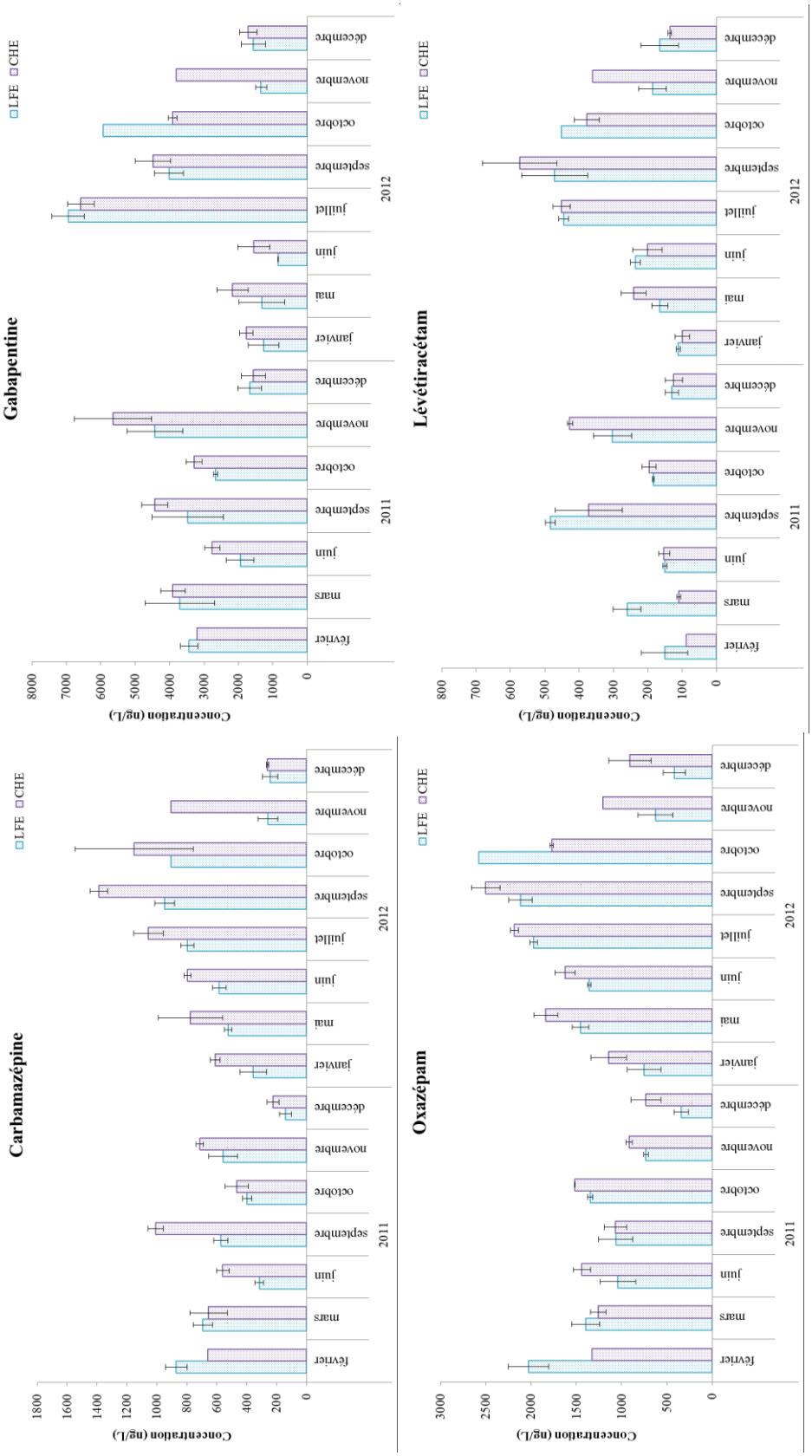


Figure IV-9. Concentrations moyennes quantifiées dans les effluents d'entrée de CdH et LF pour la Carbamazépine, la Gabapentine, l'Oxazépam et le Lévétiracétam.

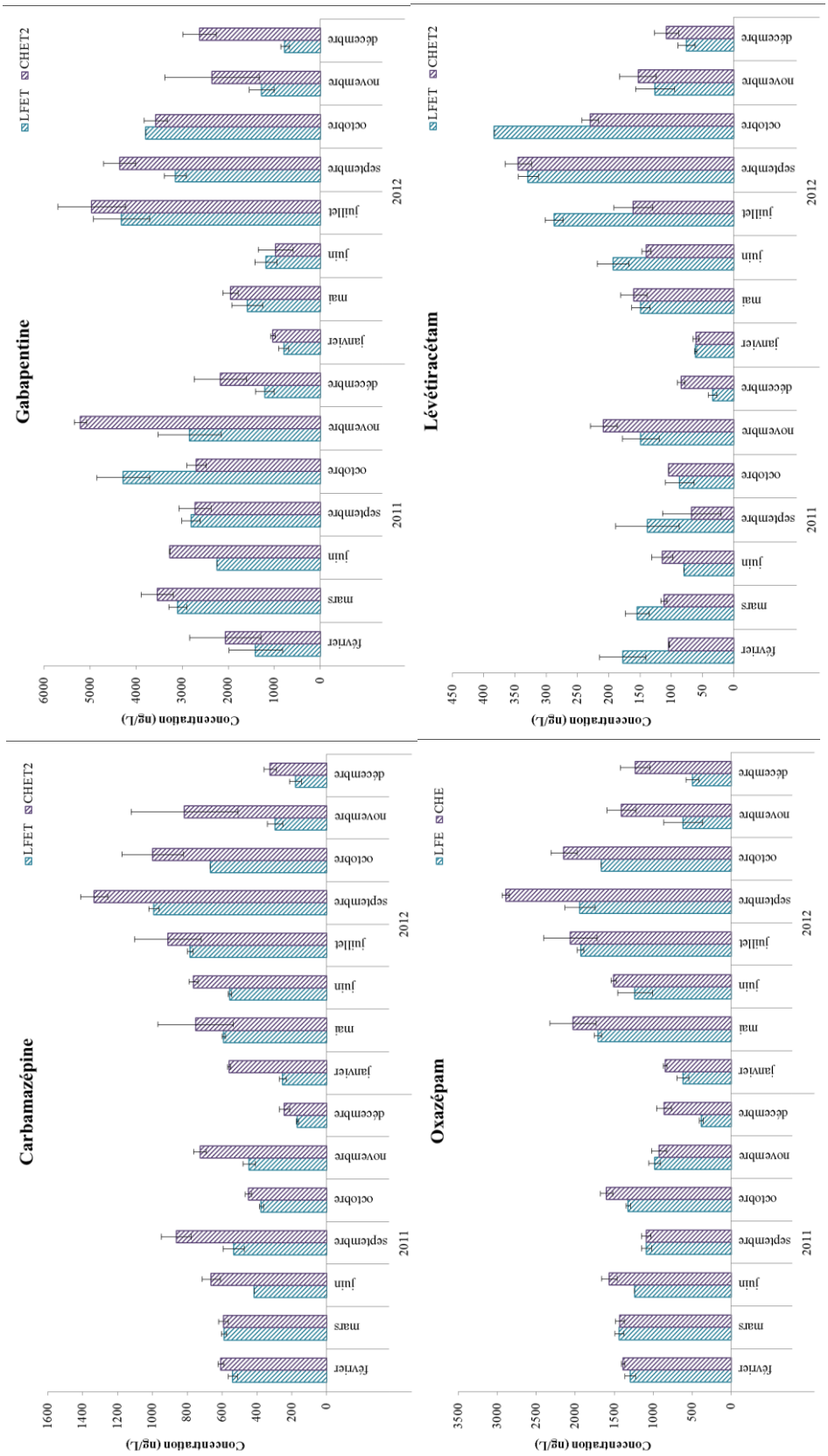


Figure IV-10. Concentrations moyennes quantifiées dans les effluents de sortie de CdH et LF pour la Carbamazépine, la Gabapentine, l'Oxazépam et le Lévétiracétam.

Enfin, plusieurs études expliquent que les variabilités saisonnières peuvent être dues au climat et donc que les faibles concentrations sont généralement observées en période de pluie et donc que les forts débits engendrent la dilution des composés. Inversement, les concentrations les plus élevées sont généralement quantifiées lors de conditions climatiques sèches d'été (Veach et Bernot, 2011 ; Baker et Kasprzyk-Horder, 2013 ; Petrie et *al.*, 2014).

Effectivement, en regardant les débits des effluents d'entrée et de sortie de Louis Fargue et de Clos de Hilde (**Figure IV-11**), nous pouvons constater que les valeurs les plus faibles sont obtenues pendant les mois d'été.

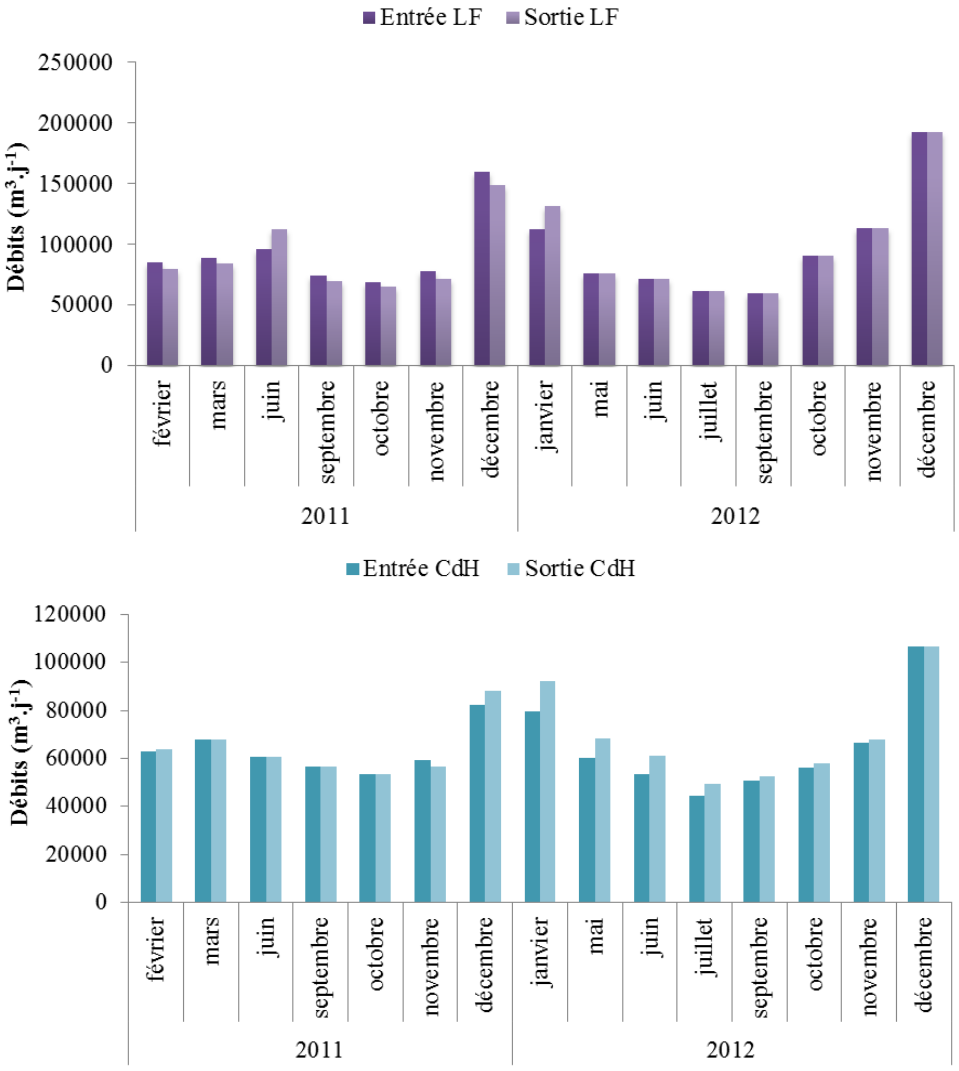


Figure IV-11. Débits des effluents d'entrée et de sortie des STEP Louis Fargue et Clos de Hilde en 2011 et 2012.

Les **Figure IV-12** et **Figure IV-13** présentent les flux moyens de la Carbamazépine, la Gabapentine, l'Oxazépam et le Lévétiracétam, pour 2011 et 2012, dans les effluents d'entrée et de sortie de CdH et LF.
Les flux moyens d'entrée et de sortie mesurés à Louis Fargue et à Clos de Hilde pour chacune des molécules sont présentés en **Annexe 23** et **Annexe 24**.

Par rapport aux concentrations, les variabilités saisonnières des flux d'entrée et de sortie des deux STEP sont moins marquées.

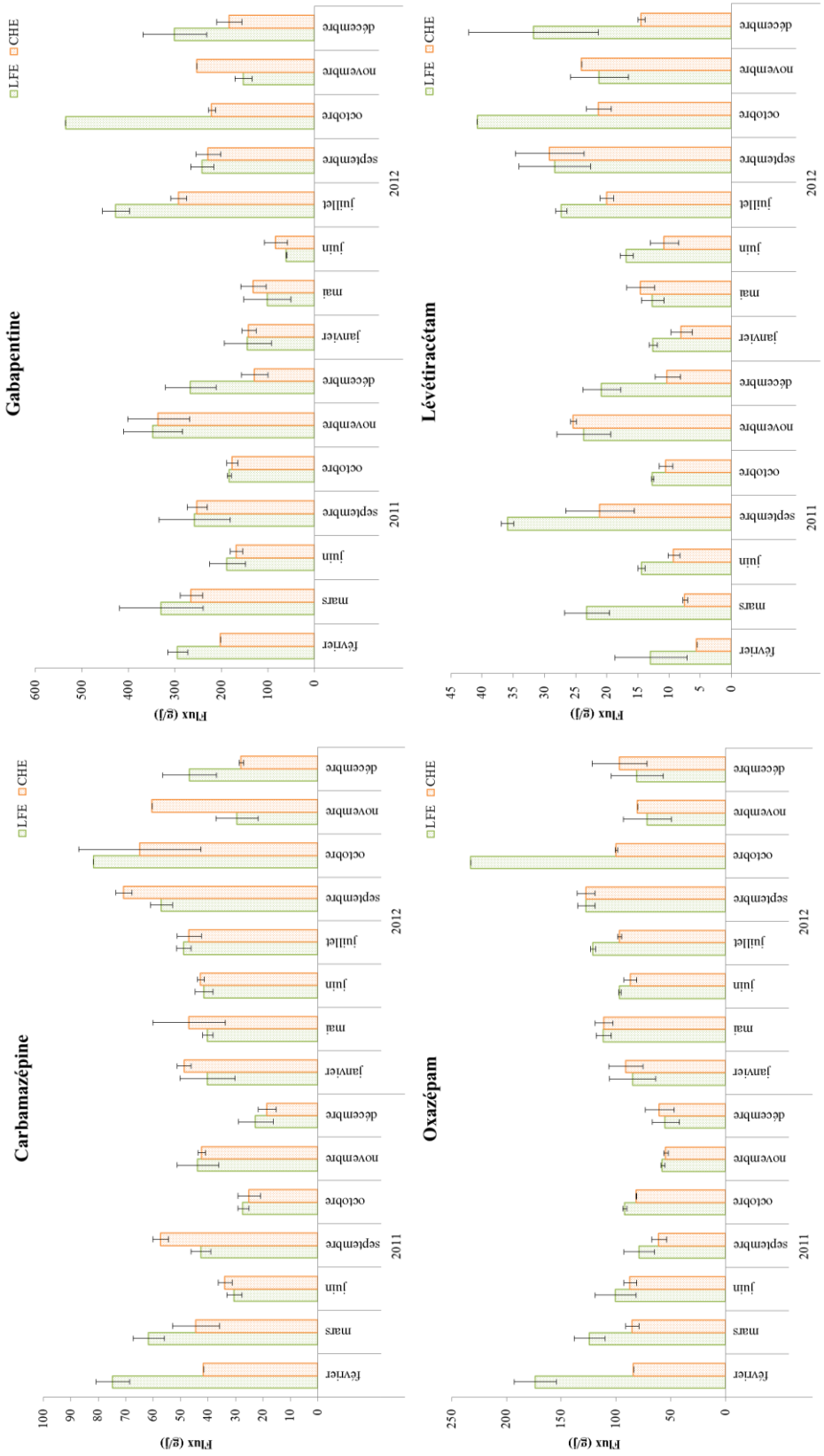


Figure IV-12. Flux moyens quantifiés dans les effluents d'entrée de CdH et LF pour la Carbamazépine, la Gabapentine, l'Oxazépam et le Lévétiracétam.

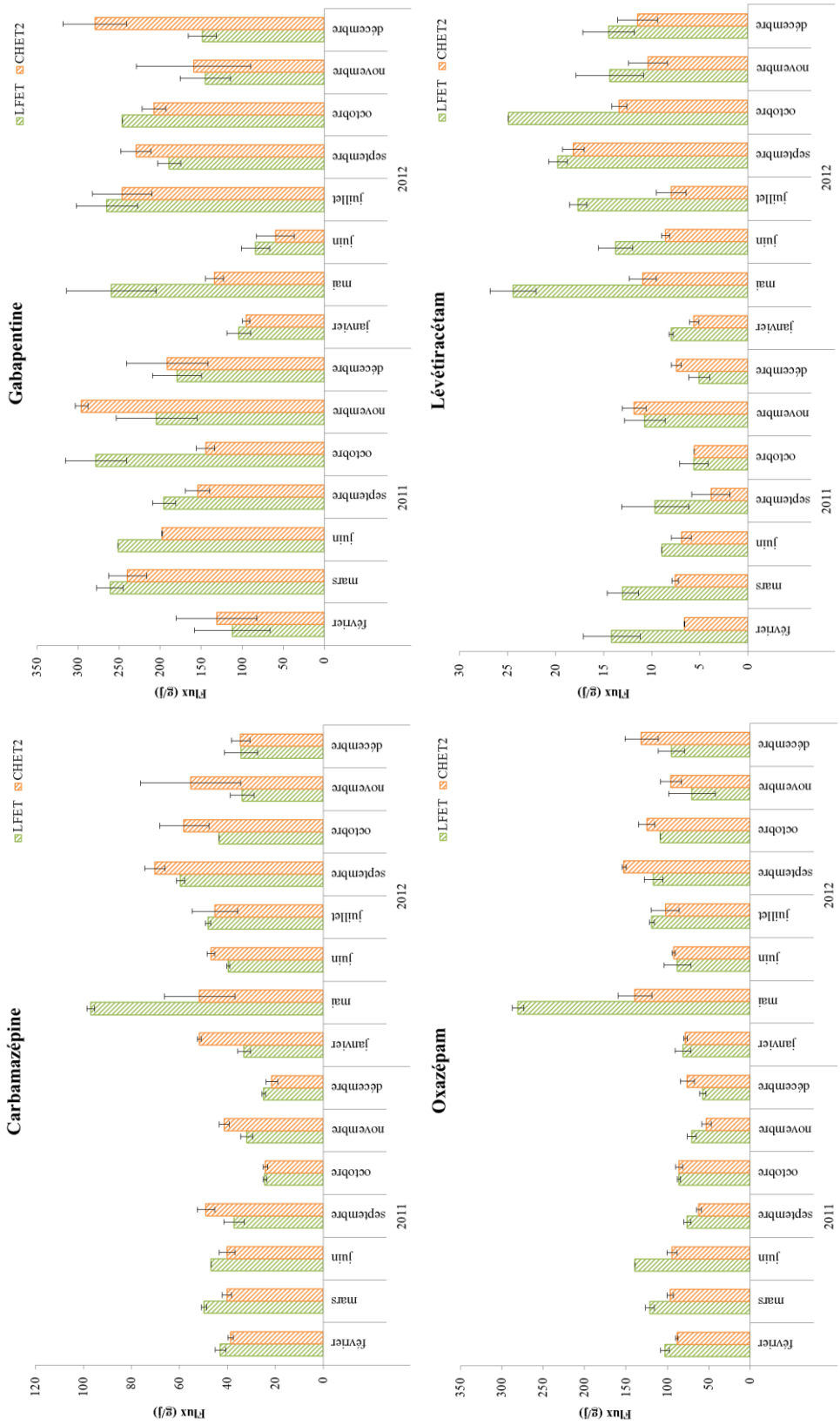


Figure IV-13. Flux moyens quantifiés dans les effluents de sortie de CdH et LF pour la Carbamazépine, la Gabapentine, l'Oxazépam et le Lévétiracétam.

- Cas particulier du Méprobamate :

Depuis avril 2012, le Méprobamate a été interdit à l'importation, la préparation, la prescription et la délivrance de préparations magistrales, officinales et hospitalières (définies à l'article L. 5121-1 du code de la santé publique) ainsi qu'à l'utilisation dans les préparations homéopathiques (**Chapitre 1. Section 1.1**). Nous pouvons observer dans la **Figure IV-14**, que les concentrations en Méprobamate dans les effluents d'entrée et de sortie de Clos de Hilde et Louis Fargue commencent à diminuer depuis fin 2011 et qu'en 2012 les concentrations sont très faibles. Ainsi, on constate que les concentrations en Méprobamate mesurées en 2012 sont 10 fois plus basses que celles de 2011.

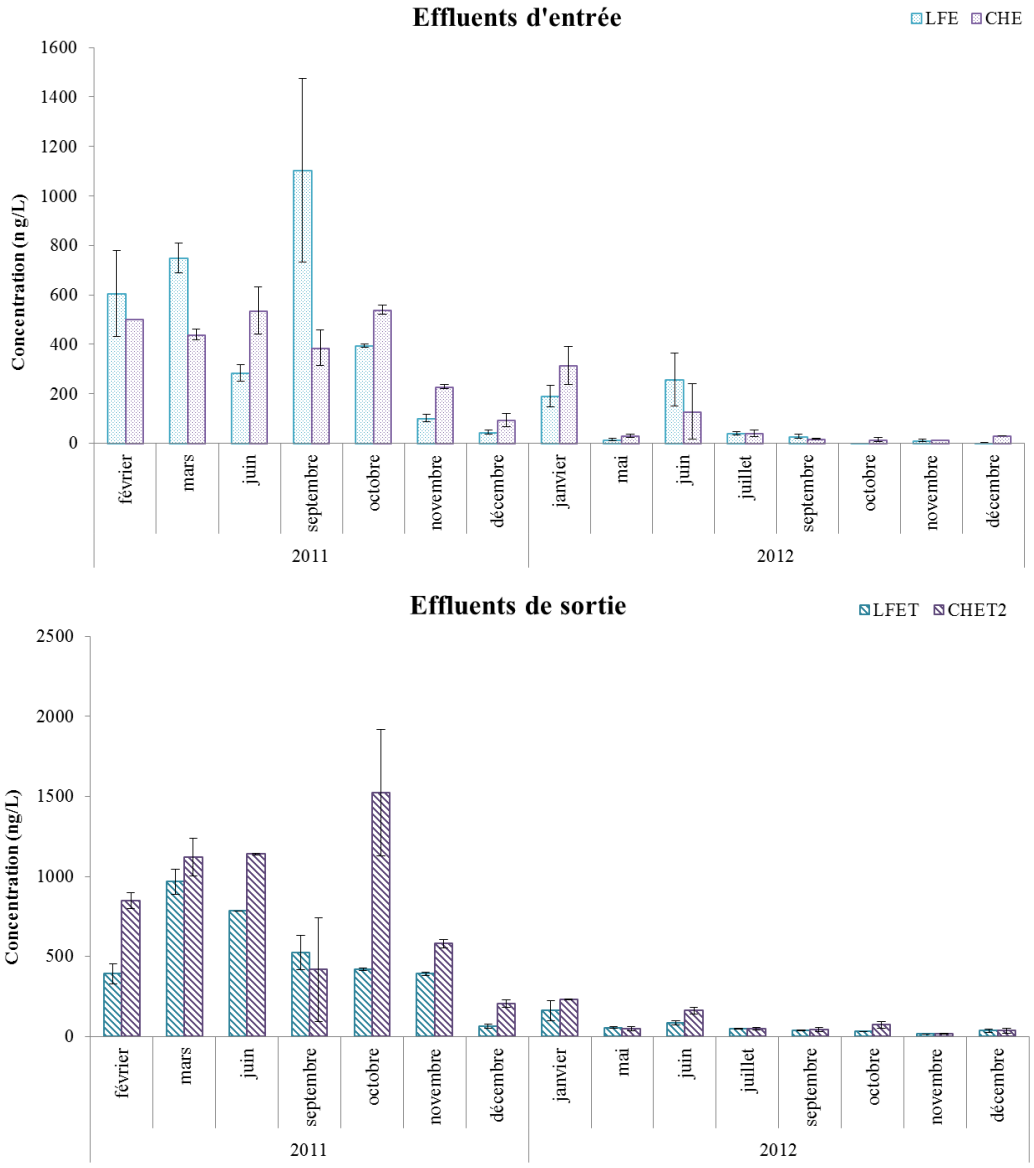


Figure IV-14. Evolution de la concentration moyenne en Méprobamate dans les effluents d'entrée et de sortie de CdH et LF pour les années 2011 et 2012.

Les données de consommation MEDICAM confirment bien une diminution du nombre de boîtes de Méprobamate remboursées entre 2011 (4 973 075 boîtes remboursées) et 2012 (153 760 boîtes remboursées).

Le **Tableau IV-11** présente l'apport moyen des STEP LF et CdH en Méprobamate, la consommation et la consommation corrigée par le taux d'excrétion sous forme inchangée du Méprobamate pour les années 2011 et 2012.

Tableau IV-11. Consommation, consommation corrigée et apports des deux STEP pour le Méprobamate.

	2011	*2012*
Consommation (mg/an/hab)	395,6	13,3
Consommation corrigée (mg/an/hab)	39,6	1,3
Apport moy. de LF et CdH (mg/an/hab)	30,1	5,5

Les données montrent que la baisse des apports en Méprobamate en STEP de 2012 est bien corrélée avec la diminution de consommation de ce psychotrope. L'interdiction de mise sur le marché du Méprobamate est bien observable quand on compare les valeurs des années 2011 et 2012.

1.4.Rendement d'épuration

1.4.1. Méthodologie

Les rendements d'épuration, aussi appelés taux d'abattement, ont été calculés avec les flux d'entrée et de sortie de chacune des STEP bordelaises étudiées et à partir de la méthodologie établie par Choubert et *al*. (2011). Les rendements d'épuration (R) de la phase dissoute pour chaque molécule, sont calculés à partir de l'équation suivante :

$$R(\%) = \frac{F_{entrée} - F_{sortie}}{F_{entrée}} \times 100 \qquad \textbf{Equation 16}$$

Où $F_{entrée}$ est le flux d'entrée moyen admis dans les STEP de Clos de Hilde et de Louis Fargue et F_{sortie} est le flux de sortie moyen mesuré en sortie des STEP bordelaises étudiées.

Les rendements vont être classés en 3 groupes auxquels sont associés un code couleur et une efficacité d'élimination :

- R < 30% (couleur rouge) : rendement d'élimination faible.
- 30% < R < 70% (couleur orange) : rendement d'élimination moyen.
- R > 70% (couleur verte) : rendement d'élimination fort.

Il existe des règles permettant de consolider la validité des rendements calculés afin d'éliminer les valeurs aberrantes. Ainsi un calcul de R est possible quand :

- Conc. $_{entrée}$ > 10 x LQ (limite de quantification) et LQ < Conc. $_{sortie}$ < 10 x LQ.
- Conc. $_{entrée}$ > 10 x LQ ou LQ < Conc. $_{entrée}$ < 10 x LQ et Conc. $_{sortie}$ < LQ alors Conc. $_{sortie}$ = LQ/2.

De plus, un calcul de R n'est pas possible quand :

- Conc. $_{entrée}$ et Conc. $_{sortie}$ sont comprises entre LQ et 10 x LQ.
- Conc. $_{entrée}$ < LQ.

Les LQ sont dépendantes de la matrice entrée ou sortie.

1.4.2. Rendement moyenné par molécules

Sur les 30 psychotropes quantifiés à Louis Fargue, seuls les taux d'abattement du Témazépam et du Bromazépam n'ont pu être calculés. A Clos de Hilde, seul le rendement d'épuration du Bromazépam n'a pu être mesuré.

Le **Tableau IV-12** présente les valeurs des rendements d'épuration moyens (R) obtenus pour chaque composé à Louis Fargue et à Clos de Hilde sur les 15 mois échantillonnés entre 2011 et 2012.

Tableau IV-12. Rendements d'épuration moyens pour chaque molécules qui ont été quantifiées à Louis Fargue et Clos de Hilde. Les rendements inférieurs à 30% sont représentés en rouge, les rendements compris entre 30% et 70 % sont en orange et ceux compris entre 70% et 100% sont en vert.

Familles thérapeutiques	Composés	R (%) Louis Fargue	Nombre de valeurs	R (%) Clos de Hilde	Nombre de valeurs
Benzodiazépines	Zopiclone	-15	14	4	14
	Zolpidem	-146	14	-341	15
	Nordiazépam	14	15	-15	15
	Oxazépam	0	14	-20	15
	Bromazépam	-	-	17	11
	Clorazépate	21	15	5	15
	Diazépam	18	15	45	15
	Lorazépam	1	13	2	14
	Témazépam	-	-	-	-
	Prazépam	5	15	-14	15
Antidépresseurs	Milnacipran	-214	15	-253	15
	Venlafaxine	-267	15	-275	15
	Citalopram	-67	15	-127	13
	Paroxétine	68	14	69	13
	Amitriptyline	41	12	38	11
	Fluoxétine	6	14	34	14
	Clomipramine	52	14	58	13
Antipsychotiques - Neuroleptiques	Sulpiride	-255	15	-540	15
	Cyaméazine	29	15	45	14
	Tiapride	-311	15	-479	15
	Amisulpride	-183	15	-178	15
Antiépileptiques	Gabapentine	24	15	9	15
	Valpromide	-5	15	-22	15
	Carbamazépine	6	15	1	15
	Lévétiracétam	39	15	41	15
	Lamotrigine	-27	15	-52	15
	Primidone	-35	15	-62	15
Anxiolytiques	Méprobamate	-12	15	-95	15
	Hydroxyzine	-33	14	-50	14
Substituts aux opiacés	Méthadone	-45	15	2	12

À Louis Fargue, les rendements d'épuration moyens sont compris entre 0% et 68%. Sur les 30 psychotropes quantifiés dans cette station d'épuration, aucun n'a un rendement d'élimination fort (> 70%), 4 (Paroxétine, Amitriptyline, Clomipramine et Lévétiracétam) ont un rendement moyen (entre 30% et 70%) et 24 molécules (Zopiclone, Zolpidem, Nordiazépam, Oxazépam, Clorazépate, Diazépam, Lorazépam, Prazépam, Milnacipran, Venlafaxine, Citalopram, Fluoxétine, Sulpiride, Cyamémazine, Tiapride, Amisulpride, Gabapentine, Valpromide, Carbamazépine, Lamotrigine, Primidone, Méprobamate, Hydroxyzine et Méthadone) ont un rendement faible (< 30%) dont 15 (Zopiclone, Zolpidem, Oxazépam, Milnacipran, Venlafaxine, Citalopram, Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Valpromide, Lamotrigine, Primidone, Méprobamate, Hydroxyzine et Méthadone) ont un rendement d'épuration négatif.

Dans la STEP Clos de Hilde, les rendements d'élimination sont compris entre 0%.et 69%. Sur les 30 composés quantifiés, aucun n'a un rendement d'élimination fort (> 70%), 7 (Diazépam,

Paroxétine, Amitriptyline, Fluoxétine, Clomipramine, Cyamémazine et Lévétiracétam) ont un rendement moyen (entre 30% et 701%) et 22 (Zopiclone, Zolpidem, Nordiazépam, Oxazépam, Bromazépam, Clorazépate, Lorazépam, Prazépam, Milnacipran, Venlafaxine, Citalopram, Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Gabapentine, Valpromide, Carbamazépine, Lamotrigine, Primidone, Méprobamate, Hydroxyzine et Méthadone) molécules ont un rendement faible (< 30%) dont 15 (Zolpidem, Nordiazépam, Oxazépam, Prazépam, Milnacipran, Venlafaxine, Citalopram, Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Valpromide, Lamotrigine, Primidone, Méprobamate et Hydroxyzine) ont un taux d'abattement négatif.

Les valeurs des rendements d'épurations sont globalement en accord avec ceux trouvés dans la littérature (Soulier et *al*., 2011 ; Collado et *al*., 2014 ; Gurke et *al*., 2015b). Soulier et *al*. (2011) montrent également que la Carbamazépine est une molécule résistante avec un taux d'abattement négatif dans les STEP avec un traitement secondaire à boues activées alors que l'Amitriptyline va être une molécule moins réfractaire avec un rendement d'élimination moyen. Cependant, Radjenović et *al*. (2009) constatent que le traitement secondaire par bioréacteur à membrane (MBR) est plus efficace pour plusieurs composés dont la Fluoxétine en permettant de l'éliminer à 98% alors qu'un traitement à boues activées ne permet que 33% de son élimination. Avec des rendements d'élimination plus élevés, le traitement mis en place à Clos de Hilde (bioréacteur membranaire) semble être efficace sur un plus grand nombre de molécules comparé à Louis Fargue (boues activée et en décembre 2011 bioréacteur à membrane) (**Figure IV-15**). Ainsi Clos de Hilde présente une meilleure efficacité épuratoire car plus de molécules ont des rendements d'élimination compris entre 30% et 70%.

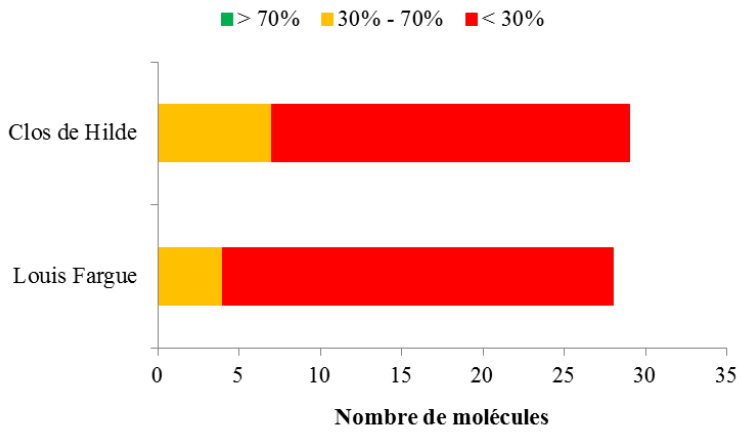


Figure IV-15. Nombre de molécules par classe de rendement d'élimination pour Louis Fargue et Clos de Hilde.

La valeur de rendement d'épuration minimale pour Louis Fargue est de -311% pour le Tiapride et pour Clos de Hilde, il est de -540% pour le Sulpiride.
L'étude de Paíga et *al*. (2016) montre que les rendements d'épuration des 10 psychotropes choisis (Carbamazépine, 10,11-Epoxycarbamazépinene, Fluoxétine, Norfluoxétine, Sertraline, Citalopram, Venlafaxine, Paroxétine, Trazodone et Diazépam) sont négatifs ce qui sous-entend que les traitements des STEP étudiées ne sont pas efficaces pour leur élimination. Les auteurs de Gurke et *al*. (2015b) remarquent aussi que la Lamotrigine est totalement réfractaire au traitement secondaire avec un rendement d'épuration de -51,8%.

Globalement, les psychotropes étudiés dans ces travaux de thèse sont des molécules qui sont partiellement ou totalement résistantes aux traitements mis en place dans les stations d'épuration (Calisto et *al*., 2009). Pour de nombreuses d'entre elles, les rendements sont même négatifs. Le phénomène de déconjugaison pourrait expliquer ces résultats. Ainsi les psychotropes seraient métabolisés par l'homme sous forme glucuro-conjuguée, forme pharmacologiquement inactive, et seraient ensuite déconjugués en composés parents par l'enzyme β-glucuronidase, qui est produite par les bactéries fécales comme *Escherichia coli*. Ce processus de déconjugaison va alors augmenter la quantité de composés parents dans les effluents de sortie (Ternes, 1998 ; Calisto et *al*., 2009 ; Collado et *al*., 2014 ; Gurke et *al*., 2015b). C'est pourquoi il est important d'ajouter les métabolites dans la liste de composés à suivre lors des études de caractérisations des stations d'épuration. Il est aussi important d'étudier la présence de psychotropes dans les boues qui peuvent les adsorber (Löffler et *al*., 2005 ; Stein et *al*., 2008 ; Calisto et *al*., 2009) et les relarguer. Ce phénomène pourrait aussi expliquer les rendements d'épuration négatifs.

Enfin l'autre facteur à prendre en compte ce sont les erreurs instrumentales qui pourraient entraîner à des résultats inexacts et contribuer à l'estimation de taux d'élimination négatifs. Effectivement dans les travaux de d'Aminot (2013), qui ont été menés sur les mêmes STEP, nous observons une différence sur le rendement d'épuration de la Primidone qui est entre -62 et -35% dans notre étude et entre 33 et 53% dans la sienne. En comparant les concentrations des effluents d'entrée des STEP Lf et CdH de notre étude et de la sienne, nous constatons que nos concentrations sont deux fois plus faibles cependant, les concentrations dans les effluents de sortie sont identiques. Ainsi, nous pouvons supposer que, dans ce cas, nous avons eu une extinction de signal causé par la matrice et l'augmentation du bruit de fond lors de l'analyse de nos échantillons d'effluent d'entrée de STEP ; conduisant à sous-estimation des concentration (Gómez *et al.* (2006).

2. Etude de la contamination en psychotropes de la Gironde

Cette partie vise à étudier la contamination en psychotropes dans la Gironde estuarienne (description **Chapitre 2. Section 9.1**). L'objectif est d'étudier les niveaux de concentrations en psychotropes dans cet hydrosystème mais aussi la variabilité propre à chaque site d'étude et chaque molécule grâce à un suivi effectué par prélèvement ponctuel et passif. Enfin l'apport amont et le devenir de cette classe thérapeutique sont évalués.

2.1. Suivi de la contamination par prélèvement ponctuel

2.1.1. Fréquence de quantification, occurrence et gammes de concentrations

Les fréquences de quantification, les concentrations moyennes, minimales et maximales (en $ng.L^{-1}$) des psychotropes trouvées dans la Gironde estuarienne sont présentées dans le **Tableau IV-13**.

Tableau IV-13. Fréquences de quantification et concentrations des psychotropes trouvés dans les 86 échantillons d'eau de la Garonne.

Composés	Conc. Moyenne ng/L	E-T	Nombre d'échantillons	Fréquence de quantification %	Conc. Minimale ng/L	Conc. Maximale ng/L
Gabapentine	34,4	24,4	86	100	2,8	172,1
Oxazépam	20,6	10,3	86	100	1,6	104,4
Lamotrigine	12,8	8,6	86	100	1,42	89,8
Carbamazépine	9,0	5,1	86	100	0,7	31,1
Amisulpride	5,1	4,4	86	100	0,2	42,3
Méprobamate	4,2	1,5	19	22	2,38	12,8
Tiapride	3,4	2,9	86	100	0,1	35,2
Venlafaxine	2,9	2,4	86	100	0,1	39,1
Primidone	2,4	1,7	84	98	0,2	32,1
Milnacipran	2,3	1,9	82	95	0,06	18,6
Valpromide	2,0	1,3	86	100	0,2	14,7
Lévétiracétam	1,5	1,0	86	100	0,1	12,6
Sulpiride	1,3	0,9	86	100	0,04	6,1
Bromazépam	1,0	0,6	82	95	0,2	6,9
Zopiclone	0,6	0,3	85	99	0,1	1,6
Citalopram	0,6	0,5	86	100	0,04	12,8
Nordiazépam	0,6	0,3	64	74	0,1	2,3
Méthadone	0,2	0,1	76	88	0,01	0,8
Prazépam	0,2	0,1	72	84	0,03	0,5
Zolpidem	0,1	0,04	85	99	0,01	0,8

Sur l'ensemble des sites échantillonnés, 11 psychotropes (Gabapentine, Oxazépam, Lamotrigine, Carbamazépine, Amisulpride, Tiapride, Venlafaxine, Valpromide, Lévétiracétam, Sulpiride et Citalopram) ont une fréquence de quantification de 100 %, 9 molécules (Méprobamate, Primidone, Milnacipran, Bromazépam, Zopiclone, Nordiazépam, Méthadone, Prazépam, Zolpidem) ont une fréquence de quantification comprise entre 98% et 22% et 27 composés (Maprotiline,

Mirtazapine, Buspirone, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Paroxétine, Imipramine, Cyamémazine, Hydroxyzine, Duloxétine, Clorazépate, Amitriptyline, Norfluoxétine, Clonazépam, Lorazépam, Fluoxétine, Chlorpromazine, Sertraline, Alprazolam, Clomipramine, Flunitrazépam, Témazépam, Clobazam, Diazépam et Pimozide) ne sont jamais détectés.

Sur la totalité des psychotropes détectés et quantifiés, la concentration moyenne la plus élevée est mesurée pour la Gabapentine (34,4 ± 24,4 $ng.L^{-1}$) et la concentration moyenne la plus faible est retrouvée pour le Zolpidem (0,1 ± 0,04 $ng.L^{-1}$).

Parmi les psychotropes sélectionnés dans ces travaux de thèse, 19 étaient peu ou pas retrouvés dans la littérature et 6 molécules n'avaient jamais été étudiées (**Chapitre 2. Section 1.3**). Parmi les 6 composés jamais recherchés, le Valpromide et le Zopiclone ont été quantifiés lors de ce suivi avec des concentrations moyennes respectives de 2,0 ± 1,3 $ng.L^{-1}$ et 0,6 ± 0,04 $ng.L^{-1}$.
De même, sur les 19 molécules déjà étudiées mais peu ou pas détectées, la Lamotrigine (12,8 ± 8,6 $ng.L^{-1}$), l'Amisulpride (5,1 ± 4,4 $ng.L^{-1}$), le Tiapride (3,4 ± 2,9 $ng.L^{-1}$), le Milnacipran (2,3 ± 1,9 $ng.L^{-1}$), le Lévétiracétam (1,5 ± 1,0 $ng.L^{-1}$), le Sulpiride (1,3 ± 0,9 $ng.L^{-1}$), le Prazépam (0,2 ± 0,1 $ng.L^{-1}$) et le Zolpidem (0,1 ± 0,04 $ng.L^{-1}$) ont pu être quantifiés. Ainsi pour ces 10 psychotropes, les concentrations qui ont été retrouvées sont généralement supérieures à celles retrouvées dans la littérature.
Concernant les 9 autres molécules (Gabapentine, Oxazépam, Carbamazépine, Méprobamate, Venlafaxine, Primidone, Citalopram, Nordiazépam, et Méthadone) trouvées dans la Garonne, les niveaux de concentrations sont globalement en accord avec les données rassemblées dans le **Tableau II-3, Chapitre 2. Section 1.3**.

En comparant les données des deux traceurs Gabapentine et Carbamazépine, dans la Garonne et la Jalle de Blanquefort (**Tableau IV-14**), il a été observé que les niveaux de concentrations moyens mesurés dans la Jalle sont 11 à 17 fois plus élevés que ceux mesurés dans la Garonne.

Tableau IV-14. Débits, STEP majoritaires sur la Garonne et la Jalle de Blanquefort. Les concentrations de la Gabapentine et la Carbamazépine mesurées dans ces 2 hydrosystèmes.

	Garonne		Jalle de Blanquefort
Débit ($m^3.s^{-1}$)	481		0,14
STEP majoritaires (équivalent habitant)	Louis Fargue (300 000)	Clos de Hilde (403 300)	Cantinolle (85 000)
Concentration Gabapentine ($ng.L^{-1}$)	34,4		498,7
Concentration Carbamazépine ($ng.L^{-1}$)	9,0		104,2

Données de concentrations pour la Jalle et du **Chapitre 3. Section 1.**

Les rejets des stations d'épuration sont considérés comme les principaux apports de médicaments et donc de psychotropes dans les eaux de surface (Gonzalez Alonso et *al.*, 2010). Ainsi la capacité de la STEP va jouer un rôle dans les niveaux de concentrations qui seront mesurés dans les hydrosystèmes récepteurs des rejets (Kasprzyk-Hordern et *al.*, 2007). Cependant le **Tableau IV-14** montre que le débit du milieu va aussi influencer les niveaux de contamination.

C'est pourquoi, la Jalle de Blanquefort qui est une petite rivière à faible débit (0,14 $m^3.s^{-1}$) enregistre des niveaux de concentrations en Gabapentine et Carbamazépine plus élevés que la Garonne, bien qu'elle draine un bassin versant moins important que celui de ce fleuve. De plus, la Garonne est un hydrosystème qui a une dilution importante des masses d'eau due à une intrusion haline de l'océan Atlantique.
Les résultats précédents sont aussi observés dans l'estuaire de la rivière Douro au Portugal. L'étude de Madureira et *al*. (2010) présente des niveaux de concentrations en Carbamazépine du même ordre de grandeur (concentration moyenne de 15,4 $ng.L^{-1}$) que ceux retrouvés dans ces travaux de thèse. Cette estuaire portugais (débit moyen de 505 $m^3.s^{-1}$) est comme l'estuaire de la Gironde, le récepteur de plusieurs rejets de station d'épuration et influencé par une intrusion haline de l'océan Atlantique.

Le **Figure IV-16** présente le nombre de molécules quantifiées dans les 6 sites (Pauillac, Libourne, Bordeaux, Bègles, Cadaujac et Saint Macaire) étudiés, classés par gamme de taux de détection.

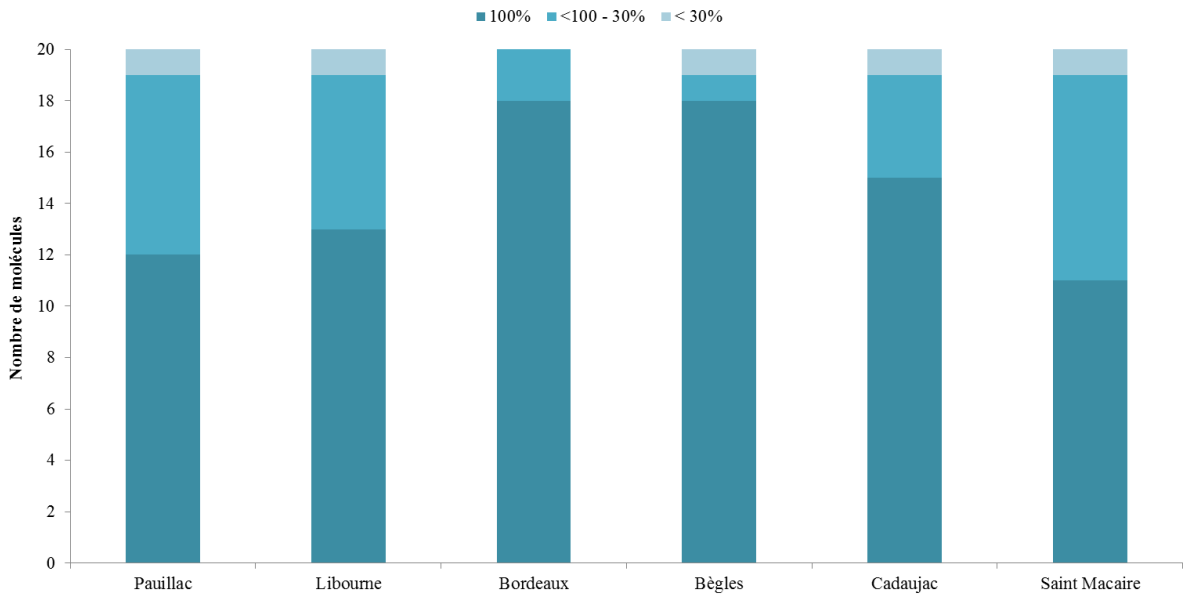


Figure IV-16. Nombre de molécules quantifiées dans l'ensemble des échantillons prélevés sur les 6 sites d'étude, classés par gamme de taux de détection.

Les sites de Bordeaux et de Bègles comptabilisent le maximum de composés (18) qui sont quantifiés dans tous les échantillons. Alors que Pauillac et Saint Macaire sont les sites qui comptabilisent le moins de molécules (12) avec une fréquence de quantification de 100 %. Enfin, sur les 20 composés quantifiés à Bordeaux, tous ont une fréquence de quantification supérieure à 37,5 %.

2.1.2. Etudes des variabilités par point et saisonnières

Dans ces travaux, l'analyse des variabilités par point et saisonnières sur les 6 sites de prélèvements n'a pu être présentée pour l'ensemble des psychotropes retrouvés dans la Gironde estuarienne. C'est pourquoi, l'examen des variabilités a été fait sur 6 molécules, (Carbamazépine, Oxazépam, Gabapentine, Sulpiride, Amisulpride et Tiapride) qui ont été choisies pour leur fréquence de quantification de 100 % et leur stabilité dans la Gironde estuarienne. De plus, la Carbamazépine, l'Oxazépam et la Gabapentine sont des molécules dont le comportement en eaux de surface françaises ou étrangères est plus ou moins renseigné alors que pour l'Amisulpride, le Tiapride et le Sulpiride aucune données n'est disponible en France et très peu à l'étranger.

Les concentrations des autres psychotropes mesurées dans les 6 sites de prélèvements sont présentées en **Annexes 25**.

La **Figure IV-17** rassemble les concentrations mesurées dans l'ensemble des points d'échantillonnage pour la Gabapentine, l'Oxazépam, la Carbamazépine, l'Amisulpride, le Tiapride et la Sulpiride.
Les concentrations minimales sont quantifiées à Pauillac pour les 6 composés, les concentrations maximales pour la Gabapentine, l'Oxazépam et la Carbamazépine sont mesurées à Bordeaux alors que celles de l'Amisulpride, le Tiapride et la Sulpiride sont quantifiées à Saint Macaire.

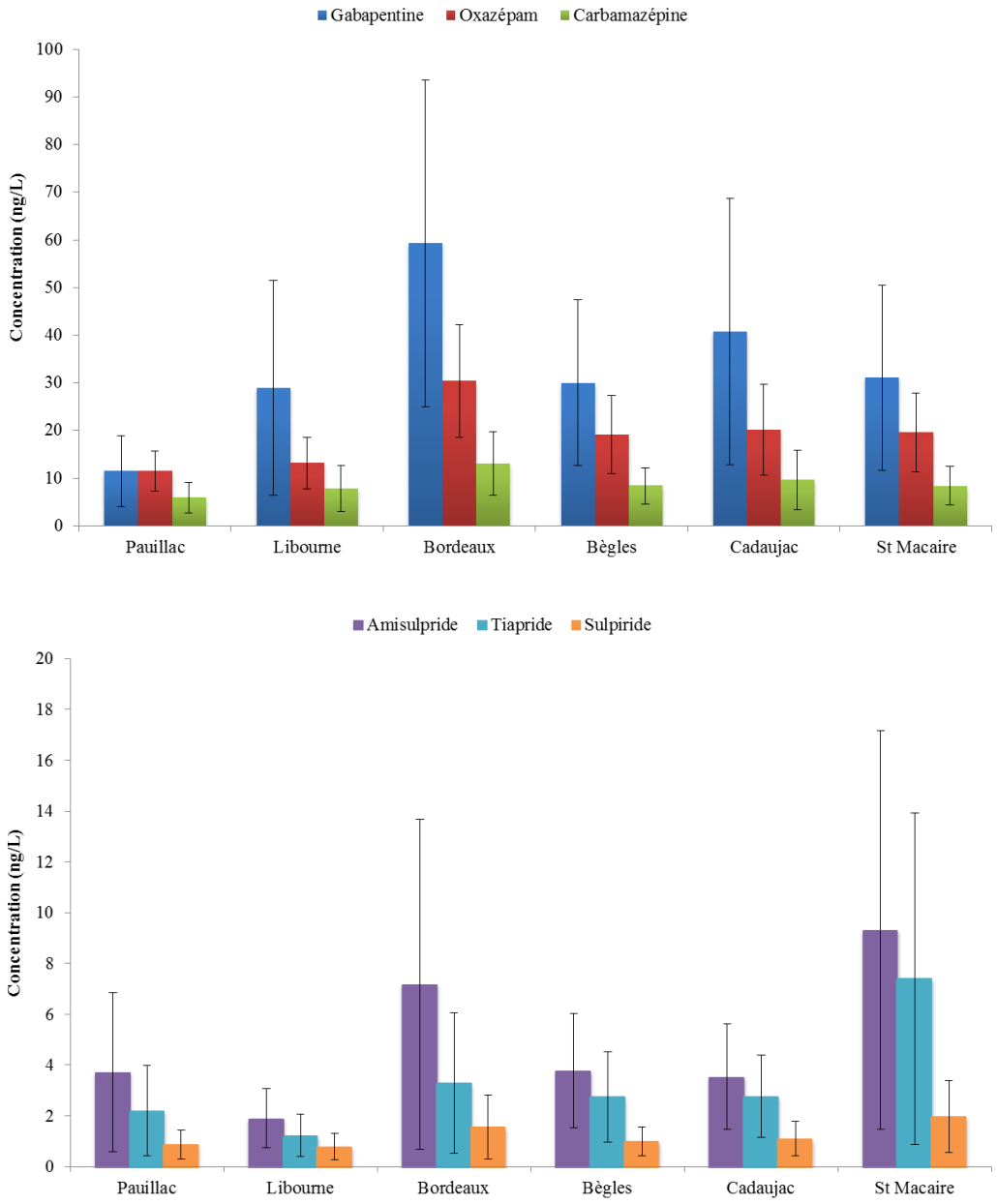


Figure IV-17. Concentrations mesurées dans les 6 sites de prélèvements pour la Gabapentine, l'Oxazépam, la Carbamazépine, l'Amisulpride, le Tiapride et la Sulpiride.

Le point de prélèvements de Bordeaux est celui qui enregistre les niveaux de concentrations en Gabapentine, Oxazépam et Carbamazépine les plus importants car il est proche du rejet de la station d'épuration Louis Fargue (408 000 EH), de plus, avec les marées il peut aussi être impacté par le rejet de la STEP Clos de Hilde (300 000 EH) situé à Bègles (à 10 km).

En comparant les points de prélèvement Bordeaux, Bègles, Cadaujac et St Macaire, nous pouvons observer que pour ces 3 psychotropes les niveaux de concentrations sont du même ordre de grandeur et donc que ces composés sont globalement persistants dans le milieu.

En observant les concentrations en Amisulpride, Tiapride et Sulpiride dans chaque site de prélèvements, nous constatons que les valeurs maximales sont mesurées à Saint Macaire. Des

recherches sur internet ont permis de voir que le site de St Macaire était proche de deux centres hospitaliers spécialisés dans la prise en charge de la maladie mentale (**Figure IV-18**). Celui situé à Cadillac (situé à 13 km du point de prélèvement) est spécialisé pour les adultes et celui de Toulenne (situé à 4 km du point de prélèvement) est spécialisé pour les enfants. De plus, ce site reçoit aussi les rejets de la moyenne station d'épuration LANGON Toulenne (30 000 EH, traitement secondaire), situé à Toulenne (à 4 km du point de prélèvement) qui récolte les eaux usées des villes de Fargue, Langon, Le Pian-sur-Garonne, Saint Macaire, Saint Maixant, Saint Pierre de Mons, Toulenne et Verdelais.

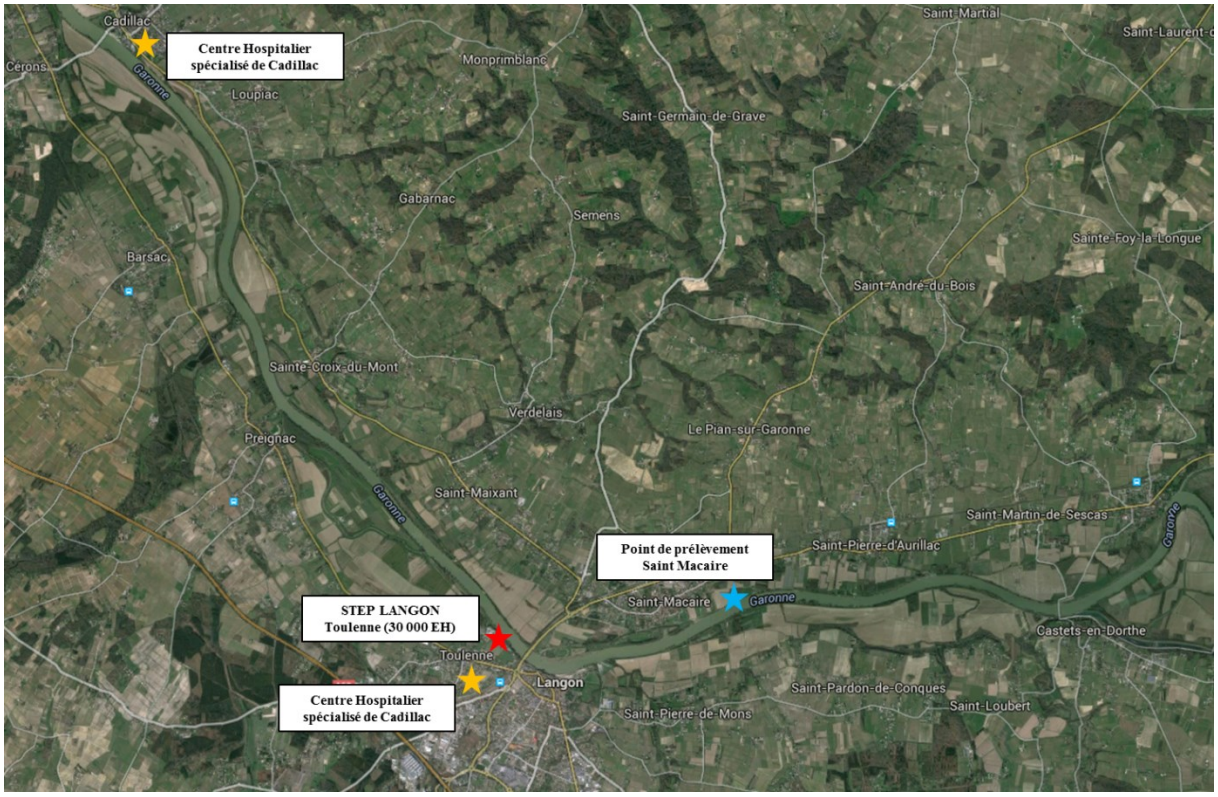


Figure IV-18. Localisation du point de prélèvement Saint Macaire, des deux centres hospitalier spécialisés de Cadillac et de la STEP LANGON Toulenne.

L'Amisulpride, le Tiapride et la Sulpiride sont des antipsychotiques généralement utilisés pour traiter les psychoses ou encore la schizophrénie. Nous pouvons alors supposer que ce type de composés peut être plus fortement consommé dans les centres hospitaliers spécialisés comme ceux de Cadillac et de Toulenne.

La **Figure IV-19** et **Figure IV-20** regroupe l'ensemble des concentrations mesurées sur les 16 mois échantillonnés dans les 6 points de prélèvement de la Gironde estuarienne pour la Gabapentine, l'Oxazépam, la Carbamazépine, l'Amisulpride, le Tiapride et la Sulpiride.

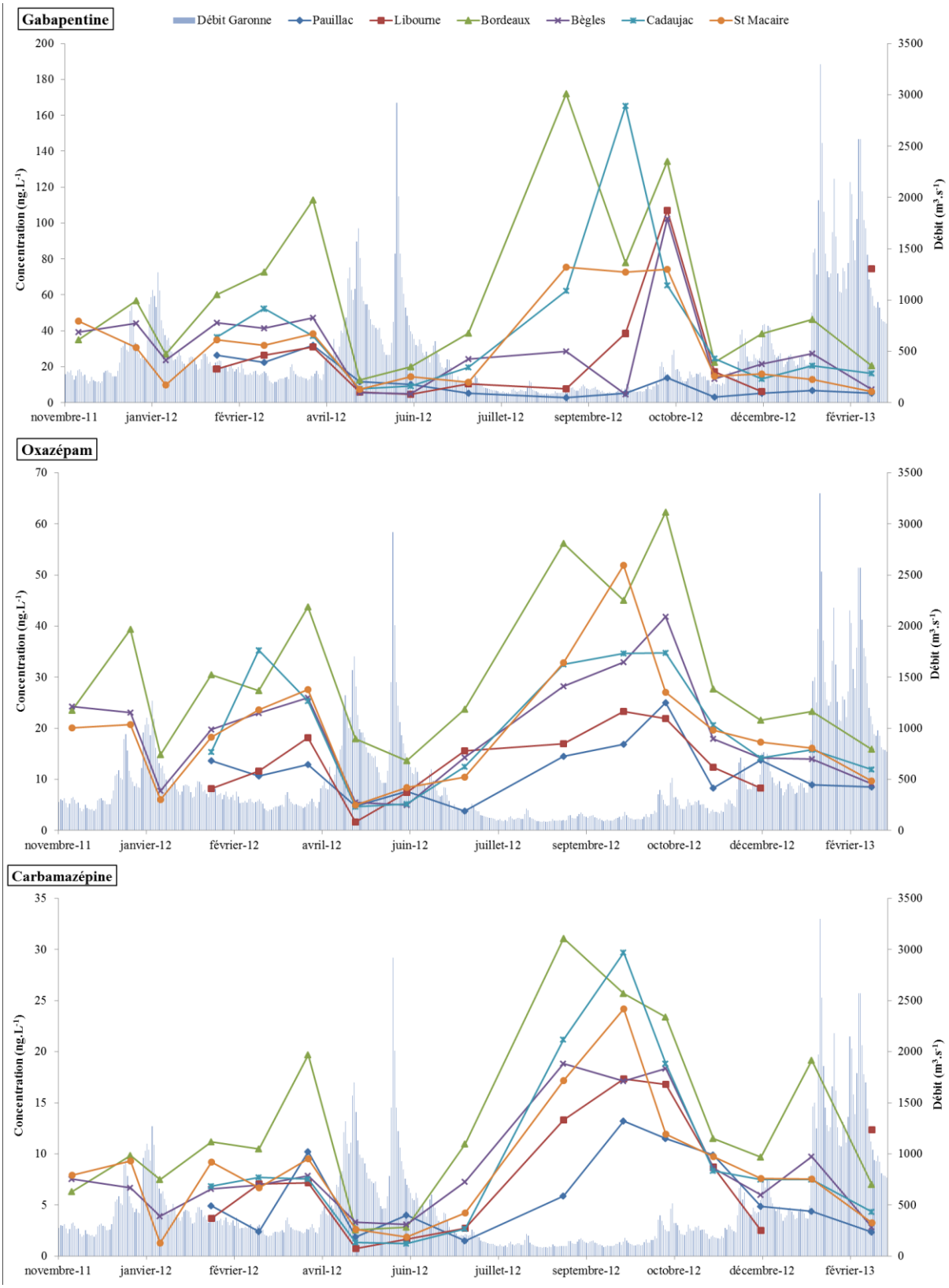


Figure IV-19. Concentrations de la Gabapentine, l'Oxazépam et la Carbamazépine mesurées dans les 6 sites de prélèvement de l'estuaire, de novembre 2011 à février 2013. Les mesures en-dessous de la limite de quantification ont été enlevées.

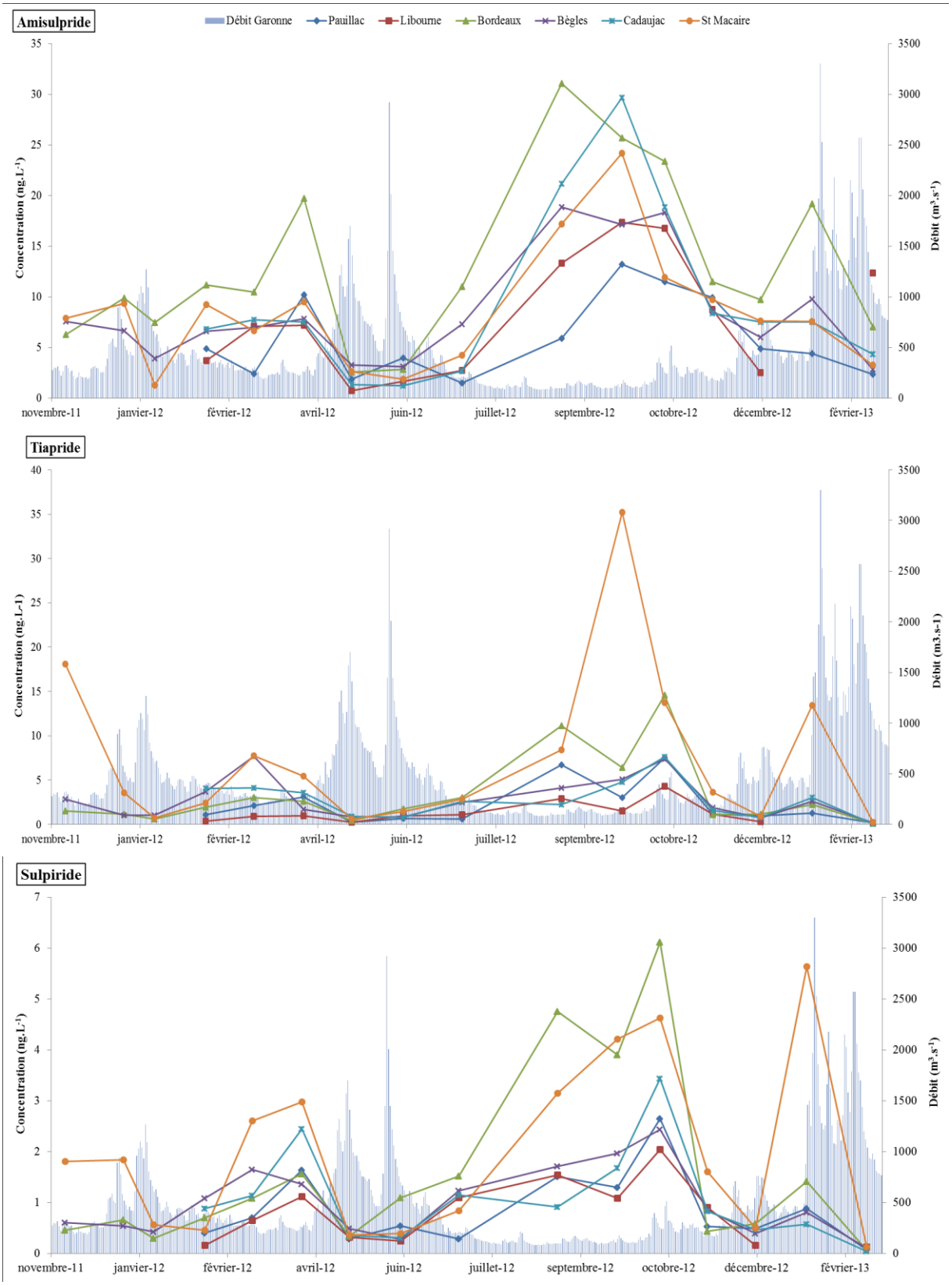


Figure IV-20. Concentrations de l'Amisulpride, le Tiapride et la Sulpiride mesurées dans les 6 sites de prélèvement de l'estuaire, de novembre 2011 à février 2013. Les mesures en-dessous de la limite de quantification ont été enlevées.

Pour les 6 composés et pour les 6 sites d'échantillonnage, le même profil de variabilité saisonnière est observé. Une augmentation des concentrations est observable entre février et avril 2012 (fin de l'hiver, printemps) et entre juillet et novembre 2012 (fin de l'été, automne). La comparaison avec les débits de la Garonne, lors des périodes de prélèvement, indique que les concentrations maximales sont atteintes en période d'étiage et les concentrations minimales en période de crue. Il y a donc un phénomène de dilution pendant les mois de pluie comme ce qui a été observé au niveau des STEP.
Ces variabilités saisonnières peuvent être liées au climat (Veach et Bernot, 2011 ; Baker et Kasprzyk-Horder, 2013 ; Petrie et *al*., 2014) mais aussi aux troubles psychiques qui engendrent une augmentation des prises de psychotropes. L'étude de Williams et *al*.(1987) montre qu'il existe bien une saisonnalité dans les désordres affectifs et qu'ils sont généralement plus prononcé au printemps et à l'automne. Ces résultats sont donc en accord avec le profil saisonnier que nous avons observé pour la Gabapentine, l'Oxazépam, la Carbamazépine, l'Amisulpride, le Tiapride et la Sulpiride dans la Gironde estuarienne.

- Cas particulier du Méprobamate :

La **Figure IV-21** montre que le Méprobamate est quantifiable à des concentrations inférieures à 10 ng.L^{-1}, dans quelques sites d'échantillonnage, de novembre 2011 à février 2012 avant l'arrêté d'avril 2012 mais aussi d'août à octobre 2012.

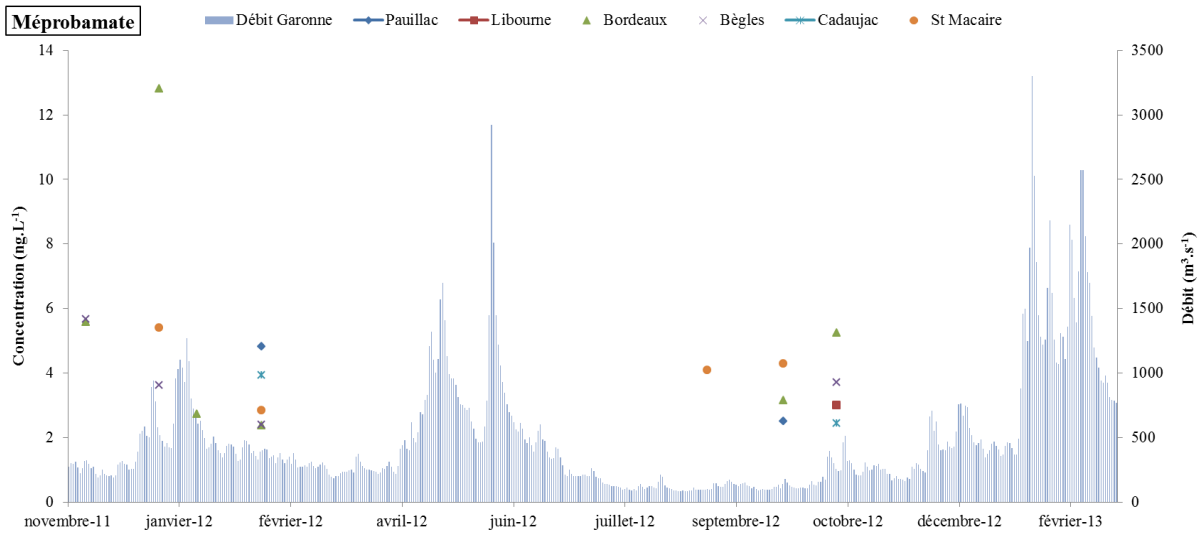


Figure IV-21. Concentrations du Méprobamate mesurées dans les 6 sites de prélèvement de l'estuaire, de novembre 2011 à février 2013. Les mesures en-dessous de la limite de quantification ont été enlevées.

Bien que ce composé soit interdit à l'importation, la préparation, la prescription et la délivrance de préparations magistrales, officinales et hospitalières (définies à l'article L. 5121-1 du code de la santé publique) ainsi qu'à l'utilisation dans les préparations homéopathiques depuis avril 2012 (**Chapitre 1. Section 1.1**), il est tout de même possible de le retrouver après cette date dans les sites d'étude de la Gironde estuarienne et surtout lors des périodes d'étiage. En regardant les données de consommation de MEDICAM, nous pouvons constater que bien que ce composé ait un arrêt de commercialisation depuis janvier 2012 il reste tout de même prescrit en faible quanti-

té en 2012 et même jusqu'en 2016 (**Annexe 5**). C'est pourquoi, lors des mois d'étiage (été, automne) il est détectable et quantifiable, dans la Garonne, à des niveaux de concentrations de l'ordre de quelques ng.L^{-1} et que lors de périodes de forts débits (printemps, hiver) il est dilué et pas retrouvé.

2.2.Suivi de la contamination par échantillonnage passif

2.2.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentration

Les fréquences de quantification, les concentrations moyennes, minimales et maximales (en ng/g de phase de POCIS) des psychotropes quantifiés dans les échantillonneurs passifs placés dans la Gironde estuarienne sont présentées dans le **Tableau IV-15**.

Tableau IV-15. Fréquences de quantification et concentrations en ng/g de phase des psychotropes trouvés sur l'ensemble des POCIS posés dans les sites de la Garonne.

Composés	Conc. Moyenne	E-T	Nombre d'échantillons	Fréquence de quantification	Conc. Minimale	Conc. Maximale
	ng/g de phase			%	ng/g de phase	ng/g de phase
Oxazépam	389,1	172,9	88	100	98,1	930,8
Carbamazépine	216,1	94,6	88	100	52,1	644,8
Amisulpuride	176,5	135,3	88	100	10,9	1246,5
Tiapride	119,1	90,7	88	100	7,6	678,8
Venlafaxine	97,1	80,9	88	100	4,8	765,9
Lamotrigine	89,7	46,2	88	100	8,5	276,9
Méprobamate	59,1	52,9	80	91	4,2	347,0
Sulpiride	40,8	29,2	88	100	2,3	238,1
Milnacipran	33,2	31,7	62	70	4,7	360,3
Primidone	20,4	12,1	88	100	1,6	100,5
Fluoxétine	15,0	15,3	35	40	0,2	102,0
Bromazépam	14,0	9,7	80	91	1,6	75,8
Valpromide	12,7	9,9	76	86	1,7	51,5
Témazépam	11,8	3,2	48	55	7,1	27,1
Citalopram	10,0	6,9	73	83	1,4	47,8
Amitriptyline	9,0	3,1	26	30	5,0	26,8
Clorazépate	7,9	4,0	87	99	1,2	31,0
Zopiclone	6,8	3,5	36	41	1,9	22,3
Nordiazépam	6,5	2,9	88	100	1,1	20,8
Méthadone	5,6	3,3	55	63	2,0	23,5
Miansérine	5,0	3,2	74	84	1,0	28,2
Imipramine	3,6	2,4	5	6	1,3	12,4
Cyamémazine	2,9	1,2	11	13	1,2	12,0
Prazépam	2,6	1,6	88	100	0,2	13,8
Zolpidem	1,0	0,8	83	94	0,1	8,7

Sur l'ensemble des sites échantillonnés avec les POCIS, 10 psychotropes (Oxazépam, Carbamazépine, Amisulpride, Tiapride, Venlafaxine, Lamotrigine, Sulpiride, Primidone, Nordiazépam et Prazépam) ont une fréquence de quantification de 100%, 15composés (Méprobamate, Milnacipran, Bromazépam, Zopiclone, Nordiazépam, Méthadone, Prazépam, Zolpidem) ont une fréquence de quantification comprise entre 6% et 99% et 22 molécules (Maprotiline, Mirtazapine, Buspirone, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Paroxétine, Imipramine, Cyamémazine, Hydroxyzine, Duloxétine, Clorazépate, Amitriptyline, Norfluoxétine, Clonazépam, Lorazépam, Fluoxétine, Chlorpromazine, Sertraline, Alprazolam, Clomipramine, Flunitrazépam, Témazépam, Clobazam, Diazépam et Pimozide) ne sont jamais détectées.

Sur la totalité des psychotropes détectés et quantifiés en ng par gramme de phase de POCIS, la concentration moyenne la plus élevée est mesurée pour l'Oxazépam (389,1 ± 172,9 ng/g de phase de POCIS) et la concentration moyenne la plus faible est retrouvée pour le Zolpidem (1,0 ± 0,8 ng/g de phase de POCIS).

Le **Tableau IV-16** présente les Rs utilisés et les Rs corrigés par les PRC (voir **Chapitre 3. Section 2**) et les concentrations en $ng.L^{-1}$ obtenues par les POCIS.

Tableau IV-16. Rs, Rs corrigé et concentration moyenne en ng.L-1 obtenus par les POCIS placés dans la Garonne.

Composés	Conc. Moyenne ng/g de phase	Rs	Rs corrigé	Conc. Moyenne ng/L	E-T	Conc. Minimale ng/L	Conc. Maximale ng/L
Oxazépam	399,5	0,29	0,27	13,8	7,9	1,6	97,3
Carbamazépine	215,7	0,15	0,14	15,6	9,6	1,5	109,6
Amisulpuride	175,4	-	-	-	-	-	-
Tiapride	122,5	0,14	0,13	8,9	7,9	0,3	50,5
Venlafaxine	96,1	0,12	0,11	7,9	7,0	0,2	40,4
Lamotrigine	89,1	-	-	-	-	-	-
Méprobamate	56,8	0,15	0,16	4,8	5,0	0,1	24,4
Sulpiride	40,6	0,15	0,14	2,8	2,3	0,09	20,0
Milnacipran	32,5	0,03	0,03	13,4	13,6	0,5	211,2
Primidone	19,6	0,18	0,17	1,6	1,5	0,05	12,5
Bromazépam	14,5	0,09	0,08	1,6	1,3	0,2	9,3
Fluoxétine	14,4	0,17	0,15	0,7	0,7	0,005	5,4
Valpromide	12,2	-	-	-	-	-	-
Témazépam	11,8	0,16	0,15	0,6	0,3	0,09	2,4
Citalopram	10,0	0,15	0,14	0,7	0,5	0,05	4,4
Amitriptyline	8,9	0,19	0,17	0,5	0,3	0,1	1,5
Clorazépate	8,0	0,09	0,08	0,9	0,6	0,06	4,5
Zopiclone	6,6	0,80	0,74	0,07	0,03	0,01	0,3
Nordiazépam	6,4	0,18	0,17	0,4	0,2	0,04	1,5
Méthadone	5,8	0,36	0,33	0,1	0,1	0,02	0,6
Miansérine	4,8	-	-	-	-	-	-
Imipramine	3,6	0,18	0,17	0,2	0,1	0,06	0,6
Cyamémazine	2,8	0,07	0,07	0,3	0,2	0,05	0,8
Prazépam	2,7	0,12	0,11	0,2	0,1	0,02	0,8
Zolpidem	1,0	-	-	-	-	-	-

Parmi les 25 composés trouvés dans les POCIS, 13 molécules (Oxazépam, Carbamazépine, Tiapride, Venlafaxine, Sulpiride, Milnacipran, Bromazépam, Témazépam, Clorazépate, Zopiclone, Imipramine, Cyamémazine et Prazépam) ont un Rs leur permettant de convertir les ng/g de phase en $ng.L^{-1}$, 8 psychotropes (Amisulpride, Lamotrigine, Méprobamate, Primidone, Fluoxétine, Valpromide, Citalopram et Nordiazépam) ont des Rs qui ont été obtenus lors des calibrations en laboratoire (**Chapitre 3. Section 2**) mais qui ne peuvent être utilisés dans ce suivi car leurs gammes de linéarité sont beaucoup plus courtes (5 à 18 jours) que le temps d'exposition des POCIS placés dans la Garonne (25 à 30 jours). De plus, 4 molécules (Amitriptyline, Méthadone, Miansérine et Zolpidem) n'ont pas de Rs car elles ont eu une accumulation aléatoire ou elles ne se sont pas accumulées dans les POCIS lors des calibrations en laboratoire. Enfin pour le Méprobamate, la Primidone, la Fluoxétine, le Citalopram, l'Amitriptyline, le Nordiazépam et la Méthadone des Rs ont été récupérés dans des travaux de thèse qui ont été effectués au laboratoire (Belles, 2012 ; Aminot, 2013 ; Brieudes, 2014).

Ainsi avec les POCIS exposés dans la Garonne, la concentration moyenne la plus élevée est mesurée pour la Carbamazépine (15,6 ± 9,6 $ng.L^{-1}$) et la concentration moyenne la plus faible est retrouvée pour le Zopiclone et la Méthadone (0,07 ± 0,03 $ng.L^{-1}$).

La **Figure IV-22** présente le nombre de molécules quantifiées, classées par gamme de détections, dans les sites de Pauillac, Libourne, Bordeaux, Bègles, Cadaujac et Saint Macaire.

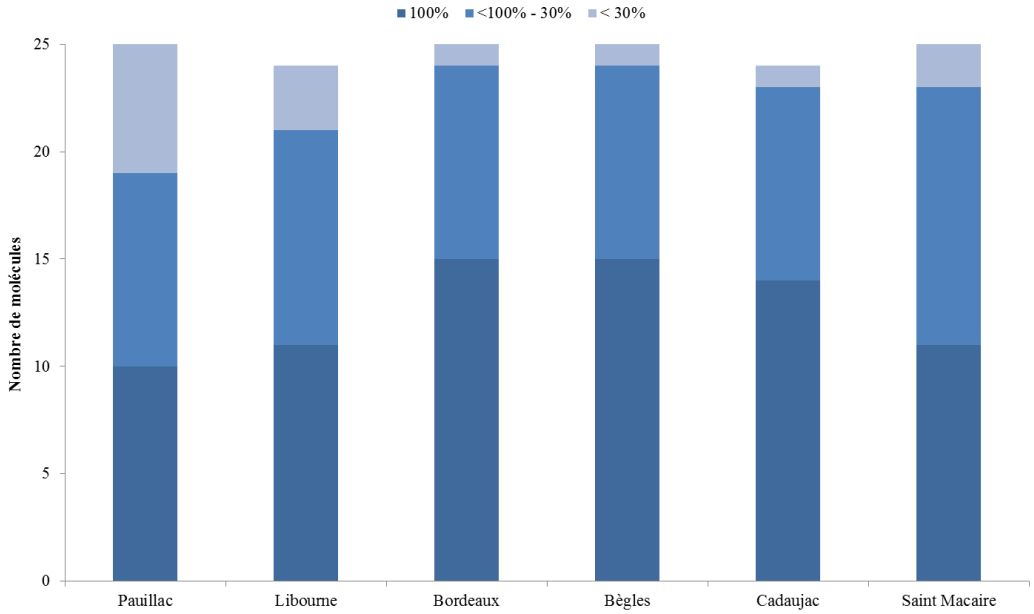


Figure IV-22. Nombre de molécules quantifiées dans l'ensemble des échantillons passifs prélevés sur les 6 sites d'étude, classés par gamme de taux de détection.

Les POCIS placés dans le site de Bordeaux comptabilisent le maximum de composés (15) qui ont un taux de quantification de 100%. En revanche, les POCIS exposés dans le site de Pauillac recensent le plus de psychotropes (6) avec un taux de quantification inférieur à 30% et comptabilise seulement 10 molécules avec un taux de quantification de 100 %.

2.2.2. Comparaison avec l'échantillonnage ponctuel

La **Figure IV-23** présente le nombre de molécules quantifiées dans les échantillons ponctuels et passifs prélevés dans les 6 sites d'étude, classées par gamme de détections.

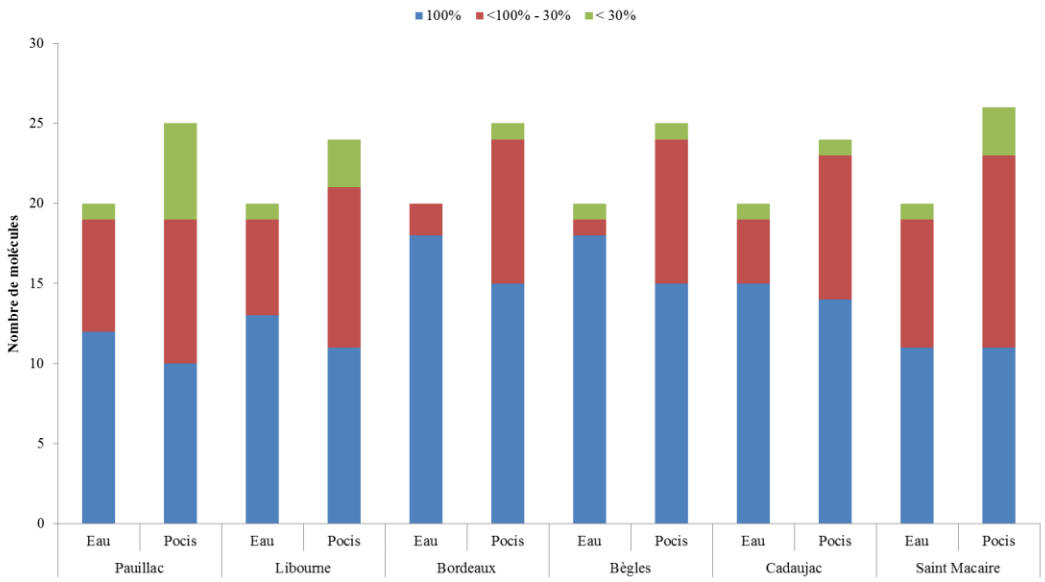


Figure IV-23. Nombre de molécules quantifiées dans l'ensemble des échantillons ponctuels et passifs prélevés sur les 6 sites d'étude, classés par gamme de taux de détection.

Les résultats montrent que plus de composés ont été trouvés dans les POCIS (25) que dans les échantillons d'eau (20). Mais aussi, que plus de composés avec des taux de détection inférieure à 100% ont été retrouvés dans les POCIS que dans les échantillons d'eau ponctuels.
Le caractère intégratif du POCIS lui permet d'abaisser les limites de détection et donc de détecter des composés qui sont présent à l'état de trace dans le compartiment aquatique et qui ne sont donc pas perceptibles dans les échantillons d'eau.
Ainsi 7 molécules ont été trouvées dans les POCIS et non dans les échantillons ponctuels : la Fluoxétine, le Témazépam, l'Amitriptyline, le Clorazépate, le Miansérine, l'Imipramine et la Cyamémazine. Les concentrations moyennes prédites par le POCIS de ces psychotropes (quand cela a été possible) sont comprises entre 0,9 ± 0,6 et 0,2 ± 0,1 $ng.L^{-1}$.
Cependant, comme il a été observé dans le **Chapitre 3. Section 2**, la Gabapentine et le Lévétiracétam n'ont pas été accumulés par les POCIS alors qu'ils sont présents dans les échantillons d'eau de la Garonne à des concentrations non négligeables.

La comparaison des concentrations moyennes ($ng.L^{-1}$) mesurées dans les échantillons ponctuels et dans les échantillonneurs passifs pour l'ensemble du suivi dans l'estuaire de la Gironde est présentée dans la **Figure IV-24**. Globalement, les concentrations obtenues avec les deux méthodes d'échantillonnage ne diffèrent pas plus d'un facteur 2,5.

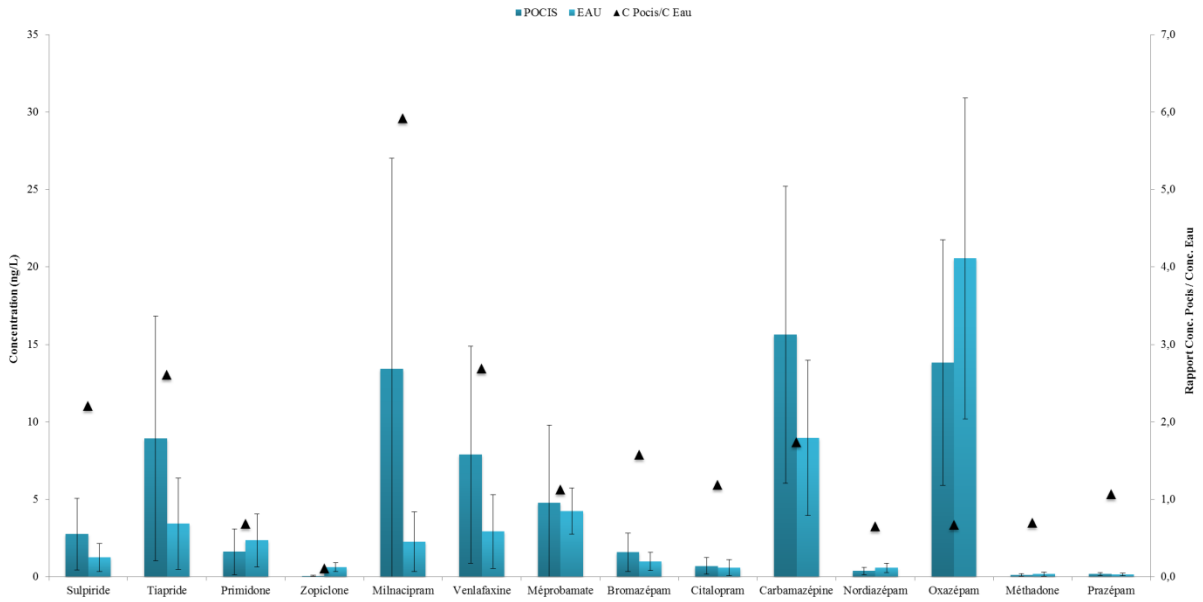


Figure IV-24. Concentrations moyennes en ng.L^{-1} et rapports des concentrations des composés quantifiés dans les échantillons ponctuels et les échantillonneurs passifs.

Seulement le Milnacipran et le Zopiclone ont des rapports de concentrations extrêmes (5.9 et 0.1, respectivement). Le faible log Kow du Zopiclone (0.81) et donc sa forte hydrophilie peut expliquer une faible accumulation dans le POCIS et donc une sous-évaluation de la concentration dans le milieu avec cet outil. De plus, nous avons pu observer dans le **Chapitre 3. Section 2** que des composés très hydrophiles comme la Gabapentine et le Lévétiracétam n'étaient pas accumulés dans le POCIS.

Dans le cas du Milnacipran, dans la calibration *in situ* au site de Cadaujac sur la Garonne (**Chapitre 3. Section 2**) nous avons observé que ce composé atteignait au bout de 10 jours d'exposition un équilibre. Ainsi dans le cas de notre suivi, il est possible qu'il y ait eu le même phénomène, entrainant alors une surévaluation de la concentration dans le POCIS.

2.2.3. Etude des variabilités par point et saisonnières

A titre d'exemple, la **Figure IV-25** présente les concentrations mesurées dans les échantillons ponctuels et dans les POCIS sur l'ensemble des sites du suivi effectué dans l'estuaire de la Gironde pour la Carbamazépine et l'Oxazépam.

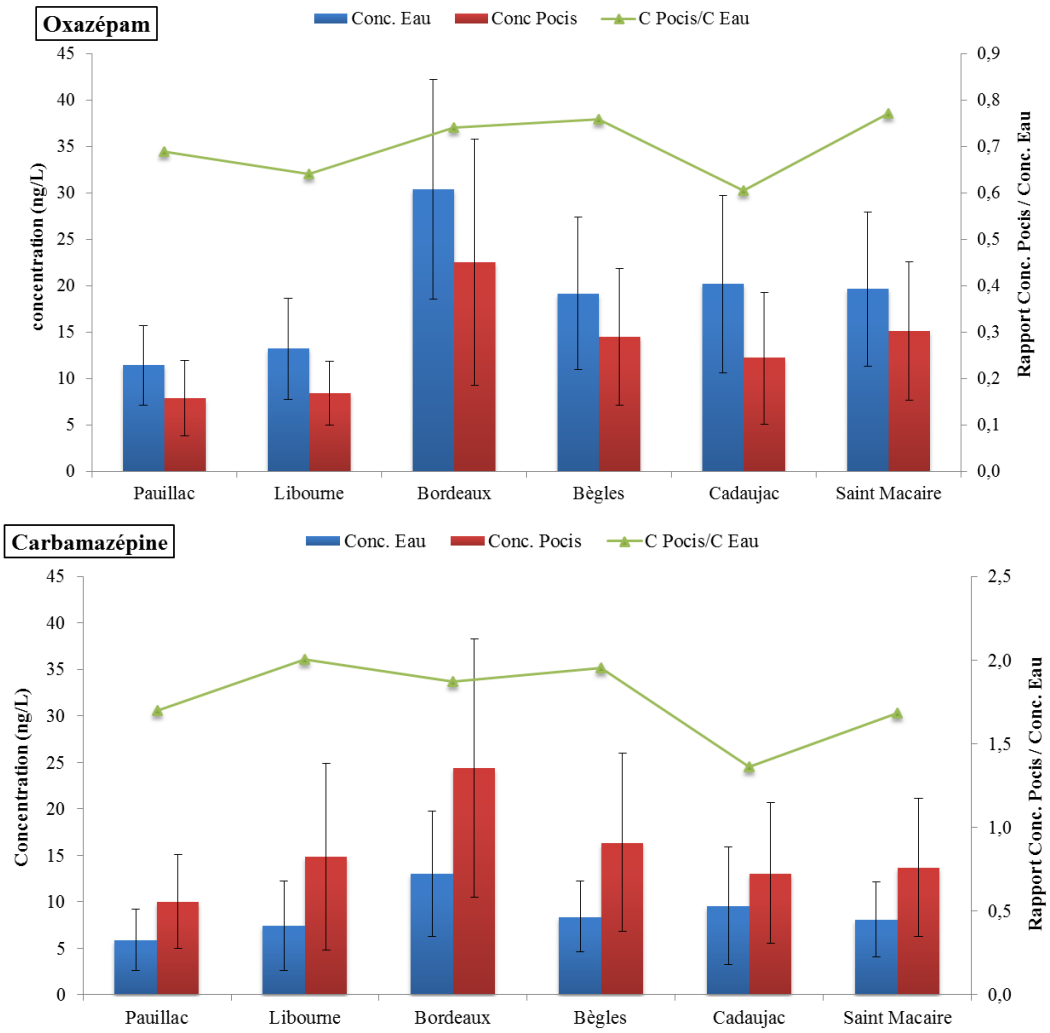


Figure IV-25. Concentrations moyennes en ng.L^{-1} et rapport des concentrations de la Carbamazépine et de l'Oxazépam quantifiés dans les échantillons ponctuels et les échantillonneurs passifs prélevés dans les 6 sites de l'estuaire de la Gironde.

Globalement pour ces deux molécules, les niveaux de concentrations observés dans les POCIS sont en accord avec ceux mesurés dans les échantillons ponctuels. De plus les rapports de concentrations entre le POCIS et les échantillons d'eau ne dépassent pas un facteur 2. Enfin, les mêmes tendances sont observées entre les différents sites d'étude où les concentrations les plus élevées sont quantifiées à Bordeaux et les plus faibles à Pauillac.

Le caractère intégratif du POCIS lui permet de lisser les variations de concentrations, dans le milieu, observées par échantillonnage ponctuel, qui sont généralement liées aux saisons et aux débits du cours d'eau (**Figure IV-26**).

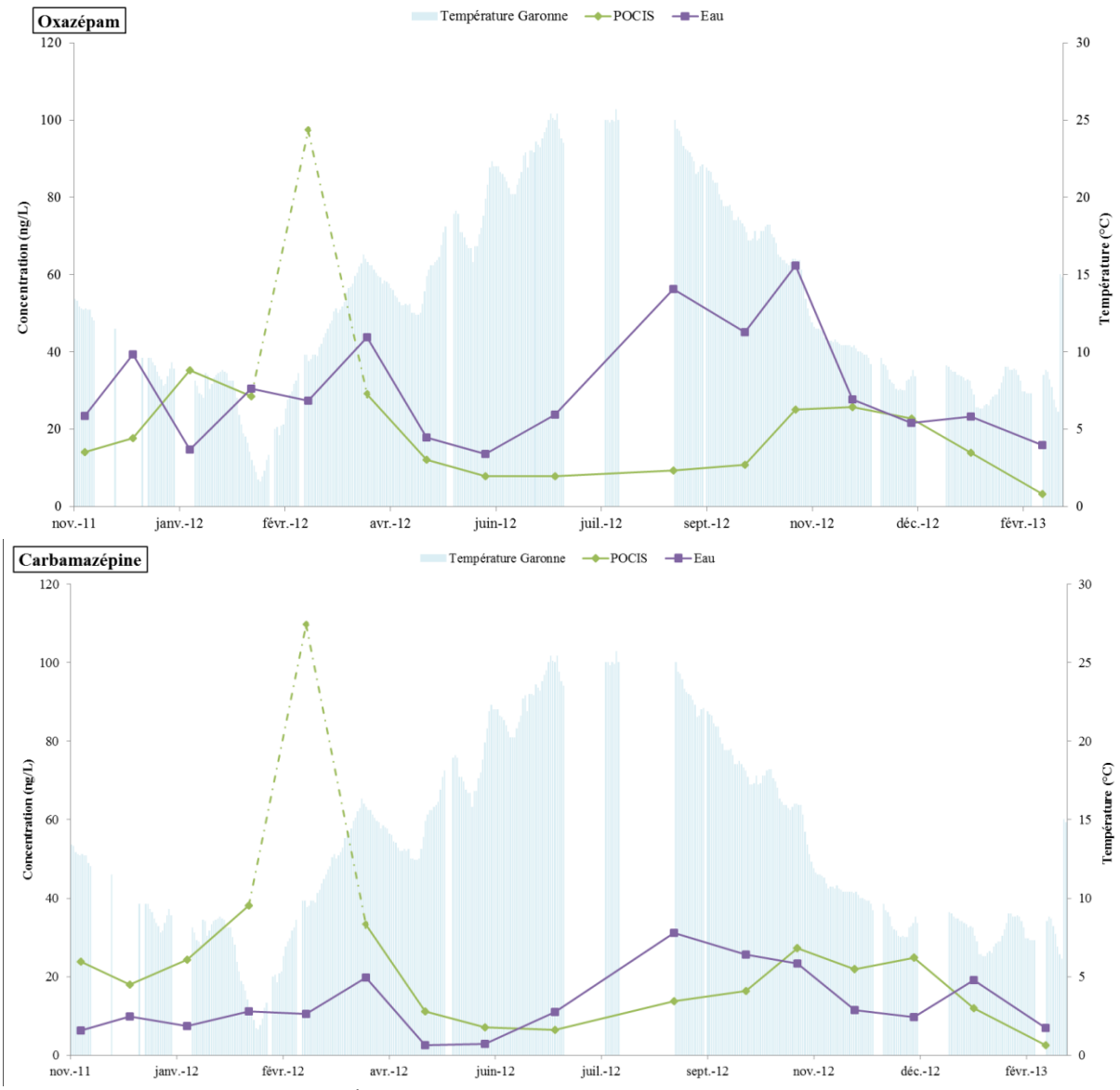


Figure IV-26. Concentrations (ng.L^{-1}) en Oxazépam et Carbamazépine mesurées à Bordeaux dans les échantillons ponctuels et dans les POCIS lors des 16 prélèvements.

Cependant une augmentation anormale des concentrations mesurées dans les POCIS est remarquée entre février et mars 2012 pour l'ensemble des psychotropes (exemple de l'Oxazépam et la Carbamazépine dans la **Figure IV-26**). Ce résultat est en désaccord avec les données obtenues avec l'échantillonnage ponctuel. Nous pouvons observer que cette hausse est corrélée à une forte diminution de la température de l'eau à cette même période (données MAGEST ; température inférieure à 5°C)

Nous nous sommes alors intéressés à la saisonnalité des constantes d'élimination (**Figure IV-27**) au site de Bordeaux des 3 PRC utilisés dans les POCIS.
Sur la totalité du suivi, la constante d'élimination du Salbutamol D3 (en rouge) est plus élevée que celle de la Caféine 13C (en bleu) et de la DIA D5 (en vert). Néanmoins, la variation des constantes d'élimination des 3 PRC va fluctuer de la même manière au cours du suivi.

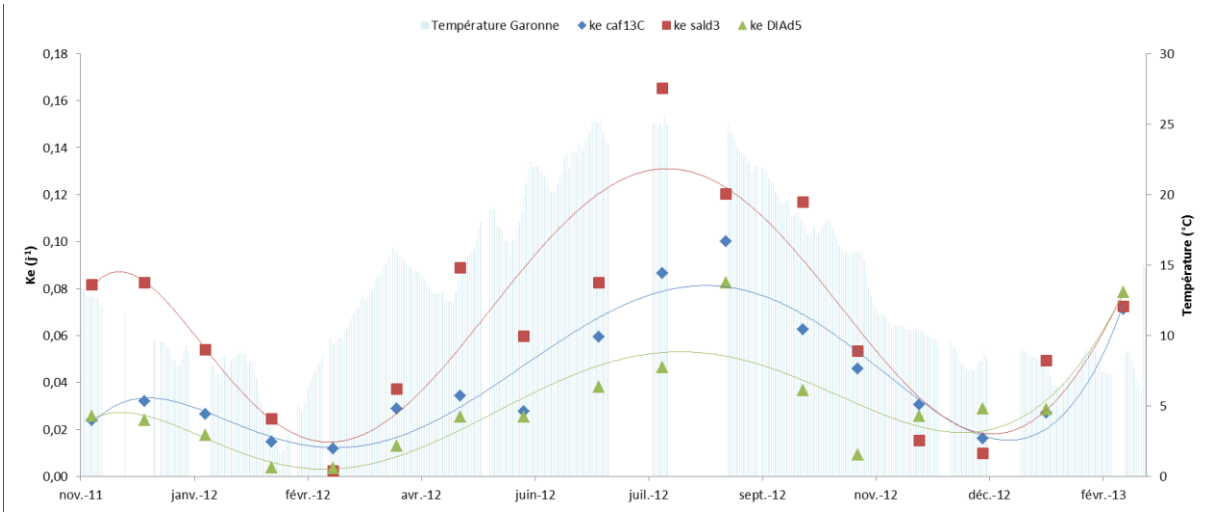


Figure IV-27. Variations des constantes d'élimination des 3 PRC au cours du suivi dans la Garonne au site de Bordeaux.

Une bonne corrélation est observée entre les variations des constantes d'éliminations des 3 PRC placés dans les POCIS et les variations de températures enregistrées dans le milieu. Ainsi les plus faibles valeurs de constantes d'élimination sont recueillies lors de la forte baisse de température de l'eau de la Garonne entre février et mars 2012. Ce même phénomène est aussi observé entre novembre et décembre 2012.

Par ailleurs, les variations du pourcentage de PRC restant dans les POCIS exposés au site de Bordeaux (**Figure IV-28**) confirment les observations qui ont été faites précédemment. Effectivement lors des faibles températures enregistrées dans l'eau (février-mars 2012 et novembre-décembre 2012), les 3 PRC présents dans les POCIS désorbent beaucoup moins. Ainsi entre février et mars 2012, plus de 90% du Salbutamol D3 et de la DIA D5 sont encore présents dans les POCIS après exposition et plus de 70% dans la période de novembre à décembre 2012.

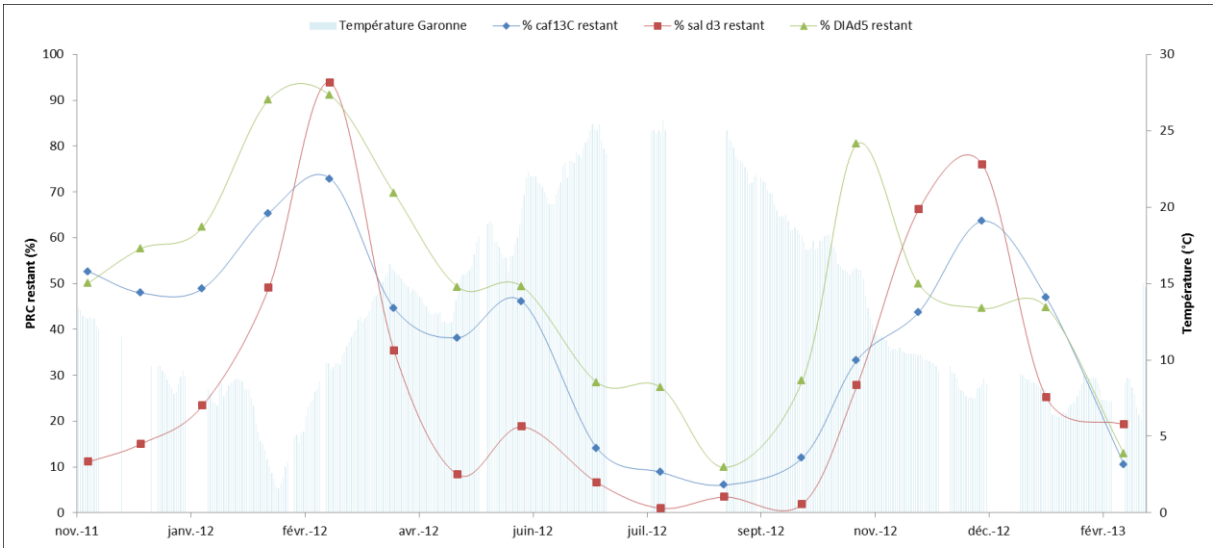


Figure IV-28. Variations du pourcentage de PRC restant dans les POCIS après exposition au site de Bordeaux.

Ce phénomène a déjà été observé dans plusieurs études portant sur diverses échantillonneurs passifs pour composés hydrophobes et/ou hydrophiles (Booij et *al*., 2003 ; Alvarez et *al*., 2004 ; Vrana et *al*., 2006 ; Li et *al*., 2010 ; Harman et *al*., 2011 ; Tang et *al*., 2012). Les travaux de Togola et Budzinski (2007) évoquent la possible implication de la température dans la variation des taux d'échantillonnage. Alvarez et *al.* (2004) ont montré que l'équation de Hayduk et Laudie (Lyman et *al*., 1982) mettait en relation le coefficient de diffusion dans l'eau (Dw) et la température, qui sont directement proportionnels. Enfin Dw entre dans la formulation du taux d'échantillonnage. Ainsi dans cette étude, les auteurs observent que le coefficient de diffusion augmente doublement entre une température à 10°C et 30°C, augmentant ainsi de 50 % le Rs. Les travaux de recherche de Li et *al*. (2010) montrent également que le taux d'échantillonnage des POCIS pharmaceutiques va être influencé par la température de l'eau mais de manière différente selon les composés. Une augmentation d'un facteur 2 est constaté pour la Carbamazépine et le Citalopram entre les Rs obtenus à 5°C et ceux à 25°C alors que pour la Venlafaxine et le Nadolol, la hausse est 3 fois supérieure. Donc ce phénomène est composé dépendant (Harman et *al*., 2011).
Néanmoins, il s'avère que les taux d'échantillonnage et les constantes d'élimination des PRC peuvent être affectés par plusieurs facteurs environnementaux (pH, salinité, température, hydrodynamisme, etc…). Donc la plupart des études supposent que la température à de faibles effets sur la variation de ces composantes à moins que de grandes différences de températures existent entre les sites d'exposition ou les périodes d'exposition (été/hiver) (Booij et *al*., 2003 ; Tang et *al*., 2012).

Nos résultats restent tout de même en accord avec les tendances retrouvées sur les mêmes sites d'études et les mêmes périodes de suivi que Belles (2012) et Aminot (2013).

Ainsi cette relation « très faible température – faible désorption des PRC » entraine une mauvaise efficacité du POCIS et donc une mauvaise quantification des composés. Dans la **Figure IV-26**, l'effet de la température sur la quantification de l'Oxazépam et la Carbamazépine par le POCIS est bien marqué pour la période février-mars 2012 mais quasiment imperceptible pour novembre-décembre 2012. Cependant la **Figure IV-29** montre que lors des deux périodes où la température de l'eau a chuté, la concentration en Venlafaxine a été surévaluée par le POCIS par rapport à celle mesurée dans les échantillons ponctuels.

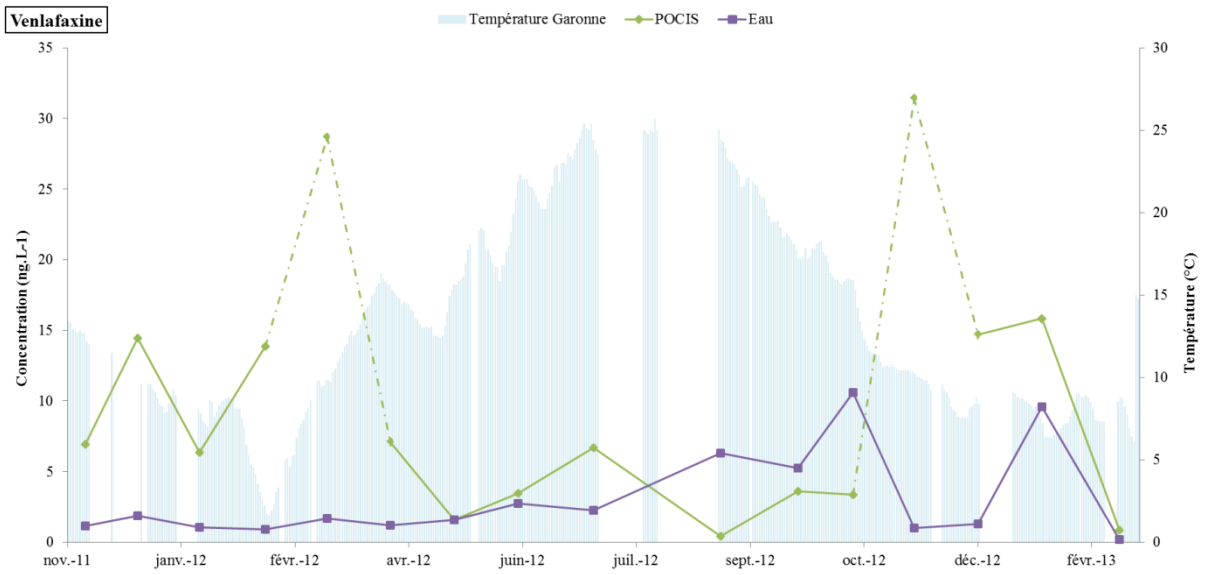


Figure IV-29. Concentrations en Venlafaxine mesurées à Bordeaux dans les échantillons ponctuels et dans les POCIS lors du suivi dans la Garonne.

Même s'il est encore nécessaire d'améliorer le POCIS, cet outil permet tout de même d'abaisser les limites de détection et donc de quantifier des composés présents à l'état de trace dans le milieu et non perceptibles dans les échantillons d'eau.

La **Figure IV-30** donne les concentrations de quelques composés, seulement mesurés par les échantillonneurs passifs placés dans les 6 sites du suivi sur l'estuaire de la Gironde.

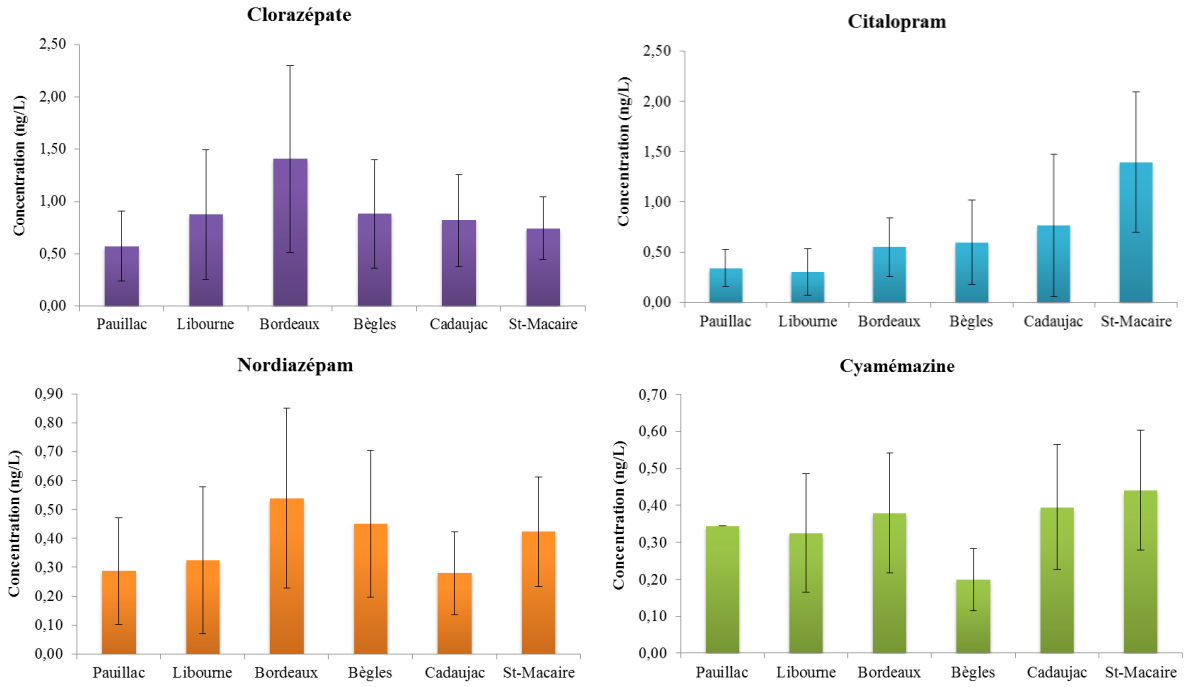


Figure IV-30. Concentrations quantifiées par échantillonnage passif du Clorazépate, Citalopram, Nordiazépam et Cyamémazine dans les 6 sites de prélèvement du suivi sur l'estuaire de la Gironde.

2.3. Caractérisation des apports

Dans la littérature, les stations d'épurations sont décrites comme les apports majoritaires de composés pharmaceutiques et donc de psychotropes pour le milieu aquatique. Ainsi, les flux calculés à partir des concentrations mesurées dans les deux STEP de l'agglomération bordelaise Louis Fargue et Clos de Hilde ont été sommés pour estimer le flux des effluents urbains entrant en Garonne (**Tableau IV-17**).
Le flux maximal estimé est de 379,1 ± 54,3 $g.j^{-1}$ pour la Gabapentine et le flux minimal estimé est pour le Diazépam avec une valeur de 0,7 ± 0,01 $mg.j^{-1}$.

Tableau IV-17. Bilan des flux en psychotropes déversés en Garonne par les STEP Clos de Hilde et Louis Fargue.

Composés	Flux moyens apportés en Garonne par LF et CdH $g.j^{-1}$
Gabapentine	379,1 ± 54,3
Oxazépam	205,4 ± 26,9
Amisulpride	91,9 ± 37,6
Carbamazépine	87,6 ± 10,6
Lamotrigine	65,6 ± 15,5
Méprobamate	50,5 ± 21,9
Venlafaxine	26,9 ± 6,8
Lorazépam	25,6 ± 11,2
Lévétiracétam	22,7 ± 4,2
Citalopram	12,0 ± 3,2
Valpromide	11,0 ± 2,6
Tiapride	10,2 ± 2,8
Milnacipran	8,1 ± 2,1
Zopiclone	6,5 ± 1,2
Sulpiride	6,4 ± 2,0
Primidone	5,2 ± 1,2
Paroxétine	5,0 ± 1,6
Témazépam	4,6 ± 1,1
Fluoxétine	3,8 ± 1,0
Clorazépate	3,0 ± 0,6
Bromazépam	2,9 ± 0,7
Amitriptyline	2,9 ± 0,6
Nordiazépam	2,7 ± 0,5
Méthadone	2,5 ± 0,8
Hydroxyzine	2,4 ± 0,6
Cyamémazine	2,4 ± 0,8
Prazépam	1,3 ± 0,3
Zolpidem	0,9 ± 0,3
Clomipramine	0,8 ± 0,2
Diazépam	0,7 ± 0,1

A partir des données de débits au site de Bordeaux et des concentrations mesurées dans le milieu, nous avons pu calculer les flux en psychotropes dans la Garonne (**Tableau IV-18**).

Tableau IV-18. Flux moyens en psychotropes mesurés dans la Garonne en g.j-1 et rapport entre les flux calculés et les flux estimés dans la Garonne.

Composés	Flux moyens en psychotrope en Garonne ($g.j^{-1}$)	Rapport flux sortants des STEP / flux moyens en Garonne
Gabapentine	1709,6 ± 628,5	0,2
Oxazépam	1009,5 ± 400,1	0,2
Lamotrigine	468,7 ± 211,2	0,1
Carbamazépine	410,2 ± 187,3	0,2
Amisulpuride	187,9 ± 127,6	0,5
Venlafaxine	114,3 ± 107,9	0,2
Lévétiracétam	87,6 ± 59,2	0,3
Tiapride	80,1 ± 46,7	0,1
Bromazépam	79,1 ± 89,7	0,0
Valpromide	72,7 ± 28,5	0,2
Méprobamate	60,4 ± 78,3	0,8
Primidone	59,1 ± 36,8	0,1
Milnacipran	56,5 ± 36,0	0,1
Sulpiride	40,4 ± 24,5	0,2
Zopiclone	32,2 ± 24,3	0,2
Citalopram	22,3 ± 25,9	0,5
Nordiazépam	18,3 ± 15,1	0,1
Prazépam	7,4 ± 3,0	0,2
Méthadone	5,2 ± 4,3	0,5
Zolpidem	2,8 ± 2,0	0,3

Le flux maximal retrouvé dans la Garonne est de 1709,6 ± 628,5 $g.j^{-1}$ pour la Gabapentine et le flux minimal est mesuré pour le Zolpidem avec 2,8 ± 2,0 $g.j^{-1}$.

En comparant les flux moyens apportés par les STEP (**Tableau IV-17**) avec les flux mesurés en Garonne (**Tableau IV-18**), nous remarquons que tous les composés retrouvés en STEP ne le sont pas forcément dans le milieu. Certains psychotropes sont dilués, dégradés ou subissent d'autres phénomènes physico-chimiques à leur entrée dans la Garonne.

Afin d'estimer l'importance de l'apport des effluents sortants des STEP de l'agglomération bordelaise par rapport à l'apport de l'amont dans la Garonne, nous avons évalué le rapport du flux moyen sortant des STEP de l'agglomération sur le flux apporté par la Garonne (**Tableau IV-18**). Ainsi, les psychotropes avec un rapport supérieur à 1 ont pour principal apport dans l'estuaire les effluents urbains des deux STEP majoritaires de Bordeaux Métropole sinon ce sont les apports amont.
Sur les 20 psychotropes quantifiés dans la Garonne, aucun n'a un rapport supérieur à 1. Ainsi nous pouvons supposer que l'apport des psychotropes en Garonne ne vient pas majoritairement des stations d'épurations Louis Fargue et Clos de Hilde mais de l'amont. Les résultats trouvés sont en accord avec les travaux de thèse d'Aminot (2013) qui montrent que la Carbamazépine et l'Oxazépam ont pour apport majoritaire l'amont de la Garonne.

Pour valider cette hypothèse, des campagnes de prélèvements ont été effectuées sur la Garonne et la Dordogne pour évaluer l'apport majoritaire en psychotropes dans ces deux milieux mais aussi celui de la Gironde.
Plusieurs échantillonnages ont été faits à la Réole (amont Garonne), à Pessac sur Dordogne (amont Dordogne), à Blanquefort (sur la Jalle, affluent de la Garonne) et à Guîtres (sur l'Isle, affluent de la Dordogne) (**Tableau IV-19**).

Tableau IV-19. Flux moyens en psychotropes mesurés dans l'amont de la Garonne et de la Dordogne et dans 2 affluents l'Isle et la Jalle de Blanquefort(en g.j-1).

Composés	Flux en $g.j^{-1}$			
	Amont Garonne	Amont Dordogne	Isle	Jalle de Blanquefort
Gabapentine	892,9	114,3	168,1	1,0
Oxazépam	813,1	140,9	52,2	0,5
Lamotrigine	450,8	120,2	20,9	0,3
Carbamazépine	298,4	61,9	27,0	0,3
Méprobamate	125,8	20,4	6,5	0,1
Milnacipran	104,8	4,7	0,5	0,01
Amisulpuride	86,0	14,1	2,7	0,03
Venlafaxine	59,7	19,7	1,6	0,02
Primidone	51,6	9,2	10,8	0,02
Tiapride	41,1	7,0	1,8	0,004
Citalopram	39,2	25,5	0,9	0,01
Témazépam	38,9	6,2	1,7	0,02
Valpromide	31,2	12,5	2,1	0,01
Clorazépate	23,1	4,4	1,4	0,01
Fluoxétine	12,6	1,0	0,1	0,003
Sulpiride	12,1	3,7	0,6	0,004
Nordiazépam	10,4	2,7	0,6	0,004
Prazépam	6,4	1,7	0,8	0,002
Méthadone	3,8	0,5	0,1	0,002
Zopiclone	3,6	0,3	0,05	0,01
Imipramine	0,8	0,2	0,02	0,0002

Le **Tableau IV-19** montre que l'apport majoritaire en psychotropes provient de l'amont pour la Garonne et la Dordogne. La Jalle de Blanquefort est un apport négligeable pour les composés étudiés car elle ne représente que 0,05% des apports en psychotropes.

Nos données sont en accord avec les travaux d'Aminot (2013) qui montrent que la Carbamazépine et l'Oxazépam ont pour apport majoritaire l'amont et donc de manière plus global le bassin versant de la Garonne et de la Dordogne situés en amont de la Gironde.
D'après le dossier de synthèse de l'actualisation de l'état des lieux du SDAGE 2016-2021 pour la Garonne et la Dordogne (SDAGE-PDM Garonne, 2014 ; SDAGE-PDM Dordogne, 2014) seulement 53% et 35% de la population de ces deux bassins versants respectifs, sont raccordés au réseau d'assainissement. Ainsi, les rejets directs de la population non raccordés peuvent être un

apport en médicaments dans la Garonne et la Dordogne. L'autre paramètre expliquant ces apports amont majoritaires peut être les STEP non adaptées aux traitements des médicaments : (i) les STEP de petites capacités, (ii) celles qui n'ont qu'un traitement primaire ou encore (iii) celles qui ne sont pas conformes comme à Libourne ou Preignac (http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr/).
Enfin, nous avons pu observer que, de manière générale, les psychotropes sont des molécules peu traitées en STEP et qui sont persistants dans le milieu.
Ainsi l'accumulation de tous ces paramètres peut expliquer que l'apport amont soit majoritaire dans la Garonne et la Dordogne.

La **Figure IV-31** présente pour une sélection de 12 psychotropes (Gabapentine, Oxazépam, Lamotrigine, Carbamazépine, Amisulpride, Venlafaxine, Tiapride, Valpromide, Méprobamate, Primidone, Milnacipran et Sulpiride), la répartition des apports dans la Gironde estuarienne.

Nous pouvons observer que la Garonne contribue en moyenne à 80% des apports en psychotropes dans la Gironde, pour la plupart des molécules. Cependant pour le Valpromide et la Primidone, il semblerait que la Dordogne et la Garonne apporte à part égale ces composés en Gironde.

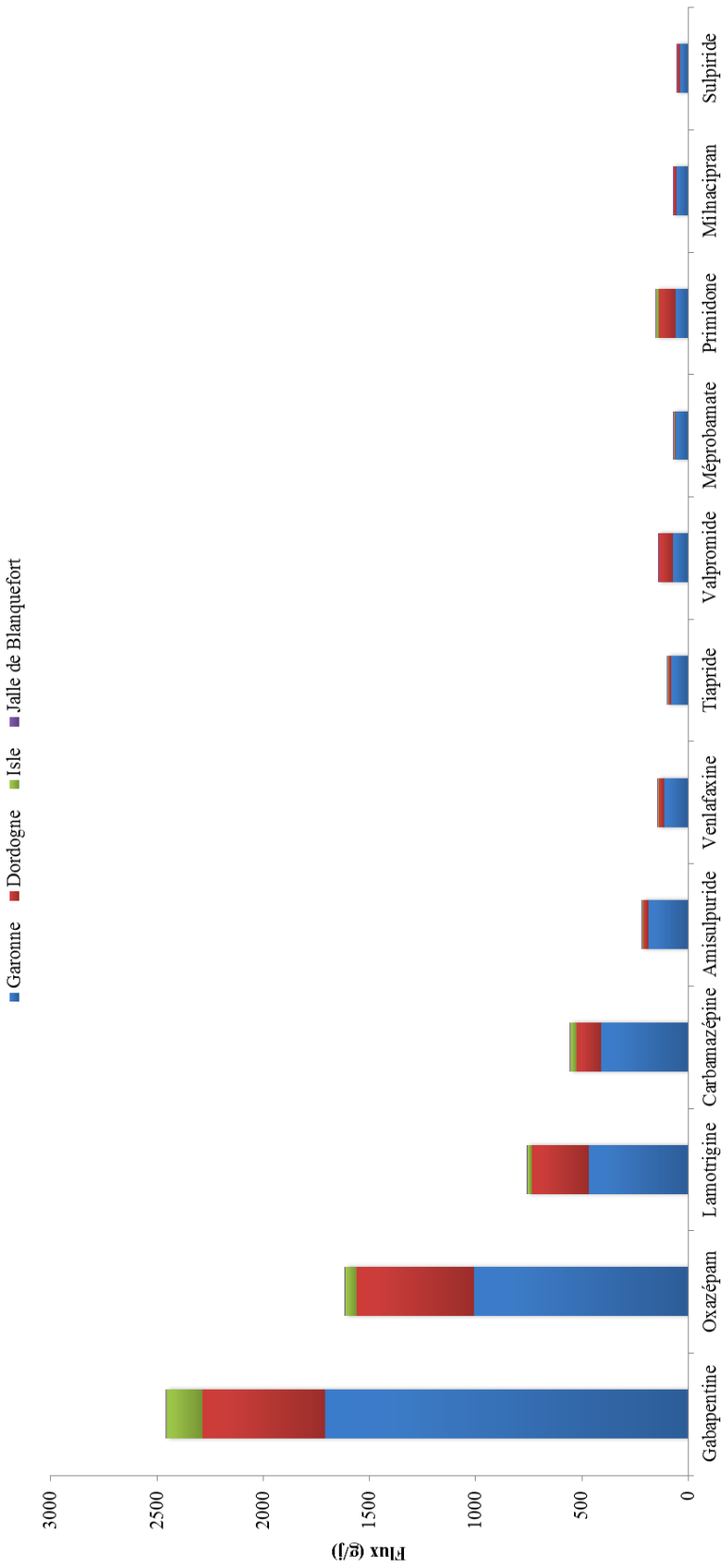


Figure IV-31. Répartition des apports en psychotropes dans la Gironde.

2.4.Estimation du risque environnemental

L'objectif de cette partie est d'évaluer le risque environnemental potentiel des psychotropes qui ont été retrouvés dans l'estuaire de la Gironde. La procédure utilisée vise à établir un quotient de risque (RQ : Risk Quotient) à partir des concentrations environnementales mesurées (MEC) dans le milieu et des concentrations prédites sans effets biologiques sur les organismes aquatiques (PNEC). Ainsi le rapport MEC/PNEC permet d'obtenir le quotient de risque environnemental (Bouisson-Schurtz et *al*., 2014).
Les valeurs de MEC utilisées correspondent aux concentrations maximales en psychotropes mesurées au site de Bordeaux alors que les valeurs de PNEC ont été prises dans la littérature pour des espèces biologiques d'eau douce (Schaff, 2012 ; Deo et *al*., 2013 ; Bouisson-Schurtz et *al*., 2014 ; Minguez et *al*., 2016 ; Helwig et *al*., 2016).

Selon les valeurs du quotient de risque obtenu avec le rapport MEC/PNEC, les composés sont classés de la manière suivante :

MEC/PNEC < 0,1 → Risque insignifiant
0,1 < MEC/PNEC < 1 → Risque faible
1 < MEC/PNEC < 10 → Risque modéré
MEC/PNEC > 10 → Risque élevé

Le **Tableau IV-20** regroupe les valeurs de MEC pour les psychotropes retrouvés au site de Bordeaux, les données de PNEC, les valeurs du RQ et le niveau du risque environnemental.
Pour le Tiapride, le Milnacipran, le Valpromide, le Nordiazépam et le Prazépam aucune valeur de PNEC n'ont été trouvées, pour des espèces d'eau douce, dans la littérature et donc il n'a pas été possible d'évaluer le risque environnemental pour ces composés.

Quand cela a été possible plusieurs données de PNEC ont été choisies pour comparer les valeurs de risque obtenues. Nous pouvons alors observer que selon la PNEC choisie, le risque peut passer de insignifiant à faible pour la Carbamazépine ou même à modéré pour la Venlafaxine.
Selon les tests aigues ou chroniques qui ont été faits dans les études toxicologies, les PNEC vont avoir des valeurs assez différentes engendrant des valeurs de risques variées.
Généralement, les PNEC à partir de tests de toxicités aigus sont plus facilement trouvables dans la littérature que les PNEC à partir de tests chroniques. Cependant les composés pharmaceutiques et donc les psychotropes sont des molécules qui sont continuellement apportées dans le milieu aquatique par les rejets urbains. De plus, parmi les psychotropes étudiés certains sont persistants dans l'environnement aquatique. Ces caractéristiques font que les organismes aquatiques y sont exposés en continu. C'est pourquoi les tests chroniques semblent plus adaptés pour l'obtention de PNEC (Ferrari et *al*., 2004 ; Carlsson et *al*., 2006).

Le risque environnemental est estimé pour une molécule pharmaceutique cependant dans le milieu aquatiques le composé est en mélange avec d'autres médicaments et même avec d'autres composés organiques (pesticides, HAP, PCB, etc…) et inorganiques (métaux, minéraux, etc…). Des études ont alors été menées sur des mélanges de composés, cependant les

réponses aux tests de toxicité sont généralement complexes, rendant leurs interprétations difficiles.

Tableau IV-20. Evaluation du risque environnemental à partir des données de MEC dans la Gironde et de PNEC de la littérature.

Composés	MEC Gironde (ng/L)	PNEC (ng/L)	Références	RQ = MEC/PNEC	Risque
Gabapentine	172,1	100000	*Minguez et al., 2014*	0,002	insignifiant
		24347100	*Helwig et al., 2016*	0,00001	insignifiant
Oxazépam	104,4	481	*Bouisson-Schurtz et al., 2014*	0,217	faible
Lamotrigine	89,8	39700	*Schaff, 2012*	0,002	insignifiant
Carbamazépine	31,1	250	*Komori et al., 2013*	0,12	faible
		2500	*Bouisson-Schurtz et al., 2014*	0,01	insignifiant
		10000	*Minguez et al., 2014*	0,003	insignifiant
Amisulpride	42,3	6400	*Helwig et al., 2016*	0,007	insignifiant
Méprobamate	12,8	110000	*Randhir et al., 2013*	0,0001	insignifiant
Tiapride	35,2	-	-	-	-
Venlafaxine	39,1	13	*Helwig et al., 2016*	3,0	modéré
		47580	*Minguez et al., 2014*	0,0008	insignifiant
Primidone	32,1	4300	*Randhir et al., 2013*	0,007	insignifiant
Milnacipran	18,6	-	-	-	-
Valpromide	14,7	-	-	-	-
Lévétiracétam	12,6	100000	*Minguez et al., 2014*	0,0001	insignifiant
Sulpiride	6,1	100000	*Komori et al., 2013*	0,0001	insignifiant
Bromazépam	6,9	42000	*NORMAN ecotoxdatabase*	0,0002	insignifiant
Zopiclone	1,6	5100	*Helwig et al., 2016*	0,0003	insignifiant
Citalopram	12,8	3030	*Minguez et al., 2014*	0,004	insignifiant
		4200	*Moe et al., 2009*	0,003	insignifiant
		6500	*Helwig et al., 2016*	0,002	insignifiant
Nordiazépam	2,3	-	-	-	-
Méthadone	0,8	10600	*Helwig et al., 2016*	0,0001	insignifiant
Prazépam	0,5	-	-	-	-
Zolpidem	0,8	2200	*Schaff, 2012*	0,0004	insignifiant

« - » : aucune donnée de PNEC n'a été trouvée dans la littérature.

De manière générale, l'ensemble des psychotropes qui ont été retrouvés dans la Gironde ont un risque pour l'environnement insignifiant aux concentrations maximales auxquelles ils ont été mesurés. Mais la méthodologie à appliquer pour évaluer le risque environnemental d'une molécule ou d'un mélange de molécules reste encore à développer et uniformiser.

Pour finir, les psychotropes sont des composés qui vont agir sur le système nerveux central des individus exposés donc ils peuvent agir sur leur métabolisme mais aussi sur leur comportement (prédation, défense, etc…). L'étude de Di Poi et *al*. (2014) montre qu'en présence de Fluoxétine, le comportement de défense des juvéniles de seiche est modifié, entrainant une perte de camouflage et donc jouant sur leur survie.
Les changements de comportement induits par les molécules psychoactives peuvent agir sur toute la chaîne trophique et donc à plus grande échelle sur l'écosystème du milieu. Il faudrait

alors aussi prendre en compte ce genre de phénomène pour évaluer le risque environnemental de ces composés.

3. Conclusion

Les stations d'épuration : Clos de Hilde et Louis Fargue

Dans les effluents d'entrée et de sortie des deux stations d'épuration étudiées, 30 psychotropes ont été trouvés sur les 47 cherchés, avec des gammes de concentrations moyennes allant de quelques nanogrammes par litre à plus de 3 000 $ng.L^{-1}$. Parmi toutes les molécules retrouvées, 3 n'avaient jamais été étudiées (le Zopiclone, la Cyamémazine et le Valpromide) et 11 avaient été peu ou pas retrouvées dans les eaux usées (le Zolpidem, le Clorazépate, le Prazépam, le Milnacipran, la Clomipramine, le Sulpiride, le Tiapride, l'Amisulpride, la Lamotrigine, le Lévétiracétam et l'Hydroxyzine). De plus, la molécule pour laquelle les concentrations les plus élevées sont quantifiées est la Gabapentine.

Nous avons pu aussi observer que la présence des psychotropes dans les effluents d'entrée des STEP pouvait être liée aux données de consommation de ces médicaments, comme par exemple pour la Gabapentine qui a un taux d'excrétion de 1. Cependant, il existe une perte par rapport à ce qui est attendu dans les STEP qui peut être due à plusieurs facteurs, telles que la métabolisation ou une dégradation dans le réseau.

Il existe une variabilité des concentrations en psychotropes dans les effluents d'entrée et de sortie des STEP qui peut être influencée par la zone géographique étudiée (pays ou même régions) par les habitudes de prescription et de consommation de la population étudiée, par les procédés épuratoires utilisés par les STEP, par le climat mais aussi par la saisonnalité. De même, plusieurs études ont montré qu'en hiver les troubles psychiques (dépressions, phobies, etc…) augmentaient, provoquant ainsi une hausse des consommations en psychotropes.

Globalement, les psychotropes étudiés sont des molécules qui sont partiellement ou totalement résistantes aux traitements mis en place dans les stations d'épuration. Seulement 4 composés pour Louis Fargue et 7 molécules pour Clos de Hilde ont des rendements épuratoires compris entre 34 et 69 %.
Le reste des molécules ont des rendements épuratoires négatifs. Néanmoins, ces résultats semblent montrer que CdH est un peu plus performante que LF.

La Gironde estuarienne

Lors des prélèvements dans les 6 sites sur la Gironde, il a été trouvé 20 psychotropes par échantillonnage ponctuel et 25 par échantillonnage passif avec des concentrations moyennes comprises entre 0,1 $ng.L^{-1}$ et 34 $ng.L^{-1}$. Parmi tous les composés retrouvés, la Gabapentine est celui qui a les concentrations les plus élevées.
Les sites de Bordeaux et Bègles sont ceux qui comptabilisent le plus de molécules avec un taux de quantification de 100% contrairement à Pauillac et Saint Macaire. De plus les concentrations maximales en psychotropes sont généralement retrouvées à Bordeaux sauf pour l'Amisulpride, le Tiapride et le Sulpiride où les valeurs maximales sont mesurées à Saint Macaire. Nous pouvons supposer que la proximité de ce site avec les centres spécialisés dans la maladie mentale

de Cadillac et Toulenne mais aussi avec la STEP de LANGON Toulenne, peut jouer un rôle sur l'augmentation des concentrations de ces 3 composés.

Comme en station d'épuration, une variabilité saisonnière est observée. Une augmentation des concentrations est constatée entre février et avril 2012 (fin de l'hiver, printemps) et entre juillet et novembre 2012 (fin de l'été, automne). La comparaison avec les débits de la Garonne, lors des périodes de prélèvement, indique que les concentrations maximales sont atteintes en période d'étiage et les concentrations minimales en période de crue. Il y a donc un phénomène de dilution pendant les mois de pluie. Néanmoins ces variabilités saisonnières peuvent être liées au climat mais aussi aux troubles psychiques qui augmentent à ces périodes et donc à une hausse des prises de psychotropes.

L'utilisation du POCIS a permis d'abaisser les limites de détection et donc de détecter et quantifier des composés qui sont présents à l'état de trace dans la Gironde tel que la Fluoxétine, le Témazépam, l'Amitriptyline, le Clorazépate, le Miansérine, l'Imipramine et la Cyamémazine. De plus, le caractère intégratif du POCIS a permis de lisser les variations de concentrations dans le milieu, qui ont été observées par échantillonnage ponctuel et qui sont généralement liées aux saisons et aux débits. Cependant, dans ce suivi, nous avons constaté que le POCIS avait des limites d'utilisation car en période de grands froids les concentrations mesurées avec cet outil sont aberrantes, nécessitant des développements supplémentaires dans ces conditions.

Les stations d'épurations sont décrites comme les apports majoritaires de médicaments et donc de psychotropes dans le milieu. Cependant en faisant le rapport entre les flux en psychotropes sortants des deux STEP bordelaises avec ceux mesurés dans la Garonne, nous constatons qu'aucun des composés trouvés ont un rapport supérieur à 1. Donc dans la Garonne l'apport principal en psychotropes ne vient pas des rejets des STEP Louis Fargue et Clos de Hilde mais de l'amont (de 50 à 90% selon les composés). Enfin nous avons pu observer que la Garonne contribue en moyenne à 80% des apports en psychotropes dans la Gironde estuarienne.

Pour finir, nous avons pu observer que l'évaluation du risque était un paramètre qui devait être encore développé car selon les PNEC utilisés, l'estimation du risque peut passer de « insignifiante » à « modérée ». Globalement, l'ensemble des psychotropes qui ont été retrouvés dans la Gironde ne présentent pas de risque pour l'environnement aux concentrations auxquelles ils ont été mesurés.

B. ETUDE DE LA CONTAMINATION EN PSYCHOTROPES DANS LES STEP QUEBECOISES ET DANS LE SAINT LAURENT.

L'étude de la contamination en psychotropes dans les STEP québécoises et dans le Saint Laurent est moins exhaustive que celle qui a était faite en France mais elle permet tout de même de caractériser la contamination en psychotropes présente au Québec.

1.1. Présence et devenir des psychotropes dans les STEP québécoises

Trois stations de traitement des eaux usées sont étudiées dans cette partie : les étangs aérés de Le Gardeur (LG), la STEP de Ile Lebel (IL) toutes les deux situés à Repentigny et la STEP Jean Marcotte de Montréal (JM) (description **Chapitre 2. Section 3.5**). L'objectif de cette partie est le même que celui pour la partie 1 de l'étude en France, c'est-à-dire de caractériser la présence et le devenir des psychotropes dans ces 3 stations.

1.1. Etude des eaux d'entrée de STEP

1.1.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentrations

a) Les deux entrées des étangs aérés de Le Gardeur (Le Gardeur et Charlemagne)
La description du secteur de Le Gardeur est détaillée dans le **Chapitre 2. Section 3.5.2**.
Les fréquences de quantification, les concentrations moyennes, minimales et maximales (en $ng.L^{-1}$) des psychotropes trouvés dans les effluents des deux entrées des étangs aérés de Le Gardeur sont présentés dans le **Tableau IV-21**.

Sur les 5 échantillons de LG entrée Le Gardeur analysés, 20 psychotropes (Gabapentine, Carbamazépine, Oxazépam, Lévétiracétam, Venlafaxine, Paroxétine, Citalopram, Zopiclone, Lamotrigine, Amitriptyline, Témazépam, Sertraline, Fluoxétine, Mirtazapine, Primidone, Nordiazépam, Valpromide, Méthadone, Hydroxyzine et Imipramine) sont systématiquement quantifiés, seulement une molécule (Milnacipran) a une fréquence de quantification de 60% et 26 psychotropes (Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Zolpidem, Méprobamate, Buspirone, Bromazépam, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Cyamémazine, Maprotiline, Duloxétine, Clorazépate, Norfluoxétine, Clonazépam, Lorazépam, Chlorpromazine, Alprazolam, Clomipramine, Flunitrazépam, Clobazam, Diazépam, Pimozide et Prazépam) ne sont jamais détectés

Sur les 5 échantillons de LG entrée Charlemagne étudiés, 19 psychotropes (Gabapentine, Carbamazépine, Oxazépam, Lévétiracétam, Venlafaxine, Paroxétine, Citalopram, Zopiclone, Lamotrigine, Amitriptyline, Témazépam, Sertraline, Fluoxétine, Mirtazapine, Nordiazépam, Valpro-

mide, Méthadone, Hydroxyzine et Imipramine) sont systématiquement quantifiés, 2 molécules (Primidone et Milnacipran) ont une fréquence de quantification de 80% et 60% (respectivement) et 26 psychotropes (Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Zolpidem, Méprobamate, Buspirone, Bromazépam, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Cyamémazine, Maprotiline, Duloxétine, Clorazépate, Norfluoxétine, Clonazépam, Lorazépam, Chlorpromazine, Alprazolam, Clomipramine, Flunitrazépam, Clobazam, Diazépam, Pimozide et Prazépam) ne sont jamais détectés

Tableau IV-21. Fréquences de quantification et concentrations des psychotropes quantifiés dans les effluents des deux entrées des étangs aérés de Le Gardeur (Le Gardeur et Charlemagne).

Composés	LG entrée Le Gardeur						Composés	LG entrée Charlemagne					
	Conc. Moyenne ng/L	E-T	Nombre d'échantillons	Fréquence de quantification %	Conc. Minimale ng/L	Conc. Maximale ng/L		Conc. Moyenne ng/L	E-T	Nombre d'échantillons	Fréquence de quantification %	Conc. Minimale ng/L	Conc. Maximale ng/L
Gabapentine	2003,7	606,4	5	100	1265,9	3049,6	Gabapentine	5668,5	2038,3	5	100	2070,2	10716,3
Carbamazépine	123,0	62,0	5	100	50,5	251,6	Carbamazépine	398,6	127,7	5	100	122,0	557,7
Oxazépam	73,9	40,7	5	100	29,5	135,1	Oxazépam	180,4	46,1	5	100	112,6	264,5
Lévétiracétam	64,5	29,5	5	100	21,9	109,3	Lévétiracétam	117,7	18,1	5	100	72,4	137,6
Venlafaxine	58,8	45,4	5	100	16,2	125,5	Paroxétine	100,4	49,1	5	100	29,5	215,1
Paroxétine	43,4	9,7	5	100	27,8	56,1	Lamotrigine	95,0	22,6	5	100	60,1	126,2
Citalopram	40,1	27,9	5	100	13,3	81,9	Venlafaxine	92,6	53,8	5	100	40,3	176,9
Zopiclone	36,1	9,5	5	100	16,9	47,1	Zopiclone	89,8	43,2	5	100	34,7	134,3
Lamotrigine	35,8	25,8	5	100	11,6	76,2	Citalopram	63,2	8,3	5	100	52,7	75,7
Amitriptyline	24,0	13,7	5	100	9,7	50,1	Amitriptyline	46,7	9,0	5	100	27,1	63,1
Témazépam	17,6	11,6	5	100	5,3	34,5	Témazépam	46,5	18,6	5	100	21,3	80,6
Sertraline	16,9	9,9	5	100	6,9	40,2	Sertraline	44,8	24,9	5	100	16,7	107,0
Fluoxétine	8,1	2,9	5	100	4,6	12,5	Fluoxétine	9,8	3,3	5	100	2,1	14,3
Mirtazapine	5,4	6,3	5	100	0,6	21,2	Mirtazapine	6,1	4,7	5	100	2,4	17,9
Primidone	3,1	1,4	5	100	0,4	4,9	Primidone	4,8	4,7	4	80	1,6	14,2
Nordiazépam	2,3	0,8	5	100	0,6	3,0	Valpromide	3,4	1,6	5	100	1,6	6,8
Valpromide	1,8	0,7	5	100	0,9	3,2	Nordiazépam	2,6	2,2	5	100	0,8	8,0
Méthadone	1,2	1,4	5	100	0,1	4,5	Méthadone	1,4	1,3	5	100	0,2	4,7
Hydroxyzine	0,4	0,3	5	100	0,1	0,9	Imipramine	0,7	0,3	5	100	0,2	1,5
Mihacipran	0,3	0,1	3	60	0,2	0,5	Mihacipran	0,5	0,3	3	60	0,1	0,9
Imipramine	0,3	0,3	5	100	0,1	1,0	Hydroxyzine	0,5	0,3	5	100	0,2	1,1

Sur les 21 psychotropes quantifiés dans les effluents des deux entrées des étangs aérés de Le Gardeur, la molécule ayant la concentration moyenne la plus élevée est la Gabapentine (Le Gardeur : 2003,7 ± 606,4 ng.L^{-1} et Charlemagne : 5668,5 ± 2038,3 ng.L^{-1}) et celle avec la concentration moyenne la plus faible est l'Imipramine (0,3 ± 0,3 ng.L^{-1}) pour Le Gardeur et l'Hydroxyzine (0,5 ± 0,3 ng.L^{-1}) pour Charlemagne.

Dans le **Chapitre 2. Section 1.3** nous avions observé que sur les 47 psychotropes étudiés, 6 molécules n'avaient jamais été étudiées et 19 avaient été retrouvées dans la littérature mais étaient peu voire pas détectées. Sur ces 25 molécules, 6 (Lévétiracétam, Zopiclone, Lamotrigine, Valpromide, Hydroxyzine et Milnacipran) ont été retrouvées dans les échantillons des deux effluents d'entrée de Le Gardeur, avec des concentrations comprises entre 0,3 ± 0,1 ng.L^{-1} (Milnacipran) et 117,7 ± 18,1 ng.L^{-1} (Lévétiracétam). Cette étude a donc permis de trouver pour la première fois ces psychotropes dans les effluents urbains québécois. De même pour la Gabapentine qui est la molécule quantifiée avec les concentrations les plus élevées.

Pour l'ensemble des composés, les niveaux de concentrations mesurés dans les deux effluents d'entrée de Le Gardeur sont généralement en accord avec les valeurs retrouvées dans la littérature (**Tableau II-3, Chapitre 2. Section 1.3**). Cependant, nous avons pu observer que les concentrations de Paroxétine mesurées dans ces deux effluents d'entrée étaient 5 à 11 fois plus élevées que les concentrations quantifiées dans les 5 STEP canadiennes étudiées par Lajeunesse et *al*. (2008). A l'inverse, les concentrations en Primidone, Méthadone et Imipramine sont inférieures à celles retrouvées dans la littérature.
Ces différences de concentrations montrent que la quantité de psychotropes retrouvée dans les effluents d'entrée de station de traitement d'eaux usées vont être influencées par plusieurs facteurs telles que les habitudes de consommation de la population étudiée ou encore la zone géographique examinée.

Les rapports de concentrations moyens des 21 psychotropes trouvés dans les deux effluents d'entrée de Le Gardeur (Charlemagne et Le Gardeur) sont présentés dans la **Figure IV-32**.

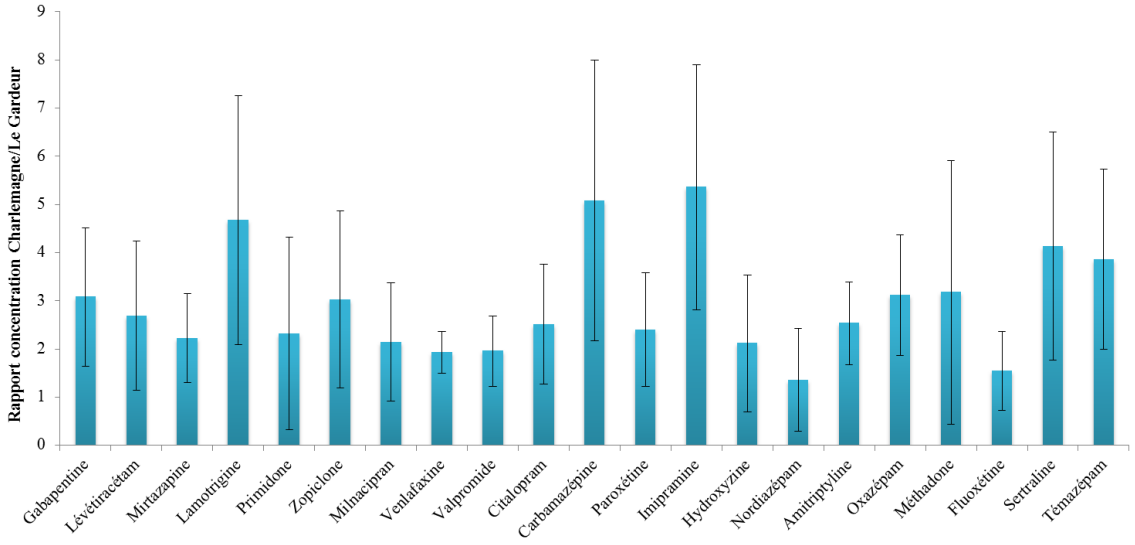


Figure IV-32. Rapports de concentrations moyens entre Le Gardeur et Charlemagne pour les psychotropes trouvés.

Les rapports de concentration moyens Charlemagne/Le Gardeur varient de 1,4 ± 1,1 à 5,4 ± 2,5. Les eaux de l'effluent d'entrée Charlemagne ont globalement des concentrations en psychotropes supérieures à celles mesurées dans l'effluent d'entrée de Le Gardeur. Cependant, en termes de flux, l'entrée Le Gardeur a des valeurs plus élevées que l'entrée Charlemagne (**Tableau IV-22**). Ceci est dû au fait que l'entrée Le Gardeur a un débit moyen (8 139 $m^3.j^{-1}$) 3,5 fois supérieur à celui de l'entrée Charlemagne (2 279 $m^3.j^{-1}$).

Tableau IV-22. Flux d'entrée moyens de Le Gardeur et Charlemagne.

Composés	Flux d'entrée moyen ± E-T ($g.j^{-1}$)	
	Le Gardeur	Charlemagne
Gabapentine	16,3 ± 4,9	12,9 ± 4,6
Carbamazépine	1,0 ± 0,5	0,9 ± 0,3
Oxazépam	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,1
Lévétiracétam	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,04
Venlafaxine	0,5 ± 0,4	0,2 ± 0,1
Paroxétine	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Citalopram	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,02
Zopiclone	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Lamotrigine	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1
Amitriptyline	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,02
Témazépam	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,04
Sertraline	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Fluoxétine	0,1 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Mirtazapine	0,04 ± 0,05	0,01 ± 0,01
Primidone	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Nordiazépam	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,005
Valpromide	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,004
Méthadone	0,01 ± 0,01	0,003 ± 0,003
Hydroxyzine	0,003 ± 0,002	0,001 ± 0,001
Imipramine	0,002 ± 0,002	0,001 ± 0,001
Milnacipran	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,001

b) Comparaison des STEP de Repentigny : Le Gardeur et Ile Lebel

Dans cette partie les concentrations mesurées pour chacun des psychotropes quantifiés dans les deux effluents d'entrée des étangs aérés de Le Gardeur ont été rassemblés en une seule concentration, appelée LG entrée totale, en prenant en compte la proportion de chacun des effluents d'entrée (Le Gardeur et Charlemagne).

Les fréquences de quantification, les concentrations moyennes, minimales et maximales (en $ng.L^{-1}$) des psychotropes trouvés dans les effluents d'entrée de Le Gardeur et d'Ile Lebel sont présentées dans le **Tableau IV-23**.

Sur les 10 échantillons de LG entrée totale, 19 psychotropes (Gabapentine, Carbamazépine, Oxazépam, Lévétiracétam, Venlafaxine, Paroxétine, Citalopram, Zopiclone, Lamotrigine, Amitriptyline, Témazépam, Sertraline, Fluoxétine, Mirtazapine, Nordiazépam, Valpromide, Méthadone, Hydroxyzine et Imipramine) sont systématiquement quantifiés, la Primidone et le Milnacipran ont respectivement une fréquence de quantification de 90% et 60% et 26 psychotropes (Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Zolpidem, Méprobamate, Buspirone, Bromazépam, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Cyamémazine, Maprotiline, Duloxétine, Clorazépate, Norfluoxétine, Clonazépam, Lorazépam, Chlorpromazine, Alprazolam, Clomipramine, Flunitrazépam, Clobazam, Diazépam, Pimozide et Prazépam) ne sont jamais détectés.

Tableau IV-23. Fréquences de quantification et concentrations des psychotropes quantifiés dans les effluents d'entrée des deux STEP de Repentigny, Le Gardeur et d'Ile Lebel.

	LG entrée totale						IL entrée					
Composés	Conc. Moyenne ng/L	E-T	Nombre d'échantillons	Fréquence de quantification %	Conc. Minimale ng/L	Conc. Maximale ng/L	Composés	Conc. Moyenne ng/L	E-T	Nombre d'échantillons	Fréquence de quantification %	Conc. Minimale ng/L	Conc. Maximale ng/L
Gabapentine	1789,2	518,3	10	100	575,0	3049,6	Gabapentine	3312,0	1257,0	5	100	1521,9	5460,3
Carbamazépine	116,9	15,8	10	100	33,9	251,6	Carbamazépine	296,5	86,4	5	100	170,3	404,3
Oxazépam	62,0	22,4	10	100	29,5	135,1	Oxazépam	169,7	16,5	5	100	130,9	198,6
Lévétiracétam	48,6	13,8	10	100	20,1	109,3	Lévétiracétam	110,5	29,0	5	100	42,6	140,3
Venlafaxine	42,2	30,2	10	100	11,2	125,5	Lamotrigine	89,1	27,3	5	100	47,0	157,4
Paroxétine	35,7	8,9	10	100	8,2	59,8	Venlafaxine	88,7	33,2	5	100	31,9	169,9
Lamotrigine	31,1	12,7	10	100	11,6	76,2	Zopiclone	64,6	32,8	5	100	15,2	108,4
Zopiclone	30,5	7,4	10	100	9,6	47,1	Paroxétine	48,3	27,2	5	100	3,8	76,7
Citalopram	28,8	14,7	10	100	13,3	81,9	Citalopram	46,9	5,9	5	100	37,0	56,0
Amitryptiline	18,5	7,8	10	100	7,5	50,1	Sertraline	34,5	19,9	5	100	14,9	67,7
Témazépam	15,3	6,3	10	100	5,3	34,5	Témazépam	34,1	6,8	5	100	22,3	41,1
Sertraline	14,7	5,4	10	100	4,6	40,2	Amitryptyline	25,5	9,8	5	100	15,5	42,4
Fluoxétine	5,4	1,0	10	100	0,6	12,5	Fluoxétine	12,7	2,9	5	100	6,7	19,9
Mirtazapine	3,6	3,8	10	100	0,6	21,2	Primidone	9,6	2,4	5	100	7,5	14,2
Primidone	2,6	1,1	9	90	0,4	4,9	Mirtazapine	4,5	3,5	5	100	0,8	13,3
Nordiazépam	1,5	0,5	10	100	0,2	3,0	Valpromide	2,3	1,1	5	100	1,3	4,2
Valpromide	1,4	0,6	10	100	0,4	3,2	Nordiazépam	2,0	0,7	5	100	1,0	3,7
Méthadone	0,8	0,7	10	100	0,1	4,5	Méthadone	1,5	0,6	5	100	0,8	2,4
Hydroxyzine	0,3	0,2	10	100	0,04	0,9	Milnacipran	0,7	0,3	2	40	0,4	1,0
Imipramine	0,2	0,2	10	100	0,1	1,0	Hydroxyzine	0,4	0,2	5	100	0,1	0,8
Milnacipram	0,2	0,02	6	60	0,04	0,5	Imipramine	0,2	0,05	5	100	0,1	0,2

Sur les 5 échantillons de IL entrée étudiés, 20 psychotropes (Gabapentine, Carbamazépine, Oxazépam, Lévétiracétam, Venlafaxine, Paroxétine, Citalopram, Zopiclone, Lamotrigine, Amitriptyline, Témazépam, Sertraline, Fluoxétine, Mirtazapine, Primidone, Nordiazépam, Valpromide, Méthadone, Hydroxyzine et Imipramine) sont systématiquement quantifiés, seulement le Milnacipran a une fréquence de quantification de 40% et 26 psychotropes (Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Zolpidem, Méprobamate, Buspirone, Bromazépam, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Cyamémazine, Maprotiline, Duloxétine, Clorazépate, Norfluoxétine, Clonazépam, Lorazépam, Chlorpromazine, Alprazolam, Clomipramine, Flunitrazépam, Clobazam, Diazépam, Pimozide et Prazépam) ne sont jamais détectés.

Sur les 21 psychotropes quantifiés dans les effluents d'entrée des étangs aérés de Le Gardeur et la STEP Ile Lebel, la molécule ayant la concentration moyenne la plus élevée est la Gabapentine (Le Gardeur : 1789,2 ± 518,3 ng.L^{-1} et Ile Lebel : 3312,0 ± 1257,0 ng.L^{-1}) et celle avec la concentration moyenne la plus faible est le Milnacipran (0,2 ± 0,02 ng.L^{-1}) pour Le Gardeur et l'Imipramine (0,2 ± 0,04 ng.L^{-1}) pour Ile Lebel.
De plus, la **Figure IV-33** montre que sur les 21 composés trouvés, la majorité ont des niveaux de concentrations compris entre 100 ng.L^{-1} et < 10 ng.L^{-1} et seulement 3 psychotropes (Gabapentine, Carbamazépine et Oxazépam) pour Le Gardeur et 4 (Gabapentine, Carbamazépine, Oxazépam et Lévétiracétam) pour Ile Lebel ont des concentrations supérieures à 100 ng.L^{-1}.

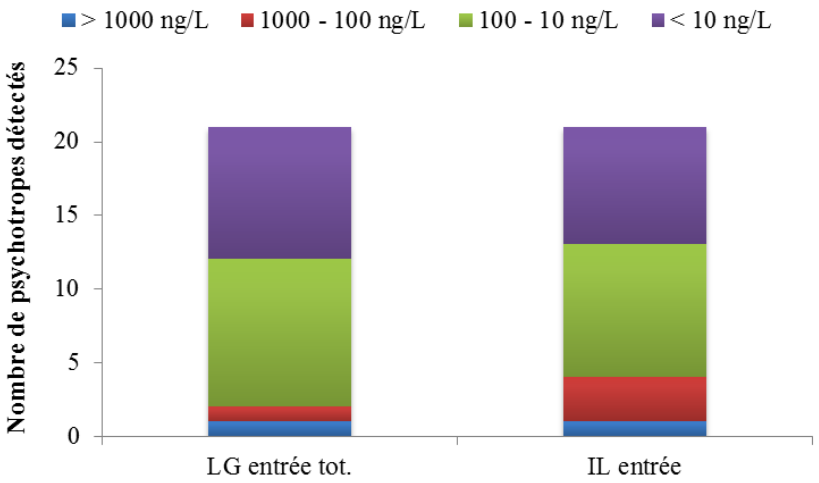


Figure IV-33. Classement des psychotropes quantifiés dans les effluents d'entrée de Le Gardeur et Ile Lebel par gamme de concentrations.

Les données du **Tableau IV-24** montrent que les 21 psychotropes quantifiés dans l'effluent d'entrée des étangs aérés de Le Gardeur sont les mêmes que ceux dans l'effluent d'entrée de la STEP Ile Lebel. Même si les niveaux de concentrations des psychotropes mesurés dans les effluents d'entrée de ces deux stations sont du même ordre de grandeur, les concentrations mesurées dans l'effluent d'entrée d'Ile Lebel sont 2,05 ± 0,56 fois plus élevés que celles quantifiées à Le Gardeur. De plus, en termes de flux, ceux d'Ile Lebel sont en moyenne 6,1 ± 1,6 fois plus élevées que ceux de Le Gardeur (**Tableau IV-24**). Ce résultat peut être expliqué par le fait que la STEP d'Ile Lebel a un nombre d'habitants connectés (63 000 hab.) et un débit d'entrée

moyen (24 328 $m^3.j^{-1}$) beaucoup plus élevés que ceux de Le Gardeur (nombre d'habitant : 27 000 ; débit d'entrée Le gardeur : 8 139 $m^3.j^{-1}$ et de Charlemagne : 2 279 $m^3.j^{-1}$).

Tableau IV-24. Flux d'entrée moyens de Le Gardeur et Ile Lebel.

Composés	Flux d'entrée moyen ± E-T ($g.j^{-1}$)	
	Ile Lebel	Le Gardeur tot.
Gabapentine	80,6 ± 30,6	14,6 ± 5,3
Carbamazépine	7,2 ± 2,1	1,0 ± 0,4
Oxazépam	4,1 ± 0,4	0,5 ± 0,2
Lévétiracétam	2,7 ± 0,7	0,4 ± 0,2
Lamotrigine	2,2 ± 0,7	0,3 ± 0,2
Venlafaxine	2,2 ± 0,8	0,3 ± 0,1
Zopiclone	1,6 ± 0,8	0,3 ± 0,1
Paroxétine	1,2 ± 0,7	0,2 ± 0,1
Citalopram	1,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2
Sertraline	0,8 ± 0,5	0,2 ± 0,1
Témazépam	0,8 ± 0,2	0,1 ± 0,1
Amitriptyline	0,6 ± 0,2	0,1 ± 0,1
Fluoxétine	0,3 ± 0,1	0,04 ± 0,02
Primidone	0,2 ± 0,1	0,03 ± 0,03
Mirtazapine	0,1 ± 0,1	0,02 ± 0,01
Valpromide	0,1 ± 0,03	0,01 ± 0,01
Nordiazépam	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,01
Méthadone	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Hydroxyzine	0,01 ± 0,01	0,002 ± 0,002
Milnacipran	0,01 ± 0,01	0,002 ± 0,002
Imipramine	0,004 ± 0,001	0,001 ± 0,001

c) Comparaison des STEP de Ile Lebel et de Montréal

Les fréquences de quantification, les concentrations moyennes, minimales et maximales (en $ng.L^{-1}$) des psychotropes trouvés dans les effluents d'entrée de la STEP de Montréal (Jean Marcotte) sont présentées dans le **Tableau IV-25**.

Sur les 6 échantillons de Jean Marcotte étudiés, 21 psychotropes (Gabapentine, Lamotrigine, Carbamazépine, Sertraline, Lévétiracétam, Oxazépam, Valpromide, Amitriptyline, Paroxétine, Venlafaxine, Zopiclone, Fluoxétine, Citalopram, Témazépam, Méthadone, Primidone, Nordiazépam, Mirtazapine, Hydroxyzine, Milnacipran, Imipramine) sont systématiquement quantifiés et 26 psychotropes (Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Zolpidem, Méprobamate, Buspirone, Bromazépam, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Cyamémazine, Maprotiline, Duloxétine, Clorazépate, Norfluoxétine, Clonazépam, Lorazépam, Chlorpromazine, Alprazolam, Clomipramine, Flunitrazépam, Clobazam, Diazépam, Pimozide et Prazépam) ne sont jamais détectés

Sur les 21 psychotropes quantifiés dans l'effluent d'entrée de Jean Marcotte, la Gabapentine est la molécule avec la concentration moyenne la plus élevée (423,8 ± 200,8 ng.L^{-1}) et l'Imipramine est celle avec la concentration moyenne la plus faible (0,3 ± 0,1 ng.L^{-1}). Ces 21 composés trouvés dans l'effluent d'entrée sont les mêmes que ceux mesurés dans les effluents d'entrée d'Ile Lebel mais aussi de Le Gardeur. Ainsi nous pouvons conclure que dans les deux villes québécoises étudiées, Montréal et Repentigny, les habitudes de prescription des médecins sont les mêmes.

Tableau IV-25. Fréquences de quantification et concentrations des psychotropes quantifiés dans les effluents d'entrée de la STEP Jean Marcotte de Montréal.

Jean Marcotte entrée						
Composés	Conc. Moyenne ng/L	E-T	Nombre échantillon	Fréquence de quantification %	Conc. Minimale ng/L	Conc. Maximale ng/L
Gabapentine	423,8	200,8	6	100	212,1	705,4
Lamotrigine	97,3	52,1	6	100	16,4	204,6
Carbamazépine	79,4	34,8	6	100	38,9	123,4
Sertraline	72,7	15,4	6	100	57,2	105,1
Lévétiracétam	59,7	10,9	6	100	26,8	71,7
Oxazépam	58,6	46,3	6	100	25,5	197,7
Valpromide	53,2	52,8	6	100	0,2	137,4
Amitryptiline	44,9	14,6	6	100	20,7	65,6
Paroxétine	37,3	25,2	6	100	4,1	70,5
Venlafaxine	18,6	9,3	6	100	8,7	29,3
Zopiclone	13,8	4,1	6	100	9,3	23,6
Fluoxétine	12,3	0,9	6	100	10,9	14,2
Citalopram	11,7	2,7	6	100	6,1	14,4
Témazépam	7,7	3,3	6	100	4,3	12,7
Méthadone	6,4	5,1	6	100	1,3	19,9
Primidone	4,4	1,0	6	100	2,5	6,4
Nordiazépam	1,4	0,5	6	100	0,1	1,8
Mirtazapine	1,3	0,3	6	100	0,7	2,1
Hydroxyzine	0,4	0,2	6	100	0,1	0,8
Milnacipran	0,4	0,2	6	100	0,1	0,8
Imipramine	0,3	0,1	6	100	0,2	0,4

Cependant, de manière générale, les concentrations en psychotropes mesurées à Jean Marcotte sont plus faibles que celles quantifiées dans les effluents d'entrée d'Ile Lebel et Le Gardeur. Ainsi, en moyenne, les concentrations mesurées dans l'effluent de sortie Jean Marcotte sont 1,8 fois inférieures à celles mesurées dans l'effluent d'entrée d'Ile Lebel (**Figure IV-34**).

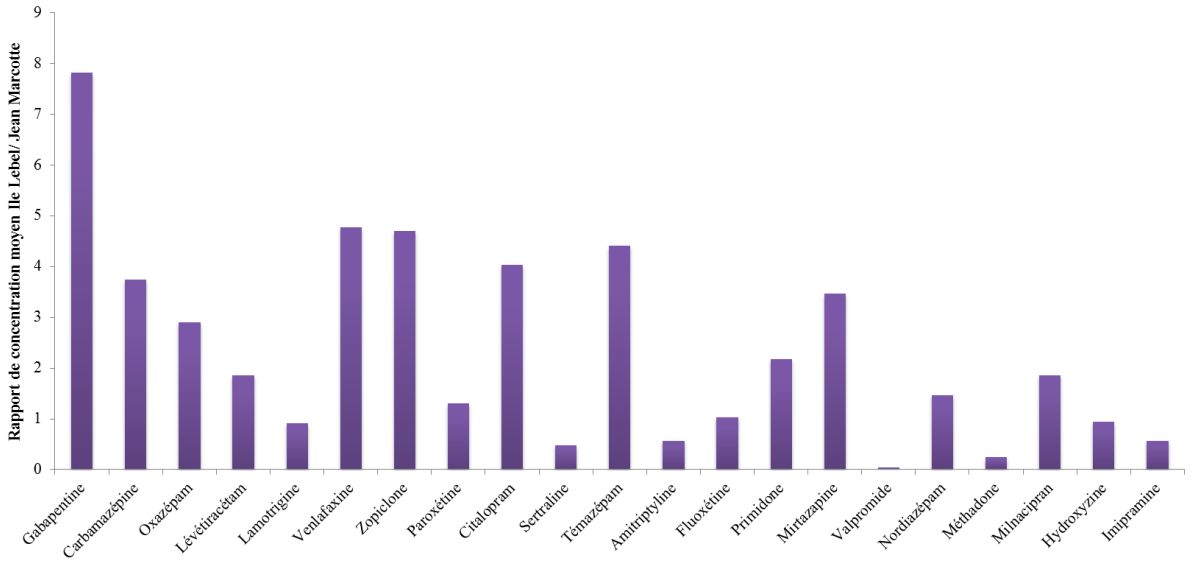


Figure IV-34. Rapports de concentration moyens entre Ile Lebel et Jean Marcotte pour les psychotropes quantifiés.

Les faibles niveaux de concentrations de la STEP Jean Marcotte peuvent être expliqués par le fait que les prélèvements ont été seulement effectués en août 2013 et mars 2014 (sur 3 jours consécutifs pour chaque mois). Ainsi, avec un suivi aussi court, il est difficile d'obtenir une bonne représentation de la contamination en psychotropes. De plus, le fort débit d'entrée de la STEP de Montréal (2 234 922 $m^3.j^{-1}$) entraine une dilution des composés et donc une diminution de leur concentration. Enfin, comme précisé dans le **Chapitre 2. Section 2.2.5 *a)***, les deux tiers du réseau de collecte de la ville de Montréal sont constitués d'un réseau unitaire. Celui-ci recueille les eaux sanitaires des maisons, des usines et des commerces mais aussi les eaux de pluies et les eaux de fonte des neiges (http://ville.montreal.qc.ca/portal/page?_pageid=6497,54249586&_dad=portal&_schema=PORTAL) entrainant alors la dilution des eaux usées arrivant en entrée de la STEP Jean Marcotte. L'étude de Gagnon et Lajeunesse (2012) montre qu'effectivement les niveaux de concentrations des composés pharmaceutiques retrouvés dans la STEP de Montréal sont plus faibles que ceux relevés dans la STEP de Granby. Cela se vérifie aussi avec la concentration de la Gabapentine qui est 4 à 8 fois plus faible que celle qui est retrouvée dans les effluents d'entrée de Le Gardeur et Ile Lebel (**Tableau IV-21** et **Tableau IV-23**) mais aussi de la littérature (**Tableau II-3, Chapitre 2. Section 1.3**).

Cependant, lorsque les données de concentrations sont converties en flux (**Tableau IV-26**), l'effluent d'entrée de la STEP Jean Marcotte a des niveaux beaucoup plus élevés que ceux mesurés dans l'effluent d'entrée d'Ile Lebel.

Tableau IV-26. Flux d'entrée moyens de Jean Marcotte et rapports de concentrations moyens entre les STEP Jean Marcotte et Ile Lebel.

Composés	Flux d'entrée moyen ± E-T de Jean Marcotte ($g.j^{-1}$)	Rapport Jean Marcotte/Ile Lebel
Gabapentine	947,2 ± 448,7	11,9
Lamotrigine	217,6 ± 116,4	101,5
Carbamazépine	177,5 ± 77,7	24,9
Sertraline	162,5 ± 10,6	196,1
Lévétiracétam	133,3 ± 15,6	50,2
Oxazépam	131,1 ± 55,9	32,1
Valpromide	118,8 ± 118,0	2130,7
Amitriptyline	100,4 ± 24,8	163,8
Paroxétine	83,4 ± 56,3	71,8
Venlafaxine	41,6 ± 20,9	19,5
Zopiclone	30,8 ± 5,4	19,8
Fluoxétine	27,5 ± 0,4	90,1
Citalopram	26,1 ± 4,1	23,1
Témazépam	17,3 ± 4,7	21,1
Méthadone	14,3 ± 10,9	396,5
Primidone	9,8 ± 0,7	42,7
Nordiazépam	30, ± 0,7	63,5
Mirtazapine	2,9 ± 0,7	26,8
Hydroxyzine	1,0 ± 0,4	99,4
Milnacipran	0,9 ± 0,2	50,1
Imipramine	0,6 ± 0,1	164,2

Le **Tableau IV-27** présente les apports moyens en mg/an/hab des 3 stations étudiés pour le 21 psychotropes quantifiés. Ces données montrent que les apports moyens d'un habitant connecté à Ile Lebel sont au moins 2 fois supérieurs à ceux de Le Gardeur et Jean Marcotte.

Exemple : un habitant connecté à Ile Lebel apporte 466,8 mg/an de Gabapentine alors qu'un habitant connecté à Le Gardeur et Jean Marcotte en apporte respectivement 197,6 mg/an et 172,9 mg/an.

Tableau IV-27. Apports moyens en psychotrope d'un habitant connecté à Le Gardeur ou Ile Lebel ou Jean Marcotte.

Composés	Apport moyen (mg/an/hab)		
	Ile Lebel	Le Gardeur	Jean Marcotte
Gabapentine	466,8	197,6	172,9
Carbamazépine	41,8	12,9	32,4
Oxazépam	23,9	6,9	23,9
Lévétiracétam	15,6	5,4	24,3
Lamotrigine	12,6	3,4	39,7
Venlafaxine	12,5	4,7	7,6
Zopiclone	9,1	3,4	5,6
Paroxétine	6,8	3,9	15,2
Citalopram	6,6	3,2	4,8
Sertraline	4,9	1,6	29,7
Témazépam	4,8	1,7	3,2
Amitriptyline	3,6	2,0	18,3
Fluoxétine	1,8	0,6	5,0
Primidone	1,4	0,2	1,8
Mirtazapine	0,6	0,4	0,5
Valpromide	0,3	0,2	21,7
Nordiazépam	0,3	0,2	0,6
Méthadone	0,2	0,1	2,6
Hydroxyzine	0,1	0,03	0,2
Milnacipran	0,04	0,02	0,2
Imipramine	0,02	0,03	0,1

Le nombre d'habitants connectés et le niveau des débits d'entrée peuvent expliquer la différence d'apport moyen d'un habitant par an entre la STEP d'Ile Lebel et les étangs aérés de Le Gardeur.

La différence d'apport moyen d'un habitant connecté à la STEP Jean Marcotte avec les deux autres stations de Repentigny peut être expliquée par la forte dilution des eaux usées dans le réseau d'égout de la ville de Montréal mais aussi par le fait que seulement 2 mois ont été échantillonnés à Jean Marcotte. De plus, il est peu probable que les habitudes de prescriptions des médecins et de consommation de la population soient différentes entre la ville de Montréal et celle de Repentigny qui sont situées à 40 km l'une de l'autre.

N'ayant pas trouvé les données de consommations des médicaments au Québec en mg/an/hab de chacun des 21 psychotropes mesurés, il nous est impossible de faire comme dans la **Section 1.1.2 de la partie A de ce chapitre** et donc de comparer les données de consommations aux apports calculés dans les effluents d'entrée des 3 stations étudiées.

1.2. Etude des eaux de sortie de STEP

1.2.1. Fréquence de quantification, occurrence et gamme de concentration

a) Comparaison Le Gardeur et Ile Lebel

Le **Tableau IV-28** présente les fréquences de quantification, les concentrations moyennes, minimales et maximales (en $ng.L^{-1}$) des psychotropes quantifiés dans les échantillons d'effluent de sortie de Le Gardeur et Ile Lebel.

Sur l'ensemble des échantillons analysés en sortie de Le Gardeur, 19 psychotropes (Gabapentine, Carbamazépine, Venlafaxine, Lamotrigine, Oxazépam, Citalopram, Témazépam, Lévétiracétam, Zopiclone, Primidone, Sertraline, Amitriptyline, Fluoxétine, Valpromide, Nordiazépam, Méthadone, Hydroxyzine, Imipramine) sont systématiquement quantifiés, 3 molécules (Mirtazapine, Paroxétine et Milnacipran) ont des fréquences de quantification comprises entre 60% et 80% et 26 psychotropes (Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Zolpidem, Méprobamate, Buspirone, Bromazépam, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Cyamémazine, Maprotiline, Duloxétine, Clorazépate, Norfluoxétine, Clonazépam, Lorazépam, Chlorpromazine, Alprazolam, Clomipramine, Flunitrazépam, Clobazam, Diazépam, Pimozide et Prazépam) ne sont jamais détectés.

Sur les 5 échantillons analysés en sortie d'Ile Lebel, 20 psychotropes (Gabapentine, Carbamazépine, Oxazépam, Lévétiracétam, Lamotrigine, Venlafaxine, Zopiclone, Paroxétine, Citalopram, Témazépam, Amitriptyline, Sertraline, Fluoxétine, Primidone, Mirtazapine, Valpromide, Méthadone, Nordiazépam, Hydroxyzine, Imipramine) sont systématiquement quantifiés, seul le Milnacipran a une fréquence de quantification de 40% et 26 psychotropes (Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Zolpidem, Méprobamate, Buspirone, Bromazépam, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Cyamémazine, Maprotiline, Duloxétine, Clorazépate, Norfluoxétine, Clonazépam, Lorazépam, Chlorpromazine, Alprazolam, Clomipramine, Flunitrazépam, Clobazam, Diazépam, Pimozide et Prazépam) ne sont jamais détectés.

Tableau IV-28. Fréquences de quantification et concentrations des psychotropes quantifiés dans les effluents de sortie de Le Gardeur et Ile Lebel.

LG sortie						
Composés	Conc. Moyenne ng/L	E-T	Nombre échantillon	Fréquence de quantification %	Conc. Minimale ng/L	Conc. Maximale ng/L
Gabapentine	1507,0	213,9	5	100	1130,3	1732,9
Carbamazépine	180,7	64,6	5	100	107,8	276,3
Venlafaxine	135,1	47,3	5	100	47,4	252,7
Lamotrigine	131,4	49,6	5	100	43,9	200,0
Oxazépam	114,5	15,3	5	100	88,3	137,0
Citalopram	45,5	17,9	5	100	23,7	87,7
Témazépam	24,1	4,7	5	100	17,6	33,3
Lévétiracétam	20,9	7,5	5	100	11,3	29,7
Zopiclone	13,6	9,2	5	100	1,9	31,2
Primidone	10,2	2,8	5	100	5,8	14,9
Sertraline	9,5	5,6	5	100	1,5	19,1
Amitriptyline	9,0	3,4	5	100	6,0	15,0
Mirtazapine	7,8	5,3	4	80	0,5	13,4
Paroxétine	7,2	2,1	4	80	3,7	9,5
Milnacipran	6,0	2,0	3	60	3,1	8,4
Fluoxétine	3,1	1,2	5	100	1,2	4,8
Valpromide	1,9	0,5	5	100	1,2	2,8
Nordiazépam	1,4	0,8	5	100	0,5	2,6
Méthadone	0,7	0,1	5	100	0,5	1,0
Hydroxyzine	0,4	0,1	5	100	0,2	0,7
Imipramine	0,1	0,05	5	100	0,0	0,2

IL sortie						
Composés	Conc. Moyenne ng/L	E-T	Nombre échantillon	Fréquence de quantification %	Conc. Minimale ng/L	Conc. Maximale ng/L
Gabapentine	3905,8	2220,8	5	100	1491,9	7676,6
Carbamazépine	277,1	108,8	5	100	177,7	435,0
Oxazépam	132,5	30,5	5	100	65,7	178,1
Lévétiracétam	109,5	54,8	5	100	58,2	183,2
Lamotrigine	87,6	31,2	5	100	42,9	142,5
Venlafaxine	79,1	43,1	5	100	27,2	151,4
Zopiclone	63,5	35,6	5	100	19,0	128,7
Paroxétine	45,8	27,1	5	100	21,8	113,7
Citalopram	37,6	9,4	5	100	23,3	53,4
Témazépam	29,8	9,1	5	100	14,7	44,5
Amitriptyline	22,4	6,1	5	100	11,0	34,9
Sertraline	15,4	6,3	5	100	8,1	29,8
Fluoxétine	7,9	1,9	5	100	4,8	11,0
Primidone	7,3	2,4	5	100	1,9	10,8
Mirtazapine	3,3	2,7	5	100	0,6	6,9
Valpromide	1,9	0,6	5	100	1,1	3,2
Méthadone	1,2	0,6	5	100	0,3	2,7
Nordiazépam	1,0	0,3	5	100	0,4	1,5
Hydroxyzine	0,3	0,1	5	100	0,1	0,5
Imipramine	0,1	0,05	5	100	0,1	0,2
Milnacipran	0,1	0,04	2	40	0,04	0,1

Sur l'ensemble des psychotropes retrouvés dans les effluents de sortie de Le Gardeur et Ile Lebel, la Gabapentine est la molécule ayant la concentration moyenne la plus élevée (LG : 1507,0 ± 213,9 ng.L^{-1} et IL : 3905,0 ± 2020,8 ng.L^{-1}) et le composé avec la concentration moyenne la plus faible est l'Imipramine (0,1 ± 0,05 ng.L^{-1}) pour Le Gardeur et le Milnacipran (0,1 ± 0,04 ng.L^{-1}) pour Ile Lebel. Autant de composés ont été retrouvés dans les effluents d'entrée des deux stations que dans les effluents de sortie. De plus, nous remarquons, comme dans les effluents d'entrée, que la majorité des psychotropes quantifiés ont des niveaux de concentrations compris entre 100 ng.L^{-1} et < 10 ng.L^{-1} (**Figure IV-35**).

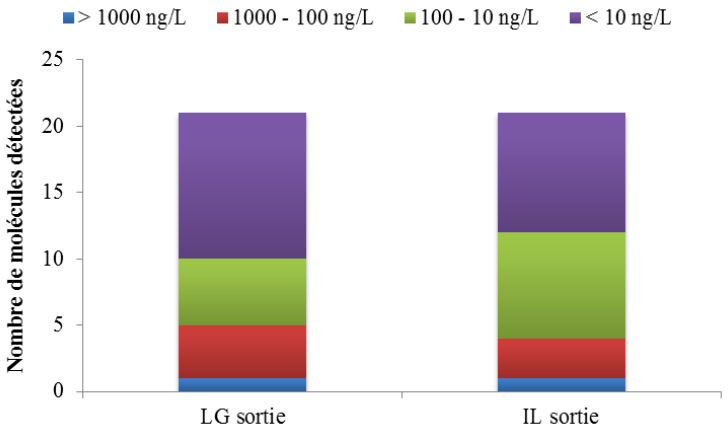


Figure IV-35. Classement des psychotropes retrouvés dans les effluents de sortie de Le Gardeur et Ile Lebel par gamme de concentrations.

Même si les niveaux de concentrations des molécules trouvées dans les effluents de sortie de Le Gardeur et Ile Lebel sont proches, les concentrations mesurées à Ile Lebel sont en moyenne 1,8 fois plus élevées que celles de Le Gardeur (**Figure IV-36**).

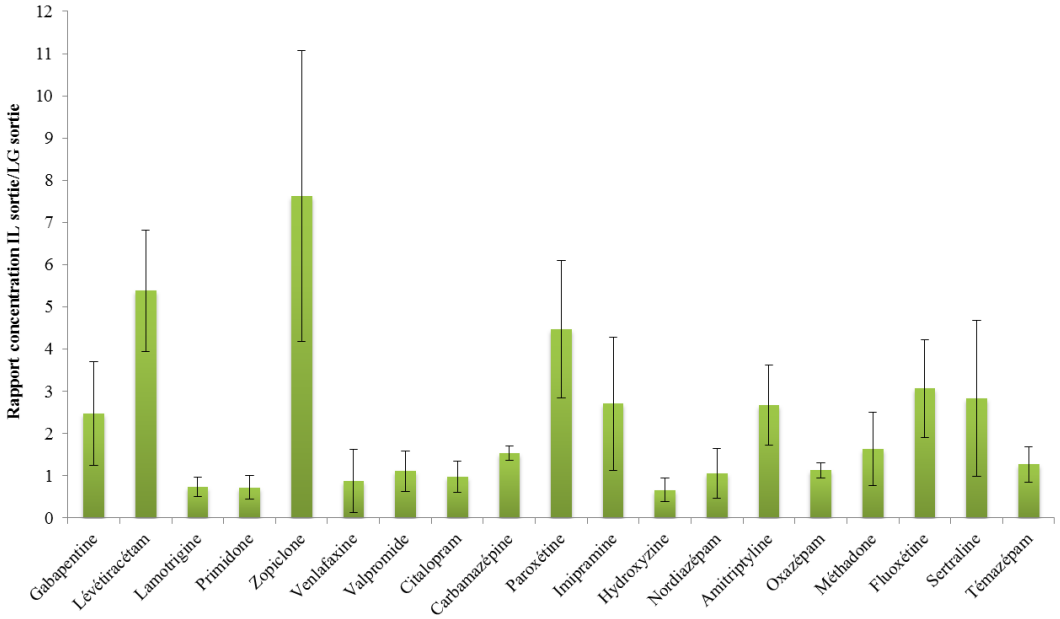


Figure IV-36. Rapports des concentrations moyens entre les effluents de sortie d'Ile Lebel et Le Gardeur.

En termes de flux, la même tendance est observée que dans les effluents d'entrées. Ainsi les flux en psychotropes calculés dans l'effluent de sortie d'Ile Lebel sont environ 4,6 ± 1,8 fois supérieurs à ceux calculés à Le Gardeur (**Tableau IV-29**).

Tableau IV-29. Flux de sortie moyens d'Ile Lebel et Le Gardeur.

Composés	Flux de sortie moyen ± E-T ($g.j^{-1}$)	
	Ile Lebel	**Le Gardeur**
Gabapentine	98,9 ± 56,3	15,8 ± 4,0
Carbamazépine	7,0 ± 2,8	0,9 ± 0,2
Oxazépam	3,4 ± 0,8	0,7 ± 0,3
Lévétiracétam	2,8 ± 1,4	0,3 ± 0,2
Lamotrigine	2,2 ± 0,8	0,4 ± 0,3
Venlafaxine	2,0 ± 1,1	0,5 ± 0,3
Zopiclone	1,6 ± 0,9	0,2 ± 0,2
Paroxétine	1,2 ± 0,7	0,3 ± 0,2
Citalopram	1,0 ± 0,2	0,3 ± 0,1
Témazépam	0,8 ± 0,2	0,2 ± 0,1
Amitriptyline	0,6 ± 0,2	0,1 ± 0,03
Sertraline	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,03
Fluoxétine	0,2 ± 0,05	0,04 ± 0,02
Primidone	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,04
Mirtazapine	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Valpromide	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Méthadone	0,03 ± 0,02	0,004 ± 0,002
Nordiazépam	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Hydroxyzine	0,01 ± 0,002	0,003 ± 0,001
Imipramine	0,004 ± 0,001	0,001 ± 0,0002
Milnacipran	0,001 ± 0,001	0,003 ± 0,001

b) Comparaison Ile Lebel et Jean Marcotte de Montréal

Le **Tableau IV-30** présente les fréquences de quantification, les concentrations moyennes, minimales et maximales (en $ng.L^{-1}$) des psychotropes trouvés dans l'effluent de sortie de la STEP Jean Marcotte à Montréal.

Tableau IV-30. Fréquences de quantification et concentrations des psychotropes quantifiés dans les effluents de sortie de Jean Marcotte.

Jean Marcotte sortie						
Composés	Conc. Moyenne ng/L	E-T	Nombre échantillon	Fréquence de quantification %	Conc. Minimale ng/L	Conc. Maximale ng/L
Gabapentine	599,3	163,1	6	100	326,0	940,4
Sertraline	102,1	17,4	6	100	73,8	129,8
Carbamazépine	94,3	30,3	6	100	51,4	167,9
Lévétiracétam	62,4	17,7	6	100	31,4	85,5
Amitryptiline	60,7	17,5	6	100	30,9	85,6
Paroxétine	60,6	34,3	6	100	20,0	108,4
Valpromide	53,3	52,2	6	100	0,8	142,7
Lamotrigine	43,4	25,6	6	100	0,0	91,5
Oxazépam	40,6	7,8	6	100	23,3	58,9
Venlafaxine	25,6	15,0	6	100	9,9	49,7
Fluoxétine	16,7	5,0	6	100	8,8	24,3
Citalopram	15,4	7,8	6	100	6,6	31,4
Zopiclone	11,4	5,6	6	100	2,8	25,6
Témazépam	8,8	3,4	6	100	4,1	12,7
Primidone	7,9	3,0	6	100	3,6	12,7
Méthadone	5,2	4,9	6	100	1,4	19,8
Mirtazapine	1,2	0,4	6	100	0,4	2,0
Hydroxyzine	1,2	0,7	6	100	0,3	3,2
Milnacipran	1,1	1,0	4	67	0,2	3,1
Nordiazépam	0,9	0,3	6	100	0,2	1,5
Imipramine	0,3	0,1	6	100	0,2	0,5

Sur les 6 échantillons d'effluent de sortie étudiés, 20 psychotropes (Gabapentine, Lamotrigine, Carbamazépine, Sertraline, Lévétiracétam, Oxazépam, Valpromide, Amitriptyline, Paroxétine, Venlafaxine, Zopiclone, Fluoxétine, Citalopram, Témazépam, Méthadone, Primidone, Nordiazépam, Mirtazapine, Hydroxyzine, Imipramine) sont systématiquement quantifiés, seulement le Milnacipran a une fréquence de quantification de 67 % et 26 psychotropes (Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Zolpidem, Méprobamate, Buspirone, Bromazépam, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Cyamémazine, Maprotiline, Duloxétine, Clorazépate, Norfluoxétine, Clonazépam, Lorazépam, Chlorpromazine, Alprazolam, Clomipramine, Flunitrazépam, Clobazam, Diazépam, Pimozide et Prazépam) ne sont jamais détectés

Sur l'ensemble des psychotropes trouvés dans l'effluent de sortie de Jean Marcotte, la Gabapentine est la molécule avec la concentration moyenne la plus élevée (599,3 ± 163,1 $ng.L^{-1}$) et l'Imipramine est celle avec la concentration moyenne la plus faible (0,3 ± 0,1 $ng.L^{-1}$).

La **Figure IV-37** montre les 21 molécules quantifiées, classées par gamme de concentrations. Nous pouvons observer qu'aucune molécule n'a été détectée avec des concentrations supérieures à 1000 ng.L-1 et que la majorité d'entre elles ont été mesurées à des niveaux de concentrations compris entre 599,3 ± 163,1 ng.L^{-1} et 0,3 ± 0,1 ng.L^{-1}.

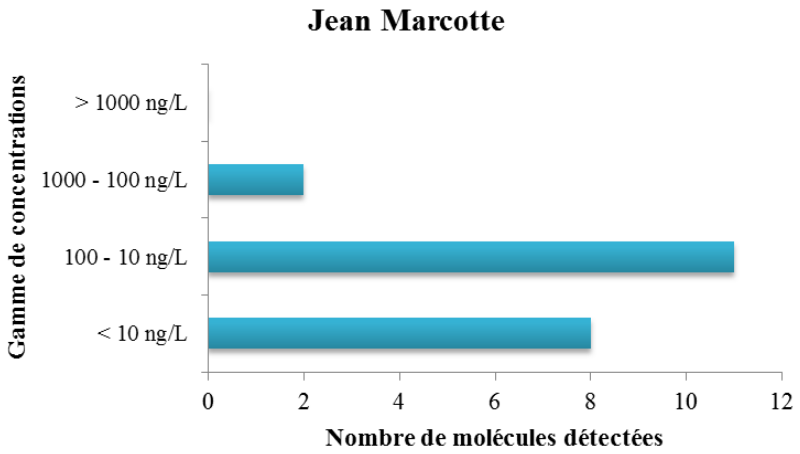


Figure IV-37. Classement des psychotropes trouvés dans l'effluent de sortie Jean Marcotte par gamme de concentrations.

Les 21 composés quantifiés dans l'effluent de sortie de Jean Marcotte sont les mêmes que ceux de l'effluent d'entrée. De plus, comme dans l'effluent d'entrée, les concentrations qui ont été mesurées dans l'effluent de sortie sont plus faibles que celles retrouvées à Ile Lebel. Ainsi, en moyenne les concentrations mesurées dans l'effluent de sortie d'Ile Lebel sont 1,8 fois plus élevées que celles analysées à Jean Marcotte (**Figure IV-38**).

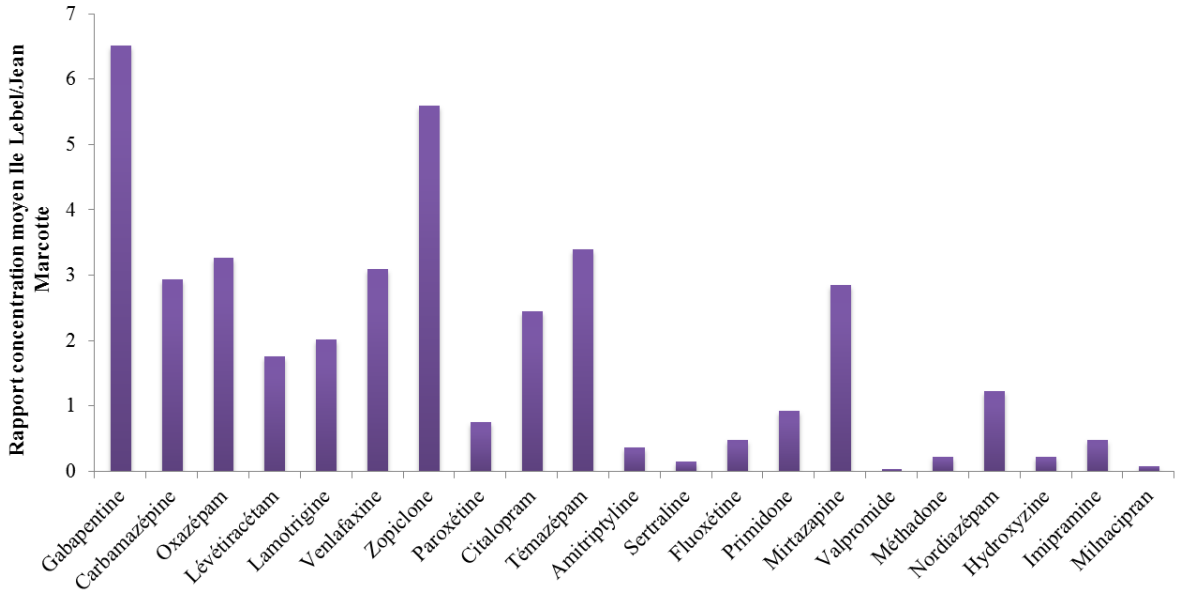


Figure IV-38. Rapports des concentrations moyens entre les effluents de sortie d'Ile Lebel et Jean Marcotte.

Cependant, les flux en psychotropes mesurés dans l'effluent de sortie de Jean Marcotte (**Tableau IV-31**) sont très élevés et sont dans le même ordre de grandeur que ceux mesurés dans l'effluent d'entrée (**Tableau IV-31**).
De plus, nous remarquons de nouveau que les flux de sortie mesurés à Jean Marcotte sont très largement supérieurs à ceux de l'Ile Lebel. Ce résultat est sûrement dû à la différence des débits de ces deux STEP.

Tableau IV-31. Flux de sortie moyens des psychotropes mesurés à Jean Marcotte et rapport de concentration moyen entre Jean Marcotte et Ile Lebel.

Composés	Flux de sortie moyen ± E-T de Jean Marcotte ($g.j^{-1}$)	Rapport Jean Marcotte/Ile Lebel
Gabapentine	1339,4 ± 313,3	13,5
Sertraline	228,1 ± 36,7	586,3
Carbamazépine	210,8 ± 45,2	30,0
Lévétiracétam	139,6 ± 20,4	50,3
Amitriptyline	135,8 ± 13,2	239,6
Paroxétine	135,5 ± 76,7	116,8
Valpromide	119,1 ± 116,7	2497,1
Lamotrigine	97,1 ± 37,3	43,7
Oxazépam	90,6 ± 10,5	27,0
Venlafaxine	57,2 ± 29,7	28,5
Fluoxétine	37,3 ± 10,8	186,3
Citalopram	34,5 ± 16,6	36,1
Zopiclone	25,4 ± 11,8	15,8
Témazépam	19,6 ± 1,2	26,0
Primidone	17,6 ± 2,7	95,3
Méthadone	11,7 ± 7,9	396,2
Mirtazapine	2,6 ± 0,2	30,9
Hydroxyzine	2,6 ± 1,4	399,9
Nordiazépam	1,9 ± 0,5	72,1
Milnacipran	1,9 ± 1,4	1378,3
Imipramine	0,7 ± 0,2	183,4

1.3. Rendement d'épuration

Selon la méthodologie établie par Choubert et *al*. (2011) (description dans ce chapitre **Section 1.3.1**), sur les 21 psychotropes quantifiés dans les 3 stations québécoises étudiées, le taux d'abattement de l'Imipramine n'a pu être calculé à Le Gardeur, celui du Milnacipran n'a pu être déterminé à Ile Lebel, enfin le rendement d'épuration du Témazépam n'a pu être calculé à Jean Marcotte.
Le **Tableau IV-32** recense les valeurs des rendements d'épuration moyens (R) qui ont pu être obtenues pour chacun des psychotropes trouvés à Le Gardeur, Ile Lebel et Jean Marcotte.

Dans les étangs aérés de Le Gardeur, les taux d'abattement moyens des psychotropes trouvés sont compris entre 0% et 32%. Sur les 21 molécules quantifiées, aucune n'a un rendement d'élimination fort (> 70%), seule la Sertraline a un rendement épuratoire moyen (entre 30% et 70%) et 19 composés (Zopiclone, Nordiazépam, Oxazépam, Témazépam, Milnacipran, Venlafaxine, Citalopram, Paroxétine, Mirtazapine, Fluoxétine, Amitriptyline, Gabapentine, Valpromide, Carbamazépine, Lévétiracétam, Lamotrigine, Primidone, Hydroxyzine et Méthadone) ont un rendement faible (< 30%) dont 14 (Nordiazépam, Oxazépam, Témazépam, Milnacipran, Venlafaxine, Citalopram, Mirtazapine, Fluoxétine, Gabapentine, Valpromide, Lamotrigine, Primidone, Hydroxyzine et Méthadone).qui ont un taux d'abattement négatif.

Tableau IV-32. Rendements d'épuration moyens pour chaque psychotropes trouvés à Le Gardeur, Ile Lebel et Jean Marcotte. Les rendements inférieurs à 30% sont représentés en rouge, les rendements compris entre 30% et 70 % sont en orange et ceux compris entre 70% et 100% sont en vert.

Familles thérapeutiques	Composés	R (%) Le Gardeur	Nombre de valeurs	R (%) Ile Lebel	Nombre de valeurs	R (%) Jean Marcotte	Nombre de valeurs
Benzodiazépines	Zopiclone	21	5	-13	5	22	6
	Nordiazépam	-93	5	33	5	38	6
	Oxazépam	-35	5	17	5	11	6
	Témazépam	-21	5	3	5	-	-
Antidépresseurs	Milnacipran	-71	3	-	-	-90	6
	Venlafaxine	-46	5	3	5	-36	6
	Citalopram	-17	5	14	5	-25	6
	Paroxétine	1	4	-117	5	-84	6
	Mirtazapine	-174	4	9	5	3	6
	Fluoxétine	-7	5	26	5	-35	6
	Imipramine	-	-	-7	5	-16	6
	Amitriptyline	8	5	-7	5	-41	6
	Sertraline	32	5	44	5	-42	6
Antiépileptiques	Gabapentine	-9	5	-23	5	-62	6
	Valpromide	-52	5	7	5	-101	6
	Carbamazépine	7	5	1	5	-33	6
	Lévétiracétam	13	5	-8	5	-4	6
	Lamotrigine	-28	5	-3	5	50	6
	Primidone	-240	5	20	5	-78	6
Anxiolytiques	Hydroxyzine	-33	5	13	5	-148	6
Substituts aux opiacés	Méthadone	-24	5	18	5	6	6

Dans la STEP d'Ile Lebel, les taux d'abattement mesurés sont compris entre 0% et 44%. Sur les 21 psychotropes trouvés, aucun n'a un rendement d'épuration fort (> 70%), 2 (Nordiazépam et Sertraline) ont un rendement moyen (entre 30% et 70%) et 18 composés (Zopiclone, Oxazépam, Témazépam, Venlafaxine, Citalopram, Paroxétine, Mirtazapine, Fluoxétine, Imipramine, Amitriptyline, Gabapentine, Valpromide, Carbamazépine, Lévétiracétam, Lamotrigine, Primidone, Hydroxyzine et Méthadone) ont un taux d'abattement faible (< 30%) dont 7 (Zopiclone, Paroxétine, Imipramine, Amitriptyline, Gabapentine, Lévétiracétam et Lamotrigine) sont négatifs.

Enfin, dans la station de traitement des eaux usées Jean Marcotte, les rendements d'épuration calculés sont compris entre 0% et 50%. Sur les 21 psychotropes trouvés, aucun n'a un rendement d'épuration fort (> 70%), 2 (Nordiazépam et Lamotrigine) ont un rendement moyen (entre 30% et 70%) et 18 composés (Zopiclone, Oxazépam, Milnacipram, Venlafaxine, Citalopram, Paroxétine, Mirtazapine, Fluoxétine, Imipramine, Amitriptyline, Sertraline, Gabapentine, Valpromide, Carbamazépine, Lévétiracétam, Primidone, Hydroxyzine et Méthadone) ont un taux

d'abattement faible (< 30%) dont 14 (Milnacipram, Venlafaxine, Citalopram, Paroxétine, Fluoxétine, Imipramine, Amitriptyline, Sertraline, Gabapentine, Valpromide, Carbamazépine, Lévétiracétam, Primidone et Hydroxyzine) sont négatifs.

Les taux d'abattement calculés pour ces trois stations québécoises sont globalement en accord avec ceux donnés dans la littérature (Gagnon et Lajeunesse, 2012 ; Soulier et *al*., 2012 ; Li et *al*., 2013). L'étude de Li et *al*. (2013) montre aussi que la Carbamazépine est une molécule résistante aux traitements mis en place dans les étangs aérés avec des taux d'abattement faibles. De même, Gagnon et Lajeunesse (2012) constatent aussi que la STEP de Montréal qui utilise un traitement primaire physico-chimique, n'élimine pas efficacement la Carbamazépine. De manière générale, il ne semble pas avoir de différence d'efficacité entre Le Gardeur, Ile Lebel et Jean Marcotte pour les psychotropes étudiés (**Figure IV-39**).

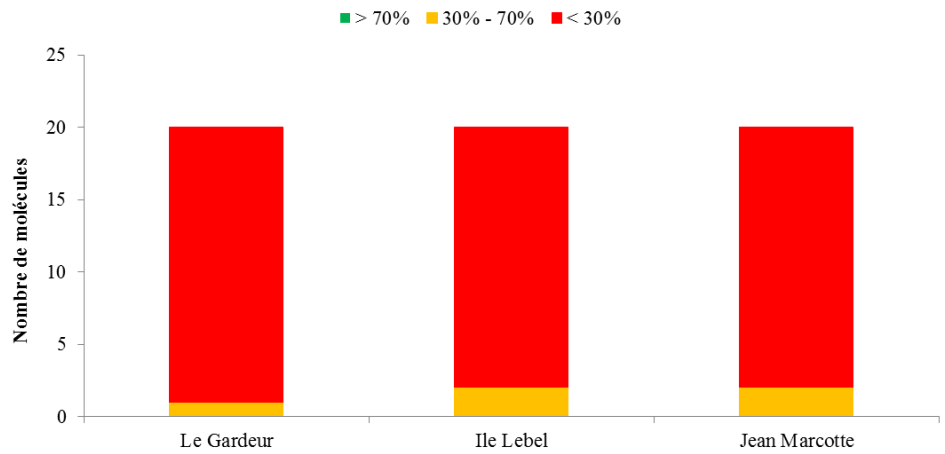


Figure IV-39. Nombre de molécules par classe de rendement d'épuration pour les 3 stations québécoises étudiées.

Néanmoins, en observant seulement la catégorie de composés ayant des taux d'élimination faibles, nous pouvons constater que la STEP d'Ile Lebel semble avoir un traitement épuratoire plus efficace que les deux autres stations étudiées (**Figure IV-24**). La STEP d'Ile Lebel recense 11 psychotropes (Oxazépam, Témazépam, Venlafaxine, Citalopram, Mirtazapine, Fluoxétine, Valpromide, Carbamazépine, Primidone, Hydroxyzine et Méthadone) avec un rendement épuratoire compris entre 30% et 0% alors que la STEP Jean Marcotte en totalise 4 (Zopiclone, Oxazépam, Mirtazapine, Méthadone) et les étangs aérés de Le Gardeur en comptabilise 5 (Zopiclone, Paroxétine, Amitriptyline, Carbamazépine et Lévétiracétam).

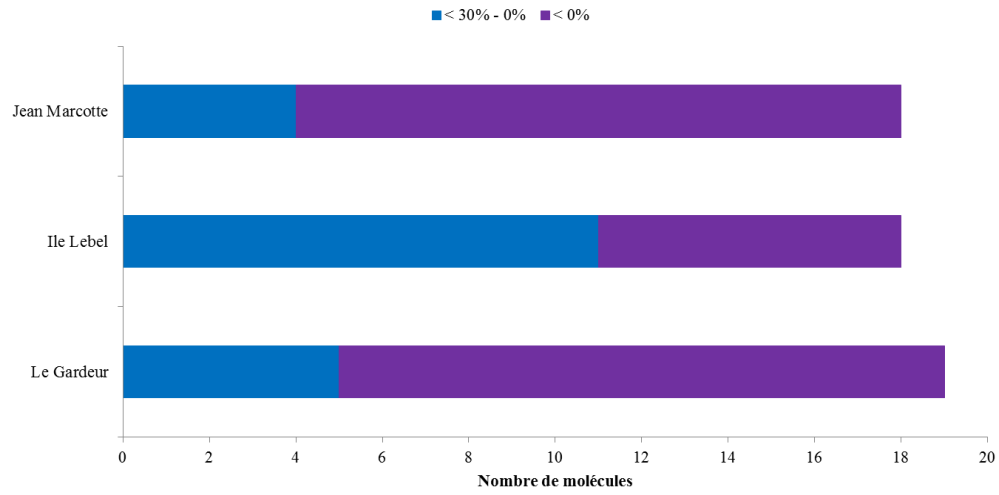


Figure IV-40. Nombre de molécules avec un rendement épuratoire faible et inférieur à 0% pour les 3 stations québécoises étudiées.

La valeur de rendement épuratoire minimale pour Le Gardeur est de -240 pour la Primidone, pour Ile lebel il est de -117 pour la Paroxétine et pour Jean Marcotte il est de -148 pour l'Hydroxyzine.

Les valeurs de rendements épuratoires négatifs sont en accords avec la littérature (Aminot, 2013 ; Gurke et *al*., 2015b ; Paíga et *al*., 2016) et avec les données retrouvées dans les STEP françaises Louis Fargue et Clos de Hilde. Donc les conclusions sont les mêmes que celles dans la **Partie A. Section 1.3.2** de ce chapitre.

2. Etude de la contamination en psychotropes du Saint Laurent

Cette partie vise à étudier la contamination en psychotrope dans le Saint Laurent (description **Chapitre 2. Section 10.1**). L'objectif est alors d'étudier les niveaux de concentrations en psychotrope, les variabilités propres à chaque site d'étude mais aussi les apports et le devenir de ces molécules dans cet hydrosystème.

2.1. Suivi de la contamination par prélèvement ponctuel

2.1.1. Fréquence de quantification, occurrence et gammes de concentrations

Le **Tableau IV-33** présente les fréquences de quantification, les concentrations moyennes, minimales et maximales (en $ng.L^{-1}$) des psychotropes trouvées dans le fleuve Saint Laurent au niveau de Montréal et Repentigny.

Tableau IV-33. Fréquences de quantification et concentrations des psychotropes trouvés dans les 24 échantillons d'eau prélevés dans le Saint Laurent.

Composés	Conc. Moyenne ng/L	E-T	Nombre échantillon	Fréquence de quantification %	Conc. Minimale ng/L	Conc. Maximale ng/L
Gabapentine	33,4	21,5	24	100	12,6	137,0
Oxazépam	5,9	1,5	7	29	3,7	8,0
Carbamazépine	2,7	2,1	24	100	0,74	8,5
Venlafaxine	1,8	2,3	24	100	0,19	10,9
Valpromide	0,8	0,4	24	100	0,0	2,7
Citalopram	0,5	0,4	15	63	0,1	1,5
Lévétiracétam	0,4	0,3	23	96	0,1	0,9

Sur l'ensemble des molécules analysées, 7 psychotropes (Gabapentine, Oxazépam, Carbamazépine, Venlafaxine, Valpromide, Citalopram et Lévétiracétam) ont été quantifiés avec des fréquences de quantification allant de 29% à 100% et 40 composés (Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Mirtazapine, Lamotrigine, Primidone, Zopiclone, Milnacipran, Zolpidem, Méprobamate, Buspirone, Bromazépam, Miansérine, Amoxapine, Doxépine, Tianeptine, Paroxétine, Imipramine, Cyamémazine, Hydroxyzine, Maprotiline, Duloxétine, Clorazépate, Nordiazépam, Amitriptyline, Méthadone, Norfluoxétine, Clonazépam, Lorazépam, Fluoxétine, Chlorpromazine, Sertraline, Alprazolam, Clomipramine, Flunitrazépam, Témazépam, Clobazam, Diazépam, Pimozide, Prazépam) n'ont jamais été détectés.

La concentration moyenne la plus élevée est mesurée pour la Gabapentine (33,4 ± 17,3 $ng.L^{-1}$) et la concentration moyenne la plus faible est retrouvée pour le Lévétiracétam (0,4 ± 0,2 $ng.L^{-1}$). Les valeurs de concentrations en psychotropes retrouvées dans le Saint Laurent sont en accord avec celles de la littérature (Lajeunesse et *al.*, 2008).

Dans ces travaux de thèse, parmi les 47 psychotropes analysés, 19 molécules n'ont été peu voire pas étudiées dans les eaux usées et les eaux de surface et 6 n'ont jamais été recherchées (**Tableau II-3, Chapitre 2. Section 1.3**). Parmi elles, il y a le Valpromide et le Lévétiracétam qui ont donc été quantifiés pour la première fois dans les eaux du Saint Laurent avec des concentrations moyennes respective de 0,8 ± 0,6 $ng.L^{-1}$ et 0,4 ± 0,2 $ng.L^{-1}$.
Sur la totalité des psychotropes analysés sur les échantillons d'eau du fleuve Saint Laurent, seulement 7 ont été quantifiés. Nous pouvons alors supposer que le débit important du fleuve (8 540 $m^3.s^{-1}$) entraîne une forte dilution des 21 psychotropes trouvés les effluents de sortie des STEP de Montréal et Repentigny.

2.1.2. Etude des variabilités par point et saisonnières

Dans cette partie, l'analyse des variations entre les points d'échantillonnage et les saisons étudiés se feront sur la Gabapentine, l'Oxazépam et la Carbamazépine qui sont les molécules avec les concentrations moyennes les plus élevées et qui ont été suivies dans la partie française (**Partie A** de ce chapitre).

Pour ce suivi au Québec, 10 sites de prélèvements ont été étudiés, les sites 1 et 10 sont situés dans la rivière l'Assomption qui est un petit cours d'eau avec un débit moyen de 22,7 $m^3.s^{-1}$, les sites 3 et 2 sont dans la rivière des Prairies qui a un débit moyen de 1 064,1 $m^3.s^{-1}$ et les sites 4, 5, 6, 7, 8 et 9 qui sont dans le fleuve Saint Laurent, au niveau des villes de Repentigny et de Montréal (**Figure IV-41**).

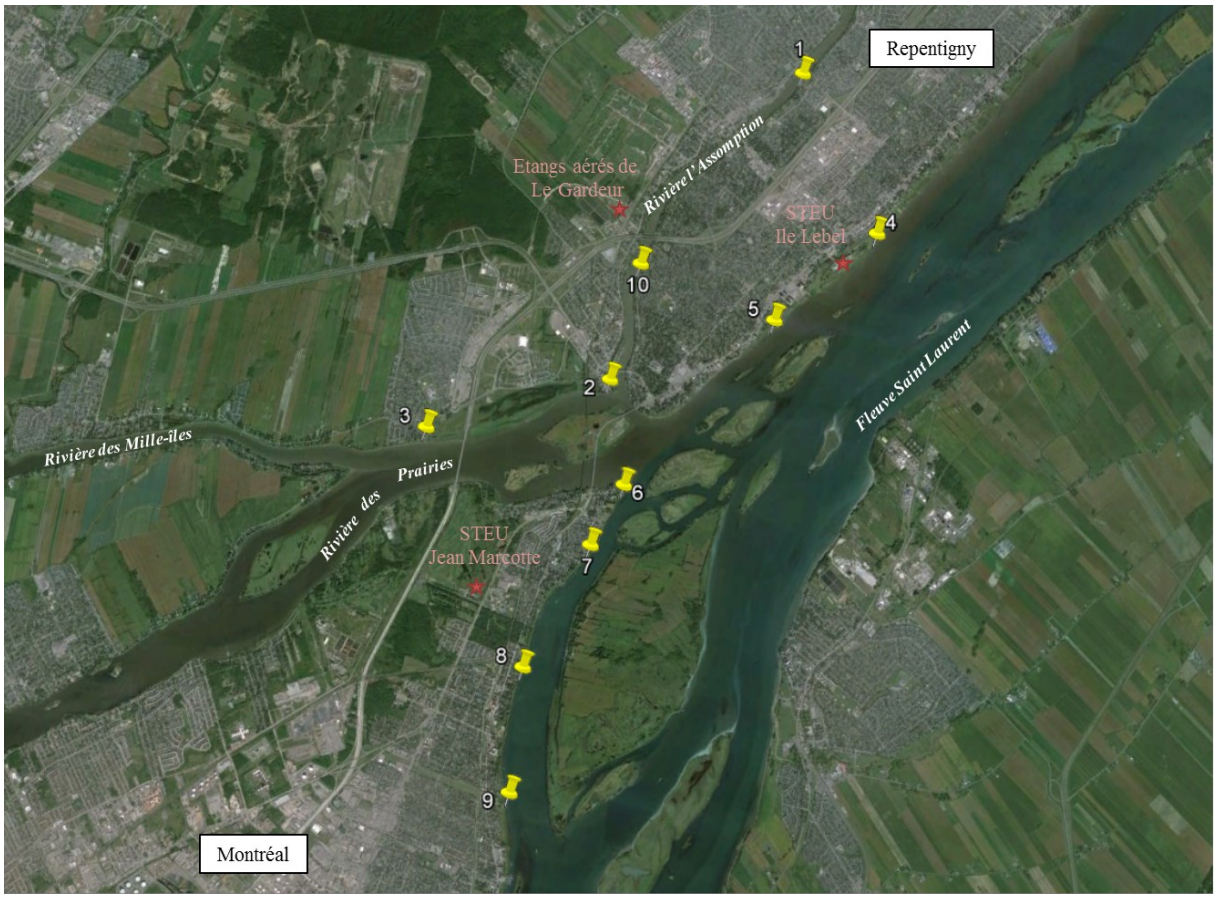


Figure IV-41. Localisation des 10 sites échantillons sur le Fleuve Saint Laurent, la rivière des Prairies et la rivière l'Assomption.

De plus les eaux prélevées dans les sites 2, 3, 4 et 5 correspondent aux eaux brunes de la rivière des Outaouais et celles échantillonnées dans les sites 6, 7, 8 et 9 correspondent aux eaux vertes des Grands lacs (**Figure I-22, Chapitre 1. Section 10.2**).

La rivière des Prairies est étudiée car c'est un affluent du fleuve Saint Laurent et la rivière l'Assomption est étudiée afin d'évaluer l'impact des étangs aérés de Le Gardeur sur une rivière à faible débit.

Enfin, les 10 sites d'échantillonnage ont été choisis de façon à ne pas être dans le panache de la STEP de Montréal (**Figure II-14, Chapitre 2. Section 3.5.1**).

La **Figure IV-42** présente le nombre de molécules mesurées dans les 10 sites de prélèvement (classées par gamme de concentration en $ng.L^{-1}$).

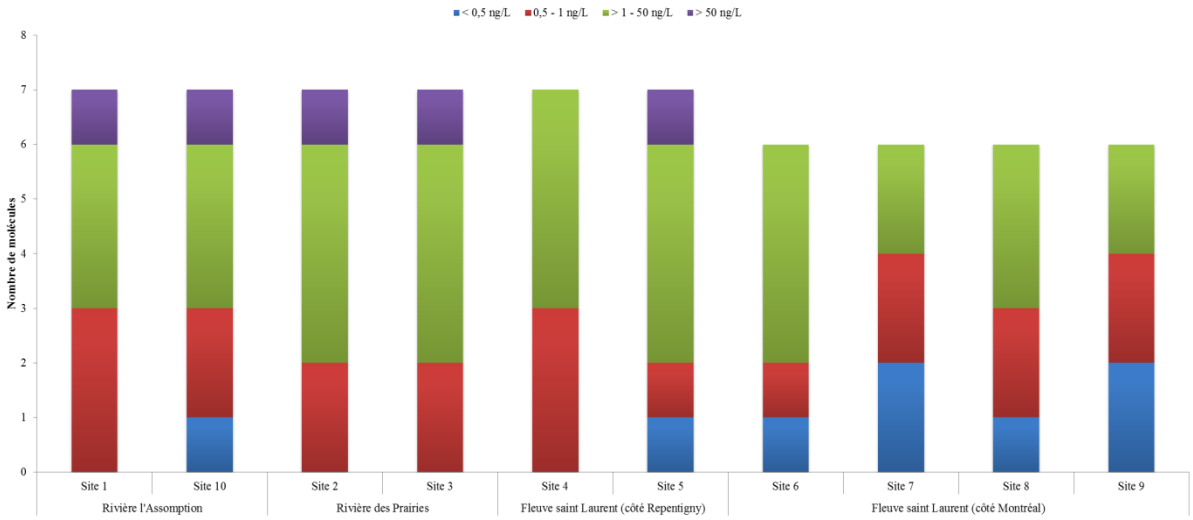


Figure IV-42. Nombre de molécules quantifiées dans l'ensemble des échantillons prélevés dans les 10 sites d'étude, classés par gamme de concentrations (en ng.L^{-1}).

Nous pouvons observer que plus de molécules sont trouvées dans les sites situés dans les eaux brunes de la rivière des Outaouais (site 1, 10, 3, 2, 5 et 4) que dans les sites 6, 7,8 et 9 qui sont dans les eaux vertes des Grands lacs. Effectivement, dans la **Figure IV-43** qui présente les concentrations en Gabapentine, Carbamazépine et Oxazépam dans chacun des sites de prélèvement, nous observons que l'Oxazépam n'est plus détecté dans les sites situés dans le fleuve Saint Laurent coté Montréal (6, 7, 8 et 9).

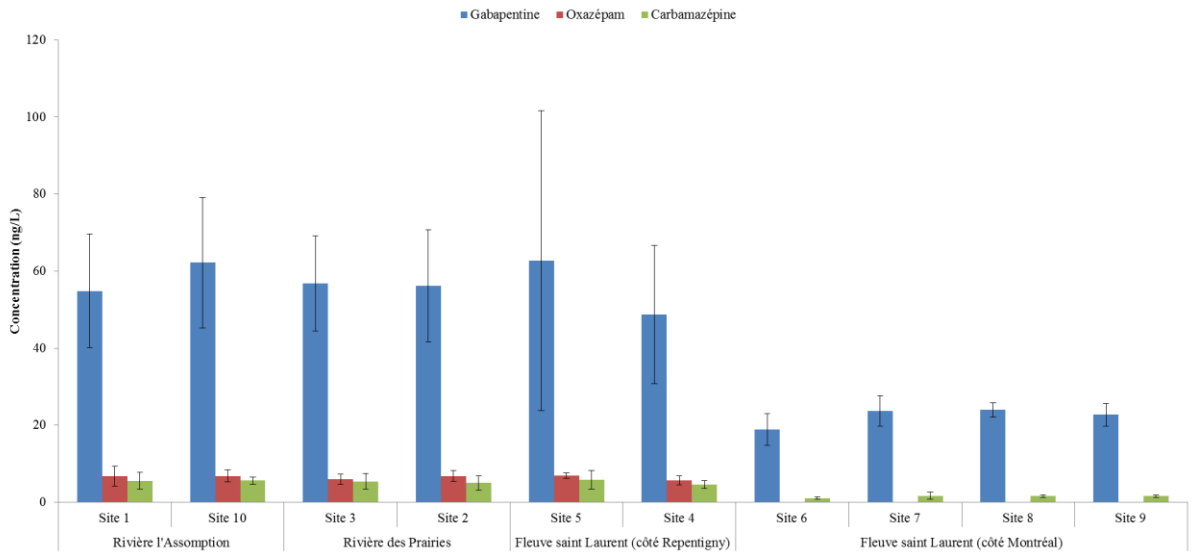


Figure IV-43. Concentrations moyennes (ng.L^{-1}) en Gabapentine, Oxazépam et Carbamazépine détectées dans les 10 sites d'étude.

De plus, nous pouvons observer que les points de prélèvements 5 et 4 du fleuve Saint Laurent situés dans les eaux brunes de la rivière des Outaouais comptabilisent en moyenne des concentrations 2,5 fois plus élevées en Gabapentine et 3,5 fois supérieures en Carbamazépine que les sites 6, 7, 8 et 9 situés dans les eaux vertes des Grands Lacs.

Néanmoins, aucune différence n'est observable au niveau des concentrations de ces 3 psychotropes entre les sites de la rivière l'Assomption, ceux de la rivière des Prairies et ceux dans le fleuve Saint Laurent à côté de Repentigny.
Donc nous ne pouvons pas dire que la rivière l'Assomption est impactée par les étangs aérés de Le Gardeur car les mêmes concentrations sont retrouvées dans les sites 3, 2, 5 et 4. Cependant, nous pouvons supposer que les sites 3, 2, 5 et 4 sont impactés par les apports amont de la rivière des Prairies et les sites 1 et 10 par ceux de la rivière de l'Assomption.

En 2012, le Réseau de Suivi du Milieu Aquatique (RSMA) a prélevé des échantillons d'eau sur le territoire de l'agglomération de Montréal afin d'évaluer la qualité de l'eau en rive (QUALO), des ruisseaux et plans d'eau intérieurs (RUISSO), des plans d'eau limitrophes (COURDO) et des réseaux d'égout pluviaux (PLUVIO) et de dresser un bilan sur l'état général de la qualité des plans d'eau à Montréal (Deschamps et Breton, 2012).
Le programme COURDO a montré, par le calcul de leur indice IC (indice COURDO) qui est relié aux teneurs de plusieurs paramètres (azote ammoniacal, coliformes fécaux, matières en suspension, oxygène dissous, pH, phosphore total et principaux métaux), que la qualité des eaux est mauvaise dans certains sites de prélèvement de notre étude : les sites 3 et 2 de la rivière des Prairies et 1 et 10 de la rivière l'Assomption. Les résultats obtenus dans ce programme peuvent être alors corrélés à ceux de notre étude qui montrent que la contamination en psychotropes est plus importante dans les sites de la rivière des Prairies (sites 2 et 3) et la rivière l'Assomption (sites 1 et 10).
Nous pouvons supposer que ces sites sont impactés par des effluents urbains car ils sont connus pour libérer, en plus des contaminants, des quantités importantes de bactéries dans le milieu aquatique à des niveaux suffisants pour diminuer la qualité de l'environnement (Menon, 1985).

Les 4 campagnes de prélèvement effectuées en juillet, août, octobre et novembre 2013, ne nous ont pas permis de mettre en évidence des variations saisonnières pour les psychotropes retrouvés.
De plus, nous savons que le débit est un facteur pouvant influencer les variations des concentrations en composés dans le milieu ; cependant, nous avons observé dans la Erreur ! Source du envoi introuvable.**, Chapitre 1. Section 10.2**, qu'il n'y avait que très peu de variations des débits au cours de l'année dans le fleuve Saint Laurent.

2.2. Suivi de la contamination par échantillonnage passif

Des POCIS ont été placés dans les sites 4, 5 et 9 aux périodes juillet-août 2013 et octobre-novembre 2013. Cependant suite à des vols de cages de POCIS et à des détériorations de membranes, seulement les POCIS exposés de octobre à novembre 2013 aux sites 4 et 5 ont pu être exploités. Donc il sera impossible de traiter les données de la même façon que celles obtenues avec le suivi français.

2.2.1. Concentrations POCIS, taux d'échantillonnage et concentrations estimées

Les concentrations en ng/g de phase de POCIS, les Rs, les Rs corrigé par les PRC et les concentrations estimées en ng/L sont présentés dans le **Tableau IV-34**.

Tableau IV-34. Concentrations moyennes en ng/g de phase, Rs, Rs corrigé et concentration moyenne en ng.L-1 estimée à partir du POCIS.

Composés	Conc. Moyenne ng/g de phase	E-T	Rs	Rs corrigé	Conc. Moyenne ng/L	E-T	Conc. Minimale ng/L	Conc. Maximale ng/L
Venlafaxine	430,9	146,9	0,12	0,04	137,9	107,1	28,9	352,2
Citalopram	76,0	6,2	0,15	0,05	14,8	7,7	6,4	30,2
Carbamazepine	73,4	9,6	0,15	0,06	14,1	8,2	7,1	30,5
Oxazépam	49,0	4,4	0,29	0,11	5,2	3,1	2,0	11,3
Lamotrigine	31,4	10,4	-	-	-	-	-	-
Témazépam	27,2	11,5	0,16	0,06	3,5	1,3	2,4	6,2
Primidone	10,2	4,4	0,18	0,07	2,3	2,1	0,4	6,4
Amitryptiline	6,7	2,7	0,19	0,07	0,6	0,3	0,5	1,0
Mirtazapine	4,8	1,2	0,13	0,05	0,8	0,3	0,5	1,4
Zopiclone	4,4	1,1	0,80	0,30	0,2	0,1	0,1	0,3
Valpromide	2,3	0,5	-	-	-	-	-	-
Sertraline	2,1	1,8	-	-	-	-	-	-
Imipramine	0,6	0,3	0,18	0,07	0,1	0,1	0,03	0,2

Sur les deux sites où les POCIS ont été exposés, 15 psychotropes (Venlafaxine, Citalopram, Carbamazépine, Oxazépam, Lamotrigine, Témazépam, Primidone, Amitriptyline, Mirtazapine, Zopiclone, Valpromide, Sertraline et Imipramine) ont été trouvés. La concentration la plus élevée est mesurée dans les POCIS est de 430,9 ± 146,9 ng/g de phase pour la Venlafaxine et la concentration la plus faible est de 0,6 ± 0,3 ng/g de phase pour l'Imipramine.

A partir des taux d'échantillonnage obtenus lors des calibrations en laboratoire et dans la littérature mais aussi à partir de leur correction par l'utilisation de la méthode des PRC, il a été possible d'estimer des concentrations en $ng.L^{-1}$ pour les psychotropes retrouvés dans les POCIS exposés dans le Saint Laurent.
La concentration moyenne estimée la plus élevée est mesurée pour la Venlafaxine (137,9 ± 107,1 $ng.L^{-1}$) et la concentration moyenne la plus faible est estimée pour l'Imipramine (0,1 ± 0,1 $ng.L^{-1}$).

La **Figure IV-44** recense le nombre de molécules détectées dans les POCIS placés dans les sites 5 et 4 (classées par gamme de concentration).

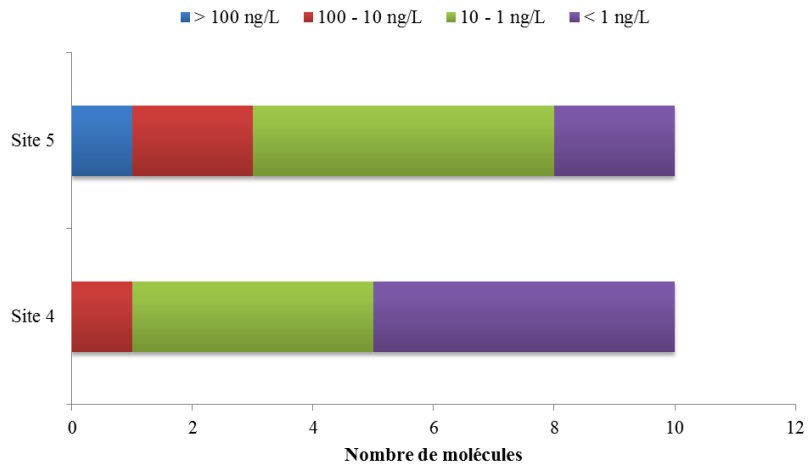


Figure IV-44. Nombre de molécules mesurées dans les POCIS prélevés au site 4 et 5, classé par gamme de concentration.

Autant de molécules ont été quantifiées dans le site 4 que dans le site 5. Néanmoins, les molécules du site 5 ont des concentrations plus élevées que celles dans le site 4. Enfin, plus de molécules ont des concentrations inférieures à 1 ng.L^{-1} dans le site 4 que dans le site 5.

2.2.2. Comparaison avec l'échantillonnage ponctuel

La **Figure IV-45** présente le nombre de psychotropes qui ont pu être trouvées dans les échantillons ponctuels d'eau et dans les échantillons passifs prélevés dans le fleuve Saint Laurent aux sites 5 et 4.

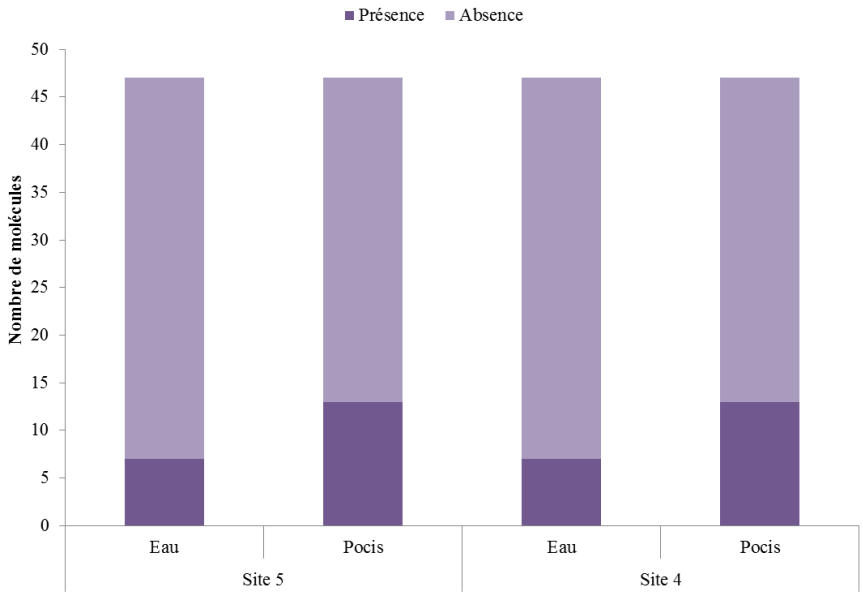


Figure IV-45. Nombre de psychotropes présents dans les échantillons ponctuels et les échantillons passifs pour les sites 5 et 4.

Les résultats montrent que plus de psychotropes ont été trouvés dans les POCIS que dans les échantillons d'eau (13 composés contre 7). Le caractère intégratif de l'échantillonneur passif lui permet d'abaisser les limites de détection et donc de trouver des composés présents à l'état de trace dans le fleuve Saint Laurent (débit très élevé de 8 400 $m^3.s^{-1}$) et non détectables dans les échantillons ponctuels.
Ainsi, la Lamotrigine, le Témazépam, la Primidone, l'Amitriptyline, la Mirtazapine, le Zopiclone et l'Imipramine ont pu être trouvés dans le Saint Laurent grâce au POCIS. Cependant, comme ce qui a été observé dans le **Chapitre 3. Section 2**, la Gabapentine et le Lévétiracétam ne sont trouvés que dans les échantillons d'eau car ces deux composés ne s'accumulent pas le POCIS.

La comparaison des concentrations moyennes (en $ng.L^{-1}$) du Citalopram, la Carbamazépine et l'Oxazépam, mesurées dans les POCIS et les échantillons d'eau sont présentés dans la **Figure IV-46**.

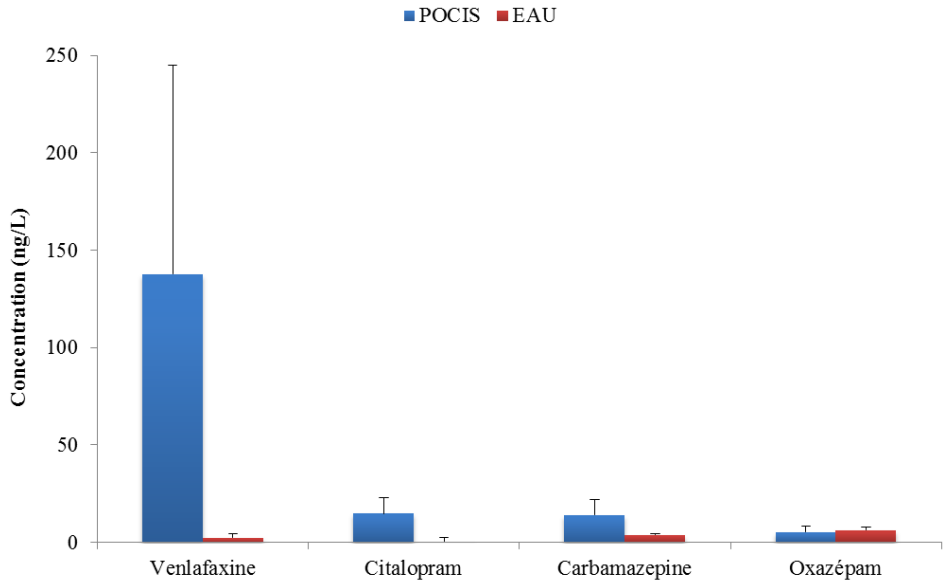


Figure IV-46. Concentrations moyennes mesurées dans les POCIS et les échantillons d'eau aux sites 5 et 4.

Les résultats obtenus montrent que pour la Venlafaxine, le Citalopram et la Carbamazépine, les concentrations estimées dans les POCIS sont supérieures à celles mesurées dans les échantillons ponctuels. Nous observons alors le même phénomène que pour les POCIS qui ont été exposés dans la Garonne en février-mars 2012 (**Figure IV-26, Figure IV-27 et Figure IV-28 Section 2.2.3** de ce chapitre).

Effectivement, en comparant les taux d'échantillonnage et les températures des deux compartiments aquatiques à ces deux périodes (**Tableau IV-35**), nous constatons que nous sommes dans le même cas de figure.

Tableau IV-35. Taux d'échantillonnage corrigé obtenus pour les POCIS exposés sur le suivi entier de la Garonne, pour la période février-mars 2012 et Rs des POCIS exposés en octobre-novembre 2013 dans le Saint Laurent.

Composés	Rs corrigé moyen suivi nov 2011-fév 2013 (Garonne)	Rs corrigé moyen février-mars 2012 (Garonne)	Rs corrigé moyen oct-nov 2013 (St Laurent)	Température Garonne février-mars 2012	Température St Laurent oct-nov 2013
Mirtazapine	0,12	0,04	0,05		
Primidone	0,17	0,06	0,07		
Zopiclone	0,74	0,26	0,30		
Milnacipran	0,03	0,01	0,01		
Venlafaxine	0,11	0,04	0,04		
Méprobamate	0,16	0,05	0,06		
Buspirone	0,10	0,03	0,04		
Bromazépam	0,08	0,03	0,03		
Citalopram	0,14	0,05	0,05		
Carbamazépine	0,14	0,05	0,06		
Paroxétine	0,23	0,08	0,09		
Imipramine	0,17	0,06	0,07		
Cyamémazine	0,07	0,02	0,03	1 - 10°C	5 - 10°C
Hydroxyzine	0,03	0,01	0,01		
Clorazépate	0,08	0,03	0,03		
Nordiazépam	0,17	0,06	0,07		
Amitriptyline	0,17	0,06	0,07		
Oxazépam	0,27	0,09	0,11		
Méthadone	0,33	0,12	0,13		
Clonazépam	0,26	0,09	0,10		
Fluoxétine	0,15	0,05	0,06		
Alprazolam	0,22	0,08	0,09		
Flunitrazépam	0,18	0,06	0,07		
Témazépam	0,15	0,05	0,06		
Diazépam	0,13	0,04	0,05		
Prazépam	0,11	0,04	0,04		

Ainsi, dans les deux compartiments aquatiques, lorsque les températures sont trop faibles, les 3 PRC présents dans la phase ne désorbent pas, entrainant de faibles constantes d'élimination et donc de faibles Rs. C'est pourquoi, ici, nous ne pouvons pas utiliser le POCIS de manière quantitative, il nous permet seulement d'observer la présence dans le Saint Laurent de psychotropes supplémentaires par rapport à ceux retrouvés dans les échantillons ponctuels.

2.3. Caractérisation des apports

Les stations d'épurations sont décrites comme des apports majoritaires de composés pharmaceutiques dans les milieux aquatiques. Ainsi, avec ce raisonnement, les flux sortant des étangs aérés de Le Gardeur sont des apports importants en psychotropes dans la rivière l'Assomption et les flux sortants des STEP d'Ile Lebel et Jean Marcotte sont des apports non négligeables pour le Saint Laurent (**Tableau IV-36**).

Les flux sortants des STEP IL et JM ont été sommés afin d'estimer le flux des effluents urbains entrant dans le Saint Laurent.

Tableau IV-36. Bilan des flux en psychotropes des étangs aérés de Le Gardeur déversés dans la rivière l'Assomption et des STEP Ile Lebel et Jean Marcotte déversés dans le fleuve Saint Laurent.

Composés	Flux apportés à la rivière l'Assomption par les étangs aérés de Le Gardeur $g.j^{-1}$	Composés	Flux apportés au Saint Laurent par les STEU d'Ile Lebel et Jean Marcotte $g.j^{-1}$
Gabapentine	15,8 ± 4,0	Gabapentine	1438,4 ± 506,3
Carbamazépine	0,9 ± 0,2	Sertraline	228,5 ± 92,9
Oxazépam	0,7 ± 0,3	Carbamazépine	217,8 ± 83,2
Paroxétine	0,5 ± 0,3	Lévétiracétam	142,3 ± 55,8
Lamotrigine	0,4 ± 0,3	Amitriptyline	136,3 ± 55,2
Citalopram	0,3 ± 0,2	Paroxétine	136,6 ± 54,8
Venlafaxine	0,3 ± 0,2	Valpromide	119,2 ± 57,6
Zopiclone	0,3 ± 0,1	Lamotrigine	99,3 ± 38,7
Lévétiracétam	0,2 ± 0,2	Oxazépam	94,0 ± 35,6
Témazépam	0,2 ± 0,1	Venlafaxine	59,2 ± 22,5
Fluoxétine	0,1 ± 0,1	Fluoxétine	37,5 ± 15,1
Amitriptyline	0,1 ± 0,03	Citalopram	35,5 ± 13,7
Primidone	0,1 ± 0,03	Zopiclone	27,0 ± 9,7
Mirtazapine	0,1 ± 0,04	Témazépam	20,4 ± 7,7
Sertraline	0,04 ± 0,02	Primidone	17,8 ± 7,1
Méthadone	0,02 ± 0,01	Méthadone	11,7 ± 4,7
Nordiazépam	0,02 ± 0,01	Mirtazapine	2,7 ± 1,0
Valpromide	0,004 ± 0,002	Hydroxyzine	2,6 ± 1,1
Imipramine	0,003 ± 0,001	Nordiazépam	1,9 ± 0,8
Milnacipran	0,003 ± 0,001	Milnacipran	1,9 ± 1,0
Hydroxyzine	0,001 ± 0,0002	Imipramine	0,7 ± 0,3

Le flux maximal estimé dans la rivière l'Assomption est de 15,8 ± 4,0 $g.j^{-1}$ pour la Gabapentine et le flux minimal estimé est pour l'Imipramine avec une valeur de 0,001 ± 0,0002 $g.j^{-1}$.

Dans le fleuve Saint Laurent, le flux maximal estimé est aussi pour la Gabapentine (1438,4 ± 506,3 $g.j^{-1}$) et le flux minimal estimé est aussi pour l'Imipramine (0,7 ± 0,3 $g.j^{-1}$).

A partir des données de débits du fleuve Saint Laurent et de la rivière l'Assomption et à partir des concentrations en psychotrope mesurées dans ces deux milieux par échantillonnage ponctuel, les flux en psychotropes ont pu être calculés (**Tableau IV-37**).

Tableau IV-37. Flux moyens en psychotropes mesurés dans la rivière l'Assomption et dans le fleuve Saint Laurent et rapport entre les flux sortant des STEP et les flux mesurés dans les deux milieux.

Composés	Flux moyens en psychotropes dans la rivière l'Assomption (g/j)	Rapport flux sortants de STEP / Flux moyens dans l'Assomption	Flux moyens en psychotropes dans le fleuve Saint Laurent (kg/j)	Rapport flux sortants de STEP / Flux moyens dans le Saint Laurent
Gabapentine	66,7 ± 34,0	0,2	29,6 ± 17,0	0,05
Oxazépam	9,1 ± 3,4	0,1	4,7 ± 0,4	0,02
Carbamazépine	7,0 ± 0,8	0,1	2,5 ± 1,5	0,1
Valpromide	3,8 ± 2,9	0,01	1,7 ± 1,4	0,1
Venlafaxine	1,3 ± 0,6	0,4	0,6 ±0,3	0,1
Citalopram	0,7 ± 0,3	0,4	0,4 ± 0,3	0,1
Lévétiracétam	0,5 ± 0,3	0,6	0,4 ± 0,1	0,4

Le flux maximal mesuré dans la rivière l'Assomption est de 66,7 ± 34,0 $g.j^{-1}$ pour la Gabapentine et le flux minimal est de 0,5 ± 0,3 $g.j^{-1}$ pour le Lévétiracétam. Dans le fleuve Saint Laurent, le flux le plus élevé est aussi mesuré pour la Gabapentine avec 29,6 ± 17,0 $kg.j^{-1}$ et le flux le plus faible est retrouvé pour le Lévétiracétam avec 0,4 ± 0,1 $kg.j^{-1}$.

En comparant les flux sortant des STEP (**Tableau IV-36**) avec les flux mesurés de la rivière l'Assomption et du fleuve Saint Laurent (**Tableau IV-37**), nous remarquons qu'une grande majorité des composés trouvés dans les étangs aérés de Le gardeur et les STEP d'Ile Lebel et Jean Marcotte ne sont pas retrouvés dans le milieu. Ainsi, certains psychotropes ont subi des phénomènes physico-chimiques ou biologiques (dilution, photodégradation, etc…) à leur entrée dans le compartiment aquatique.

Afin d'estimer l'importance de l'apport des effluents sortants des deux STEP IL et JM par rapport à l'apport amont dans le Saint Laurent, nous avons évalué le rapport du flux moyen sortant des STEP sur le flux mesurés dans le fleuve (**Tableau IV-37**). Ainsi, les psychotropes avec un rapport supérieur à 1 ont pour principal apport dans l'estuaire les effluents urbains des STEP Ile Lebel et Jean Marcotte sinon ce sont les apports amont. Le même raisonnement la rivière l'Assomption avec les étangs aérés de Le Gardeur.

Sur les 7 psychotropes quantifiés dans la rivière l'Assomption et le fleuve Saint Laurent, aucun n'a un rapport supérieur à 1. Donc nous pouvons conclure que dans la rivière l'Assomption et le fleuve Saint Laurent, les apports des stations d'épurations ne sont pas majoritaires. Nous pouvons alors supposer que les apports en psychotropes pourraient venir des affluents et/ou de l'amont.

Les prélèvements effectués dans les sites 3 et 2 dans la rivière des Prairies vont nous permettre d'évaluer la part de cet affluent dans l'apport en psychotrope du saint Laurent.

La **Figure IV-47** présente les apports en psychotropes de la rivière des prairies par rapport à ceux calculés dans le fleuve Saint Laurent.

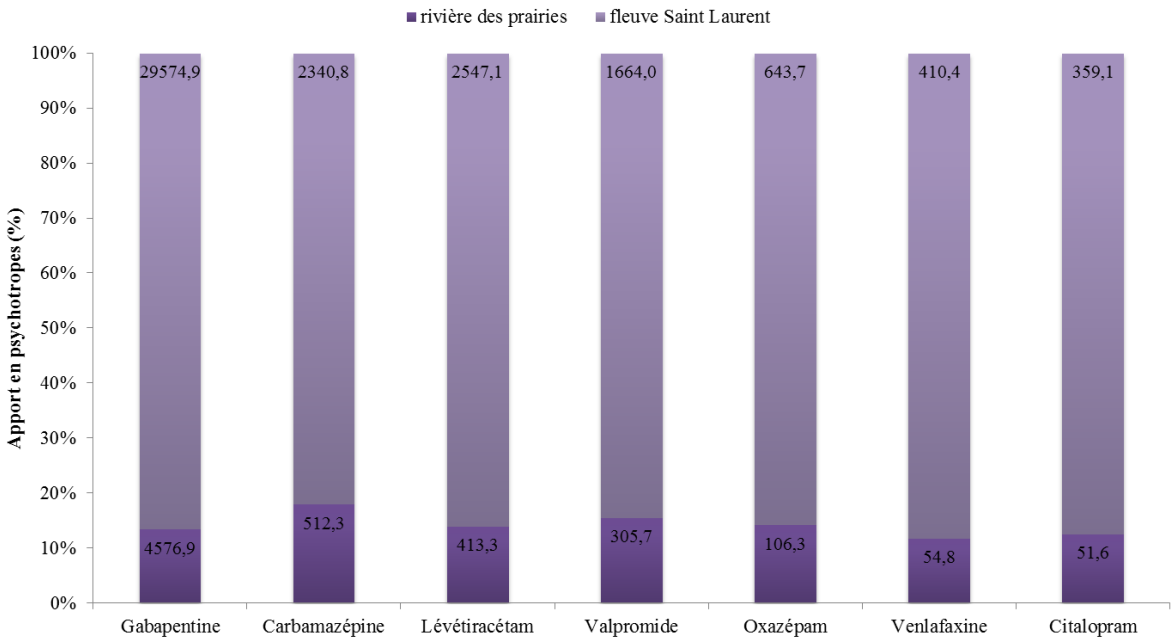


Figure IV-47. Répartition des apports en psychotropes de la rivière des prairies dans le fleuve Saint Laurent. Les chiffres correspondent aux flux en psychotropes calculés (en g.j^{-1}) dans la rivière des prairies et dans le fleuve saint Laurent.

Pour l'ensemble des psychotropes retrouvés dans le fleuve Saint Laurent, la rivière des Prairies apporte en moyenne 15% du flux calculé dans le fleuve.
Les eaux du fleuve Saint Laurent correspondent à un mélange des eaux brunes de la rivière des Outaouais et des eaux vertes des Grands Lacs. Le rapport de Hébert et Belley (2005) explique que les eaux brunes de la rivière des Outaouais contribuent à 16% du débit du fleuve et que les eaux vertes des Grands Lacs représentent, quant à elle, 80% de son débit. Donc comme nous retrouvons les mêmes proportions pour l'apport en psychotropes, nous pouvons alors supposer que les apports majoritaires en psychotropes dans le fleuve Saint Laurent proviennent des eaux des Grands Lacs.
Il serait intéressant de faire des prélèvements plus en amont du fleuve, dans les eaux vertes des Grands Lacs, pour vérifier cette hypothèse.

2.4. Risque environnemental

Le risque environnemental potentiel des psychotropes qui ont été retrouvés dans le fleuve saint Laurent a été recherché à partir de la méthode décrite dans ce chapitre dans la **Partie A Section 2.4** de ce chapitre**.**
Ainsi les valeurs de MEC pour les psychotropes trouvés dans le Saint Laurent, les PNEC de la littérature, le RQ et le niveau de risque environnemental sont présentés dans le **Tableau IV-38**.

Tableau IV-38. Evaluation du risque environnemental à partir des données de MEC dans le fleuve Saint Laurent et de PNEC de la littérature.

Composés	MEC Saint Laurent (ng/L)	PNEC (ng/L)	Références	RQ = MEC/PNEC	Risque
Gabapentine	137,0	100000	*Minguez et al., 2014*	0,001	insignifiant
		24347100	*Helwig et al., 2016*	0,00001	insignifiant
Oxazépam	8,0	481	*Bouisson-Schurtz et al., 2014*	0,02	insignifiant
Carbamazépine	8,5	250	*Komori et al., 2013*	0,03	insignifiant
		2500	*Bouisson-Schurtz et al., 2014*	0,003	insignifiant
		10000	*Minguez et al., 2014*	0,001	insignifiant
Venlafaxine	10,9	13	*Helwig et al., 2016*	0,8	faible
		47580	*Minguez et al., 2014*	0,0002	insignifiant
Valpromide	2,7	-	-	-	-
Lévétiracétam	1,5	100000	*Minguez et al., 2014*	0,00002	insignifiant
Citalopram	0,9	3030	*Minguez et al., 2014*	0,0003	insignifiant
		4200	*Moe et al., 2009*	0,0002	insignifiant
		6500	*Helwig et al., 2016*	0,0001	insignifiant

« - » : aucune donnée de PNEC n'a été trouvée dans la littérature.

De manière générale, sur les 7 psychotropes retrouvés dans le fleuve Saint Laurent, aucun ne présente un risque environnemental aux concentrations auxquelles ils ont été mesurés. Mais nous pouvons faire la même conclusion que dans la **Partie A. Section 2.4** de ce chapitre ; que la méthodologie a appliqué pour évaluer le risque environnemental d'une molécule ou d'un mélange de molécules reste encore à développer et uniformiser.

3. Conclusion

Les stations de traitements des eaux: Le Gardeur, Ile lebel et Jean Marcotte

Sur les 47 psychotropes recherchés dans les effluents d'entrée et de sortie des trois stations étudiées, 21 molécules ont été quantifiées, avec des gammes de concentrations moyennes allant de quelques nanogrammes par litre à plus de 3 000 $ng.L^{-1}$. Parmi toutes les molécules retrouvées, 2 n'avaient jamais été étudiées (le Zopiclone et le Valpromide) et 4 avaient été peu ou pas retrouvées dans les eaux usées (le Milnacipran, la Lamotrigine, le Lévétiracétam et l'Hydroxyzine).

Pour l'ensemble des composés les niveaux de concentrations mesurés sont généralement en accord avec les valeurs retrouvées dans la littérature mais quelques sont variations sont observables et peuvent être expliquées par les habitudes de consommation de la population étudiée ou encore la zone géographique examinée.
Comme pour les STEP bordelaises, la Gabapentine est la molécule qui recense les concentrations les plus élevées dans les 3 stations québécoises étudiées.

Nous avons pu constater que les concentrations mesurées dans la STEP Jean Marcotte sont plus faibles que celles d'Ile Lebel et Le Gardeur. Ce résultat peut être expliqué par :

-la faible quantité d'échantillon qui a été prélevée, ne permettant pas d'obtenir une bonne représentation de la contamination en psychotrope.

-la dilution des effluents causée par le fort débit d'entrée de de la STEP de Montréal (2 234 922 $m^3.j^{-1}$).

-la dilution dans le réseau de collecte de la ville de Montréal qui est au deux tiers unitaire, recueillant les eaux sanitaires des maisons, des usines et des commerces mais aussi les eaux de pluies et les eaux de fontes des neiges.

Globalement, les traitements épuratoires utilisés dans les trois stations québécoises étudiées ne permettent pas d'éliminer efficacement les psychotropes retrouvés. Néanmoins, en observant seulement la catégorie de composés ayant des taux d'élimination faibles, nous pouvons constater que la STEP d'Ile Lebel semble avoir un traitement épuratoire plus efficace car elle recense 11 psychotropes avec un rendement épuratoire compris entre 30% et 0% alors que la STEP Jean Marcotte en totalise 4 et les étangs aérés de Le Gardeur en comptabilisent 5.

Le fleuve Saint Laurent

Sur l'ensemble des molécules analysées, 7 psychotropes ont été quantifiés : la Gabapentine, l'Oxazépam, la Carbamazépine, la Venlafaxine, le Valpromide, le Citalopram et le Lévétiracétam. Nous pouvons alors supposer que le débit important du fleuve (8 540 $m^3.s^{-1}$) entraîne une forte dilution des 21 psychotropes trouvés les effluents de sortie des STEP de Montréal et Repentigny.

Lors du suivi dans le Saint Laurent, nous avons constaté que plus de psychotropes sont trouvés dans les sites placés à côté de Repentigny (site 5 et 4, mélange avec les eaux brunes de la rivière des Outaouais) que dans les sites à coté de Montréal (site 6, 7,8 et 9, mélange avec les eaux vertes des Grands lacs). De plus, le nombre de composés et les niveaux de concentrations mesurés dans le Saint Laurent, côté Repentigny, est du même ordre de grandeur que ceux quantifiés dans les sites 3 et 2 situés dans la rivière des Prairies (les eaux brunes de la rivière des Outaouais). Ces résultats peuvent être reliés avec les données du Réseau de Suivi du Milieu Aquatique (RSMA) de 2012, qui montrent que la qualité des eaux est mauvaise dans les sites de prélèvements 3 et 2 de la rivière des Prairies (eaux provenant des eaux brunes de la rivière des Outaouais).

Le caractère intégratif du POCIS lui permet d'abaisser les limites de détection et donc de trouver des composés présents à l'état de trace dans le fleuve Saint Laurent et non perceptibles dans les échantillons ponctuels. Ainsi, la présence de la Lamotrigine, le Témazépam, la Primidone, l'Amitriptyline, la Mirtazapine, le Zopiclone, la Sertraline et l'Imipramine a pu être détectée dans le Saint Laurent grâce au POCIS. Cependant, l'échantillonneur passif n'a pas pu être utilisé de manière quantitative car lors de son exposition, les températures de l'eau étaient trop froides, limitant la désorption des 3PRC utilisés, entrainant une surévaluation des concentrations estimées par le POCIS.

Dans l'étude des flux de psychotropes dans le Saint Laurent, nous constatons que les flux mesurés dans le fleuve sont supérieurs à ceux des effluents de sortie des STEP de Repentigny et de Montréal. Donc les apports des stations de traitements des eaux usées ne sont pas majoritaires dans le fleuve. Nous avons alors supposé que l'apport principal pouvait venir des affluents ou de l'amont. Nous avons montré que pour l'ensemble des psychotropes retrouvés dans le fleuve Saint Laurent, la rivière des Prairies (eaux brunes) apporte en moyenne 15% du flux mesuré dans le fleuve. Ce résultat est en accord avec le rapport de Hébert et Belley (2005) qui explique que les eaux brunes de la rivière des Outaouais contribuent à 16% du débit du fleuve et que les eaux vertes des Grands Lacs représentent quant à elle, 80% de son débit. Donc nous pouvons supposer que les apports majoritaires en psychotropes dans le fleuve Saint Laurent proviennent des eaux vertes des Grands Lacs, en amont.

Pour finir, l'évaluation du risque environnemental des psychotropes retrouvés dans le Saint Laurent montre que ces composés ne présentent pas de risque aux concentrations auxquelles ils ont été mesurés. Néanmoins, la méthodologie pour ce paramètre reste encore à affiner car selon les PNEC utilisés l'évaluation du risque environnemental peut être différente.

C. COMPARAISON FRANCE – QUEBEC

Dans le **Tableau IV-39,** ont été comparés quelques paramètres et résultats sur les stations d'épuration étudiées dans ces travaux de thèses.

La station de Le Gardeur n'a pas été mise dans ce tableau récapitulatif car ce sont des étangs aérés qui utilisent des traitements épuratoires différents des autres STEP, de plusses rejets ne se déversent pas directement dans le Saint Laurent mais dans la rivière l'Assomption.

Tableau IV-39. Comparaison entre la France et le Québec au niveau des psychotropes dans les stations de traitement des eaux usées.

	France		Québec	
Station de traitement des eaux usées étudiées	Louis Fargue	Clos de Hilde	Jean Marcotte	Ile Lebel
Localisation	Bordeaux	Bègles	Montréal	Repentigny
Capacité de traitement (EH)	300 000	408 300	1 839 600	13 412
Réseau unitaire	60%	13%	63%	non renseigné
Réseau séparatif	40%	87%	37%	non renseigné
Traitement épuratoire	Biofiltration	Biofiltration	Physico-chimique	Physico-chimique
Milieu récepteur	Garonne	Garonne	Saint Laurent	Saint Laurent
Débit moyen dans les eaux brutes	0,73 $m^3.s^{-1}$	1,05 $m^3.s^{-1}$	25,9 $m^3.s^{-1}$	0,28 $m^3.s^{-1}$
Débit moyen dans les eaux traitées	0,76 $m^3.s^{-1}$	1,02 $m^3.s^{-1}$	25,9 $m^3.s^{-1}$	0,29 $m^3.s^{-1}$
Effluents d'entrée				
Nombre et nom des composés détectés	*30 composés* Gabapentine, Oxazépam, Carbamazépine, Lamotrigine, Lévétiracétam, Amisulpride, Valpromide, Témazépam, Clorazépate, Nordiazépam, Sulpiride, Prazépam, Venlafaxine, Primidone, Milnacipran, Tiapride, Diazépam, Zolpidem, Méprobamate, Lorazépam, Cyamémazine, Zopiclone, Paroxétine, Hydroxyzine, Clomipramine, Citalopram, Méthadone, Fluoxétine, Bromazépam, Amitriptyline		*21 composés* Gabapentine, Lamotrigine, Carbamazépine, Sertraline, Lévétiracétam, Oxazépam, Valpromide, Amitriptyline, Paroxétine, Venlafaxine, Zopiclone, Fluoxétine, Citalopram, Témazépam, Méthadone, Primidone, Nordiazépam, Mirtazapine, Hydroxyzine, Milnacipran, Imipramine	
Concentrations moyennes maximales et minimales	Gabapentine : 2786,2 ± 1429,1 $ng.L^{-1}$ Zolpidem : 1,6 ± 1,1 $ng.L^{-1}$	Gabapentine : 3372,7 ± 1320,1 $ng.L^{-1}$ Zolpidem : 1,9 ± 1,0 $ng.L^{-1}$	Gabapentine : 423,8 ± 200,8 $ng.L^{-1}$ Imipramine : 0,3 ± 0,1 $ng.L^{-1}$	Gabapentine : 3312,0 ± 1257,0 $ng.L^{-1}$ Imipramine : 0,2 ± 0,05 $ng.L^{-1}$
Flux moyen maximal et minimal	Gabapentine : 254,8 ± 95,5 $g.j^{-1}$ Zolpidem : 0,2 ± 0,1 $g.j^{-1}$	Gabapentine : 203,6 ± 55,7 $g.j^{-1}$ Zolpidem : 0,1 ± 0,1 $g.j^{-1}$	Gabapentine : 947,2 ± 448,7 $g.j^{-1}$ Imipramine : 0,6 ± 0,1 $g.j^{-1}$	Gabapentine : 80,6 ± 30,6 $g.j^{-1}$ Imipramine : 0,004 ± 0,001 $g.j^{-1}$
Apport d'un habitant connecté aux stations étudiées	Gabapentine : 304,1 mg/an/hab Carbamazépine : 54,7 mg/an/hab	Gabapentine : 280,8 mg/an/hab Carbamazépine : 61,7 mg/an/hab	Gabapentine : 172,9 mg/an/hab Carbamazépine : 32,4 mg/an/hab	Gabapentine : 466,8 mg/an/hab Carbamazépine : 41,8 mg/an/hab
Effluents de sortie				
Nombre et nom des composés détectés	*30 composés* Gabapentine, Oxazépam, Carbamazépine, Lamotrigine, Méprobamate, Lévétiracétam, Venlafaxine, Témazépam, Primidone, Nordiazépam, Amisulpride, Lorazépam, Valpromide, Citalopram, Tiapride, Milnacipran, Sulpiride, Zopiclone, Paroxétine, Fluoxétine, Amitriptyline, Clorazépate, Bromazépam, Méthadone, Cyamémazine, Hydroxyzine, Prazépam, Zolpidem, Clomipramine, Diazépam		*21 composés* Gabapentine, Carbamazépine, Venlafaxine, Lamotrigine, Oxazépam, Citalopram, Témazépam, Lévétiracétam, Zopiclone, Primidone, Sertraline, Amitriptyline, Fluoxétine, Valpromide, Nordiazépam, Méthadone, Hydroxyzine, Imipramine, Mirtazapine, Paroxétine, Milnacipran	
Concentration moyenne maximale et minimale	Gabapentine : 2808,6 ± 1169,5 $ng.L^{-1}$ Zolpidem : 2,0 ± 0,9 $ng.L^{-1}$	Gabapentine : 2968,5 ± 1019,0 $ng.L^{-1}$ Diazépam : 4,0 ± 2,0 $ng.L^{-1}$	Gabapentine : 599,3 ± 163,1 $ng.L^{-1}$ Imipramine : 0,3 ± 0,1 $ng.L^{-1}$	Gabapentine : 3905,8 ± 2220,8 $ng.L^{-1}$ Milnacipran : 0,1 ± 0,04 $ng.L^{-1}$
Flux moyen maximal et minimal	Gabapentine : 194,8 ± 53,6 $g.j^{-1}$ Zolpidem : 0,4 ± 0,2 $g.j^{-1}$	Gabapentine : 184,2 ± 55,0 $g.j^{-1}$ Zolpidem : 0,5 ± 0,3 $g.j^{-1}$	Gabapentine : 1339,4 ± 313,3 $g.j^{-1}$ Imipramine : 0,7 ± 0,2 $g.j^{-1}$	Gabapentine : 98,9 ± 56,3 $g.j^{-1}$ Milnacipran : 0,001 ± 0,001 $g.j^{-1}$
Rendement épuratoire des stations étudiées				
Rendement d'élimination fort : R > 70 %	*aucune molécule*	*aucune molécule*	*aucune molécule*	*aucune molécule*
Rendement d'élimination moyen : 30% < R < 70%	*4 molécules* Paroxétine, Amitriptyline, Clomipramine, Lévétiracétam	*7 molécules* Diazépam, Paroxétine, Amitriptyline, Fluoxétine, Clomipramine, Cyamémazine, Lévétiracétam	*2 molécules* Nordiazépam, Lamotrigine	*2 molécules* Nordiazépam, Sertraline
Rendement d'élimination faible : R < 30 %	*24 molécules* Zopiclone, Zolpidem, Nordiazépam, Oxazépam, Clorazépate, Diazépam, Lorazépam, Prazépam, Milnacipran, Venlafaxine, Citalopram, Fluoxétine, Sulpiride, Cyamémazine, Tiapride, Amisulpride, Gabapentine, Valpromide, Carbamazépine, Lamotrigine, Primidone, Méprobamate, Hydroxyzine, Méthadone	*22 molécules* Zopiclone, Zolpidem, Nordiazépam, Oxazépam, Bromazépam, Clorazépate, Lorazépam, Prazépam, Milnacipran, Venlafaxine, Citalopram, Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Gabapentine, Valpromide, Carbamazépine, Lamotrigine, Primidone, Méprobamate, Hydroxyzine, Méthadone	*18 molécules* Zopiclone, Oxazépam, Milnacipram, Venlafaxine, Citalopram, Paroxétine, Mirtazapine, Fluoxétine, Imipramine, Amitriptyline, Sertraline, Gabapentine, Valpromide, Carbamazépine, Lévétiracétam, Primidone, Hydroxyzine, Méthadone	*18 molécules* Zopiclone, Oxazépam, Témazépam, Venlafaxine, Citalopram, Paroxétine, Mirtazapine, Fluoxétine, Imipramine, Amitriptyline, Gabapentine, Valpromide, Carbamazépine, Lévétiracétam, Lamotrigine, Primidone, Hydroxyzine, Méthadone

Les STEP françaises Louis Fargue et Clos de Hilde sont globalement similaires en termes de capacité de traitement, de débit et de traitement épuratoire. Cependant, les stations québécoises étudiées sont très différentes les unes des autres. Jean Marcotte, qui est située à Montréal, est beaucoup plus volumineuse que celle d'Ile Lebel (Repentigny) car un plus grand nombre d'habitants y est connecté.

Les résultats montrent que plus de composés sont trouvés dans les deux STEP de la région bordelaise que dans les deux STEP québécoises. Cependant, les concentrations maximales sont mesurées pour la même molécule, la Gabapentine. Les concentrations moyennes de la Gabapentine quantifiées dans les stations Louis Fargue, Clos de Hilde et Ile Lebel sont du même ordre de grandeur mais sont environ sept fois plus élevées que celles mesurées à Jean Marcotte.
Le fort débit d'entrée de la STEP de Montréal (2 234 922 $m^3.j^{-1}$) et la prédominance du réseau unitaire peuvent entrainer une dilution des composés et donc diminuer leur concentration.
Enfin, le calcul de l'apport moyen en Gabapentine montre qu'un habitant connecté à Louis Fargue et Clos de Hilde en consomme, sur une année, une quantité équivalente mais qu'un habitant connecté à Ile Lebel en consomme presque deux fois plus.
Nous pouvons donc conclure que la consommation de psychotropes est plus importante en France qu'au Québec en termes de nombre de molécules consommées mais que la consommation est plus important au Québec qu'en France en termes de quantité consommée par molécules.
Donc les habitudes de prescriptions et de consommations de la population influencent les niveaux de concentrations en psychotrope retrouvés dans les effluents de STEP.

Dans les effluents de sortie des stations d'épurations, le nombre de composés trouvés est le même que celui dans les effluents d'entrée. Ceci est aussi observable pour les flux d'entrée et de sortie de STEP.
L'étude des rendements épuratoires montre que globalement les psychotropes sont des composés réfractaires aux traitements physico-chimiques et biologiques mis en place dans les stations québécoises et françaises.
Cependant, les STEP françaises, et en particulier Clos de Hilde, éliminent plus de composés avec leur traitement secondaire par biofiltres que les stations québécoises avec leur traitement primaire physico-chimique.

Donc nous nous sommes intéressés par la suite à la présence et au devenir de ces molécules dans les deux milieux récepteurs étudiés : l'estuaire de la Gironde et le fleuve saint Laurent.

Le **Tableau IV-40** montre quelques paramètres et résultats sur l'estuaire de la Gironde et sur le fleuve Saint Laurent permettant de comparer ces deux milieux.

Le débit du fleuve Saint Laurent qui est 18 fois plus élevé que celui de l'estuaire de la Gironde joue un rôle sur la dilution des composés car moins de psychotropes y sont détectés. Pour ces deux compartiments aquatiques, une perte de composés est constatée par rapport au nombre de psychotropes détectés dans les effluents de sortie de STEP. Néanmoins, le composé avec la

concentration moyenne la plus élevée est toujours la Gabapentine, qui est mesurée à une valeur identique dans l'estuaire de la Gironde et dans le fleuve Saint Laurent.

Dans les deux milieux aquatiques, l'utilisation du POCIS montre qu'il permet de trouver plus de composés que dans les échantillons ponctuels d'eau. Cependant, le nombre de psychotropes trouvé par les POCIS exposés dans le Saint Laurent est toujours inférieur à celui mesuré dans les POCIS placés dans la Gironde estuarienne.

Tableau IV-40. Comparaison entre la France et le Québec au niveau des psychotropes dans le milieu.

	France	**Québec**
Compartiment aquatique étudié	Estuaire de la Gironde	Fleuve Saint Laurent
Débit moyen	481 $m^3.s^{-1}$	8 540 $m^3.s^{-1}$
Nombre et nom des composés détectés par prélèvement ponctuel	*20 composés* Gabapentine, Oxazépam, Lamotrigine, Carbamazépine, Amisulpride, Tiapride, Venlafaxine, Valpromide, Lévétiracétam, Sulpiride, Citalopram, Méprobamate, Primidone, Milnacipran, Bromazépam, Zopiclone, Nordiazépam, Méthadone, Prazépam, Zolpidem	*7 composés* Gabapentine, Oxazépam, Carbamazépine, Venlafaxine, Valpromide, Citalopram, Lévétiracétam
Concentration moyenne maximale et minimale par prélèvement ponctuel	Gabapentine : 34,4 ± 24,4 $ng.L^{-1}$ Zolpidem : 0,1 ± 0,04 $ng.L^{-1}$	Gabapentine : 33,4 ± 21,5 $ng.L^{-1}$ Lévétiracétam : 0,4 ± 0,3 $ng.L^{-1}$
Nombre et nom des composés détectés par prélèvement passif	*25 composés* Oxazépam, Carbamazépine, Amisulpride, Tiapride, Venlafaxine, Lamotrigine, Sulpiride, Primidone, Nordiazépam, Prazépam, Méprobamate, Milnacipran, Bromazépam, Zopiclone, Nordiazépam, Méthadone, Prazépam, Zolpidem	*13 composés* Venlafaxine, Citalopram, Carbamazépine, Oxazépam, Lamotrigine , Témazépam, Primidone, Amitriptyline, Mirtazapine, Zopiclone, Valpromide, Sertraline, Imipramine,
Flux moyen maximal et minimal	Gabapentine : 1709,6 ± 628,5 $g.j^{-1}$ Zolpidem : 2,8 ± 2,0 $g.j^{-1}$	Gabapentine : 29 574,9 ± 16 967,4 $g.j^{-1}$ Lévétiracétam : 359,1 ± 146,0 $g.j^{-1}$
Evaluation du risque environnemental		
Risque élevé : MEC/PNEC > 10	*aucune molécule*	*aucune molécule*
Risque modéré : 1 < MEC/PNEC < 10	*aucune molécule*	*aucune molécule*
Risque faible : 0,1 < MEC/PNEC < 1	*1 molécule* Oxazépam	*aucune molécule*
Risque insignifiant : MEC/PNEC < 0,1	*12 molécules* Gabapentine, Lamotrigine, Carbamazépine, Amisulpride, Méprobamate, Venlafaxine, Primidone, Lévétiracétam, Zopiclone, Citalopram, Méthadone, Zolpidem	*6 molécules* Gabapentine, Oxazépam, Carbamazépine, Venlafaxine, Citalopram, Lévétiracétam

Lorsque les concentrations sont converties en flux, nous constatons qu'ils sont plus importants dans le fleuve Saint Laurent que dans la Gironde estuarienne. Le flux de Gabapentine dans le Saint Laurent est 17 fois plus élevé que celui mesuré dans la Gironde, ce qui est en accord avec la différence de débit de ces deux compartiments aquatiques.

Enfin, à partir des concentrations environnementales mesurées (MEC) des psychotropes dans les deux milieux et de leurs concentrations prédites sans effets biologiques sur les organismes aquatiques (PNEC) trouvées dans la littérature, le risque environnemental (RQ = MEC/ PNEC), a été évalué.
Sur l'ensemble des composés retrouvés, aucun ne présente un risque environnemental aux concentrations auxquelles ils ont été détectés.

CHAPITRE V. EXPOSITION IN VITRO ET IN VIVO DE PSYCHOTROPES SUR DES MODELES BIOLOGIQUES D'EAU DOUCE

1. EXPOSITION *IN VITRO* DES HEMOCYTES D'*ELLIPTIO COMPLANATA* AUX PSYCHOTROPES INDIVIDUELS ET EN MELANGE. 324
1.1. Introduction 324
1.2. Matériels et méthodes 324
1.3. Principaux résultats et discussion 328
1.4. Publication 1 330
2. EXPOSITION *IN VIVO* D'*ELLIPTIO COMPLANATA* AUX PSYCHOTROPES INDIVIDUELS ET EN MELANGE. 342
2.1. Introduction 342
2.2. Matériels et méthodes 343
2.3. Principaux résultats et discussion 346
2.4. Publication 2 349
3. EXPOSITION *IN VIVO* D'*ELLIPTIO COMPLANATA* AUX EAUX USEES DES STEP DE REPENTIGNY, AVANT ET APRES TRAITEMENT A L'OZONE. 362
3.1. Introduction 362
3.2. Matériels et méthodes 363
3.3. 3.3 Principaux résultats et discussion 363
3.4. Publication 3 367
4. EXPOSITION *IN VIVO* DE *CORBICULA FLUMINEA* A DES COMPOSES PHARMACEUTIQUES SEULS ET EN MELANGE AVEC DES PESTICIDES. 379
4.1. Introduction 379
4.2. Matériels et méthodes 379
4.3. Principaux résultats et discussion 381
4.4. Publication 4 384
5. CONCLUSION 396

1. Exposition *in vitro* des hémocytes d'*Elliptio complanata* aux psychotropes individuels et en mélange.

1.1. Introduction

La moule d'eau douce *Elliptio complanata* est un bivalve qui a fait l'objet de plusieurs études écotoxicologiques, aussi bien en laboratoire (Gagné et *al*., 2006 ; Martin-Diaz et *al*., 2009 ; Gust et *al*., 2012) que sur le terrain (Bouchard et *al*., 2009 ; Farcy et *al*., 2011 ; Gagné et *al*., 2011) (description **Chapitre 2. Section 7.1**). Ces différents travaux ont permis de mettre en évidence, par l'utilisation de biomarqueurs, que cette espèce de moule d'eau douce est un bon indicateur de la contamination du milieu.
En conditions naturelles, un biomarqueur peut être modulé par la pollution mais aussi par de nombreux facteurs environnementaux (température, salinité, pH, hydrodynamisme, etc…) pouvant complexifier la réponse obtenue. En revanche les études en conditions contrôlées permettent de s'affranchir de la plupart de ces facteurs et ainsi de dissocier la variabilité naturelle d'un biomarqueur de la variabilité induite pas le stress chimique.
En laboratoire, on distingue les expositions aux polluants effectuées directement sur un type cellulaire (*in vitro*), de celles réalisées sur l'organisme entier (*in vivo*).
Les tests *in vitro* sont faciles d'utilisation et reproductibles, qui utilisent généralement des expositions dites aiguës, les contaminants sont administrés pendant une courte période (de quelques heures à quelques jours) à de fortes concentrations (souvent supérieures aux concentrations environnementales). De plus ces essais permettent de tester un grand nombre de contaminants et d'évaluer leur toxicité sur plusieurs biomarqueurs afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse cellulaire. Pour finir, les tests *in vitro* peuvent être la première étape pour justifier l'application de tests *in vivo* en mésocosmes.

C'est dans cette perspective que la réponse des hémocytes de moule d'eau douce *Elliptio complanata* a été étudiée face à une contamination à des psychotropes individuels et en mélange.
Les objectifs de cette étude étaient :

- d'évaluer l'impact immunotoxique de 9 psychotropes individuellement.
- d'évaluer l'impact toxique des psychotropes en mélange sur des paramètres immunitaires.

1.2. Matériels et méthodes

Pour cela nous avons réalisé un test *in vitro* pour lequel 4 antidépresseurs (Citalopram, Venlafaxine, Paroxétine et Fluoxétine), 2 antiépileptiques (Carbamazépine et Gabapentine) et 3 antipsychotiques / neuroleptiques (Sulpiride, Amisulpride et Tiapride) ont été sélectionnés. Certains de ces composés sont retrouvés dans les effluents urbains et dans les eaux de surface, alors que d'autre n'ont jamais été détectés voire même étudiés (voir **Tableau II-3 Chapitre 2. Section 1.3**). En effet, pour certaines de ces molécules, la toxicité sur différents organismes a déjà été

examinée alors que pour d'autres, au contraire, aucune évaluation n'est disponible dans la littérature (**Tableau V-1**).

Tableau V-1. Toxicité des 9 composés étudiés (lors de l'exposition in vitro) sur des algues et des invertébrés

Composés	Espèces	Toxicité aiguë		Références
		Paramètres étudiés	Valeurs	
Citalopram (*Antidépresseur*)	Algues			
	Pseudokirchneriella subcapitata - chlorophyta (microalgue verte)	EC_{50} (48h) (biomasse)	1,6 $mg.L^{-1}$	Christensen et *al*., 2007
		EC_{50} (48h) (inibition croissance)	3,30 $mg.L^{-1}$	Minguez et *al*., 2016
	Invertébrés			
	Daphnia magma (arthropode, crustacé)	EC_{50} (48h) (biomasse)	20 $mg.L^{-1}$	Christensen et *al*., 2007
		EC_{50} (48h) (immobilisation)	30,14 $mg.L^{-1}$	Minguez et *al*., 2016
	Haliotis tuberculata (mollusque, gastéropode)	EC_{50} (48h) (activité métabo. Cell.)	32,94 $mg.L^{-1}$	Minguez et *al*., 2014
Fluoxétine (*Antidépresseur*)	Algues			
	Pseudokirchneriella subcapitata - chlorophyta (microalgue verte)	EC_{50} (120h) (croissance-turbidité)	0,24 $mg.L^{-1}$	Brooks et *al*., 2003
		EC_{50} (48h) (inibition croissance)	0,20 $mg.L^{-1}$	Minguez et *al*., 2016
	Invertébrés			
	Daphnia magma (arthropode, crustacé)	EC_{50} (48h) (survie)	0,82 $mg.L^{-1}$	Brooks et *al*., 2003
		EC_{50} (48h) (immobilisation)	5,91 $mg.L^{-1}$	Minguez et *al*., 2016
	Lampsilis fasciola (mollusque, bivalve)	EC_{50} (96h) (juvénile-métamorphose)	0,062 $mg.L^{-1}$	Hazelton et *al*., 2013
Paroxétine (*Antidépresseur*)	Algues			
	Pseudokirchneriella subcapitata - chlorophyta (microalgue verte)	EC_{50} (48h) (biomasse)	0,14 $mg.L^{-1}$	Christensen et *al*., 2007
		EC_{50} (48h) (inibition croissance)	0,63 $mg.L^{-1}$	Minguez et *al*., 2016
	Invertébrés			
	Daphnia magma (arthropode, crustacé)	EC_{50} (48h) (immobilisation)	35 $mg.L^{-1}$	Cunninghal et *al*., 2004
		EC_{50} (48h) (immobilisation)	6,24 $mg.L^{-1}$	Minguez et *al*., 2016
	Haliotis tuberculata (mollusque, gastéropode)	EC_{50} (48h) (activité métabo. Cell.)	0,12 $mg.L^{-1}$	Minguez et *al*., 2014
Venlafaxine (*Antidépresseur*)	Algues			
	Pseudokirchneriella subcapitata - chlorophyta (microalgue verte)	EC_{50} (48h) (inibition croissance)	47,6 $mg.L^{-1}$	Minguez et *al*., 2016
	Invertébrés			
	Daphnia magma (arthropode, crustacé)	EC_{50} (48h) (immobilisation)	141,3 $mg.L^{-1}$	Minguez et *al*., 2016
	Haliotis tuberculata (mollusque, gastéropode)	EC_{50} (48h) (activité métabo. Cell.)	0,12 $mg.L^{-1}$	Minguez et *al*., 2014

Composés	Espèces	Toxicité aiguë		Références
		Paramètres étudiés	Valeurs	
Carbamazépine (*Antiépileptique*)	Algues			
	Desmodesmus subspicatus (microalgue verte)	EC_{50} (inibition croissance)	74 $mg.L^{-1}$	Cleuvers, 2003
	Chlorella vulgaris (microalgue verte)	EC_{50} (48h) (croissance)	36,6 $mg.L^{-1}$	Repetto et *al*., 2003
	Invertébrés			
	Daphnia magma (arthropode, crustacé)	EC_{50} (48h) (immobilisation)	97,8 $mg.L^{-1}$	Repetto et *al*., 2003
		EC_{50} (96h) (immobilisation)	76,3 $mg.L^{-1}$	Kim et *al*., 2007
Gabapentine (*Antiépileptique*)	Algues			
	Pseudokirchneriella subcapitata - chlorophyta (microalgue verte)	EC_{50} (48h) (inibition croissance)	> 100 $mg.L^{-1}$	Minguez et *al*., 2016
	Invertébrés			
	Daphnia magma (arthropode, crustacé)	EC_{50} (48h) (immobilisation)	> 100 $mg.L^{-1}$	Minguez et *al*., 2016
Amisulpride (*Neuroleptique*)	-	-	-	-
Sulpiride (*Neuroleptique*)	-	-	-	-
Tiapride (*Neuroleptique*)	-	-	-	-

Pour l'exposition des hémocytes, nous avons suivi 2 stratégies différentes. La première s'est basée sur l'utilisation des 9 psychotropes seuls et à des concentrations allant de quelques $\mu g.L^{-1}$ (représentatives de celles retrouvées dans les effluents municipaux) à quelques $mg.L^{-1}$ (qui constituent des valeurs fortes) (**Tableau V-1**). Les deux stratégies d'exposition ont pris en compte l'effet mélange de ces composés afin d'évaluer leur possibles effets synergiques ou antagonistes. En effet, dans l'environnement, les organismes aquatiques sont exposés à de multiples contaminants pouvant entrainer différents effets entre eux. Cette prise en compte du multi stress est donc plus représentative des conditions environnementales. Pour cela, nous avons utilisé deux types de mélanges :

- un mélange 1 dit « environnemental », contenant 9 psychotropes ayant des concentrations similaires à celles que l'on peut trouver dans les effluents de STEP et dans les eaux de surface
- un mélange 2 dit « concentré », contenant 9 psychotropes ayant des concentrations de l'ordre du $mg.L^{-1}$.

Une analyse chimique par UPLC-MS/MS a permis de connaitre les concentrations de chacune des solutions stocks des composés individuels mais aussi des deux solutions mélange (**Tableau V-2**).

Tableau V-2. Gamme de concentration des composés testés individuellement et en mélange.

Composés	log Kow	Solution stock	Gamme de concentrations composés seuls				Gamme de concentrations mélange 1			Gamme de concentrations mélange 2		
		($mg.mL^{-1}$)	**0,0001X** ($mg.L^{-1}$)	**0,01X** ($mg.L^{-1}$)	**X** ($mg.L^{-1}$)	**5X** ($mg.L^{-1}$)	**0,1X** ($ng.L^{-1}$)	**X** ($ng.L^{-1}$)	**5X** ($ng.L^{-1}$)	**0,01X** ($mg.L^{-1}$)	**0,1X** ($mg.L^{-1}$)	**X** ($mg.L^{-1}$)
Citalopram	3,5	31	0,0031	0,31	31	153	8,5	85	427	0,34	3,4	34
Fluoxétine	4,1	37	0,0036	0,37	37	183	4,2	42	212	0,41	4,1	41
Paroxetine	3,6	17	0,0016	0,17	17	83	0,9	9	46	0,18	1,8	18
Venlafaxine	2,8	14	0,0014	0,14	14	68	9,1	91	450	0,15	1,5	15
Amisulpride	0,3	26	0,0026	0,26	26	130	145	1459	7745	0,29	2,9	29
Sulpiride	0,2	25	0,0025	0,25	25	127	6,6	66	331	0,28	2,8	28
Tiapride	0,5	30	0,0030	0,30	30	149	13	132	661	0,33	3,3	33
Carbamazépine	2,5	14	0,0014	0,14	14	71	141	1410	5700	0,16	1,6	16
Gabapentine	-1,3	4	0,0004	0,04	4	22	759	7586	37930	0,05	0,5	5

Chez les bivalves, le système immunitaire est inné et est constitué de processus de réponses cellulaires et humorales assurant toutes les fonctions de défenses de l'organisme (Galloway et Depledge, 2001). Le système immunitaire cellulaire est effectué uniquement par les hémocytes qui ont pour rôle majeur de phagocyter les particules étrangères (Canesi et *al*., 2002). La phagocytose est suivie par des réaction faisant intervenir des substances réactives d'oxygène ou de l'azote (composantes du système immunitaire humorale) afin de détruire les microorganismes (Toreilles et *al*., 1996; Pipe et *al*., 1997).
Les autres composantes humorales de l'immunité des bivalves sont l'activité des lysozymes, la production de lectines et/ou de cytokines et d'autre médiateurs chimiques appartenant au système neuroendocrine (Stefano et *al*., 1990; Tiscar et Mosca, 2004). Les bivalves possèdent un réseau de cytokines (interleukine-1, 2, 6 et le TNF α (Tumor Necrosis Factor α)) qui va jouer un rôle dans la coordination et la régulation des réponses immunitaires et qui est influencé par des récepteurs d'opioïde (Stefano et *al*., 1990; Lacoste, 2001). La libération d'interleukine et du TNF α pendant l'inflammation peut alors réduire l'activité de la phagocytose (Ottaviani et *al*., 1995). Le système neuroendocrine et immunitaire des bivalves seraient donc liés (Lacoste, 2001). Ainsi les substances psychoactives pourraient moduler le système immunitaire des moules d'eau douce par leur action sur des médiateurs chimiques du système neuroendocrine.

Dans ces travaux, nous avons voulu évaluer comment pourraient être modulées la viabilité cellulaire, la capacité de phagocytose et la production d'ERO par la présence de psychotropes. Les choix de ces biomarqueurs de l'immunité pourraient être considérés comme peu pertinents dans cette étude car ils ne sont pas spécifiques de la famille des psychotropes (agissant sur le système nerveux central). Cependant ce sont des biomarqueurs qui peuvent répondre à de multiples perturbations et qui de plus présentent une importance écologique car l'altération du système immunitaire peut favoriser les infections et conduire à la mort de l'individu (Paul-pont et *al*., 2010a, 2010b).

1.3. Principaux résultats et discussion

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude *in vitro* sont présentés dans le **Tableau V-3**.

Tableau V-3. Récapitulatifs des différents résultats obtenus sur les 3 biomarqueurs testés après exposition des hémocytes de moule d'eau douce à 9 psychotropes seuls et en mélange.

	Viabilté cellulaire	Activité de phagocytose	Production d'EROs
Citalopram	- ($153\ mg.L^{-1}$)	/	+ (31 et $153\ mg.L^{-1}$)
Fluoxétine	/	/	- ($183\ mg.L^{-1}$)
Paroxetine	- ($83\ mg.L^{-1}$)	- ($83\ mg.L^{-1}$)	- ($83\ mg.L^{-1}$)
Venlafaxine	/	/	+ ($68\ mg.L^{-1}$)
Amisulpride	/	/	/
Sulpiride	/	/	/
Tiapride	/	/	/
Carbamazépine	/	/	/
Gabapentine	/	/	/
Mélange 1	/	/	/
Mélange 2	- (~ $24\ mg.L^{-1}$)	- (~ $24\ mg.L^{-1}$)	+ (~ $2{,}4\ mg.L^{-1}$)

+ : il y a une induction statistiquement significative par rapport à la référence (Témoin DMSO) pour le marqueur étudié. - : il y a une répression statistiquement significative par rapport à la référence (Témoin DMSO) pour le marqueur étudié.

Sur les 9 psychotropes étudiés individuellement, seulement la Paroxétine (à $83\ mg.L^{-1}$) a inhibé la réponse des 3 biomarqueurs étudiés. La libération de cytokines en présence de Paroxétine peut expliquer la diminution de l'activité phagocytaire observée. De plus quelques études ont montré que la mitochondrie jouait un rôle important dans la production d'ERO, chez les invertébrés (Abele et *al.*, 2007 ; Donaghy et *al.*, 2012 ; Minguez et *al.*, 2014b). Elle libère des ERO lors du transfert d'électrons pour la phosphorylation oxydative et la formation d'un gradient de protons pour la formation d'ATP. Ainsi, la Paroxétine perturberait l'activité mitochondriale, ce qui expliquerait la diminution de la production d'ERO. La même hypothèse peut être formulée pour la Fluoxétine à $183\ mg.L^{-1}$.

A l'inverse, l'exposition des hémocytes de moule d'eau douce à la Venlafaxine et au Citalopram engendre une augmentation du niveau d'espèces réactives de l'oxygène. La phagocytose est suivie par la production d'ERO qui sont produits lors de la dégradation intracellulaire des particules étrangères qui ont été phagocytés (Anderson et *al.*, 1995; Wootton et Pipe, 2003). Ainsi nous pouvons supposer qu'en présence de Venlafaxine et de Citalopram, les hémocytes de

moule d'eau douce ont mis en place un mécanisme de phagocytose qui a engendré la production de ROS.
Pour finir, nous avons pu observer que le Citalopram à 153 $mg.L^{-1}$ et la Paroxétine à 83 $mg.L^{-1}$ induisaient une diminution de la viabilité des hémocytes. Ce résultat montre que ces deux molécules, aux concentrations maximales testées, sont toxiques pour les hémocytes d'*Elliptio complanata*.

Sur les 9 psychotropes étudiés individuellement, l'Amisulpride, le Sulpiride, le Tiapride, la Carbamazépine et la Gabapentine n'ont eu aucun effet sur les paramètres immunitaires testés et ce pour l'ensemble des concentrations testées. Cependant, l'étude de Gagné et *al*. (2006) montre une induction de l'activité phagocytaire lorsque les hémocytes de moules d'eau douce sont exposés à 14 $mg.L^{-1}$ de Carbamazépine pendant 24h. Donc, dans cette étude, les auteurs obtiennent une réponse avec la Carbamazépine à une concentration que nous avons testée. Nous pouvons supposer que le temps d'exposition des cellules aux contaminants peut jouer un rôle car avec 21h d'exposition nous n'avons pas eu d'effet avec la Carbamazépine. Galloway et Delpedge (2001) vont dans ce sens car ils considèrent que le temps d'exposition est un des paramètres importants pour déterminer le potentiel immunotoxique d'un contaminant. Effectivement, plusieurs études récentes utilisant des temps d'exposition plus longs que les nôtres ; 24h, 48h ou encore 96h ; ont eu des réponses immunotoxiques à des concentrations plus faibles que celles que nous avons testées (Parolini et *al*., 2010; Gust et *al*., 2012; Minguez et *al*., 2014b).
Une autre explication serait que ces 5 molécules sont très hydrophiles (log Kow inférieur à 2) et donc moins biodisponibles que les autres. Il a été montré que les effets cytotoxiques peuvent être parfois expliqués par les propriétés apolaires et la nature lipophile des composés (Cleuvers, 2003). Effectivement, les molécules qui ont modulé les réponses du système immunitaire des moules d'eau douce, sont le Citalopram, la Fluoxétine, la Paroxétine et la Venlafaxine qui ont les log Kow les plus élevés (apolaires) (**Tableau V-2**). Minguez et *al*. (2014a) constate que la toxicité aiguë du Citalopram, la Fluoxétine, la Venlafaxine et la Paroxétine, est en corrélation avec leur coefficient de partage octanol/eau élevé. Les travaux de Lacaze et *al*. (2015) sur *Mytilus Edulis* sont aussi en accord avec ces résultats.

Sur les deux mélanges testés seulement le mélange « concentré » (mélange 2) a eu un effet sur les biomarqueurs étudiés, suggérant que les concentrations environnementales du mélange 1 n'étaient pas assez élevées pour induire une réponse sur les 3 paramètres sélectionnés.
Le mélange 2 induit une diminution de la viabilité cellulaire et de la phagocytose à une concentration moyenne d'environ 24 $mg.L^{-1}$, ainsi qu'une augmentation du niveau d'ERO à une concentration moyenne d'environ 2,4 $mg.L^{-1}$.
Ces résultats montrent que les composés en mélange induisent des effets sur les hémocytes *d'Elliptio complanata* à des concentrations plus faibles que lorsqu'ils sont utilisés seuls. En effet, il existe un facteur 3 entre les concentrations testées en individuel et celles testées en mélange, pour lesquelles une réponse de la phagocytose a été observées. De même, il est mis en évidence un facteur 35 entre les concentrations testées en individuel et celles testées en mélange, qui ont induit un effet sur la production d'ERO.
Ces résultats prouvent qu'en mélange les psychotropes vont être plus toxiques qu'individuellement, on parle alors d'effet mélange ou d'effet synergique (Cleuvers, 2003 ; Quinn

et *al*, 2009 ; Farcy et *al*., 2011). Effectivement, Cleuvers (2004) observe qu'en mélange, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens ont une toxicité plus importantes chez *Daphnia magna* que lorsqu'ils sont testés individuellement.
Ainsi cette interaction chimique entre les composés peut produire une activité biologique et/ou toxique plus intense sur les hémocytes exposées.

Pour conclure, ce travail montre que les paramètres immunitaires utilisés peuvent être modulés par la présence de psychotropes par l'intermédiaire de médiateurs chimiques ou d'autres mécanismes (cytokines, stess oxydatifs, etc…). Même si les réponses du système immunitaire face à ces contaminants sont complexes, nous avons pu observer qu'il était impacté lors d'un stress chimique et encore plus quand les composés étaient en mélange. Ceci suggère que dans l'environnement, où le mélange des contaminants est plus complexe, avec la présence de plusieurs familles thérapeutiques (comme dans les effluents de STEP) et même plusieurs familles de polluants (PCB, HAP, pesticides, etc…), les effets toxiques sur le système immunitaire des bivalves pourraient être plus impactant et avoir lieu à de plus faible niveaux de concentrations.

1.4. Publication 1

Immunotoxic effect of 9 psychoactive substances alone and combined on freshwater mussel (*Elliptio complanata*) hemocytes.

Authors: J. Pédelucq [a, b], E. Lacaze [a], M. Fortier [a], P. Gonzalez [c], H. Bijoux [b], A. Gougeard [a], P. Mazellier [b], H. Budzinski [b], M. Fournier [a]

[a] Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier (INRS-IAF), 31 Des Prairies Blvd., Laval, Quebec, Canada H7V 1B7
[b] Université de Bordeaux, EPOC-LPTC, UMR 5805, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France.
[c] Universitéd de Bordeaux, EPOC-EA, UMR CNRS 5805, Place du Dr B. Peyneau, 33120 Arcachon, France

Abstract

The psychotropic compounds are more and more prescribed and are found in the aquatic environment. This is why some studies have investigated the toxic potential upon aquatic organisms. This paper aims at investigating the immunotoxic effects of 9 psychotropic compounds (carbamazepine and gabapentin, amisulpride, sulpiride and tiapride, citalopram, fluoxetine, paroxetine and venlafaxine) alone and combined on freshwater mussel (*Elliptio complanata*) hemocytes. Individually, only paroxetine at maximum concentration tested (83 $mg.L^{-1}$) modulated the three immune parameters studied (cell viability, phagocytosis and production of Reactive Oxygen Species). Nevertheless, in mixture, all the 9 psychotropic compounds induced immunotoxic effects on the freshwater mussel hemocytes at lower concentrations than those tested individually, suggesting sunergistic or additive effects. Thus the chemical interactions between the compounds can produce a biological or toxic activity most intense on exposed hemocytes.

Keyword : immunotoxicity; hemocytes; psychoactive substances, mixture of contaminants; Elliptio complanata.

1. Introduction

Pharmaceuticals compounds are emerging contaminants (Daughton and Ternes, 1999) which are found in the environment at different levels of concentration from $ng.L^{-1}$ to $\mu g.L^{-1}$ (Sacher et *al*., 2001; Hernando et *al*., 2004; Togola and Budzinski, 2008; Santos et *al*., 2010). The main source of pharmaceuticals in the environment is the municipal and hospital wastewater effluent. The compounds are continuously introduced in the sewage water and finally in the surface water because the treatments used are inefficient for the elimination of this pollutant group (Petrović et *al.*, 2003; Ternes, 1998). Consequently a wide spectrum of compounds belonging to several therapeutic families with different physico-chemical characteristics were detected in

aqueous compartments (Devier et *al*., 2013; Peysson and Vulliet, 2013; Ferrer and Thurman, 2012; Petrović et *al*., 2014).

Psychoactive substances belong to the most prescribed therapeutic groups. Their presence in the aquatic environment has been evidenced (Lajeunesse et al. 2008; Giebultowicz et *al*., 2014) and recent studies evaluated their potential toxicity on the aquatic organisms (Gagné et *al*., 2006; Boxall et *al*., 2012; Minguez et *al*., 2016).

Aquatic organisms are important targets as they are continuously exposed to mixture of contaminants in which synergistic effects between compounds may occur (Cleuvers, 2003; Quinn et *al*., 2009).

However, only few studies have been conducted to determinate the effect of pharmaceuticals used individually or mixed on the immune parameters of bivalves or other invertebrates (Gagné et *al*. 2006; Canesi et *al*., 2007; Gust et *al*., 2012; Gust et *al*., 2013).

In bivalve, the immune system is innate (Mydlarz et *al*., 2006) and is composed of cellular and humoral components consisting of cells and molecules circulating in the hemolymph. The cellular immune system is performed only by hemocytes which are circulating cells providing functions of defense, transport and nutrients digestion. The main function of hemocytes is devoted to phagocytosis of foreign particles (Canesi et *al*., 2002). This reaction is follow by the production of oxygen or nitrogen reactive substances involved in the destruction of microorganisms (Toreilles et *al*., 1996; Pipe et *al*., 1997). The humoral components of mussel immunity comprise lysozyme activity, lectin/cytokine production and other chemical mediators (Stefano et *al*., 1990; Tiscar and Mosca, 2004). The cytokine network (interleukin-1, 2, 6 and tumor necrosis factor α) plays a role in the coordination and regulation of the immune response and is influenced by the opiate receptors (Stefano et *al*., 1990; Lacoste, 2001). The activation of opiate receptors in mussel hemocytes by morphine reduces phagocytic activity, through the release of nitric oxide by neural ganglia (Stefano et *al*., 1993; Stefano et *al*., 2004; Gagné et *al*., 2006). The release of interleukins or tumor necrosis factor α (TNF-α) during inflammation could also reduce phagocytic activity and cell motility (Ottaviani et *al*., 1995). The cellular and humoral immune systems in mussels are efficient in controlling infections but are susceptible to disruption from various environmental stressors.

The aim of the present work was to evaluate immunotoxic effects of different psychoactive substances alone and in mixture on freshwater mussel (*Elliptio complanata*) hemocytes and at different concentration ranges. Nine compounds were selected: 2 antiepileptics (carbamazepine and gabapentin), 3 antipsychotics (Amisulpride, Sulpiride and Tiapride) and 4 antidepressants (citalopram, fluoxetine, paroxetine and venlafaxine).

Immunotoxicity of these compounds was investigated following the hemocyte viability, the phagocytosis activity and the production of ROS.

2. Materials and Methods

2.1 Mussel collection and maintenance

Mussels were collected by hand in June 2013 in the Ecorce Lake (Mont Laurier, Québec, Canada), which is not subjected to any sources of pollution. The animals were maintained in aquarium with oxygenated freshwater at 15°C, with a 12 h-light/ 12 h-dark cycle. Mussels were fed

three times weeks with phytoplankton concentrates (Phytoplex®, Kent Marine, Franklin, WI, USA).

2.2 Pharmaceuticals solutions

All pharmaceuticals were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). The psychotropic compounds selected (amisulpride, carbamazepine, citalopram, fluoxetine, gabapentin, paroxetine, sulpiride, tiapride, venlafaxine) were tested both individually and as a mixture. The minimum concentrations tested for the individual compounds were some $\mu g.L^{-1}$ and they were in accordance with the concentrations of the municipal effluent reported in the literature. The maximum concentrations tested were greater than $mg.L^{-1}$ in an attempt to have an effect of these compounds on the freshwater mussel cells.

All drugs were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The concentration of DMSO in the samples never exceeded 0.5%. Prior to this study, dose-response tests were made with DMSO on hemolymph of freshwater mussel and no effect was observed at 0.5%. Thus this concentration was used for the solvent control. Concentrations of pharmaceuticals ranged from µg/L to mg/L. The very highest concentration tested potentially resulted in cytotoxicity, according to solubility limits.

For all exposure, a stock solution of each compound was prepared in DMSO which was stored at -20°C.

2.3 Hemolymph collection and exposure experiment

Hemolymph was collected individually from the posterior adductor muscle using a sterile syringe with a 23G needle.

Viability was evaluated mixing 4 µL of a 100 µg/mL of propidium iodide (PI) solution (Sigma-Aldrich) to 500 µL of hemolymph. The viability of hemocyte and their concentration in hemolymph (cellularity) were determined by FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) equipped with a 488 nm argon laser. For each sample 5 000 events were acquired at a fluorescence emission of 620 nm (FL3). The hemocyte population was electronically gated in a FSC/SSC dot plot and the fluorescence frequency distribution histogram was obtained using FL3. The percentage of dead hemocyte was determined using a marker, the propidium iodide (PI). Results were analyzed with the CellQuest Pro software (Version 4.0.1, Becton Dickinson). The viability was determined in percentage of viable cell and cellularity in number of hemocyte by mL.

Hemolymph samples with cell viability > 80 % were used and they were diluted to obtain 200 000 hemocytes per mL with PBS (phosphate buffered saline) pre-diluted in water (PBS ¼). Six mussels per compounds and mixture of compounds were used. The hemolymph of each mussel is used to test the control, solvent control and the concentration range selected.

For the exposure, stock solutions of drugs were diluted several times in PBS ¼. 25 µL of each diluted solutions was added to 475 µL of cells to obtain the final concentration chosen. Compounds were tested individually and diluted but mixtures have also been made to mimic environmental conditions (Mixture 1) and highly concentrated conditions (Mixture 2) (Table 2 and 3)

After the addition of psychotropic solutions, the exposure lasted 21 hours at 15°C in the dark under gentle agitation.

For phagocytosis, hemolymphe was mixed with green-yellow latex Fluoresbrite® Carboxylate microspheres with a 1.6 µm diameter were added (Polysciences,Inc., Warrington, PA, USA) at a hemocyte-to-bead ratio 1:100 after to 3 h of exposure. The suspensions were re-incubated for 18 hours.

2.4 Chemical analysis

Each stock solution of compounds alone and in mixture was analyzed to quantify the exposure concentration of freshwater hemocytes.

The analytical procedure was adapted from Togola and Budzinski, 2008 and Devier et *al*., 2013. Briefly, each stock solution was analyzed using a Waters UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) Acquity coupled to Waters Quattro Premier XE triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Saint Quentin en Yvelines, France), equipped with a electrospray ionization (ESI). The chromatographic separation was achieved with a Kinetex C18 column (100 × 2.1 mm; 1.7µm) in 17 min. Identification of each compound was ensured through the monitoring of two transitions (Table 1). The ion ratio was used as a confirmation criterion.

Instrumental blank were performed for each sample in order to prevent any contamination. The instrumental method was validated through estimation of linearity, repeatability and sensitivity. Method Detection Limits (MDLs) of the compounds studied was ranged from 0.02 ng.L^{-1} to 1.1 ng.L^{-1}.

Table 1: MS/MS parameters for the analysis of the compounds studied.

Thérapeutic classes	Compounds	log Kow	Precursor ion (*m/z*)	Product ion I			Product ion II		
				Quantification trace (*m/z*)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Confirmation trace (*m/z*)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Antidepressants	Venlafaxine	2.8	278.2	58.3	20	18	260.67	20	13
	Citalopram	3.5	325.2	109.0	35	20	262.21	35	20
	Paroxetine	3.6	330.1	70.4	40	30	44.47	40	25
	Fluoxetine	4.1	310.2	44.4	20	12	148.01	25	14
Antipsychotics	Sulpiride	0.2	342.1	112.1	40	25	58.33	40	28
-	Tiapride	0.5	329.1	256.1	30	22	213.08	30	35
Neuroleptics	Amisulpride	0.3	370.4	242.1	40	25	195.98	40	42
Antiepileptics	Gabapentin	-1.3	172.1	154.1	20	15	137.24	20	15
	Carbamazepine	2.5	237.2	194.1	25	20	179.06	25	35

2.5 Phagocytosis assay

Immediately after the exposure, the viability was evaluated. After viability assessment phagocytosis was measured according to a flow cytometry method developed for bivalve hemocytes (Brousseau et *al*. 2000). Briefly, after the 21 h exposure, the free beads were removed from the cells by centrifugation on a 3% bovine serum albumin (BSA) gradient in RPMI-1640 medium (150xg for 8 min at 4°C). The cell pellets were re-suspended in 0.5 mL fixation solution containing 0.5% formaldehyde and 0.2% sodium azide (in diluted in PBS ¼).

Acquisitions were performed with a FACSCalibur flow cytometer. Cells were first gated by size and granularity from the surrounding cell debris or aggregates. For each sample, the fluorescence emission of 5 000 events was acquired and collected at 530 nm (FL1). The data were analyzed using the green fluorescence frequency distribution histogram of hemocyte population. Results were analyzed with the CellQuest Pro software to determinate the percentage of hemo-

cytes having engulfed one or more fluorescent beads (immunocapacity) and three or more fluorescent beads (immunoefficiency).

2.6 Intracellular production of ROS

The level of H_2O_2 in hemocytes was determined using the fluorescent substance H_2DCFDA (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate) and the method according to Brousseau et *al*. 1998. After contaminants exposure, hemocytes suspensions were centrifuged. Then the pellets were re-suspended and incubated in 0.4 mL of PBS ¼ with 0.1 % glucose and 0.01 $g.mL^{-1}$ of H_2DCFDA probe during 3 h in the dark at 15°C.

The concentration of ROS was determined by FACSCalibur flow cytometer in FL1 at 495 nm excitation and 525 nm emission. Results were analyzed with the CellQuest Pro software and expressed as the percentage difference from the value of the control cells.

2.7 Statistical analysis

The data were expressed as mean ± standard deviation (N= 6, 2 replicates of 3 mussels). Statistical analysis was carried out using the Prism® version 5.03 software (GraphPad Software, Inc.). A Kruskal-Wallis ANOVA test and non-parametric Mann Whitney U-test were performed to identify groups that differed significantly from solvent control. Significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Concentration of stock solution

The chemical analyzes of the stock solutions are presented in the Table 2 and Table 3.

The concentrations ranges of the nine psychoactive substances tested individually on the freshwater mussel hemocytes were expressed in $mg.L^{-1}$ (Table 2). The concentrations analyzed are included between 0.00043 $mg.L^{-1}$ (0.0001X of gabapentin) and 183 $mg.L^{-1}$ (5X of fluoxetine).

The concentration ranges of the nine compounds in the Mixture 1 and Mixture 2 were expressed in $ng.L^{-1}$ and $mg.L^{-1}$, respectively (Table 3). The concentrations of molecules in Mixture 1 are included between 1 $ng.L^{-1}$ (0.1X of paroxetine) and 37 930 $ng.L^{-1}$ (5X of gabapentin). The concentrations of molecules in Mixture 2 are included between 0.048 $mg.L^{-1}$ (0.01X of gabapentin) and 41 $mg.L^{-1}$ (X of fluoxetine).

Table 2: Concentration range ($mg.L^{-1}$) of the nine psychoactive substances tested individually on freshwater mussel hemocytes.

Compounds	Stock solution ($mg.mL^{-1}$)	0.0001X ($mg.L^{-1}$)	0.01X ($mg.L^{-1}$)	X ($mg.L^{-1}$)	5X ($mg.L^{-1}$)
Citalopram	31	0.0031	0.305	31	153
Fluoxetine	37	0.0036	0.365	37	183
Paroxetine	17	0.0016	0.165	17	83
Venlafaxine	14	0.0014	0.136	14	68
Amisulpride	26	0.0026	0.26	26	130
Sulpiride	25	0.0025	0.254	25	127
Tiapride	30	0.003	0.297	30	149
Carbamazepine	14	0.0014	0.141	14	71
Gabapentin	4	0.00043	0.043	4	22

Table 3: Concentration range of the nine psychoactive substance tested in mixture on *Elliptio complanata* hemocytes.

	Mixture 1			Mixture 2		
Compounds	0.1X ($ng.L^{-1}$)	X ($ng.L^{-1}$)	5X ($ng.L^{-1}$)	0.01X ($mg.L^{-1}$)	0.1X ($mg.L^{-1}$)	X ($mg.L^{-1}$)
Citalopram	8.5	85	427	0.34	3.4	34
Fluoxetine	4.2	42	212	0.41	4.1	41
Paroxetine	0.9	9	46	0.18	1.8	18
Venlafaxine	9.1	91	450	0.15	1.5	15
Amisulpride	145	1459	7745	0.29	2.9	29
Sulpiride	6.6	66	331	0.28	2.8	28
Tiapride	13	132	661	0.33	3.3	33
Carbamazepine	141	1410	5700	0.16	1.6	16
Gabapentin	759	7586	37930	0.05	0.5	5

3.2 Comparison of the effect of psychotropic used alone

Viability

Cell viability was tested before and after the exposure to psychotropic compounds. The freshwater mussels selected for the *in vitro* tests have initial hemocyte viability greater than 80 %.

After 21 h of exposure, seven compounds tested did not induce cytotoxic effects on the cell viability, as shown in Figure 1.

Only citalopram and paroxetine at the highest concentration (5X: 153 and 83 $mg.L^{-1}$ respectively) lead to a significant decreased of hemocytes viability of 32% for citalopram and 55% for paroxetine.

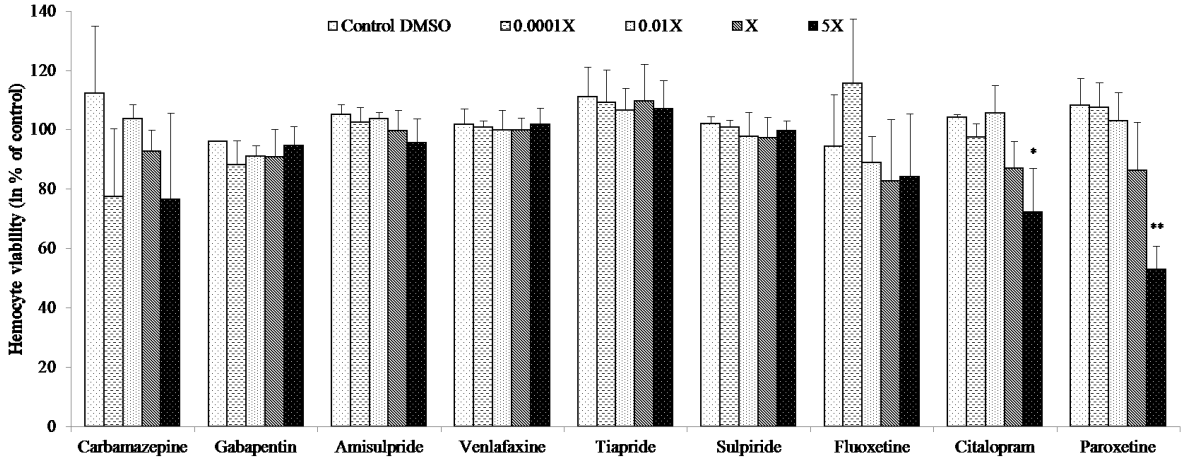


Fig. 1: Hemocytes viability of freshwater mussel exposed to individual compounds (mean value and standard deviation). Asterisks (*) indicate significant difference from solvent control DMSO (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$).

Phagocytosis

Immunoefficiency (hemocytes having engulfed three beads or more) of all compounds studied alone was represented in the Figure 2. Among the 9 compounds tested only paroxetine at the highest concentration (83 mg.L^{-1}) had a significant effect on the phagocytic activity of the *Elliptio complanata* hemocytes.

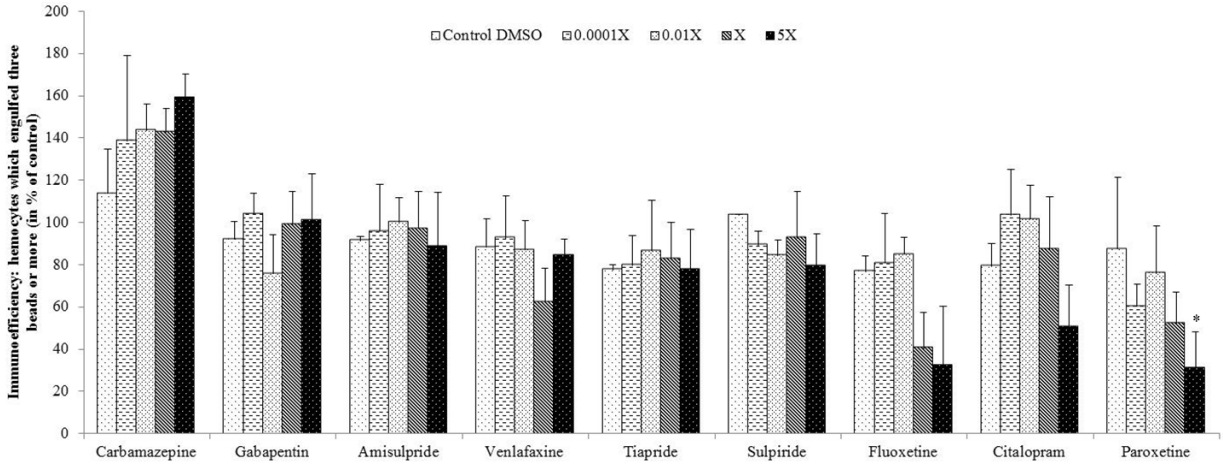


Fig. 2: Phagocytosis efficiency of *Elliptio complanata* exposed to individual compounds (mean value and standard deviation). Asterisks (*) indicate significant difference from solvent control DMSO (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$).

ROS level

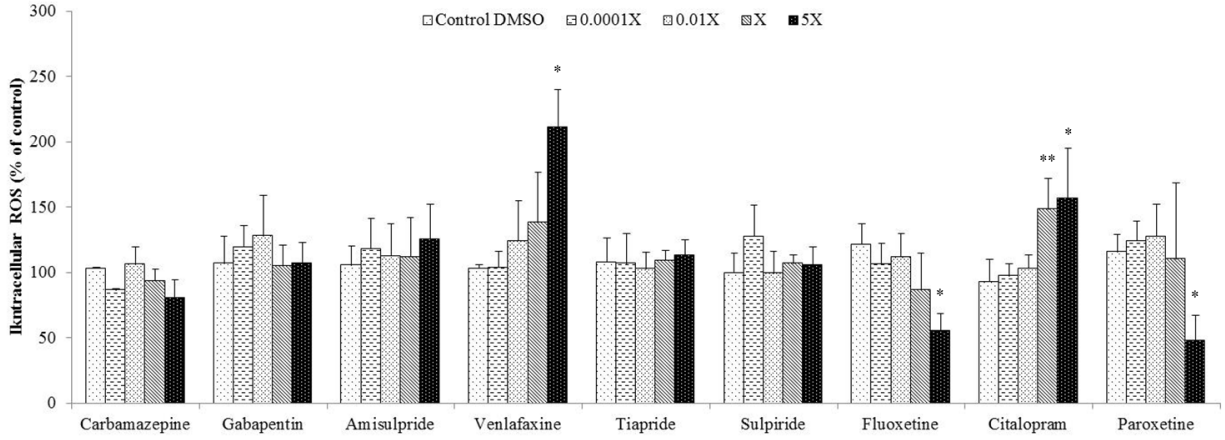


Fig. 3: Variation in ROS level in hemocytes of freshwater mussel exposed to individual compounds (mean value and standard deviation). Asterisks (*) indicate significant difference from solvent control DMSO (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$).

Intracellular ROS levels in freshwater mussel hemocytes were represented in the Figure 3. Four compounds only seemed to induce significant variation of the ROS levels in the comparison to the control DMSO. Two of them triggered a decrease of the ROS production: fluoxetine at 183 $mg.L^{-1}$ and paroxetine at 153 $mg.L^{-1}$. On the other hand, the two others induced an increase of the ROS level: venlafaxine at 68 $mg.L^{-1}$ and citalopram at 31 and 153 $mg.L^{-1}$.

3.3 Effect of psychotropic compounds in mixture

Two kinds of mixtures were tested in this study, the first (Mixture 1) is representative of concentrations that can be detected in the municipal effluent and in the environment. The second (Mixture 2) is form by high concentrations to test the effects of acute exposure.

No effects were observed on *Elliptio complanata* hemocytes exposed to Mixture 1 (Fig. 4: A, C and E).

Nevertheless for Mixture 2 at the highest concentration (X: 218 $mg.L^{-1}$) a significant decrease of 66% of hemocytes viability was observed (Fig. 4B). Moreover, at the same concentration a reduction of 42% was evidence on the immoefficiency of freshwater mussel hemocytes (Fig. 4D).

Mixture 2 lead also to a significant increase of 533% of ROS level on hemocytes exposed to the concentration 0.1X (1087 $ng.L^{-1}$) (Fig 4F).

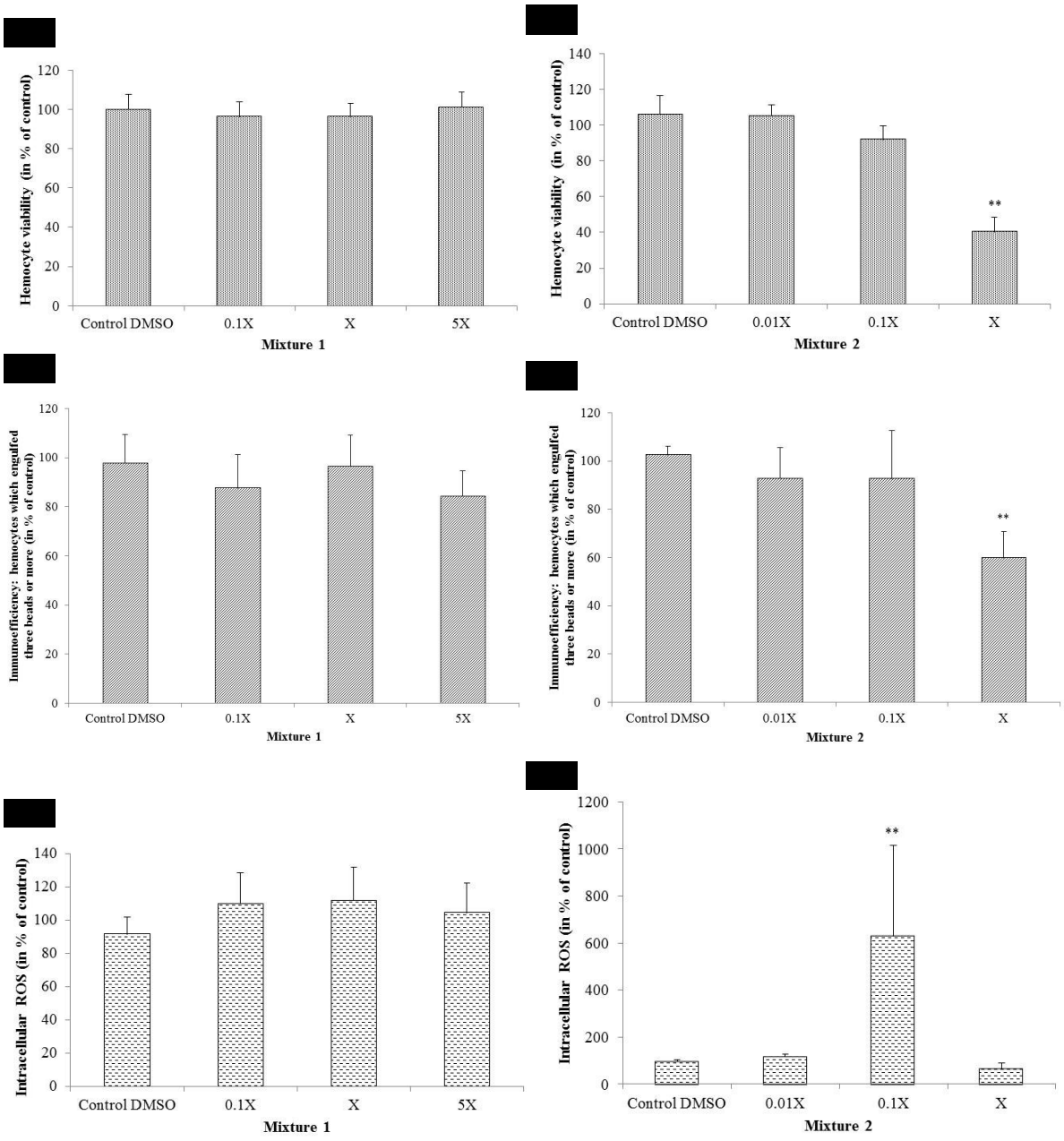


Fig. 4: Effect of psychotropic in mixture on the different immune parameters: (A and B) hemocyte viability, (C and D) phagocytosis efficiency, (E and F) intracellular ROS. Asterisks (*) indicate significant difference from solvent control DMSO (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$).

4. Discussion

The main goal of the *in vitro* assays is to provide the primary effect of contaminants and information concerning their toxicity. Thus in this study, we wanted to identified the effect of 9 selected psychoactive substances (amisulpride, carbamazepine, citalopram, fluoxetine,

gabapentin, paroxetine, sulpiride, tiapride, venlafaxine) alone and in mixture on the *Elliptio complanata* hemocytes.

Among the compounds tested individually, only paroxetine decreases significantly the viability of hemocytes, the phagocytic activity and the ROS level at the concentration of 83 $mg.L^{-1}$.

The decrease of phagocytic activity can be explained by the release of cytokine during inflammation (Ottaviani et *al*., 1993; Gagné et *al*., 2006). Likewise, the reduction of the ROS level suggested putative disturbance of the mitochondrial activity (Minguez et *al*., 2014b). Indeed, mitochondria play an important role in ROS production in invertebrates (Abele et *al*., 2007; Donaghy et *al*., 2012) because release ROS during electron transfer for oxidative phosphorylation and the formation of proton gradient for ATP production. This decrease of ROS production, in the hemocytes exposed to paroxetine, could probably be correlated to a decrease of mitochondria metabolism. The same phenomenon is observed with fluoxetine at 183 $mg.L^{-1}$.

Conversely, exposure of freshwater mussel hemocytes to venlafaxine and citalopram increased levels of reactive oxygen species. Generally, phagocytosis is followed by the production of ROS, which are produced at the intracellular degradation of foreign particles phagocytosed (Anderson et *al*., 1995; Pipe and Wootton, 2003). Thus, in the presence of venlafaxine and citalopram, freshwater mussel hemocytes have set up a phagocytosis mechanism that generated ROS production.

Finally, we observed that citalopram to 153 mg L^{-1} and paroxetine 83 mg L^{-1} induced a decrease in viability of hemocytes. This result shows that these two molecules, the maximum concentrations tested are toxic to E*lliptio complanata* hemocytes.

However, Gagné et *al*. (2006) showed an induction of the phagocytic activity when freshwater mussels hemocytes are exposed to 14 $mg.L^{-1}$ of carbamazepine during 24h. The authors then get a response with carbamazepine concentration for which we have no effect. We can assume that the duration of exposure of cells to contaminants play a role because with 21h exposure we have had no response. Galloway and Delpedge (2001) consider that the duration, concentration and the route of exposure are important parameters to determine the potential immunotoxic of a contaminant. Indeed several recent studies using longer exposure times than ours; 24, 48 or 96 hours; had immunotoxic responses at lower concentrations than those we tested (Parolini et *al*, 2010; Gust et *al*, 2012;. Minguez et *al*, 2014b).

Another explanation is the hydrophilic nature of these 5 compounds (log Kow < 2) (Table 2), therefore they are less bioavailable than others psychotropic drugs studied. It has been shown that the cytotoxic effects have sometimes been explained by the apolar properties and lipophilic nature of these compounds (Cleuvers, 2003). Indeed, citalopram, fluoxetine, paroxetine and venlafaxine which have the highest log Kow (nonpolar), modulated the immune system responses of freshwater mussels. Minguez et *al*. (2014a) finds that the acute toxicity of citalopram, fluoxetine, venlafaxine and paroxetine, was correlated with their high octanol-water partition coefficient. The works of Lacaze et *al*. (2015) on *Mytilus edulis* are also in agreement with these results.

On both mixtures tested, only Mixture 2 induces an effect in cellular viability, phagocytosis and ROS level. The environmental concentrations of Mixture 1 were not high enough to induce a response on the 3 biomarkers studied or the exposure time was not long enough.
Mixture 2 induces a decrease in cellular viability and in phagocytosis at a mean concentration of 24 $mg.L^{-1}$ and an increase of ROS level at a mean concentration of 2.4 $mg.L^{-1}$. Therefore, the compounds in mixture will induce a more intense impact on the *Elliptio complanata* hemocytes at lower concentrations than compounds alone. We can observe a factor of 3 between the concentrations used for the compounds alone and in mixture which generate effects in cellular viability and phagocytic activity of hemocytes and a factor of 35 for the ROS level.
These results prove that psychotropic compounds in mixture will be more toxic than the psychotropic substances individual; this is called mixture effect or synergistic effect (Cleuvers et *al*., 2003; Quinn et *al*., 2009; Farcy et *al*, 2011). Indeed, Cleuvers (2004) observed that non-steroidal anti-inflammatory drugs mixture had a higher toxicity to *Daphnia magna* as when tested individually. Thus this chemical interaction between the compounds can produce a biological or toxic activity most intense on exposed hemocytes.

The results confirm that in bivalves the immune function can represent a significant target for the action of psychoactive substances.

5. Conclusion

This work shows for the first time the *in vitro* immunotoxic response of 9 psychotropic drugs alone and in mixture on *Elliptio complanata* hemocytes. The immune parameters can be modulated by the presence of psychotropic compounds with the intermediary of chemical mediators or other mechanisms (cytokines, oxidative stress…). The responses of the immune system in these contaminants are complex and even more when they are in mixture. The psychoactive substance mixture have a stronger effect than alone, leaving understand what is happening in the environment where the mixtures are more complex and with lower concentrations.

Acknowledgments

This work is a contribution to the Canada Research Chair in Environmental immunotoxicology. The authors are grateful to Robert Vaillancourt and Jean-Christophe Boussin for their assistance in animal care in Biodôme of Montréal.

2. Exposition *in vivo* d'*Elliptio complanata* aux psychotropes individuels et en mélange.

2.1. Introduction

L'expérience de contamination *in vitro* (**Chapitre 5. Section 1**) a confirmé que les psychotropes testés pouvaient moduler les biomarqueurs de l'immunité étudiés sur les hémocytes de moule d'eau douce. Cependant les concentrations utilisées qui se sont révélées efficaces sur ses paramètres, sont beaucoup plus élevées que celles retrouvées dans l'environnement. Donc, les conditions expérimentales réalisées *in vitro* sont assez éloignées de la réalité. C'est pourquoi, cette deuxième expérience a été mise en place pour évaluer le potentiel immunotoxique et génotoxique, des mêmes psychotropes, mais à des concentrations environnementales et à l'échelle de l'individu.

L'objectif de cette deuxième étude était alors :

- d'évaluer l'impact des psychotropes seuls et en mélange sur l'organisme entier après une période d'exposition de 21 jours.
- de continuer à approfondir nos connaissances sur les réponses d'*Elliptio complanata* face à une contamination aux psychotropes.

2.2. Matériels et méthodes

Pour cette étude, 10 conditions ont été testées et sont présentées ci-dessous (**Figure V-1**).

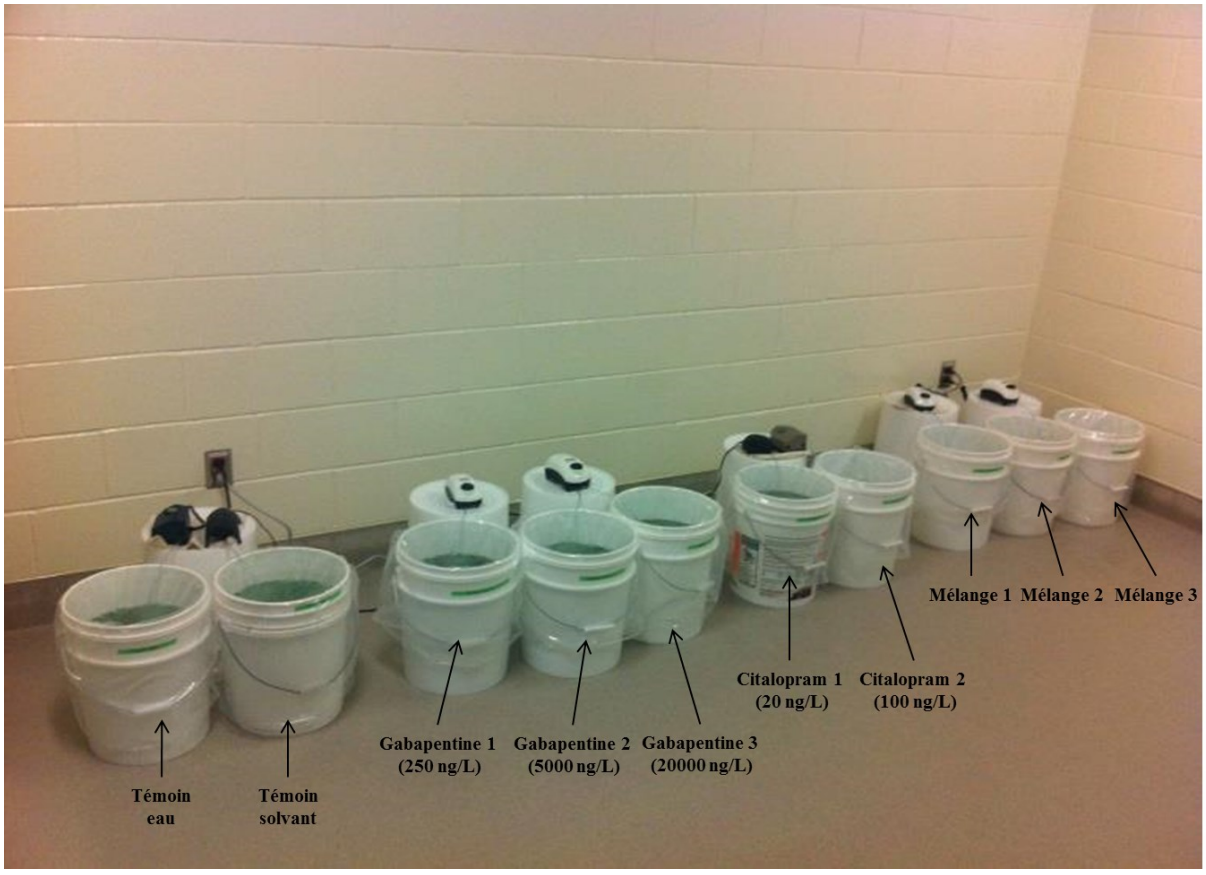


Figure V-1. Présentation des 10 conditions testées lors de l'exposition *in vivo* avec des psychotropes individuels et en mélange.

Chaque unité expérimentale contient 15 L d'eau douce et 12 moules qui n'ont pas été nourries lors des 21 jours d'exposition, ni lors de la semaine d'acclimatation. L'eau de chaque unité est contaminée tous les 3 jours lors du renouvellement d'eau. La température de l'eau a été maintenue à 15°C et la pièce était éclairée selon une alternance lumière/obscurité de 12h/12h.

Pour ces travaux seulement la Gabapentine et le Citalopram ont été testés individuellement car ce sont des molécules qui ont été peu ou pas étudiées sur les invertébrés (Minguez et *al*., 2014b ; Di Poi et *al*., 2016) et qui n'ont jamais été étudiées sur la moule d'eau douce. De plus, la Gabapentine et le Citalopram sont des composés retrouvés dans les eaux de surface et dans les STEP à des concentrations non négligeables (de la centaine de $ng.L^{-1}$ au $\mu g.L^{-1}$) (**Chapitre 3** et **Chapitre 4**).
Pour les conditions mélanges, les 9 composés testés sont les mêmes que ceux pour l'étude *in vitro*. Les concentrations qui ont été choisies pour cette étude correspondent à celles qui peuvent être trouvées dans l'environnement, dans les sorties et les entrées de STEP.
Les valeurs des concentrations testées sont présentées dans le **Tableau V-4**.

Tableau V-4. Concentrations en ng.L-1 des psychotropes placés dans les différentes conditions.

Composés	Concentrations dans les unités expérimentales (ng.L^{-1})							
	Citalopram 1	Citalopram 2	Gabapentine 1	Gabapentine 2	Gabapentine 3	Mélange 1	Mélange 2	Mélange 3
Citalopram	20	100	-	-	-	20	100	500
Gabapentine	-	-	250	5000	20000	250	5000	25000
Carbamazépine	-	-	-	-	-	50	1000	5000
Fluoxétine	-	-	-	-	-	5	20	100
Paroxétine	-	-	-	-	-	5	10	50
Venlafaxine	-	-	-	-	-	10	100	500
Sulpiride	-	-	-	-	-	10	50	250
Tiapride	-	-	-	-	-	5	50	250
Amisulpride	-	-	-	-	-	30	1000	5000

Après une exposition de 21 jours, les moules ont été retirées des unités expérimentales pour en prélever l'hémolymphe dans le muscle adducteur postérieur et ont ensuite été disséquées, le jour même, sur glace afin d'isoler la gonade. L'hémolymphe a été utilisée pour mesurer la concentration d'hémocytes et leur viabilité, la phagocytose, la production de NO (activité cytotoxique et inflammation) l'activité de la cyclooxygénase (inflammation) et les dommages à l'ADN (activité génotoxique).
La gonade a été prise pour sexer chaque individu, mesurer la quantité de sérotonine et de vitellogénine (activité reproductrice) mais aussi l'activité de la cyclooxygénase (inflammation).
Pour finir, l'indice gonado-somatique (IGS) ((masse de la gonade / masse totale de tissus) *100) et l'indice de condition (IC) (masse totale individu / longueur coquille) sont mesurés sur tous les individus qui ont été utilisés pour les analyses.

Lors de cette expérience *in vivo*, des suspicions de ponte (présence de filaments blanchâtre sur certaines coquilles) ont été faite dans certains bacs, c'est pourquoi des biomarqueurs de reproduction ont été analysés sur les gonades :

-mesure de la production de vitellogénine qui est une glycolipophosphoprotéine produite au niveau du foie, sécrétée dans la circulation sanguine et transportée jusqu'au ovaire où elle s'accumule dans les ovocytes en croissance.

-mesure de la production de sérotonine qui est un neurotransmetteur qui va transmettre l'influx nerveux entre les neurones. La sérotonine a un rôle proche de celui des hormones, elle agit sur le système nerveux central et induit différentes actions comme la régulation de certains comportements (l'humeur ou l'émotivité). Elle agit aussi sur le sommeil, les troubles sexuels, les troubles alimentaire, l'agressivité, etc…

- *Mesure de la production de vitellogénine*

Le niveau de vitellogénine est déterminée à partir d'une fraction S15 de l'homogénat de gonade (centrifugation à 15 000g pendant 20 min à 4°C) par la méthode indirecte des phosphates labiles en milieu alcalin (ALP) (Blaise et *al*., 1999) avec quelques modifications. Brièvement, un aliquot de la fraction S15 est mélangé à de l'acétone froid (35%) afin de précipiter les protéines de haut poids moléculaire. Après incubation du mélange pendant 10 min dans la glace et centrifugation à 10 000g pendant 5 min à 4°C, les protéines sont concentrées dans le culot. Celui-ci est ensuite homogénéisé dans 50 µL de NaOH à 1M et chauffé à 60°C pendant 30 min. Les niveaux de phosphates alkali-labile dans l'homogénat sont alors déterminés en utilisant la mé-

thode colorimétrique du phosphomolybdenum (Stanton, 1968) et par la lecture en spectrophotomètre Spectra Max M5 de microplaque à 815 nm et 440 nm. Du potassium de phosphate est utilisé comme standard et les valeurs de ALP total obtenues sont exprimées en µg de phosphate/mg de protéine.

- *Mesure de la production de sérotonine*

Les mesures de la production de sérotonine sur les moules d'eau douce ont été réalisées par Marc Fraser, doctorant à l'institut Armand-Frappier dans le laboratoire de grossesse et toxicologie de Cathy Vaillancourt (Laval, Québec, Canada).

Le niveau de sérotonine est déterminé à partir de la fraction S15 de l'homogénat de gonade et à l'aide de la méthode B du kit « Serotonin ELISA » (IBL International, Hambourg, Allemagne) selon les instructions du fournisseur. Brièvement, dans un tube 50 µL de la fraction S15 sont mélangés avec 100 µL de tampon d'essai et 25 µL du réactif d'acylation provenant du kit. Après une incubation à 37°C au bain marie pendant 15 min, 1 mL de tampon d'essai est ajouté dans chaque tube puis centrifugé à 1500 g pendant 10 min. Dans une microplaque ELISA dans chaque puit sont déposés 50 µL de surnageant de chaque échantillon, 50 µL de Biotine Sérotonine et 50 µL d'Antisérum Sérotonine et incubées pendant 16-20h à 2-8°C. Après les différents lavages et incubations traités selon les instructions du fabricant, les niveaux de sérotonine dans chaque puits sont mesurés par un spectrophotomètre (Spectra Max M5) à 405 nm. La production de sérotonine est déterminée en comparant les valeurs des échantillons avec une courbe standard contenant des quantités croissantes de sérotonine. Pour finir les données sont exprimées en nmol de sérotonine/mg de protéine.

Pour finir, le sexage de chaque individu a été déterminé par des frottis de gonade qui ont été lus en microscopie (**Figure V-2**).

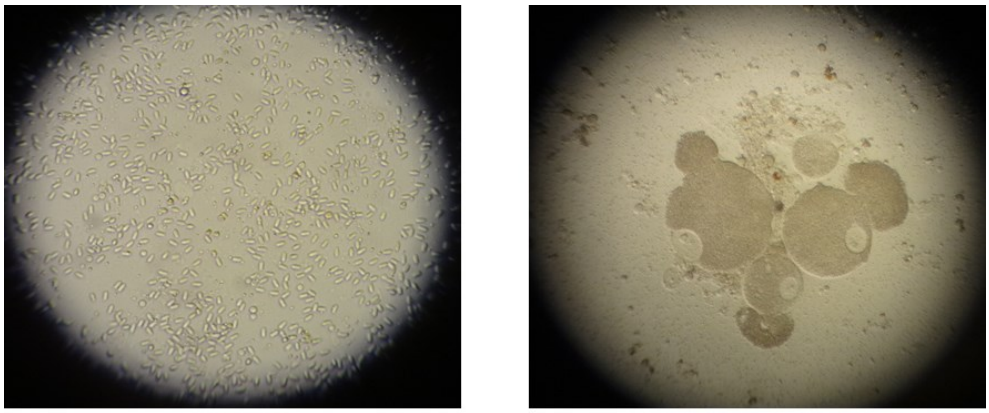


Figure V-2. Gamètes mâles et femelles de moule d'eau douce *Elliptio complanata* observées au microscope.

2.3. Principaux résultats et discussion

Lors de cette expérience *in vivo*, de la mortalité est survenue dans les conditions Témoin eau, Témoin DMSO, Citalopram 2, Gabapentine 1 et Gabapentine 2 en plus de la suspicion de ponte. C'est pourquoi, au bout de 14 jours d'exposition, une moule de chaque unité expérimentale a été prélevée pour analyser la viabilité et la phagocytose des hémocytes, car ce sont des marqueurs sensibles au phénomène de ponte. En effet, l'étude de Lemaire et *al*. (2006) montre qu'il peut y avoir des changements dans l'activité de phagocytose en fonction de la maturation sexuelle des bivalves et notamment une diminution de l'activité de phagocytose lors de la ponte. Cependant, ce contrôle n'a pas révélé de mauvais état de santé des individus étudiés donc l'expérience a été maintenue jusqu'à 21 jours.

Les données de sexage des moules d'eau douce à la fin des 21 jours d'exposition sont présentées dans le **Tableau V-5**.

Tableau V-5. Détermination du nombre de moules d'eau douce mâles et femelles dans les 10 conditions étudiées.

	Mâle	Femelle
Témoin eau	2	6
Témoin DMSO	0	7
Citalopram 1	6	5
Citalopram 2	8	2
Gabapentine 1	7	1
Gabapentine 2	2	7
Gabapentine 3	10	1
Mélange 1	8	3
Mélange 2	5	6
Mélange 3	6	5

Pour les différents biomarqueurs étudiés, les résultats n'ont pas été agencés en fonction du sexe des individus car aucune différence n'a été observée entre les mâles et les femelles de chaque condition. De plus, la condition Témoin DMSO, qui est la référence, ne contenait aucun mâle et dans certaines unités la répartition le nombre de mâles et de femelles n'était pas assez important pour permettre des analyses statistiques.

Pour l'analyse des résultats, la référence choisie permettant les analyses statistiques est le témoin DMSO car sur tous les biomarqueurs étudiés aucune différence statistiquement significative n'a été observée avec le témoin eau.

L'ensemble des résultats de cette expérience est regroupé dans le **Tableau V-6**.

Tableau V-6. Bilan de tous les résultats obtenus pour les moules d'eau douce exposées aux 8 conditions contaminées aux psychotropes.

Paramètres	Citalopram 1	Citalopram 2	Gabapentine 1	Gabapentine 2	Gabapentine 3	Mélange 1	Mélange 2	Mélange 3
IC	/	/	/	/	/	/	/	/
IGS	/	/	/	/	/	/	/	/
Mesures sur hémolymphe								
Cellularité	+	/	+	/	+	+	+	+
Viabilité	/	-	-	-	/	/	/	/
Phagocytose	/	+	+	/	/	+	/	/
Activité COX	/	-	/	/	/	/	/	/
Dommage à l'ADN	/	+	+	+	+	+	+	+
Mesures sur gonade								
APL	/	/	/	/	/	/	/	/
Activité COX	-	/	/	/	/	/	-	/
Serotonine	/	/	+	/	+	/	/	/

+ : il y a une induction statistiquement significative par rapport à la référence pour le biomarqueur étudié.
- : il y a une répression statistiquement significative par rapport à la référence pour le biomarqueur étudié.

La production d'oxyde nitrique (NO) n'a finalement pas été introduite dans les résultats car l'analyse n'a révélé aucune présence de NO dans tous les échantillons étudiés. De potentiels problèmes techniques liés à la conservation des échantillons pourraient être à l'origine de ce phénomène.

Les niveaux de sérotonine, de vitellogénine, l'activité de COX et l'indice gonado-somatique ont été étudiés dans les gonades afin d'identifier ou non une éventuelle ponte lors des 21 jours de l'expérience, et ainsi, savoir si les modifications des biomarqueurs testés dans l'hémolymphe étaient dues à la ponte ou à l'exposition aux différents psychotropes. Lors de la reproduction, les niveaux de sérotonine augmentent pour finaliser la maturation des gamètes et initier la ponte, provoquant aussi une augmentation de l'activité de la cyclooxygénase (Matsutani et Nomura, 1987 ; Gagné et *al*., 2011) mais aussi la chute des niveaux de vitellogénine (Gross et *al*., 2000) et de l'indice gonado-somatique.
D'après les résultats obtenus, aucune baisse de l'IGS et des niveaux de vitellogénine n'a été remarquée entre le témoin DMSO et les conditions contaminées. Il n'y a pas, non plus, eu d'augmentation de l'activité de la COX dans les gonades des moules contaminées. Cependant une augmentation significative de la production de sérotonine est constatée dans les conditions Gabapentine 1 et Gabapentine 3 mais qui n'est sûrement pas dû à une ponte car aucun des 3 autres biomarqueurs ne répondent dans ces 2 conditions.
Nous pouvons conclure que les effets observés, pour les biomarqueurs testés, sur l'hémolymphe sont dus à l'exposition aux psychotropes pendant 21 jours et non à une éventuelle ponte.

Dans les conditions Citalopram à 20 $ng.L^{-1}$, Gabapentine à 250 et 25 000 $ng.L^{-1}$ et les 3 conditions de mélange, les moules présentent une augmentation du nombre d'hémocytes significative par rapport au témoin solvant. Ce phénomène peut être dû à une augmentation de la prolifération des hémocytes ou à un mouvement des cellules des tissus périphériques vers la circulation

(Pipe and Coles, 1995). Des études précédentes ont mis en évidence que plusieurs paramètres peuvent induire cette fluctuation : la température, la salinité mais aussi la concentration ou le temps d'exposition à des contaminants (Akaishi et *al*., 2000 ; Malagoli et *al*., 2007 ; Monari et *al*., 2007). De plus, les études de Bouchard et *al*. (2009) et Farcy et *al*. (2011) ont montré que le nombre d'hémocytes augmentait chez des moules d'eau douce (*Elliptio complanata*) exposées à des effluents urbains (mélange complexe de contaminants).
Les moules exposées à 100 ng.L^{-1} de Citalopram et à 250 et 5000 ng.L^{-1} de Gabapentine ont une diminution de la viabilité des hémocytes significative par rapport aux moules de la condition témoin DMSO. Ici, la perte de viabilité caractérise la toxicité de ces deux psychotropes pour les individus exposés. De plus, les individus dans les conditions Citalopram 2, Gabapentine 1 et Mélange 1 ont une augmentation significative de l'activité phagocytaire. Cette induction de la phagocytose montre une stimulation due à l'exposition aux composés seuls et en mélange à des concentrations pouvant être mesurées dans les effluents urbains (citalopram 2) et dans les eaux de surface (gabapentine 1 et Mélange 1). Dans la littérature, il a été décrit que plusieurs polluants pouvaient affecter la phagocytose chez des hémocytes de moule d'eau douce. Cependant, selon les conditions d'exposition testées (temps et concentration d'exposition) ce biomarqueur peut être surexprimé ou réprimé (Gagné et *al*., 2006 ; Gust et *al*., 2012). Les psychotropes peuvent alors induire la phagocytose comme dans notre étude ou celle de Gagné et *al*. (2006), la réprimer ou les deux à la fois comme le décrivent les travaux de Minguez et *al*. (2014b).

Chez les bivalves, l'étude de l'activité de la COX permet de mesurer l'état d'inflammation de l'hémolymphe. La cyclooxygénase est une enzyme impliquée dans l'oxydation de l'acide arachidonique conduisant à la production de prostaglandine, qui est induite lors de l'inflammation des tissus. La COX est généralement exprimée lors de la maturation des gamètes ou lors de la ponte (Osada et Nomura, 1990) et est inhibée par la présence des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme l'Ibuprofène ou l'Aspirine (Gagné et *al*., 2005). Ici, seul le Citalopram à 100 ng.L^{-1} diminue l'activité de la COX. Ainsi, ce composé pourrait avoir le même mode d'action que les AINS sur les hémocytes de moule d'eau douce.

Pour finir, ces travaux montrent que les composés utilisés seuls ou en mélange ont un potentiel génotoxique sur les hémocytes de moule d'eau douce. Dans la littérature, quelques études ont constaté que les psychotropes pouvaient induire la production de radicaux et de stress oxydatif (Post et *al*., 2000 ; Viola et *al*., 2000) pouvant engendrer des dommages à l'ADN (Marcus et *al*., 2003 ; Draz et *al*., 2009). De plus, les travaux de Brambillia et *al*. (2009a, 2009b) ont démontré que le Citalopram, la Fluoxétine, la Gabapentine, la Paroxétine et la Venlafaxine avaient des activités génotoxique et cancérigène sur des cellules de mammifères. Enfin, l'étude de Lacaze et *al*. (2015) constate que la Fluoxétine, la Paroxétine et la Venlafaxine engendrent des dommages à l'ADN sur les hémocytes de *Mytilus edulis*. Les résultats que nous avons obtenus sont donc en accord avec les différentes données de la littérature.

En conclusion, cette expérience montre que les marqueurs employés sont bien modulés par la présence de psychotropes, qu'ils soient utilisés seuls ou en mélange. Le Citalopram a des effets toxiques à une concentration de 100 ng.L^{-1}, correspondant à des concentrations retrouvées

dans les effluents urbains, alors que la Gabapentine engendre des effets à une concentration environnementale de 250 ng.L^{-1}. De plus, en mélange ces composés vont induire des effets sur les marqueurs testés à des niveaux de concentrations pouvant être quantifiées dans les eaux de surface. Ainsi en mélange ces molécules vont intéragir entre elles pour produire une activité biologique et/ou toxique plus intense à des concentrations plus faible qu'en étant seules. On retrouve alors le même phénomène de synergie que dans l'étude *in vitro* (**Section.1** de ce chapitre).

Donc ces composés seuls ou en mélange ont un potentiel immunotoxique sur les hémocytes de moule d'eau douce *Elliptio complanata*.

Par ailleurs, cette étude *in vivo* a aussi permis d'observer pour la première fois que les psychotropes testés individuellement et en mélange avait un effet génotoxique sur les hémocytes de moule d'eau douce (*Elliptio complanata*) que ce soit à des concentrations correspondant à des entrées et des sorties de STEP mais aussi à des concentrations environnementales.

2.4. Publication 2

Assessment of immunotoxic and genotoxic potential of psychotropic drugs alone and combined in freshwater mussel *Elliptio complanata*

Authors: J. Pédelucq [a, b], E. Lacaze [a], M. Fortier [a], P. Gonzalez [c], C. Kleinert [a], M. Fraser [a], C. Vaillancourt [a], A. Gougeard [a], P. Mazellier [b], H. Budzinski [b], M. Fournier [a]

[a] Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier (INRS-IAF), 31 Des Prairies Blvd., Laval, Quebec, Canada H7V 1B7
[b] Université de Bordeaux, EPOC-LPTC, UMR 5805, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France
[c] Université de Bordeaux, EPOC-EA, UMR CNRS 5805, Place du Dr B. Peyneau, 33120 Arcachon, France

Abstract

The psychotropic compounds are more and more found in the aquatic environment and some studies show their toxic potential on aquatic organisms. This study aims to evaluate the immunotoxic and genotoxic potential of psychotropic compounds tested alone and combined on freshwater mussel (*Elliptio complanata*). Citalopram and gabapentin, when exposed individually, induced biological responses at environmental and effluent WWTP realistic concentrations. Similarly, the 9 compounds (amisulpride, carbamazepine, citalopram, fluoxetine, gabapentin, paroxetine, sulpiride, tiapride and venlafaxine) in mixture modulate the biomarkers tested on *Elliptio complanata* but at lower concentrations than the compounds used alone. Depending on the parameters, there is a factor 3 or 35 between the concentrations used for the compounds alone and combined which generate effects. Finally, these results confirm that the immune function of bivalves can represent a significant target for the action of psychoactive substances and that these compounds alone and in mixture have a genotoxic potential at environmental concentrations.

Keywords : *hemocytes; phagocytosis; DNA damage; immunotoxicity; psychotropic compounds; mixture of contaminants; Elliptio complanata.*

1. Introduction

Pharmaceuticals compounds are a class of emerging environmental pollutants continuously discharged into aquatic environments by the municipal and hospital wastewater effluents (Kummerer, 2004) because the treatment applied are inefficient for the elimination of this pollutant group (Petrović et *al.*, 2003; Ternes, 1998). In consequence, a wide spectrum of compounds belonging to several therapeutic families were detected in aqueous compartments at concentrations from nanograms to microgram-per-liter range (Devier et *al.*, 2013; Peysson and Vulliet, 2013; Ferrer and Thurman, 2012; Petrović et *al.*, 2014).

In this context, psychoactive substances represent one of the most prescribed therapeuthic groups. Their presence in the aquatic environment has been confirmed in several studies (Lajeunesse et *al*. 2008; Santos et *al*., 2010; Giebultowicz et *al*., 2014) and their toxicity begins to be established for the aquatic organisms (Gagné et *al*., 2006; Boxall et *al*., 2012; Minguez et *al*., 2016).

Psychotropic drugs are used to treat depression (antidepressant), anxiety (anxiolytic), psychosis (neuroleptic), epilepsy (antiepileptic) and other psychiatric disorders. Most of the studies dealing with the effects of psychotropic drugs on aquatic organisms have focused on fluoxetine and citalopram (Minguez et *al*., 2014b; Di Poi et *al*., 2014, Gagné et *al*., 2006) and a few on carbamazepine (Gagné et *al*., 2006; Martin-Diaz et *al*., 2009; Gust et *al*., 2013; Chen et *al*., 2014). In addition, the studies concerning these compounds generally treat their individual effect on the cells or organisms (Gagné et *al*. 2006; Minguez et *al*., 2014b) whereas in the environment the aquatic organisms are continuously exposed to complex mixtures of these contaminants. Consequently; in this work, the effects of these psychotropic drugs were studied alone and in mixture on the freshwater mussel *Elliptio complanata*. Freshwater bivalves are benthic filter-feeding animals, with a sessile life form presenting the ability to accumulate pollutants, which could compromise immune function and progressively lead to infectious diseases (Krishnakumar et *al*., 1999).

The immune system of mussel is innate (Mydlarz et *al*., 2006) and is composed of cellular and humoral components consisting of cells and molecules circulating in the hemolymph. The cellular immune system is performed only by circulating hemocytes which are the first line of defense against microorganisms. The main function of hemocytes is the phagocytosis of pathogens (Canesi et *al*., 2002). Some studies have demonstrated that the pharmaceuticals and some antidepressants have effects on the immune system of invertebrates (Gagné et *al*., 2006; Canesi et *al*., 2007; Gust et *al*., 2012; Minguez et *al*., 2014b). The phagocytosis is also followed by the secretion of various humoral factors (cytokine, reactive oxygen species) and by an inflammation (Galloway and Depledge, 2001).

Inflammation was therefore assessed by tracking changes in cyclooxygenase (COX) activity. COX is an enzyme involved in the arachidonic acid oxidation leading to the production of prostaglandins which are readily induced during inflammatory reactions in many tissues of the mussel. Inhibition of COX activity by NSAIDs (Nonsteroidal anti-inflammatory drug: aspirin, ibuprofen…) in *Elliptio complanata* is only documented (Gagné et *al*., 2005).

The pharmaceuticals can bring others disorders in bivalves such as DNA damages (Binelli et *al*., 2009; Gacic et *al*., 2014; Lacaze et *al*., 2015; Parrella et *al*., 2015). DNA damages can result in gene mutation, which could lead to serious biological dysfunction and even disease, whose effects normally take a long time to appear (Villela et *al*., 2006; Hagenaars et *al*., 2008). The ability of compounds to interfere with DNA integrity and gene expression makes them potentially mutagenic or even carcinogenic. The studies of Brambilla et *al.* (2009a and 2009b) have demonstrated that the psychotropic compounds as citalopram, fluoxetine or gabapentin have a genotoxicity and that carcinogenic effects cannot be excluded; therefore we have studied the DNA damage by the comet assay in our work.

The objective of this study was to evaluate immunotoxic and genotoxic effects of citalopram and gabapentin alone and psychoactive substances in mixture on freshwater mussel (*Elliptio complanata*). citalopram and gabapentine are detected in the municipal effluents and in the

surface water at varied concentrations. For example, gabapentine was found at 15 747 ng.L-1 in effluent of a wastewater treatment plant and between 105 and 1224 ng.L^{-1} in river water in South Wales, UK (Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009); citalopram was detected at 173 ng.L^{-1} in the treatment plant effluents in Canada and at 11.5 ng.L^{-1} in St Lawrence water (Canada) (Lajeunesse et *al*., 2008 and 2012).
Several parameters for assessing the physiology of mussel were also tested: condition index and gonado-somatic index. Hemocyte viability, cellularity and phagocytic activity were analyzed in hemocytes to investigate the immunotoxicological effects of the psychoactive substances alone and in mixture. A selection of biomarkers was also analyzed in gonad and hemocytes to investigate the reproductive (vitellogenin-like proteins, serotonine) and inflammatory (cyclooxygenase activity) functions and to assess the physiological integrity of mussel gonad.

2. Materials and Methods

2.1 Pharmaceuticals solutions

All pharmaceuticals (amisulpride, carbamazepine, citalopram, fluoxetine, gabapentin, paroxetine, sulpiride, tiapride and venlafaxine) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). All the compounds were tested in mixture; only gabapentin and citalopram were tested alone.
The concentrations of compounds used in this *in vivo* study are representative of those encountered in the surface water, effluents WWTP and influents WWTP.
All pharmaceuticals were solubilized in DMSO (dimethylsulfoxide) and the final concentration of the solvent was 0.01%. A water control and solvent control were included in the experiment. The stock solutions used for each condition were stored at -20°C.

2.2 Mussel handling and exposure

Mussels were collected by hand in the Ecorce Lake (Mont Laurier, Québec, Canada), which is not subjected to any sources of pollution. The animals were maintained in aquarium with oxygenated water at 15°C, with a 12 h-light/ 12 h-dark cycle. The mussels were fed three times a week with phytoplankton concentrates (Phytoplex®, Kent Marine, Franklin, WI, USA).
For the in vivo experiment, 8 experimental units filled with 15 L of water supplemented with 1.5 mL of psychotropic solutions and each containing 12 mussels, were used. The 8 experimental conditions were: citalopram 1, citalopram 2, gabapentin 1, gabapentin 2, gabapentin 3, Mixture 1, Mixture 2 and Mixture 3, and 2 conditions control: Control water, Control DMSO. Concentrations of compounds tested are represented in Table 1.
Contaminated water was entirely renewed every 3 days. Mussels were not fed during the 21 days of exposure. At the end of the experiment, hemolymph and gonad were collected on ten mussels in each tank after the 21 days of the experiment to perform the different analyzes. Therefore markers of the reproductive function were tested on the gonad and at the fourteenth day of exposure, viability and phagocytic activity of hemocytes were tested on one mussel of each tank. The study of Lemaire et *al*. (2006) explains that spawning period there may be a decrease in phagocytosis yet in own study no modulations of this biomarker and the cell viability were observed so the experiment was continued up to 21 days.

Table 1. Psychoactive substances concentrations tested in the contaminated conditions.

Compounds	Concentrations in the experimental units ($ng.L^{-1}$)							
	Citalopram 1	Citalopram 2	Gabapentin 1	Gabapentin 2	Gabapentin 3	Mixture 1	Mixture 2	Mixture 3
Citalopram	20	100	-	-	-	20	100	500
Gabapentin	-	-	250	5000	20000	250	5000	25000
Carbamazepine	-	-	-	-	-	50	1000	5000
Fluoxetine	-	-	-	-	-	5	20	100
Paroxetine	-	-	-	-	-	5	10	50
Venlafaxine	-	-	-	-	-	10	100	500
Sulpiride	-	-	-	-	-	10	50	250
Tiapride	-	-	-	-	-	5	50	250
Amisulpride	-	-	-	-	-	30	1000	5000

2.3 Immunocompetence evaluation

Hemolymph was collected individually from the posterior adductor muscle with a syringe with a 23G gauge needle.

Viability and cellularity were evaluated by mixing 500 µL of hemolymph with 4 µL of a 100 µg/mL of propidium iodide (PI) solution (Sigma-Aldrich). The two parameters were determined by FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) equipped with a 488 nm argon laser.

Phagocytosis was measured according to a flow cytometry method developed for bivalve hemocytes (Brousseau et *al*. 2000). Briefly, hemocytes were mixed with green-yellow latex Fluoresbrite® Carboxylate microspheres (Polysciences,Inc., Warrington, PA, USA) which had a diameter of 1.6 µm, at a hemocyte-to-bead ratio 1:100. The suspensions were incubated for 18 hours at 16°C in the dark. After the incubation, the free beads were removed from the cells by centrifugation on a 3% bovine serum albumin (BSA) gradient in RPMI-1640 medium (150xg for 8 min at 4°C). The cell pellets were re-suspended in 0.5 mL of 0.5% formaldehyde fixation solution and the acquisitions were performed with a FACSCalibur flow cytometer. Hemocyte populations were defined on the basis of their forward and right angle scatter properties (FSC and SSC, respectively). For each sample, the fluorescence emission of 5 000 events was acquired and collected at 530 nm (FL1). The data were analyzed for the green fluorescence frequency distribution histogram of hemocyte population. Results were analyzed with the CellQuest Pro software to determinate the percentage of cells that engulfed one or more fluorescent beads (immunocapacity) and three or more fluorescent beads (immunoefficiency).

Cyclooxygenase (COX) activity in hemocytes was measured by the oxidation of the 2,7-dichlorofluorescein in the presence of arachidonate (Fujimoto et *al*., 2002). Briefly, 1 mL of hemolymph was centrifuged at 10000xg for 10 min at 4°C and the pellet obtained was resuspended in 250 µL phosphate buffered saline. In a microplate, 25 µL of the suspension was mixed with 200 µL of 50 µM arachidonate, 10 µM dichlorofluorescein and 0.1 $\mu g.mL^{-1}$ of horseradish peroxidase in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.1% of Tween 20, 0.5 mM EDTA and 10 µM hematin. A kinetic measurement of fluorescence was made each 5 min during 30 min, at 485 nm for excitation and 520 nm for emission (Spectra Max M5, VWR, Canada). The data were expressed as increase in relative fluorescence units (RFU)/min/mg protein. The protein concentration was measured using the protein-dye binding method of Bradford (1976).

2.4 Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet assay)

The Comet assay was performed according to the procedure described by Singh et *al*. (1988) and modified as follows: 20 µL of exposed hemolymph were mixed with 20 µL of 1% low melting point agarose prepared in phosphate buffered saline at 37°C. This mixture was spread on a frosted microscope slide precoated with normal agarose (1%) and was covered with a 22×22 mm coverslip (two gels per slide). Coverslips were withdrawn after agarose polymerization (4°C, 10 min) and slides were incubated for 90 min in a lysing solution (2.5 M NaCl, 0.1 M Na_2EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X100; pH 10) at 4°C in the dark. The slides were then placed 30 min in an electrophoresis buffer (0.3 M NaOH and 1 mM Na_2EDTA, pH>13) to allow the unwinding of DNA. Electrophoresis was carried out at 25 V (0.61 V/cm) and 300 mA for 24 min. Slides were then washed three times for 5 min with a neutralization buffer (0.4 M Tris–HCl, pH 7.5) and dried in absolute ethanol. After staining with diluted Sybr Green solution (1/10000), each slide was viewed by fluorescence microscopy (x400). Results were gained by a visual scoring system, for which a total of 100 randomly selected cells on each gel were classified as belonging to one of five categories of comets according to the tail and head intensity (Azqueta et *al*. 2011).

2.5 Gonad activity

Gonad tissues were homogenized at 4°C in 25 mM Hepes-NaOH buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, 0.1 mM dithiothreitol and 1 $mg.mL^{-1}$ aprotinin using an ultra-turrax homogenizer. The homogenate was then centrifuged at 15000×g for 20 min at 4 °C to get the S15 fraction. The gonado-somatic index (GSI) was calculated as the ratio between gonad weight and whole tissues weight.

Levels of vitellogenin-like proteins were determined in the S15 fraction by the indirect method of alkali labile phosphate (ALP) assay (Gagné and Blaise, 1998) with some modifications. High-molecular-weight proteins were precipitated in 35% cold acetone. After incubation for 10 min on ice, the protein pellet was obtained by centrifugation at 10000xg for 5 min at 4°C. The resulting pellet was homogenized in 50 mL of NaOH 1M and heated at 60°C for 30 min. Levels of alkali labile phosphates were measured at 815 nm and 444 nm with a Spectra Max M5 microplate reader using the molybdenum reagent for phosphate determination (Stanton, 1968). Potassium phosphate was used as the standard. Total ALP was normalized to the total protein (using method Bradford, 1976) content of the gonad and data were expressed as µg phosphate/mg protein.

Cyclooxygenase (COX) activity was measured in S15 fraction of gonad by the oxidation of the 2,7-dichlorofluorescein in the presence of arachidonate (Fujimoto et *al*., 2002).

Serotonin levels in the S15 fraction were performed using a serotonin ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Kit (RE59121, Immuno-Biological Laboratories International, Hamburg, Germany). According to the manufacturer's instructions (IBL, Serotonin ELISA), 50 µL of S15 fraction were mixed with 100 µL of the kit assay buffer and 25 µl of kit acylation buffer. After incubation at 37°C for 15 min, 1 mL of assay buffer was added to the homogenates and the precipitated proteins were removed by centrifugation (10 min at 1500xg). Fifty microliters of the supernatant was added to duplicate wells in the ELISA plate, which was then processed according to the directions of the manufacturer. The optical densities of each well were measured at 405 nm. The serotonin content was determined by comparing the optical density of the sam-

ples with a standard curve containing increasing amounts of serotonin and the data were expressed in nmol serotonin/mg protein.

2.6 Statistical analysis

The data were expressed as mean ± standard deviation (*n* = 10 mussels). Statistical analysis was carried out using the Prism® version 5.03 software (GraphPad Software, Inc.). A Kruskal-Wallis ANOVA test and non-parametric Mann Whitney U-test were performed to identify groups that differed significantly from solvent control. Significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Immune status

No differences were observed between control water and control DMSO. Consequently, only control DMSO values are presented here.

Cell viability was around 60-70%. There is a significant loss of viability in conditions citalopram 2 (100 $ng.L^{-1}$), gabapentin 1 (250 $ng.L^{-1}$) and gabapentin 2 (5000 $ng.L^{-1}$) relative to control DMSO (Fig. 1 A and B). However, no difference was observed in mixture conditions (Fig. 1 C).
Hemocyte cellularity was significantly higher in condition citalopram 1, gabapentin 1, gabapentin 3, Mixture 1, Mixture 2 and Mixture 3 (ranging from 450 000 to 800 000 cell/mL) compared to control DMSO (250 000 cell/mL) (Fig. 1 D, E and F).

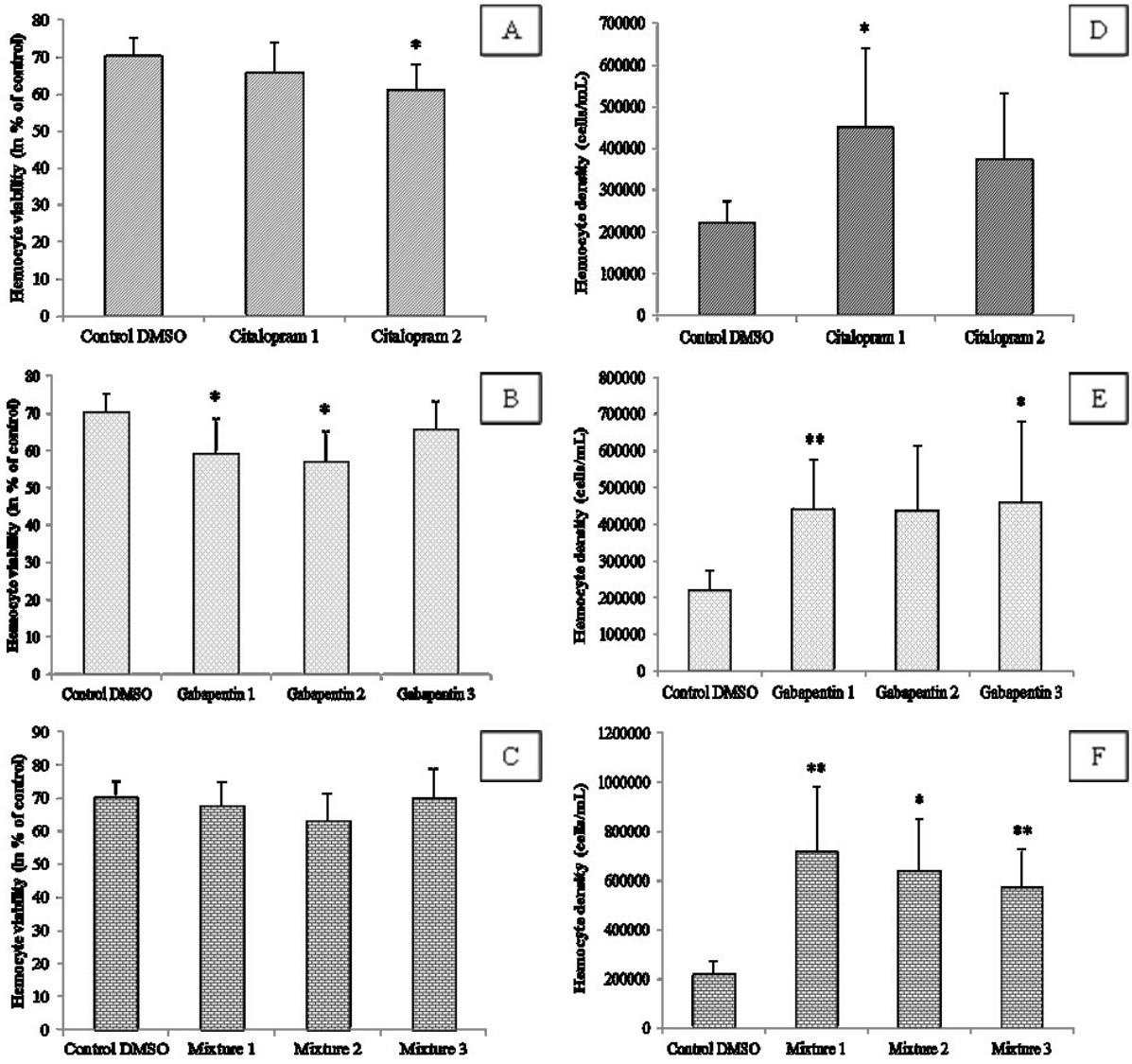


Fig. 1. Hemocyte viability (A, B and C) and counts (D, E and F) of freshwater mussel exposed to individual and mixture compounds (mean value and standard deviation). Asterisks (*) indicate significant difference from solvent control DMSO (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$).

Phagocytic activity of all conditions studied was represented in the Figure 2 A, B and C. Only the conditions citalopram 2, gabapentin 1 and Mixture 1 had an effect on phagocytosis. Indeed an increase of the immunocapacity and immunoefficienty of the *Elliptio complanata* hemocytes. It is to be noted that such response was observed at concentrations corresponding to those encountered in effluent notably for citalopram (100 $ng.L^{-1}$) and gabapentin (250 $ng.L^{-1}$).

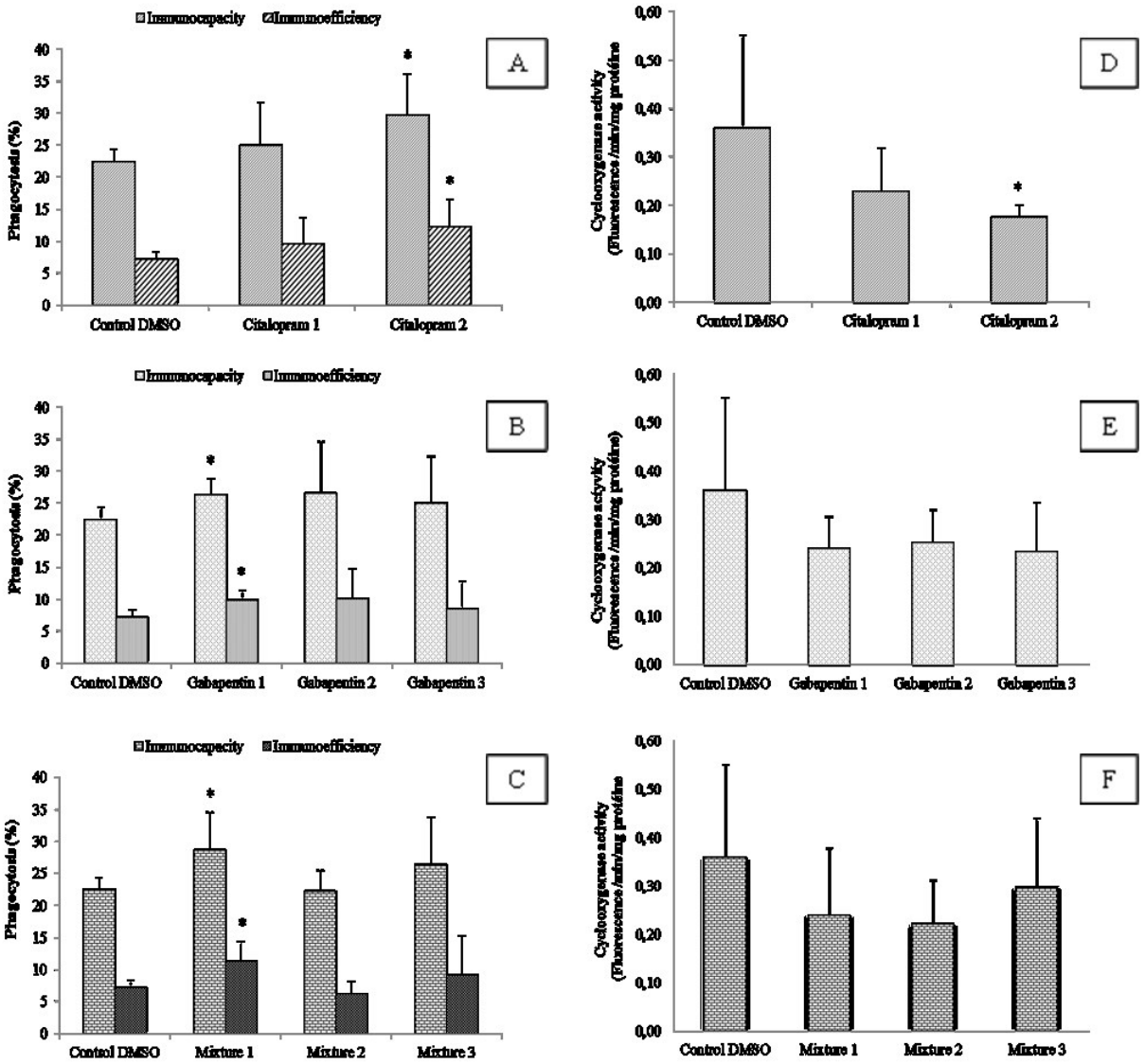


Fig. 2. Effect of psychotropic in alone and in mixture on the different phagocytosis efficiency (A, B and C) and Cyclooxygenase activity (D, E and F) (mean value and standard deviation). Asterisks (*) indicate significant difference from solvent control DMSO (*: $p < 0.05$).

The cylooxygenase activity was only impacted in condition citalopram 2 (Fig. 2 D). No effect was found on the COX activity of *Elliptio complanata* hemocytes after exposure to the 3 concentrations of gabapentin tested as well as the 3 mixtures (Fig. 2 E and F).

3.2 Genotoxicity

A statistically significant increase of DNA damage was observed in the 3 mixture conditions (22-31%), in 3 gabapentin conditions (23-39%) and condition Citalopram 2 (19%) (Fig. 3 A, B and C). Only Citalopram at 20 ng.L^{-1} has not induced DNA damage.

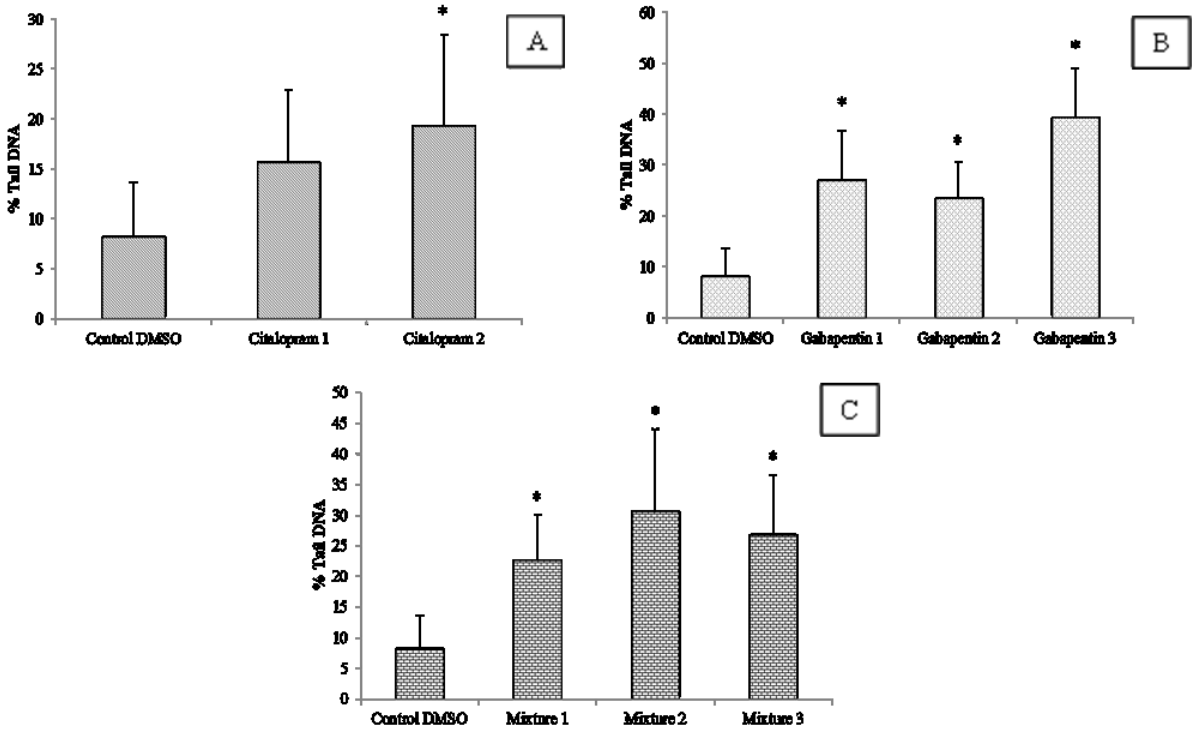


Fig. 3: DNA damage in hemocytes detected by comet assay induced by alone compounds (A and B) and in mixture (C) (mean value and standard deviation expressed as arbitrary units). Asterisks (*) indicate significant difference from solvent control DMSO (*: $p < 0.05$).

3.3 Gonad analysis

Serotonin and vitellogenin levels, COX activity and GSI were studied in the gonads of mussels exposed to see if there has been a spawning during the 21 days of the experiment *in vivo* (Table 2).

Table 2. Summary of biological measurements and statistical results. Asterisks (*) indicate significant difference from solvent control DMSO (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$). SD: standard deviation. ns: no significant differences.

Parameters	Control DMSO		Citalopram 1			Citalopram 2		
	Mean	±SD	Mean	±SD	Stats	Mean	±SD	Stats
Gonado-somatic index	16	3.5	16	2.5	ns	16	1.9	ns
APL	0.09	0.04	0.14	0.05	ns	0.08	0.03	ns
Cox activity	1.55	0.12	0.91	0.22	*	1.22	0.18	ns
Serotonine	1.4	0.44	1.12	0.34	ns	1.02	0.33	ns

Parameters	Control DMSO		Gabapentin 1			Gabapentin 2			Gabapentin 3		
	Mean	±SD	Mean	±SD	Stats	Mean	±SD	Stats	Mean	±SD	Stats
Gonado-somatic index	16	3.5	17	2.1	ns	16	1.8	ns	15	3.6	ns
APL	0.09	0.04	0.08	0.03	ns	0.09	0.03	ns	0.07	0.02	ns
Cox activity	1.55	0.12	1.24	0.28	ns	1.42	0.25	ns	1.68	0.14	ns
Serotonine	1.4	0.44	2.33	0.6	*	2.05	0.53	ns	3.11	0.34	**

Parameters	Control DMSO		Mixture 1			Mixture 2			Mixture 3		
	Mean	±SD	Mean	±SD	Stats	Mean	±SD	Stats	Mean	±SD	Stats
Gonado-somatic index	16	3.5	16	2.1	ns	16	2.1	ns	15	2.5	ns
APL	0.09	0.04	0.07	0.02	ns	0.07	0.01	ns	0.09	0.01	ns
Cox activity	1.55	0.12	1.24	0.35	ns	1.05	0.18	*	1.18	0.38	ns
Serotonine	1.4	0.44	1.08	0.33	ns	0.99	0.3	ns	1.12	0.57	ns

These tests allow knowing whether the effects observed in the hemolymph are due to spawning or exposure to different psychotropic drugs. At the moment of reproducing, the levels of serotonin increases to finalize gamete maturation and initiate spawning, also causing an increase in the cyclooxygenase activity (Matsutani and Nomura, 1987; Gagné et *al*., 2011) as well as the fall of the vitellogenin level (Gross et *al*., 2000) and the GSI.

According to our results, no decline in the IGS and vitellogenin levels were observed between control DMSO and contaminated conditions. Moreover, there has been no increase in COX activity in gonads contaminated mussels. However, a statistically significant increase in the production of serotonin was found in the conditions gabapentin 1 and 3 but was certainly not due to spawning because no white filament was observed in condition gabapentin 3 and none of the other 3 biomarkers are altered in these two conditions.

We can conclude that the observed effects on biomarkers tested in hemolymph are only due to exposure of 21 days to psychotropic drugs.

4. Discussion

Mussels exposed to citalopram at 20 $ng.L^{-1}$, gabapentin at 250 and 20000 $ng.L^{-1}$ and 3 mixtures have a significant increase in hemocyte counts compared to the Control DMSO. This increase can be attributed to increased hemocyte proliferation or to a movement of cells from tissues into circulation (Pipe and Coles, 1995). The number of circulating hemocyte can increase with high temperatures, mechanical stress or change in salinity (Malagoli et *al*., 2007; Monari et *al*., 2007). But other parameters can fluctuate the hemocytes counts such as the concentration and time of exposure to contaminants (Akaishi et *al*., 2007). Indeed, exposure to PAH and trace metal increase the number of circulating hemocytes in wild oyster (Fisher et *al*., 2000). Also, Bouchard et *al*. (2009) and Farcy et *al*. (2011) show that the municipal effluents can increase the hemocyte cellularity of freshwater mussels (*Elliptio complanata*). A significant loss in cell viability was observed in experimental units with citalopram at 100 $ng.L^{-1}$, gabapentin at 250 $ng.L^{-1}$ and 5000 $ng.L^{-1}$. This decrease of hemocytes viability could reflect the toxicity of the pollutants. Pa-

rolini et *al*. (2011) indicate that the viability is a parameter with a high variability according to susceptibility of aquatic organisms to chemicals, times of exposure and experimental conditions.

Several pharmaceuticals products, including psychoactive substances, have been shown to affect hemocytes functional parameters, including phagocytosis with different effect depending on the exposure conditions (Gagné et *al*., 2006; Canesi et *al*., 2007; Gust et *al*., 2012 and 2013). According to the literature, the phagocytic activity can be induced or repressed following exposure to contaminants. This could depend on the nature of pollutants, on its concentrations and the exposure duration (Bouchard et *al*., 1999; Fournier et *al*., 2000; Canesi et *al*., 2006). In our study, a significant increase of the immunocapacity and the immunoefficiency has been observed for citalopram at 100 $ng.L^{-1}$, gabapentin at 250 $ng.L^{-1}$ and in Mixture 1. Indeed, studies show that as psychotropic drugs, the phagocytic response can be stimulated as carbamazepine in Gagné et *al*. (2006), depressed or the both as clomipramine and amitriptyline in Minguez et *al*. (2014b).

The state of inflammation in the hemolymph was examined by the COX activity. Bivalves have been shown to possess prostaglandin synthase or cyclooxygenase, which generally expressed during gamete maturation and spawning (Osada and Nomura, 1990). Reduced COX activities result in decreased prostaglandin which is the case with exposure to NSAIDs (Gagné et *al*., 2005). Our study shows a decrease in COX activity in the hemolymph with 100 $ng.L^{-1}$ of Citalopram and gonads with 50 $ng.L^{-1}$ of citalopram and with the Mixture 2 corresponding at concentrations found in municipal discharges. The results suggested that the citalopram may have the same mode of action than NSAIDs on prostaglandins or COX activity.

Our study also shows that the compounds used alone or in mixture have a genotoxic potential because they produce DNA damage to hemocytes of freshwater mussel. Several studies found that antidepressants can induce free radicals and oxidative stress (Post et *al*., 2000; Viola et *al*., 2000) which cause DNA damage (Marcus et *al*., 2003; Draz et *al*., 2009). Furthermore, the studies of Brambilla et *al* (2009a and 2009b) demonstrated that citalopram, fluoxetine, gabapentin, paroxetine and venlafaxine have a genotoxic and carcinogenic activity in mammalians cells. Recent study of Lacaze et *al*. (2015) have also showed that Fluoxetine, Paroxetine and Venlafaxine induced DNA damages on blue mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes. Consequently, the increased DNA damages observed in our study would probably due to DNA strand brakes and nucleotide oxidation involving ROS produced during contaminant exposures.

Moreover, we observed that compounds in mixture induced a more intense impact on the hemocyte *Elliptio complanata* than compounds alone and at lower concentrations.

These results prove that psychotropic compounds in mixture have a toxic impact at environmental concentrations. Thereby these results strongly suggested that there is a synergistic effect between the compounds within mixture (Cleuvers et *al*., 2003; Quinn et *al*., 2009; Farcy et *al*, 2011).

5. Conclusion

Psychotropic compounds alone and in mixture modulate the immune response in freshwater mussels during *in vivo* exposure at environmental and effluent WWTP realistic concentrations. These results confirm that in bivalves the immune function can represent a significant tar-

get for the action of psychoactive substances. Moreover, these compounds alone and in mixture have a genotoxic potential at really low concentrations.

Acknowledgments

This work is a contribution to the Canada Research Chair in Environmental immunotoxicology. The authors are grateful to Robert Vaillancourt and Jean-Christophe Boussin for their assistance in animal care in Biodôme of Montréal.

3. Exposition *in vivo* d'*Elliptio complanata* aux eaux usées des STEP de Repentigny, avant et après traitement à l'ozone.

3.1. Introduction

Nous venons de voir que les expériences de contamination *in vitro* et *in vivo* ont confirmé que les psychotropes étudiés avaient un potentiel immunotoxique et génotoxique sur les hémocytes de moules d'eau douce (*Elliptio complanata*). De plus, ces deux études ont permis de constater qu'en mélange ces composés avaient un impact toxique à des concentrations plus faibles (niveaux environnementaux), que lorsqu'ils sont testés individuellement. C'est pourquoi, le but de cette troisième expérience est d'évaluer le potentiel immunotoxique et génotoxique d'un mélange de composés pharmaceutiques plus complexe, retrouvés dans les eaux usées de deux stations de traitements de la ville de Repentigny utilisant des procédés différents :

- La STEP de l'Ile Lebel (IL) qui utilise un traitement physico-chimique.
- La STEP de Le Gardeur (LG) qui est composée d'étangs aérés utilisant donc un traitement biologique.

De plus, il sera aussi évalué l'impact toxique d'un traitement par ozonation des effluents de ces deux STEP.

L'ozone (O_3) est un puissant oxydant qui permet de dégrader de nombreuses molécules organiques. Il est instable et réagit rapidement pour se transformer en oxygène (description **Chapitre 1. Section 4.1 c**).

Les doses d'ozone appliquées pour le traitement des eaux usées sont comprises entre 1 et 10 mg O_3/L et n'entraînent qu'une oxydation partielle des composés, qui peuvent se transformer en sous-produits biologiquement actifs, voire même dans certains cas en composés plus toxiques que la molécule d'origine. Mais l'ozonation est souvent en complément d'un traitement biologiquement actif, comme une filtration sur sable, pour neutraliser ces sous-produits réactifs (Hollender et *al*., 2009).

Une des principales problématiques de la formation des sous-produits de la désinfection avec l'ozone est sa réactivité avec les composés bromés et la formation possible de deux composés cancérogènes : le BrO_3- et le TOBr (Zhang et *al*., 2007). Un dosage maximal de 2 mg/L de O_3 est suggéré afin de prévenir la formation des sous-produits bromés (Kim et *al*., 2007). Cependant selon les caractéristiques des effluents de STEP, il est nécessaire d'augmenter ces doses d'ozone pour que le traitement soit efficace sur les composés organiques, inorganiques et les coliformes fécaux. Néanmoins il est intéressant d'évaluer la toxicité de ces différentes doses d'ozone sur les organismes aquatiques.

L'objectif de cette troisième étude était alors :

- d'évaluer l'impact toxique des eaux usées de deux stations d'épuration, ayant des traitements différents, sur la moule d'eau douce (*Elliptio complanata*) après une période d'exposition de 28 jours.
- d'évaluer l'impact toxique du traitement à l'ozone des effluents des deux STEP étudiées sur la moule d'eau douce, après 28 jours d'exposition.

3.2.Matériels et méthodes

Pour cette étude 9 conditions ont été testées et sont présentées ci-dessous (**Figure V-3**).

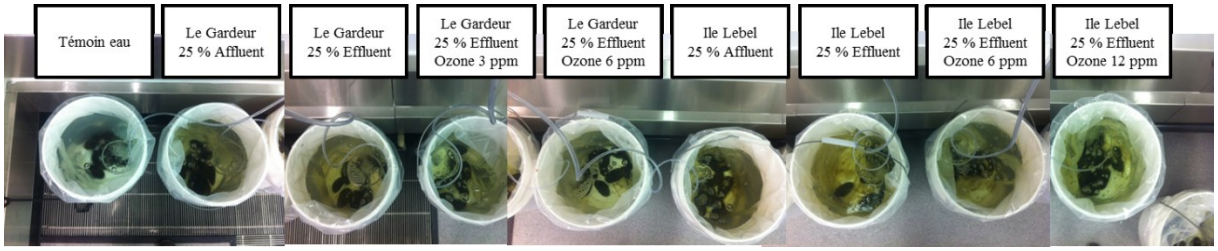


Figure V-3. Présentation des 9 conditions testées lors de l'exposition *in vivo* avec les affluents, effluents et effluents ozonés des deux STEP de Repentigny.

Chaque unité expérimentale contient 20 L d'eau et 10 moules qui n'ont pas été nourries lors des 28 jours d'exposition, ni lors de la semaine d'acclimatation. La température de l'eau a été maintenue à 15°C et la pièce était éclairée selon une alternance lumière/obscurité 16h/8h. L'eau de chaque unité expérimentale a été renouvelée tous les 3 jours avec de l'eau du robinet de la ville de Montréal traitée aux UV et au charbon actif, supplémentée de 25 % l'affluent de Le Gardeur, ou 25% de l'effluent de LG, ou 25% de l'effluent de LG ozoné à 3 ppm, ou 25% de l'effluent de LG ozoné à 6 ppm, ou 25 % l'affluent de Ile Lebel, ou 25% de l'effluent de IL, ou 25% de l'effluent de IL ozoné à 6 ppm, ou 25% de l'effluent de IL ozoné à 12 ppm.

Après exposition, les moules ont été retirées des unités expérimentales pour en prélever l'hémolymphe dans le muscle adducteur postérieur. L'hémolymphe a permis de mesurer la concentration d'hémocytes et leur viabilité, la phagocytose, la production de NO, l'activité de la cyclooxygénase, l'activité des lysozymes et les dommages à l'ADN (activité génotoxique). De plus, l'indice de condition (IC) (masse totale individu / longueur coquille) est mesuré sur tous les individus qui ont été utilisés pour les analyses.
Pour finir, lors de l'expérience plusieurs prélèvements d'eau de chaque unité expérimentale ont été effectués afin de faire une analyse chimique et d'évaluer la contamination en psychotropes de chaque bac.

3.3.3.3 Principaux résultats et discussion

Lors de cette expérience *in vivo*, aucune différence significative n'a été observée entre les IC des moules placées dans les 9 unités expérimentales.

L'analyse chimique par UPLC-MS/MS a permis d'évaluer la présence en psychotropes dans chaque unité expérimentale. Le **Tableau V-7** présente les données d'analyse chimique obtenues dans les 8 conditions contenant les eaux usées des deux stations de traitement de Repentigny.
La condition « Témoin eau » n'est pas représentée car aucun des 47 composés recherchés n'a été détecté.

Tableau V-7. Concentrations des psychotropes qui ont été quantifiées dans les 8 conditions d'exposition contenant des eaux usées des deux STEP de Repentigny.

	Le Gardeur				Ile Lebel			
	25% Aff.	25% Eff.	25% Eff. Oz. 3 ppm	25% Eff. Oz. 6 ppm	25% Aff.	25% Eff.	25% Eff. Oz. 6 ppm	25% Eff. Oz. 12 ppm
	($ng.L^{-1}$)				($ng.L^{-1}$)			
Gabapentine	2911,1 ± 134,9	2528,7 ± 1541,2	2761,5 ± 358,3	1578,5 ± 155,6	1812,9 ± 948,1	2718,4 ± 562,7	2980,2 ± 71,0	1521,2 ± 701,9
Lorazépam	226,5 ± 0,6	48,8 ± 11,5	112,7 ± 53,2	< LDM	189,0 ± 84,3	133,0 ± 22,3	< LDM	< LDM
Carbamazépine	77,0 ± 32,5	64,7 ± 2,0	44,9 ± 27,8	6,0 ± 0	85,0 ± 13,2	104,7 ± 40,2	7,7 ± 6,0	0,5 ± 0
Oxazépam	60,8 ± 2,5	36,8 ± 12,6	51,4 ± 9,2	26,0 ± 1,7	88,8 ± 40,0	39,8 ± 9,4	17,7 ± 0,7	19,9 ± 10,1
Lévétiracetam	32,0 ± 7,4	31,4 ± 13,9	35,4 ± 4,1	23,9 ± 0	29,8 ± 3,7	37,4 ± 13,3	34,7 ± 0,1	25,8 ±7,5
Sertraline	29,7 ± 0,3	29,6 ± 10,6	39,7 ± 31,7	4,6 ± 0	35,7 ± 21,6	26,6 ± 15,1	6,9 ± 0	3,2 ± 2,5
Paroxétine	19,8 ± 0,7	7,0 ± 3,4	4,3 ± 2,7	1,9 ± 0,5	47,4 ± 6,2	15,3 ± 8,6	3,5 ± 0	< LDM
Venlafaxine	13,9 ± 2,4	29,2 ± 21,2	19,4 ± 10,9	5,0 ± 0,5	16,4 ± 8,1	29,3 ± 21,2	3,2 ± 1,2	1,4 ± 1,3
Primidone	12,5 ± 4,0	9,1 ± 2,4	8,3 ± 1,5	9,1 ± 4,4	4,6 ± 0,3	3,7 ± 1,1	4,4 ± 1,1	2,0 ± 1,9
Lamotrigine	11,9 ± 0,8	8,9 ± 1,3	21,5 ± 8,8	5,9 ± 0,8	18,1 ± 3,6	9,9 ± 2,4	13,9 ± 3,6	4,7 ± 1,3
Témazépam	10,3 ± 4,6	4,9 ± 1,0	5,1 ± 0,6	2,6 ± 0,1	13,6 ± 2,0	7,9 ± 2,7	5,7 ± 0,5	2,0 ± 0,3
Amitryptiline	9,4 ± 3,2	7,1 ± 2,3	6,7 ± 2,3	2,9 ± 2,3	13,3 ± 4,2	9,7 ± 6,0	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0
Citalopram	7,9 ± 0,6	8,3 ± 4,5	6,3 ± 3,3	0,5 ± 0,1	15,2 ± 4,1	9,3 ± 7,8	0,5 ± 0,1	0,2 ±0,1
Zopiclone	1,4 ± 0,2	3,3 ± 2,8	1,0 ± 0	8,0 ± 0	6,6 ± 0	1,5 ± 0,4	0,6 ± 0	< LDM
Nordiazépam	0,7 ± 0,4	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0	1,2 ± 1,1	0,5 ± 0,4	0,9 ± 0	0,3 ± 0	< LDM
Mirtazapine	0,5 ± 0	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0	< LDM	1,1 ± 0,9	0,4 ± 0,4	< LDM	< LDM
Méthadone	0,2 ± 0,1	< LDM	< LDM	< LDM	0,2 ± 0	< LDM	< LDM	< LDM
Hydroxyzine	0,1 ± 0	< LDM	< LDM	< LDM	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0	< LDM	< LDM

< LDM : valeurs inférieure à la limite de détection méthodologique

Sur les 47 psychotropes recherchés, dans les conditions d'exposition de Le Gardeur, 18 ont été quantifiés dans les unités expérimentales 25% Aff., 16 dans les conditions 25% Eff. et 25% Eff. Oz. 3 ppm alors que 14 sont retrouvés dans la condition 25% Eff. Oz. 6 ppm. Dans les conditions de l'Ile Lebel, 18 ont été mesurés dans le bac 25% Aff., 17 dans 25% Eff., 14 dans 25% Eff. Oz. 6 ppm et 11 dans la condition 25% Eff. Oz. 12 ppm.

L'analyse de l'eau de chaque condition pour Le Gardeur montre une diminution du nombre de composés à partir de la condition 25% Eff. Oz. 6 ppm, et pour Ile Lebel à partir des conditions 25% Eff. Oz. 6 ppm et 25% Eff. Oz. 12 ppm. Au niveau des concentrations des composés retrouvés, une diminution est aussi observée pour la plupart des molécules et surtout dans les conditions où les effluents sont ozonés. Pour les conditions d'expositions avec les eaux de Le Gardeur, la diminution du niveau de concentrations est plus importante entre les conditions 25% Eff. et 25% Eff. Oz. 6 ppm qu'entre les conditions 25% Eff. et 25% Eff. Oz. 3ppm. De même pour Ile Lebel les niveaux de concentrations vont être plus faibles à la condition 25% Eff. Oz. 12 ppm qu'à la condition 25% Eff. Oz. 6 ppm par rapport à la condition 25% Eff. Ainsi, les doses d'ozone utilisées vont alors agir sur les niveaux de concentrations des composés. L'effet de la dose d'ozone est aussi remarqué dans l'étude d'Antouniou et *al*. (2013). Les auteurs montrent que pour la plupart des molécules étudiées, plus la dose d'ozone augmente plus les composés sont dégradés.

Pour finir, les niveaux de concentrations et le nombre de molécules retrouvés dans les conditions 25% Aff. et 25% Eff. des deux STEP sont presque identiques. Des études ont montré que le traitement primaire comme celui de Ile Lebel et le traitement biologique par lagunage comme à Le Gardeur sont peu efficace pour l'élimination des molécules pharmaceutiques et donc aussi des psychotropes (Soulier *al*., 2011 ; Luo et *al*., 2014 ; Subedi et Kannan, 2015).

Notre analyse chimique montre que le traitement supplémentaire à l'ozone est plus efficace, comme il est aussi montré dans les études de Hollender et *al*. (2009) et Soulier et *al*. (2011).

La **Figure V-4** présente les comportements de 4 psychotropes (la Carbamazépine, le Lorazépam, la Gabapentine et le Lévétiracétam) obtenus dans les différentes conditions avec les eaux de Le Gardeur et Ile Lebel.

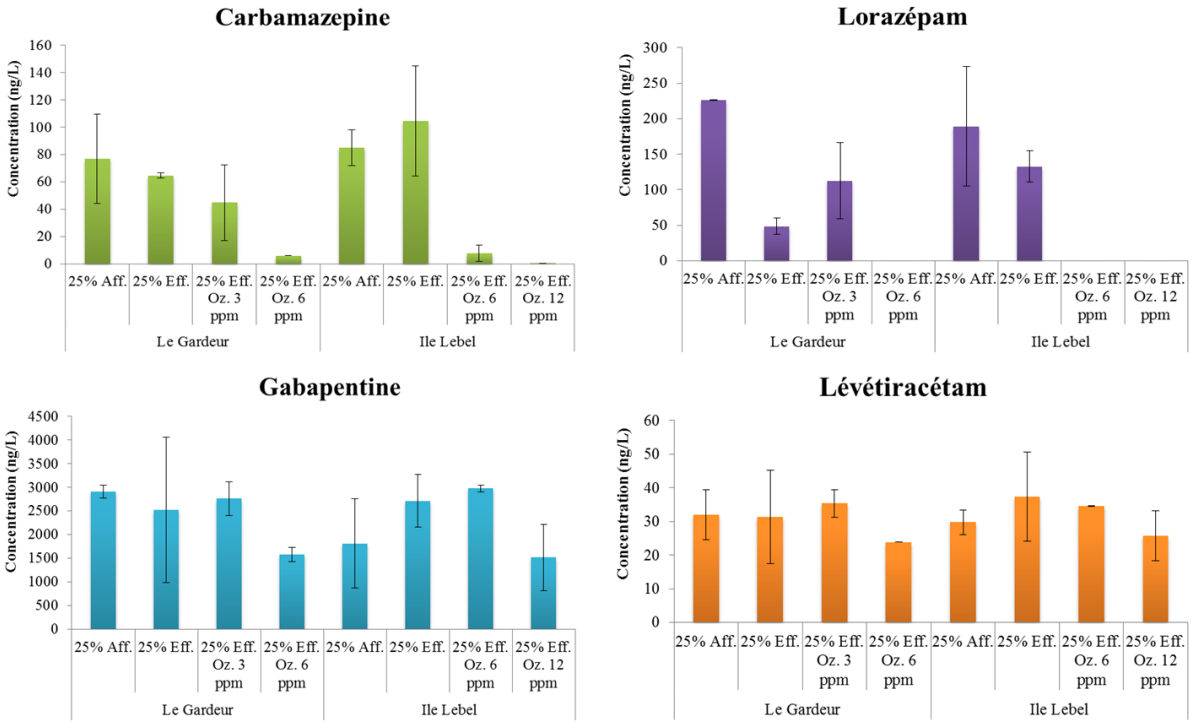


Figure V-4. Concentrations de la Carbamazépine, du Lorazépam, de la Gabapentine et du Lévétiracétam dans les 8 conditions d'exposition de l'étude.

Les graphiques montrent que la Carbamazépine est un composé où le traitement à l'ozone est efficace, particulièrement avec les doses de 6 ppm pour Le Gardeur et de 6 et 12 ppm pour Ile Lebel. De même pour le Lorazépam où les doses d'ozone de 6 et 12 ppm éliminent complètement la molécule contrairement aux traitements primaires et secondaires utilisés dans les STEP étudiées.
Cependant, il existe des composés comme la Gabapentine et le Lévétiracétam qui sont persistants aux traitements des STEP de Le gardeur et Ile Lebel. Cependant nous observons une diminition de leur concentration avec les doses d'ozone à 6 ppm et 12 ppm.

Les analyses chimiques des eaux, de chaque unité expérimentale, ont permis de mettre en évidence une meilleure efficacité du traitement à l'ozone sur la dégradation des psychotropes trouvés, par rapport aux traitements déployés dans les STEP de Le Gardeur et Ile Lebel. D'autre part, ces données ont montrés que plus la dose d'ozone est élevée, plus les niveaux de concentrations des composés diminuent.
Cependant il est intéressant de savoir si les doses d'ozone utilisées peuvent avoir un impact toxique sur les moules d'eau douce exposées.

Le **Tableau V-8** présente l'ensemble des résultats obtenus pour cette exposition *in vivo*.

Tableau V-8. Bilan des résultats obtenus lors de l'exposition aux eaux usées des 2 STEP de Repentigny.

Paramètres	Le Gardeur									
	Témoin eau		25% Aff.		25% Eff.		25% Eff. Oz. 3 ppm		25% Eff. Oz. 6 ppm	
	Moy. ± ET	Stat.	Moy. ± ET	Stat.	Moy. ± ET	Stat.	Moy. ± ET	Stat.	Moy. ± ET	Stat.
Cellularité (Nbre de cellules/mL)	2553545 ± 1521843	a	848632 ± 383060	b	897360 ± 607566	ab	805002 ± 370055	b	1044713 ± 727367	ab
Viabilité (%)	76 ± 7	ns	79 ± 6	ns	77 ± 5	ns	74 ± 9	ns	76 ± 11	ns
Phagocytose - Capacité (%)	31 ± 8	ns	42 ± 10	ns	36 ± 9	ns	44 ± 11	ns	35 ± 5	ns
Phagocytose - Efficacité (%)	16 ± 7	ns	27 ± 12	ns	19 ± 6	ns	27 ± 10	ns	18 ± 5	ns
Activité COX (fluo/min/mg prot.)	0,20 ± 0,08	ns	0,18 ± 0,06	ns	0,18 ± 0,07	ns	0,24 ± 0,14	ns	0,20 ±0,08	ns
Activité Lysozymes (ng lys./mg prot.)	0,43 ± 0,27	ns	0,35 ± 0,24	ns	0,33 ± 0,21	ns	0,43 ± 0,28	ns	0,26 ± 0,22	ns
Niveau de Nitrite (µg NO_2/mg prot.)	0,37 ± 0,14	a	3,76 ± 1,92	b	3,34 ± 2,34	b	3,59 ± 1,57	b	2,55 ± 1,16	b
Dommage à l'ADN (% ADN dans la queue)	18 ± 1	a	34 ± 10	b	24 ± 6	ab	21 ± 4	ab	16 ± 5	ab

Paramètres	Ile Lebel									
	Témoin eau		25% Aff.		25% Eff.		25% Eff. Oz. 6 ppm		25% Eff. Oz. 12 ppm	
	Moy. ± ET	Stat.	Moy. ± ET	Stat.	Moy. ± ET	Stat.	Moy. ± ET	Stat.	Moy. ± ET	Stat.
Cellularité (Nbre de cellules/mL)	2553545 ± 1521843	ns	981632 ± 619278	ns	1239530 ± 609188	ns	1539687 ± 357130	ns	1039152 ± 456756	ns
Viabilité (%)	76 ± 7	ns	78 ± 5	ns	80 ± 5	ns	78 ± 6	ns	73 ± 6	ns
Phagocytose - Capacité (%)	31 ± 8	ns	31 ± 11	ns	31 ± 6	ns	27 ± 7	ns	29 ± 9	ns
Phagocytose - Efficacité (%)	16 ± 7	ns	18 ± 9	ns	18 ± 6	ns	12 ± 5	ns	15 ± 7	ns
Activité COX (fluo/min/mg prot.)	0,20 ± 0,08	ns	0,38 ± 0,29	ns	0,21 ± 0,08	ns	0,38 ± 0,24	ns	0,25 ± 0,12	ns
Activité Lysozymes (ng lys./mg prot.)	0,43 ± 0,27	ns	0,26 ± 0,20	ns	0,14 ± 0,15	ns	0,38 ± 0,19	ns	0,55 ± 0,14	ns
Niveau de Nitrite (µg NO_2/mg prot.)	0,37 ± 0,14	a	1,59 ± 1,10	ab	3,61 ± 1,38	b	2,74 ± 1,65	b	1,90 ± 1,97	ab
Dommage à l'ADN (% ADN dans la queue)	18 ± 1	b	17 ± 3	ab	21 ± 5	b	12 ± 1	a	11 ± 2	a

Sur l'ensemble des biomarqueurs testés, seulement 3 répondent aux conditions d'exposition avec les eaux de Le Gardeur et 2 avec les conditions d'exposition avec les eaux de Ile Lebel. En effet, la viabilité, l'activité phagocytaire (capacité et efficacité), l'activité de COX et l'activité des lysozymes ne sont pas significativement modulés par les différentes conditions d'expositions.

Pour Le Gardeur, une diminution significative du nombre d'hémocytes est observable entre le témoin eau et les conditions 25% Aff. et 25% Eff. Oz. 3 ppm. Ceci peut-être expliqué par la présence de xénobiotiques mais aussi de pathogènes. Une diminution du nombre d'hémocytes est observable à Ile Lebel entre le témoin et les autres conditions d'exposition, cependant, celle-ci n'est pas statistiquement significative. Les travaux de Jasinska et *al*. (2015) observent aussi une diminution du nombre d'hémocytes chez les moules qui ont été placées directement dans le panache de l'effluent de la STEP étudiée.
Une augmentation significative du niveau de nitrite entre le témoin et les autres conditions est observable à Le Gardeur. Cet effet montre la présence d'une inflammation qui peut être due à la présence de micro-organismes. Cependant, l'ozone est connu pour être un traitement permettant de diminuer cette faune microbienne (Gehr et *al*., 2003). Néanmoins, à Le Gardeur les niveaux d'ozone utilisés n'ont pas l'air d'avoir un effet sur celle-ci, de plus, cette STEP utilise un traitement biologique par étangs aérés où les micro-organismes sont des vecteurs importants pour l'efficacité de ce traitement. Donc, il est possible que le nombre d'individus soit tellement élevé que les doses d'ozone utilisées ne soient pas assez performantes. A titre d'exemple, l'étude de Gerh et *al*. (2003) montre qu'il faut utiliser une dose de 20 mg/L d'ozone pour éliminer la faune microbienne présente dans les eaux usées des stations de traitements.
Enfin, des dommages à l'ADN sont constatés à la condition 25% Aff., cependant une tendance à la diminution pour les conditions 25% Eff. (24 ± 6 %), 25% Eff. Oz 3 ppm (21 ± 4 %) et 25% Eff. Oz 6 ppm (16 ± 5 %) est observée. Ainsi, plus les niveaux d'ozone augmentent, plus le pourcentage de dommages diminue. L'augmentation significative des dommages à l'ADN à 25% Aff. par

rapport au témoin peut être due à la présence de composés organiques et inorganiques, en mélange, dans les eaux usées qui vont induire un stress oxydant et perturber les hémocytes (Draz et *al*., 2009 ; SanJuan-Reyes et *al*., 2015).

Pour Ile Lebel, une augmentation du niveau de nitrite est significative entre le témoin et les conditions 25% Eff. et 25% Eff oz. 6 ppm. Cependant, les niveaux de nitrite tendent à diminuer avec la dose d'ozone à 12 ppm pour retrouver un état porche du témoin. Il est donc probable que la dose d'ozone à 12 ppm diminue la faune microbienne présente dans les eaux usées et donc l'inflammation chez les moules d'eau douce exposées.
Enfin, une diminution des dommages à l'ADN est observable dans les conditions 25% Eff. Oz. 6 ppm et 25% Eff. Oz. 12 ppm par rapport à la condition témoin et 25% Eff. Ces résultats suggèrent que les traitements à l'ozone utilisés améliorent la qualité de l'eau et donc limite les dommages à l'ADN sur les hémocytes de moules d'eau douce.

Pour conclure, cette étude *in vivo* sur l'exposition d'*Elliptio complanata* aux eaux usées des deux STEP de Repentigny, avant et après traitement à l'ozone, montre que les doses d'ozone utilisées dans les effluents ne sont pas toxiques pour les organismes aquatiques. Effectivement, selon les biomarqueurs soit aucun effet n'est observé, soit les conditions avec ozone sont moins toxiques que l'affluent ou l'effluent de la STEP étudiée. Enfin, les doses à 6 et 12 ppm semblent même améliorer la qualité de l'eau.
Chimiquement, sur l'analyse des 47 psychotropes dans chaque unité d'exposition, les doses d'ozone utilisées, particulièrement celles de 6 ppm et 12 ppm, ont diminué le nombre de molécules trouvées et les niveaux de concentrations mesurées pour la plupart des composés.
Biologiquement, l'efficacité de l'ozone se manifeste surtout sur l'analyse des dommages à l'ADN, qui s'est montré le biomarqueur le plus sensible dans notre étude.
De plus, les eaux usées sont constituées de composés organiques et inorganiques mais aussi de micro-organismes qui vont créer un mélange complexe (Farcy et *al*., 2011 ; Petrovic et *al*., 2014 ; Dong et *al*., 2015) et qui vont avoir des effets différents sur les hémocytes de moules d'eau douce rendant l'interprétation des analyses biologiques plus difficiles.
Pour finir, les analyses biologiques ont montré que pour Ile Lebel l'affluent semblait moins toxique que l'effluent alors que le contraire est observé pour Le Gardeur. Nous pouvons supposer que le traitement utilisé à Ile lebel libère les molécules parents enfermés dans les boues ou les matières en suspension, on parle de déconjugaison (Clara et *al*., 2004 ; Göbel et *al*., 2007 ; Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009 ; Durán-Álvarez et *al*., 2012). Ce phénomène rend alors l'effluent plus concentré en composés que l'affluent et donc plus toxique pour les moules d'eau douce exposées. Notre hypothèse semble être en accord avec les données du **Tableau 105**, où nous constatons les concentrations mesurées dans la condition 25% Eff. IL sont plus élevées que celles de la condition 25% Aff. IL.

3.4. Publication 3

Responses of freshwater mussel (*Elliptio complanata*) exposed to municipal wastewaters before and after ozonation.

Authors: J. Pédelucq [a, b], M. Fortier [a], E. Lacaze [a], P. Gonzalez [c], P. Rault [a], P. Mazellier [b], H. Budzinski [b], M. Fournier [a], P. Brousseau [a]

[a] Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier (INRS-IAF), 31 Des Prairies Blvd., Laval, Quebec, Canada H7V 1B7
[b] Université de Bordeaux, EPOC-LPTC, UMR 5805, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France
[c] Universitế de Bordeaux, EPOC-EA, UMR CNRS 5805, Place du Dr B. Peyneau, 33120 Arcachon, France

Abstract

The municipal wastewaters are à complex mixture containing a large spectrum of organic and inorganic contaminants. The emergence of new chemical contaminants, increasing volumes of wastewater discharged and the low efficiency of treatment process amplify the problem on the water quality. Nevertheless, tertiary treatments like the ozone were designed to better eliminate contaminants and to reduce their toxic impact. But ozone treatment introduces oxidative chemical modifications that could increase the toxic potential of municipal wastewaters for the aquatic ecosystems.
This study aims to assess the responses of freshwater mussel (*Elliptio complanata*) exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment. The chemical analysis show that the ozone doses used (6 and 12 $mg.L^{-1}$), decrease the number and the concentration level of the psychotropic compounds detected. Moreover, the results obtain on the biomarkers show that the doses of ozone tested aren't toxic for the freshwater mussels exposed and can improve the water quality.

Keywords : *hemocytes; phagocytosis; DNA damage; inflammation; Elliptio complanata; municipal wastewaters; ozonation.*

Introduction

Municipal effluents are considered as major sources of contamination for aquatic ecosystems. They contain numerous organic contaminants such as nonylphenol ethoxylates (NPE), volatile organic compounds (VOC) endocrine disruptors (estrogens), and various pharmaceutical (Farcy et *al*., 2011; Lajeunesse et *al*., 2012; Martinez-Bueno et *al*., 2012). Prior to discharge in freshwater ecosystems, wastewaters are usually treated by different process to remove solids materials and degrade some organic and inorganic compounds. Nevertheless, the emergence of new chemical contaminants from industry, increasing volumes of wastewater discharged and the

low efficiency of treatment process on the removal of contaminants amplify the problem of water quality. Nevertheless, additional treatments were designed to better disinfect effluents and better eliminate contaminants and to reduce their potential toxic impact. Among these tertiary treatments there is the ozone treatment which can reduce the fecal coliform levels (Gehr et *al*., 2003) and the levels of pharmaceuticals products (Huber et *al*., 2005). Thereby, the toxicological impacts of tertiary-treated effluents are expected to be low compared to those of effluents undergoing only a primary and secondary treatment, which essentially aimed at removing suspended matter and particles. However, ozone treatment introduces oxidative chemical modifications (Swietlik and Sikorska, 2004) that could modulate and possibly increase the toxic potential of municipal wastewaters for the aquatic ecosystems.

Aquatic organisms are important targets as they are continuously exposed to this mixture of contaminants where synergistic effects can occur (Cleuvers, 2003; Quinn et *al*., 2009). Despite this situation, a few studies have been carried out to evaluate the immunotoxicity and genotoxicity of effluents treated with ozone on freshwater mussels (Gagné et *al*., 2007 and 2008). These bivalves are benthic filter-feeding animals and are directly exposed to contaminants from either dissolved or particulate compartments. Moreover, these organisms are sessile and live for relatively long periods (up to 30 years in some species), which makes them relevant sentinel species for ecotoxicological studies.

The immune system of bivalves is innate (Mydlarz et *al*., 2006) and is composed of cellular and humoral components consisting of cells and molecules circulating in the hemolymph. The cellular immune system is performed only by hemocytes which are circulating cells providing functions of defense, transport and nutrient digestion. The main function of hemocytes is to phagocytose the foreign particles (Canesi et *al*., 2002). The humoral components of bivalve immunity include lysozyme activity, lectins, anti-microbial peptides and the phenoloxidase system (Stefano et al., 1990; Munoz et *al*., 2006). Lysozymes are a component of the non-specific immune response against infectious bacteria in bivalves (Mydlarz et *al*., 2006) and are secreted in plasma by hemocytes after pathogen recognition or a physiological stress (Pipe, 1990; Carballal et *al*., 1997; Hong et *al*., 2006; Monari et *al*., 2007). Nitric oxide (NO) plays an important role in immunity (Smith et *al*., 2000; Tafalla et *al*., 2003; Villamil et *al*., 2007). It is produced by NO-synthases in hemocytes during phagocytosis and reacts with hydrogen peroxide to form peroxynitrite, a highly potent bactericide molecule (Fang, 1997; Gourdon et *al*., 2001). Moreover, NO may act as an immunomodulator and mediates the effects of estrogens and opioids on immunity and inflammation (Galloway and Depledge, 2001; Stefano et *al*., 2003). Inflammation was appraised by tracking changes in cyclooxygenase (COX) activity. COX is an enzyme involved in the arachidonic acid oxidation leading to the production of prostaglandins which are readily induced during inflammatory reactions in many tissues of the mussel. The cellular and humoral immune systems in mussels are efficient in controlling infections but are susceptible to disruption from various environmental stressors.

DNA damage can result in gene mutation, which could lead to serious biological dysfunction and even disease, whose effects normally take a long time to appear (Villela et *al*., 2006; Hagenaars et *al*., 2008). The ability of mixture of compounds detected in wastewaters to interfere with DNA integrity and gene expression renders them potentially mutagenic or even carcinogenic.

The objective of this study was to evaluate the responses of freshwater mussel hemocytes (*Elliptio complanata*) exposed to effluents from two WWTP of the Repentigny city (Quebec,

Canada) treated or not with ozone. Hemocytes viability, cellularity, phagocytosis capacity, phagocytosis efficiency and lysozyme activity were analyzed in hemocytes and hemolymph to investigate the immunotoxicological effects of the effluents. Others biomarkers were also analyzed in hemocytes, two to investigate the inflammatory response (COX activity and nitrite level) and to detect DNA damage (Comet assay). In addition, a chemical analysis of waters in each condition were performed by LC-MS/MS to determinate the presence of psychotropic drugs and their concentration level.

2. Materials and Methods

2.1 Mussel collection and exposure experiment

Freshwater mussels *Elliptio complanata* were collected by hand in the Richelieu River (Québec, Canada), which is an area relatively free of point sources of urban and industrial pollution. The mussels were maintained in aquarium with oxygenated water at 15°C, with a 16 h-light/ 8 h-dark cycle. Before the experiment, hey were fed daily with concentrates of phytoplankton (Phytoplex®, Kent Marine, Franklin, WI, USA) and laboratory-cultured *Pseudokirchneriella subcapitata* microalgae. During the exposure experiment, 9 experimental units were filled with 25 L of water sampled. Eight groups of 10 mussels were distributed to each tank and were exposed to 25% of influent, 25% of effluent and 25 % ozone-treated effluent (3 and 6 $mg.L^{-1}$) of the aerated lagoon of Le Gardeur (Repentigny, Québec, Canada) but also 25% of influent, 25% of effluent and 25 % ozone-treated effluent (6 and 12 $mg.L^{-1}$) of the wastewater treatment plant of Ile Lebel (Repentigny, Québec, Canada). The control group and the dilution water consisted of UV and charcoal treated tap water from Montreal City (Quebec, Canada). The effluents of two plants were ozonized by the laboratory CREDEAU (Ecole Plytechnique, Montréal, Québec, Canada). The percentage of wastewater and level of ozone used in this study was chosen from the results obtained in a previous *in vitro* experiment made in the labora

Ile Lebel is a WWTP which use a physical and chemical treatment, while the aerated lagoons of Le Gardeur used a biological and chemical treatment. Both WWTP are located in the Repentigny city that domestic collective network. The water of tanks was changed twice a week and the animals were not fed during the 28 days of experience.

2.2 Water analysis

Chemical analysis was done on sample of each experimental units from an analytical procedure adapted from Togola and Budzinski, (2008) and Devier et *al*. (2013). Briefly, each sample was analyzed using a Waters UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) Acquity coupled to Waters Quattro Premier XE triple quadrupole (Waters, Saint Quentin en Yvelines, France), equipped with a electrospray ionization (ESI). The chromatographic separation was achieved with a Kinetex C18 column (100 × 2.1 mm; 1.7µm) in 17 min. This multi-residue method allows detecting 47 compounds belonging to the family of psychotropic drugs (Benzodiazepines, Antidepressants, Antiepileptics, Anxiolytics, Neuroleptics and Opiate substitutes).

Instrumental blank were performed for each sample in order to prevent any contamination. The instrumental method was validated through estimation of linearity, repeatability and sensitivity. Method Detection Limits (MDLs) of the compounds studied was ranged from 0.02 $ng.L^{-1}$ to 1.1 $ng.L^{-1}$.

2.3 Immunocompetence assay

Hemolymph was collected individually from the posterior adductor muscle with a syringe with a 23G gauge needle.

Viability and cellularity were evaluated by mixing 500 µL of hemolymph with 4 µL of a 100 µg/mL of propidium iodide (PI) solution (Sigma-Aldrich). The two parameters were determined by FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) equipped with a 488 nm argon laser.

Phagocytosis was measured according to a flow cytometry method developed for bivalve hemocytes (Brousseau et *al*. 2000). Briefly, hemocytes were mixed with green-yellow latex Fluoresbrite® Carboxylate microspheres (Polysciences,Inc., Warrington, PA, USA) which had a diameter of 1.6 µm, at a hemocyte-to-bead ratio 1:100. The suspensions were incubated for 18 hours at 16°C in the dark. After the incubation, the free beads were removed from the cells by centrifugation on a 3% bovine serum albumin (BSA) gradient in RPMI-1640 medium (150xg for 8 min at 4°C). The cell pellets were re-suspended in 0.5 mL of 0.5% formaldehyde fixation solution and the acquisitions were performed with a FACSCalibur flow cytometer. Hemocyte populations were defined on the basis of their forward and right angle scatter properties (FSC and SSC, respectively). For each sample, the fluorescence emission of 5 000 events was acquired and collected at 530 nm (FL1). The data were analyzed for the green fluorescence frequency distribution histogram of hemocyte population. Results were analyzed with the CellQuest Pro software to determinate the percentage of cells that engulfed one or more fluorescent beads (immune-capacity) and three or more fluorescent beads (immune-efficiency).

Lysozyme activity was measured in hemolymph according to the method described by Lee and Yang, 2002. Briefly, 1 mL of hemolymph was centrifuged at 1000xg for 10 min at 4°C. Then, 100 µL of plasma obtained were added to 100 µL of a suspension of *Micrococcus lysodeikticus* prepared at 0.4 $mg.mL^{-1}$ in a 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.2. The entire reaction was measured each minute during 20 min with a microplate reader (Spectra Max M5, VWR, Canada) at 450 nm. Chicken egg lysozymes (Sigma) were used as standard in order to express the result in ng lysozyme/mg protein. The protein concentration was measured using the protein-dye binding method Bradford, 1976.

The production of nitric oxide (NO) was estimated by measuring the levels of nitrite concentration in the plasma. Because NO reacts with oxygen to give nitrite (NO_2^-) and nitrates (NO_3^-), nitrate reductase and reduced NADH were added to reduce NO_3 to NO_2 to obtain the total nitrite concentration in the plasma (Verdon et *al*., 1995). Briefly, in a microplate, 50µL of plasma was added to 25 µL nitrate reductase 80 U/L (Sigma) and 25 µLNADPH at 3 µM (Sigma) prepared in 25 mM potassium phosphate pH 7.4. After incubation at room temperature for 30 min, the concentration of NO_2 was measured by the addition of 100 µL of Griess reagent (Sigma) to the wells. After 30 min incubation time at room temperature, the absorbance was read with a microplate reader at 450 nm and nitrite standards (Sigma) were used to express the results in µmol NO_2/mg protein.

Cyclooxygenase (COX) activity in hemocytes was measured by the oxidation of the 2,7-dichlorofluorescein in the presence of arachidonate (Fujimoto et *al*., 2002). Briefly, 1 mL of hemolymph was centrifuged at 10000xg for 10 min at 4°C and the pellet obtained was resuspended in 250 µL phosphate buffered saline. In a microplate, 25 µL of the suspension was mixed 200

µL of 50 µM arachidonate, 10 µM dichlorofluorescein and 0.1 µg.mL^{-1} of horseradish peroxidase in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.1% of Tween 20, 0.5 mM EDTA and 10 µM hematin. A kinetic measurement of fluorescence was made each 5 min during 30 min, at 485 nm for excitation and 520 nm for emission (Spectra Max M5, VWR, Canada). The data were expressed as increase in relative fluorescence units (RFU)/min/mg protein. The protein concentration was measured using the protein-dye binding method of Bradford (1976).

2.4 Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet assay)

The Comet assay was performed according to the procedure described by Singh et *al*., 1988 and modified as follows: 20 µL of exposed hemolymph were mixed with 20 µL of 1% low melting point agarose prepared in phosphate buffered saline at 37°C. This mixture was spread on a frosted microscope slide percolated with normal agarose (1%) and was covered with a 22×22 mm coverslip (two gels per slide). Coverslips were withdrawn after agarose polymerization (4°C, 10 min) and slides were incubated for 90 min in a lysing solution (2.5 M NaCl, 0.1 M Na_2EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X100; pH 10) at 4°C in the dark. The slides were then placed 30 min in an electrophoresis buffer (0.3 M NaOH and 1 mM Na_2EDTA, pH>13) to allow the unwinding of DNA. Electrophoresis was carried out at 25 V (0.61 V/cm) and 300 mA for 24 min. Slides were then washed three times for 5 min with a neutralization buffer (0.4 M Tris–HCl, pH 7.5) and dried in absolute ethanol. After staining with diluted Sybr Green solution (1/10000), each slide was viewed by fluorescence microscopy (x400). Results were gained by a visual scoring system, for which a total of 100 randomly selected cells on each gel were classified as belonging to one of five categories of comets according to the tail and head intensity (Azqueta et *al*. 2011).

2.6 Data analysis

The data were expressed as mean ± standard deviation (*n* = 10 mussels). Statistical analysis was carried out using the Prism® version 5.03 software (GraphPad Software, Inc.). A Kruskal-Wallis ANOVA test and non-parametric Mann Whitney U-test were performed to identify groups that differed significantly from solvent control. Significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Chemical analysis

The water analysis make in the different conditions showed the presence of different compounds (Table 1). The condition control is not represented in the Table 1 because no compound was detected.

Table 1. Concentration of psychotropic drugs ($ng.L^{-1}$) detected in each exposure conditions.

	Le Gardeur				Ile Lebel			
	25% inf.	25% eff.	25% eff. Oz. 3 ppm	25% eff. Oz. 6 ppm	25% inf.	25% eff.	25% eff. Oz. 6 ppm	25% eff. Oz. 12 ppm
	($ng.L^{-1}$)				($ng.L^{-1}$)			
Gabapentin	2911.1 ± 134.9	2528.7 ± 1541.2	2761.5 ± 358.3	1578.5 ± 155.6	1812.9 ± 948.1	2718.4 ± 562.7	2980.2 ± 71.0	1521.2 ± 701.9
Lorazepam	226.5 ± 0.6	48.8 ± 11.5	112.7 ± 53.2	< MDL	189.0 ± 84.3	133.0 ± 22.3	< MDL	< MDL
Carbamazepine	77.0 ± 32.5	64.7 ± 2.0	44.9 ± 27.8	6.0 ± 0	85.0 ± 13.2	104.7 ± 40.2	7.7 ± 6.0	0.5 ± 0
Oxazepam	60.8 ± 2.5	36.8 ± 12.6	51.4 ± 9.2	26.0 ± 1.7	88.8 ± 40.0	39.8 ± 9.4	17.7 ± 0.7	19.9 ± 10.1
Levetiracetam	32.0 ± 7.4	31.4 ± 13.9	35.4 ± 4.1	23.9 ± 0	29.8 ± 3.7	37.4 ± 13.3	34.7 ± 0.1	25.8 ±7.5
Sertraline	29.7 ± 0.3	29.6 ± 10.6	39.7 ± 31.7	4.6 ± 0	35.7 ± 21.6	26.6 ± 15.1	6.9 ± 0	3.2 ± 2.5
Paroxetine	19.8 ± 0.7	7.0 ± 3.4	4.3 ± 2.7	1.9 ± 0.5	47.4 ± 6.2	15.3 ± 8.6	3.5 ± 0	< MDL
Venlafaxine	13.9 ± 2.4	29.2 ± 21.2	19.4 ± 10.9	5.0 ± 0.5	16.4 ± 8.1	29.3 ± 21.2	3.2 ± 1.2	1.4 ± 1.3
Primidone	12.5 ± 4.0	9.1 ± 2.4	8.3 ± 1.5	9.1 ± 4.4	4.6 ± 0.3	3.7 ± 1.1	4.4 ± 1.1	2.0 ± 1.9
Lamotrigine	11.9 ± 0.8	8.9 ± 1.3	21.5 ± 8.8	5.9 ± 0.8	18.1 ± 3.6	9.9 ± 2.4	13.9 ± 3.6	4.7 ± 1.3
Temazepam	10.3 ± 4.6	4.9 ± 1.0	5.1 ± 0.6	2.6 ± 0.1	13.6 ± 2.0	7.9 ± 2.7	5.7 ± 0.5	2.0 ± 0.3
Amitryptiline	9.4 ± 3.2	7.1 ± 2.3	6.7 ± 2.3	2.9 ± 2.3	13.3 ± 4.2	9.7 ± 6.0	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0
Citalopram	7.9 ± 0.6	8.3 ± 4.5	6.3 ± 3.3	0.5 ± 0.1	15.2 ± 4.1	9.3 ± 7.8	0.5 ± 0.1	0.2 ±0.1
Zopiclone	1.4 ± 0.2	3.3 ± 2.8	1.0 ± 0	8.0 ± 0	6.6 ± 0	1.5 ± 0.4	0.6 ± 0	< MDL
Nordiazepam	0.7 ± 0.4	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0	1.2 ± 1.1	0.5 ± 0.4	0.9 ± 0	0.3 ± 0	< MDL
Mirtazapine	0.5 ± 0	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0	< MDL	1.1 ± 0.9	0.4 ± 0.4	< MDL	< MDL
Methadone	0.2 ± 0.1	< MDL	< MDL	< MDL	0.2 ± 0	< MDL	< MDL	< MDL
Hydroxyzine	0.1 ± 0	< MDL	< MDL	< MDL	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0	< MDL	< MDL

< MDL: Metoh Detection Limits

Among 47 compounds researched, in Le Gardeur exposure, 18 were detected in 25% inf., 16 in 25% eff. and 25% eff. Oz. 3 ppm and 14 in 25% eff. Oz. 6 ppm. In Ile Lebel conditions, 18 were found in 25 % inf., 17 in 25% eff., 14 in 25% eff. Oz 6 ppm and 11 were detected in 25% eff. Oz. 12 ppm.

The water analysis showed that the concentrations decreased according to the level of ozone used. For example, concerning Carbamazepine which is a persistent compound in the two WWTP (concentration was the same in 25% inf. and 25% eff.). An additional ozone treatment leads to a decrease from 31 to 99% concentrations by ozone level used. (Fig. 1).

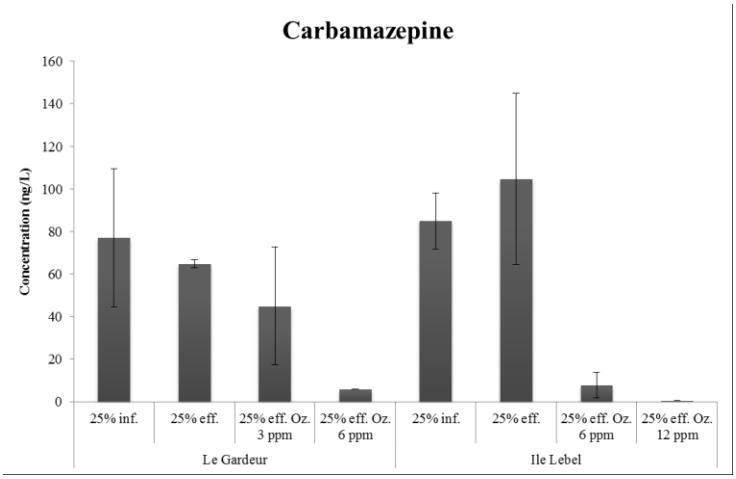


Fig.1. Concentration of Carbamazepine in the exposure conditions of Le Gardeur and Ile Lebel.

Moreover, the ozone level used can also play a role on the elimination of the compounds found because the treatment with ozone at 12 ppm was more effective than at 6 and 3.

On the contrary, some compounds were resistant to all treatments as Gabapentin or Levetiracetam.

Mortality events were observed in the conditions: 25% of influent of Ile Lebel, 25% of effluent of Ile Lebel and Le Gardeur and 25% of ozone-treatment effluent at 12 $mg.L^{-1}$ of Ile Lebel. Nevertheless no effects were observed on the condition index of individual exposed.

3.2 Immune status

Cell viability was between 75% and 80% for Le Gardeur and Ile Lebel waters and no effect was observed between the exposure conditions (Fig.2 A and B).

Hemocyte cellularity was significantly lower at condition 25% inf. and 25% eff. Oz. 3 ppm (around 85 000 and 80 000 cell/mL) than control (about 250 000 cell/mL). However no significant effects were detected in Ile Lebel conditions (Fig. 2 C and D).

Phagocytic activity of all conditions studied was represented in Fig. 2 E and F. No effect was observed on the immune-efficiency and immune-capacity of the *Elliptio complanata* hemocytes in all exposure conditions.

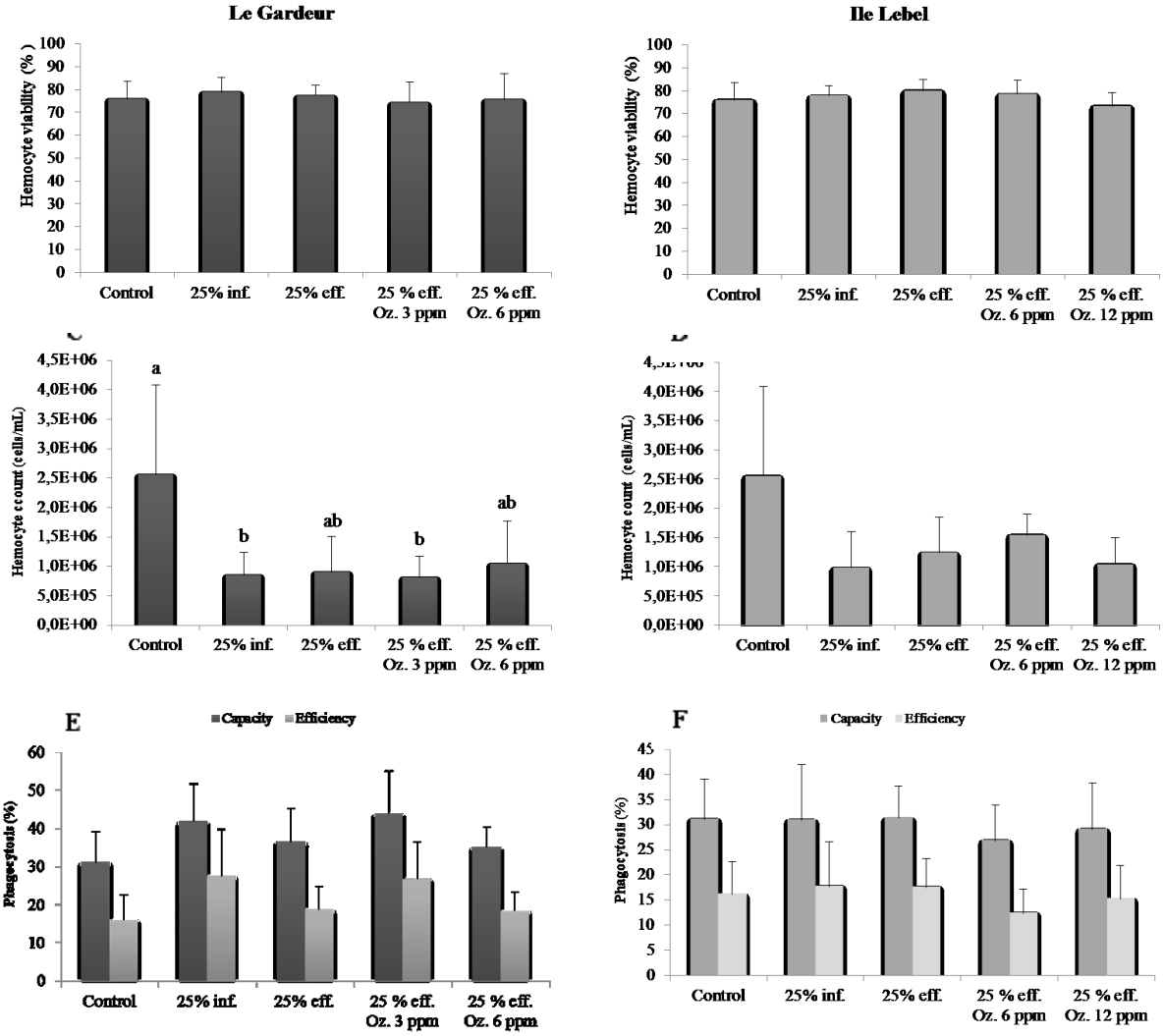


Fig.2. Hemocyte viability (A and B), hemocyte count (C and D) and phagocytic activity (E and F) of freshwater mussel exposed to different conditions with Le Gardeur and Ile Lebel waters (mean value and standard deviation). Different letters above histograms indicate significant differences (non-parametric Mann Whitney U-test; $p < 0.05$).

The Fig. 3 presented the results for lysozyme activity (A and B), nitric level (C and D) and Cylooxygenase activity (E and F) after exposure to Le Gardeur and Ile Lebel waters.

A significant increase of nitrite level was observed between the control and the other exposure conditions for Le Gardeur. For Ile Lebel, the nitrite level was significantly higher in the conditions 25% eff. (3,61 ± 1,38 µg NO_2/mg prot.) and 25% eff. Oz. 6 ppm (2,74 ± 1,65 µg NO_2/mg prot.) than control (0,37 ± 0,14 µg NO_2/mg prot.).

As with phagocytic activity, neither the activities of lysozymes in the hemolymph nor changes in COX activities were significantly altered by the exposure conditions.

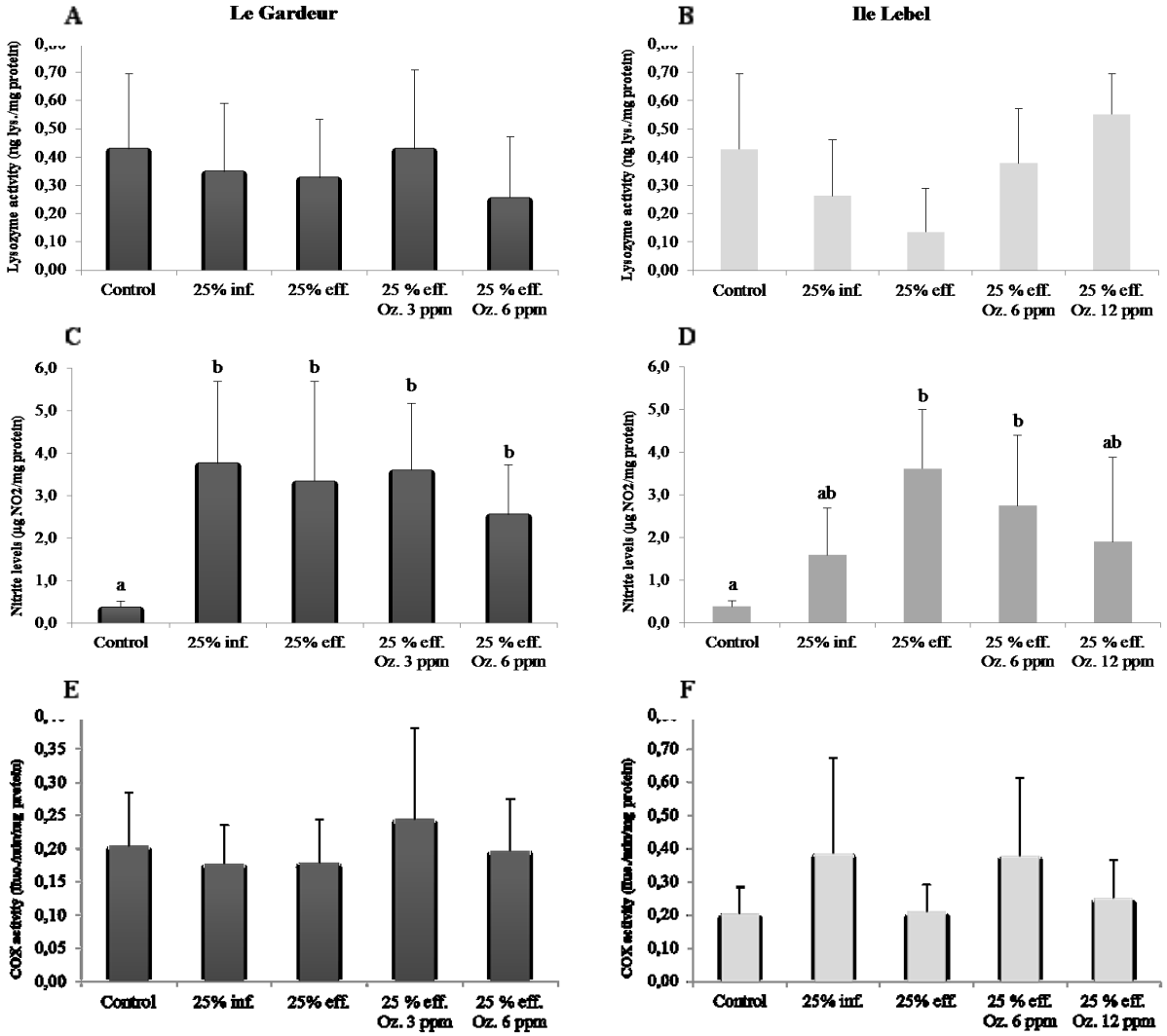


Fig. 3. Lysozyme activity (A and B), production of nitric oxide (C and D) and Cyclooxygenase activity (E and F) in hemocyte of freshwater mussel exposed to different conditions with Le Gardeur and Ile Lebel water (mean value and standard deviation). Different letters above histograms indicate significant differences (non-parametric Mann Whitney U-test; $p < 0.05$).

3.3 Genotoxicity

In Le Gardeur exposures, a significant increase of DNA damage was observed in the condition 25% inf. (34 ± 10%) compared to control (18 ± 1) whereas in the Ile Lebel conditions were noted a decrease of DNA damage in the conditions 25% eff. Oz. 6 ppm (12 ± 1%) and 25% eff. Oz. 12 ppm (11 ± 2%) (Fig. 4).

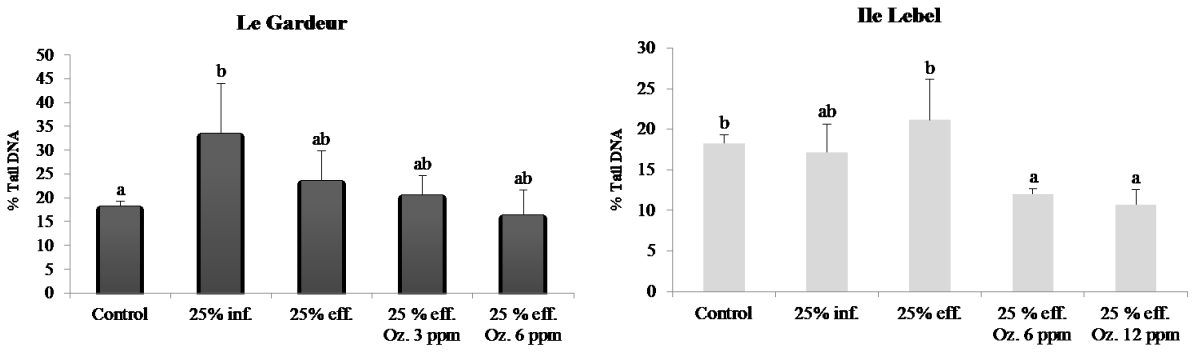


Fig. 4. DNA damage in hemocytes detected by comet assay induced by Le Gardeur waters (A) and Ile Lebel waters (B) (mean value and standard deviation expressed as arbitrary units). Different letters above histograms indicate significant differences (non-parametric Mann Whitney U-test; $p < 0.05$).

4. Discussion

The municipal wastewaters contain a large panel of organic and inorganics compounds and this complex matrix can have a toxic potential on aquatic ecosystems (Martinez-Bueno et *al*., 2012). The work of Farcy et *al*. (2011) has showed that effluent stimulate the immune system of *Elliptio complanata* hemocytes and that municipal wastewater contained several contaminants as Nonylphenol ethoxylate (NPE) , Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), Polychlorinated biphenyl (PCB), Polybrominated diphenyl ether (PBDE), Volatile organic compound (VOC), Perfluorate, Dioxin, Furan and Pharmaceutical. Thereby, the aquatic organisms are exposed in the environment at a complex mixture of pollutants. Cleuvers, (2003) showed at a laboratory study that any mixture of compounds can have an additive effect, so it is essential to evaluate the toxic impact of compounds in mixture and not only individually.

Our water analyses indicated the presence of psychotropic substances in the influent, effluent and the two ozonized effluents of Le Gardeur and Ile Lebel. And there are some psychotropic drugs with concentrations on the order of $\mu g.L^{-1}$ like Gabapentin. However, the chemical data show that the additional ozone treatment of effluent of Le Gardeur and Ile Lebel decreases the concentrations of compounds quantified compared to those found in the effluents. These results are in agreement with previous studies which have observed that ozone treatment is more efficient on psychotropic drugs or pharmaceuticals than the primary and secondary treatments (Soulier et *al*., 2011; Luo et *al*., 2014). The chemical analysis indicate that for most compounds the ozone treatment at 12 ppm used in Ile Lebel effluent was more efficiency to decrease the level of psychotropic compounds than the treatment at 6 ppm. In Le Gardeur, the ozone treatment at 6 ppm better decreased the concentration level of compound than 3 ppm. These results indicate that doses of 6 and 12 ppm appear to improve the water quality.

The biomarkers studied on freshwater mussels exposed to different conditions showed that no effects were observed on hemocytes viability, phagocytosis activity, lysozyme activity

and COX activity. Indeed, among all the biomarkers used only hemocytes count, nitrite level and DNA damage were affected by a few exposure conditions.

In Le Gardeur waters, a significant difference of hemocytes cellularity between control and the 25% inf. and 25% eff. Oz. 3 ppm conditions was observed. We can suppose that this effect can be explaining by the presence of xenobiotics and pathogens in the influent and effluent. In fact, the studies of Gillis et *al*. (2014) and Jasinska et *al*. (2015) observed that the number of bacteria pathogens increase in the wastewater. So they supposed that these bacteria in mixture with contaminants caused the decline in hemocytes count in freshwater mussels deployed directly in a wastewater discharge.

Moreover, in this site, the nitrite level increase significantly in the 25% inf. (3.76 ± 1.92 µg NO_2/mg prot.), 25% eff. (3.34 ± 2.34 µg NO_2/mg prot.), 25% eff. Oz. 3 ppm (3.59 ± 1.57 µg NO_2/mg prot.) and 25% eff. Oz. 6 ppm (2.55 ± 1.16 µg NO_2/mg prot.) compared to control (0.37 ± 0.14 µg NO_2/mg prot.). This response described inflammation that can also strengthen the potential presence of microorganisms. In this way, Le Gardeur is a WWTP using aerated lagoons where the microorganisms are important for the efficiency of the biologic treatment. Usually, ozone treatment is used to eliminate load microbial (Gehr et *al*., 2003). Taking into account our results, it is possible that the ozone doses used were not high enough to eliminate the load microorganisms presented in Le Gardeur exposure conditions. In this sense, the work of Gehr et *al*. (2003) showed that ozone treatment is effective on microorganisms only at 20 $mg.L^{-1}$ whereas the dose applied in the WWTP is more between 1 and 10 $mg.L^{-1}$ (Margot, 2011).

Results obtained on DNA damage show a significant difference between the condition 25% inf. and control. This disturbance can be induced by the presence of free radicals and oxidative stress caused by the contaminants in the wastewaters (Draz et *al*., 2009; SanJuan-Reyes et *al*., 2015).

In Ile Lebel waters, a significant increase of nitrite level was observed between the control and the 25% eff. and 25% eff. Oz. 6 ppm conditions. Then, nitrite level tends to decrease with ozone at 12 ppm suggesting that this ozone dose could decrease the inflammation and probably decrease the microbial load in water.

Moreover a significant decrease of DNA damage was noted according to the increased ozone doses used. This result shows that the ozone treatment sign an improvement and therefore that the ozone levels used on the Ile Lebel effluent limits the DNA damages for the freshwater mussel. Gagné et *al*. (2011) also showed that additional ozone treatment on effluent have an effect on DNA damage because they observed that DNA strand breaks in gills of freshwaters decrease with the ozone dose.

In this study, we observed that the Ile Lebel influent seemed less toxic than the effluent contrarily in Le Gardeur. We can assume that the treatment used to Ile Lebel releases compounds trapped in the mud or suspended solids (Clara et *al*., 2004; Göbel et *al*., 2007; Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009; Durán-Álvarez et *al*., 2012). This phenomenon then making the effluent more concentrated than the influent and probably more toxic for the freshwater exposed. Our hypothesis seems to be consistent with the data in Table 1, where we observed that concentrations measured in the 25% eff. condition are higher than those of 25% inf. condition.

Finally, wastewater are composed of organic and inorganic compounds but also microorganisms that will create a complex mixture (Farcy et al, 2011;. Petrovic et al, 2014. Dong et al,

2015) may have different effects on hemocytes of freshwater mussels and making interpretation biological analyzes difficult.

5. Conclusion

This *in vivo* study on the responses of freshwater mussels (*Elliptio complanata*) exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment shows that the ozone dose used aren't toxic for these aquatic organisms. Most of the biomarkers used showed no detectable effects. The others evidenced that ozonized effluents were less toxics than untreated influents or effluents. In fact, the ozone doses of 6 and 12 $mg.L^{-1}$ seem to greatly improve the quality of water.

Lastly, we found that ozone could reduce the microbial load and contaminant concentrations. If treatment was implemented in WWTP could avoid massive discharges of pollutants and microorganisms in the environment and improve water quality.

Acknowledgments

This work is a contribution to the Canada Research Chair in Environmental immunotoxicology. The authors are grateful to Christian Boulanger, Asselin Benoît and Laporte Antoine for providing access to wastewater treatment plants Ile Lebel and Le Gardeur, and Mireille Blais for transportation and ozonation of wastewaters. The authors thank Chantal André and Joëlle Auclair for assisting during the dissections.

4. Exposition *in vivo* de *Corbicula fluminea* à des composés pharmaceutiques seuls et en mélange avec des pesticides.

4.1. Introduction

Les 3 précédentes études étaient sur *Elliptio complanata* qui est un organisme d'eau douce originaire de l'Est de l'Amérique du Nord et qui est largement retrouvé au Québec. Nous allons alors voulu étudier les effets des psychotropes sur une espèce d'eau douce retrouvée en Europe et surtout dans les eaux de l'estuaire de la Gironde ; la palourde asiatique (*Corbicula fluminea*) (description **Chapitre 2. Section 7.2**).
La palourde asiatique est un modèle biologique souvent utilisé pour des études écotoxicologiques en laboratoire et sur le terrain pour évaluer les effets toxiques des métaux, des produits pharmaceutiques ou encore des pesticides (Baudrimont et *al*., 1997 ; Cooper et Bidwell, 2006 ; Arini et *al*., 2014 ; Aguirre-Martinez et *al*., 2015 ; Bonnafé et *al*., 2015).

Cette dernière étude a été menée afin d'observer l'impact de certains psychotropes seuls ou en mélange avec des pesticides ou d'autres médicaments sur la palourde asiatique. Les composés et les concentrations étudiés ont été choisies à partir des études de suivi de contamination de médicaments et de pesticides, qui ont été menées dans l'estuaire de la Gironde (Capdeville, 2011 ; Belles, 2012 ; Aminot, 2013 et Cruz, 2015).
L'objectif de cette étude était :

- d'évaluer l'impact toxique de psychotropes individuels et en mélange avec de pesticides et d'autres médicaments sur des réponses moléculaires et cellulaires chez la palourde asiatique.

4.2. Matériels et méthodes

Pour ce travail, des palourdes ont été exposées à 5 conditions expérimentales différentes pendant 14 jours. Deux conditions contenant 2 psychotropes seuls, la Carbamazépine et la Gabapentine, à des concentrations représentatives de l'environnement ou des rejets de STEP. Ensuite, deux conditions mélange ont été testées, une contenant de la Carbamazépine et 3 pesticides (S-Métolachlore, Métolachlore acide sulfonique (ESA) et Métolachlore acide oxanilique (OA)) et l'autre de la Carbamazépine, 1 antiviral et 1 anticancéreux (Abacavir et Cyclophosphamide) (**Figure V-5**).
La Carbamazépine et la Gabapentine sont des antiépileptiques qui sont retrouvés à des concentrations non négligeables (supérieures à la dizaine de $ng.L^{-1}$) dans les eaux de surface et dans les eaux usées (Togola et Budzinski, 2008 ; Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009 ; voir **Chapitre 4**).
Les deux mélanges ont été sélectionnés car ils sont constitués de composés qui sont retrouvés dans le milieu aquatique dont l'estuaire de la Gironde (Capdeville, 2011 ; Belles, 2012 ; Aminot, 2013 et Cruz, 2015). Enfin la dernière condition d'exposition est le témoin solvant contenant 0,01% d'acétonitrile qui est le solvant à partir duquel les solutions de contamination ont été préparées (**Figure V-5**).

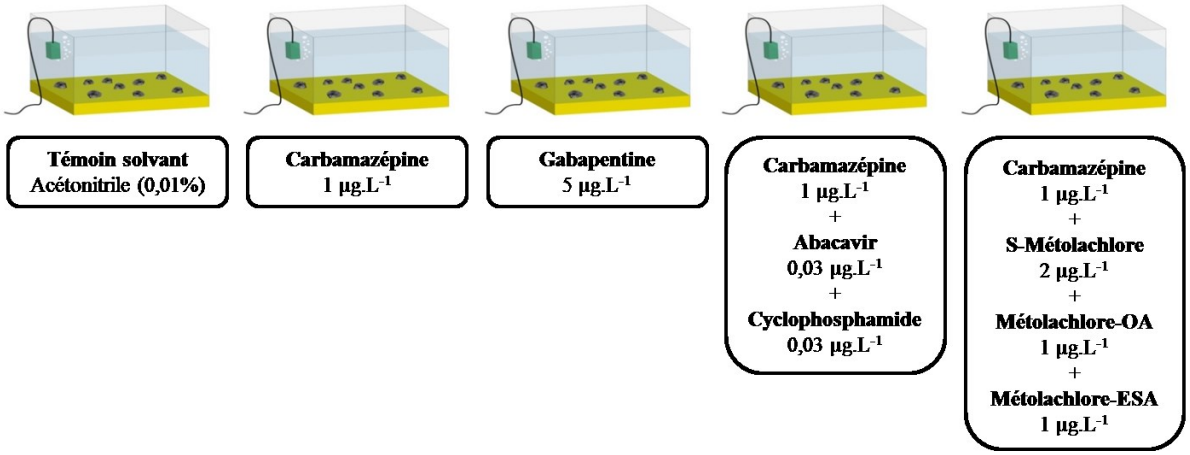


Figure V-5. Présentation des 5 conditions testées lors de l'exposition *in vivo* avec la concentration des psychotropes testés individuellement et en mélange avec des pesticides et d'autres médicaments.

Chaque unité expérimentale contient 40 L d'eau du robinet (déchlorée), 3 cm de sable ultra-pure (ISQAL, de 0,8 à 14 mm) pour l'enfouissement des palourdes, un système d'aération et 95 *Corbicula fluminea*. De plus, il a été mis à l'intérieur de chaque aquarium un revêtement plastique (polyéthylène) afin d'éviter l'adsorption des contaminants sur les parois. La température de l'eau des bacs a été maintenue à 15°C et la photopériode a été fixée selon une alternance lumière/obscurité de 12h/12h.

Les organismes ont été exposés par voie directe, pendant 14 jours, à différentes conditions expérimentales. Un système de contamination en continu, utilisant un pousse seringue multicanaux, a permis de maintenir la contamination constante pendant toute la durée de l'expérience, en tenant compte d'un renouvellement quotidien de 50% du volume total d'eau des unités expérimentales.

A T0, T3, T7 et T14 jours, des palourdes ont été retirées de chaque unité expérimentale pour en prélever les branchies et la masse viscérale. Cinq réplicats par condition ont été réalisés ; chaque réplicat était constitué de 2 individus. Les deux organes prélevés ont permis de doser les métallothionéines et d'étudier l'expression génique de 6 gènes d'intérêts.
Enfin, tous les jours, un prélèvement d'eau de chaque condition d'exposition a été effectué, permettant de suivre la concentration exacte des contaminants utilisés.

Chez les organismes aquatiques, en présence d'un stress oxydatif, plusieurs mécanismes de détoxification comme les métallothionéines (MT) ou des enzymes antioxydantes (la Catalase (CAT), les Superoxydes dismutases (SOD) et la Glutathion S-transférase (GST)) vont être mises en place pour réguler le niveau d'ERO dans la cellule (Deisseroth and Dounce, 1970; Ketterer et *al*., 1983; Fridovich, 1989; Bigot et *al*., 2011).
Les MT sont des protéines impliquées dans l'homéostasie cellulaire mais aussi dans la détoxication des métaux essentiels et non-essentiels (Baudrimont et *al*., 2003 ; Bigot et *al*., 2009). La synthèse de cette protéine peut aussi être induite par différents facteurs environnementaux (Amiard et *al*., 2006 ; Quinn et *al*., 2011) et par d'autres polluants comme les composés phar-

maceutiques, les hormones ou encore les pesticides (Cooper et Bidwell, 2006 ; Schmidt et *al*., 2011 ; Aguirre-Martinez et *al*., 2015). Les MT sont alors impliquées dans la protection contre les dommages oxydatifs qui vont être induits par ces différents stress (Stegeman et *al*., 1992).
De manière générale, les polluants (organiques et inorganiques) et les différents stress environnementaux (pH, température, etc…) peuvent perturber l'expression des gènes de cette protéine de détoxication et des enzymes antioxydantes citées précédemment.
Enfin l'expression des gènes (*coxI* et *12s*) qui caractérisent les dommages affectant le métabolisme mitochondrial, qui peut être impacté lors d'exposition à des contaminants.

Par conséquent, ces biomarqueurs ont été employés dans le cadre de notre étude pour évaluer les effets d'une exposition à des psychotropes seuls ou mélange avec des pesticides et d'autres médicaments sur *Corbicula fluminea*.

4.3. Principaux résultats et discussion

L'analyse chimique par LC-MS/MS des eaux des 5 unités expérimentales a permis de déterminer la concentration réelle des composés auxquelles ont été exposées les palourdes asiatiques (**Tableau V-9**).

Tableau V-9. Concentrations (µg.L^{-1}) des composés utilisés dans les conditions d'exposition (n=14, moyenne ± E-T).

Composés	Conditions d'exposition			
	Carbamazépine	Gabapentine	Mélange 1	Mélange 2
	µg/L			
Carbamazépine	1,3 ± 0,2	-	0,29 ± 0,096	2,0 ± 0,5
Gabapentine	-	2,8 ± 0,4	-	-
Abacavir	-	-	0,01 ± 0,008	-
Cyclophosphamide	-	-	0,03 ± 0,005	-
S-Métolachlor	-	-	-	1,6 ± 0,4
Métolachlor-ESA	-	-	-	1,1 ± 0,3
Métolachlor-OA	-	-	-	1,2 ± 0,2

La condition « Témoin solvant » n'est pas présentée dans le tableau car aucun des contaminants analysés n'y a été trouvé.

Les concentrations mesurées dans les unités expérimentales contenant les composés individuels sont du même ordre de grandeur que les concentrations visées. Même si la concentration mesurée (2,8 ± 0,4 µg.L^{-1}) de la Gabapentine est légèrement plus faible que celle visée (5 µg.L^{-1}), elle reste tout de même proche de celle mesurée dans les effluents de STEP (Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009 ; voir **Chapitre 4**).
Dans le Mélange 1, les concentrations mesurées pour la Carbamazépine (0,29 ± 0,096 µg.L^{-1}) et l'Abacavir (0,01 ± 0,008 µg.L^{-1}) sont 3 fois plus basses que celles désirées alors que celle de la Cyclophosphamide est la même que celle ciblée. De même, dans le Mélange 2, les concentrations en pesticides visées sont proches de celles mesurées, alors que, pour la Carbamazépine il y a un facteur deux entre les deux concentrations.

Pour cette expérience, le choix d'utiliser un système de contamination continu a permis de maintenir le niveau de chaque contaminant constant tout au long de l'expérience. Ainsi les différences obtenues entre la concentration mesurée et celle visée pour certains composés, peuvent être dues à un problème lors de fabrication des solutions de contamination, par exemple, lors des micro-pesées des cristaux de composés.
Ces analyses chimiques montrent qu'il est nécessaire de doser l'eau contaminée des conditions d'exposition afin de connaitre les niveaux de concentrations réels des contaminants testés.

Concernant les résultats obtenus pour les MT, aucune variation statistiquement significative n'a été observée sur les niveaux de ces protéines dans les branchies et la masse viscérale des palourdes asiatiques, exposées aux contaminants seuls ou en mélange.

Les valeurs acquises sur l'analyse de l'expression des 6 gènes d'intérêt sont présentées dans le **Tableau V-10.**

Tableau V-10. Bilan des résultats obtenus pour l'expression des gènes dans les branchies et la masses viscéral des palourdes exposées.

	Expression des gènes dans les branchies					
	coxI	*12s*	*cat*	*sod(mt)*	*mt*	*gst*
Carbamazépine	/	/	/	/	/	/
Gabapentine	- T7	/	/	/	+ T3	/
Mélange 1	- T7	/	/	/	/	/
Mélange 2	- T7	/	/	/	/	/

	Expression des gènes dans la masse viscérale					
	coxI	*12s*	*cat*	*sod(mt)*	*mt*	*gst*
Carbamazépine	/	/	/	/	/	/
Gabapentine	+ T14	/	+ T14	+ T14	/	/
Mélange 1	+ T14	- T14	/	+ T14	/	/
Mélange 2	/	- T7 ; T14	/	/	- T7 ; T14	/

Même si aucune fluctuation n'a été observée au niveau des concentrations de MT, une réponse significative a été observée sur l'expression du gène *mt* dans les branchies des palourdes exposées à la condition Gabapentine, après 3 jours d'expérience. De même, dans la masse viscérale des palourdes prélevées à T7 et T14 dans le Mélange 2. Ceci peut être expliqué par un décalage entre les réponses de l'ARNm et de la protéine. En effet, il existe des régulations post-traductionnelles qui peuvent décaler, dans le temps, la réponse sur la protéine. Il faudrait peut-être augmenter le temps d'exposition pour voir des effets sur la concentration des métallothionéines.

Des fluctuations dans l'expression des gènes étudiés ont été constatées dans les branchies et la masse viscérale des palourdes exposées à la Gabapentine, au Mélange 1 (Carbamazépine + 2

autres médicaments) et au Mélange 2 (Carbamazépine + 3 pesticides). Cependant, la contamination à la Carbamazépine seule n'a engendré aucun effet sur l'expression génique des individus exposés.

Les branchies sont les premières voies d'entrée des contaminants dans l'organisme, en raison de leur grande surface d'échange en contact direct avec l'environnement. La première variation est observée dans l'expression du gène *mt*, au bout de 3 jours, dans les branchies des palourdes asiatiques exposées à la Gabapentine. Cependant, cet effet n'est pas prolongé dans le temps. Il est possible qu'il y ait eu une adaptation de l'organisme face à ce contaminant.
Toujours dans les branchies, une répression du gène *coxI* est observée au bout de 7 jours d'exposition dans les conditions Gabapentine, Mélange 1 et Mélange 2. Ceci montre une perturbation du métabolisme mitochondrial en présence de ces contaminants, cependant elle ne persiste pas dans le temps.

La masse viscérale a un rôle de détoxication et est le principal site d'absorption des xénobiotiques (Bigot et *al*., 2009). Au bout de 7 jours d'expérience, le gène *12s* est réprimé chez les organismes exposés au Mélange 1 et au Mélange 2. Ce résultat souligne une diminution du nombre de mitochondries et probablement des atteintes du métabolisme mitochondrial par les ERO. Cette répression perdure jusqu'au 14ème jour d'exposition pour la condition Mélange 2, ainsi la cellule n'arrive pas à réguler la perturbation induite par la contamination au mélange Carbamazépine + 3 pesticides. Toujours dans cette condition, le gène *mt* est lui aussi réprimé à T7 et T14. Ce profil transcriptomique nous permet de dire qu'en mélange avec le S-Métolachlore et ses deux métabolites, la Carbamazépine est toxique à des concentrations environnementales. Les travaux de Mai et *al*. (2014) montrent aussi une répression des gènes *12s* et *mt* chez les embryons d'huître creuse (*Crassostrea gigas*) exposés au S-Métolachlore et au Métolachlore-ESA, à des concentrations environnementales. Nos résultats sont alors cohérents avec les observations de Mai et al. (2014) cependant, nous ne pouvons pas conclure si les réponses observées sont dues seulement aux pesticides ou au mélange des différents polluants produisant un effet additif.
Enfin, dans la masse viscérale des palourdes exposées aux conditions Gabapentine et Mélange 1, une surexpression significative des gènes *sod(mt)* et *coxI* est observée après 14 jours d'exposition. Ceci peut être expliqué par la lutte de la cellule contre les effets des polluants, en mobilisant ces mécanismes de défenses. Ainsi, le stress subit par la cellule induit une augmentation de la demande d'énergie pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Donc, pour répondre à cette demande et surmonter ce stress oxydatif, la cellule réprime ces deux gènes.
De ce fait, les cellules de palourdes exposées à ces deux unités expérimentales mettent en place un mécanisme compensatoire après 14 jours d'exposition, sûrement en réponse à la présence d'ERO.

Notre étude montre que la Gabapentine et le mélange « Carbamazépine + Abacavir + Cyclophosphamide » ont un effet toxique à T7 sur les palourdes exposées cependant, un mécanisme de détoxication est mis en place à T14 par les cellules afin de lutter contre la contamination. De plus, ces travaux montrent que le mélange « Carbamazépine + S-Métolachlore + Métolachlore-

OA + Métolachlore-ESA » est la condition d'exposition ayant les effets biologiques les plus forts sur les palourdes exposées, car les cellules des individus ne sont pas en mesure de surmonter les effets toxiques du mélange au cours des 14 jours d'exposition.

Pour conclure, ce travail prouve que les composés testés à des concentrations environnementales ont un impact toxique sur les organismes aquatiques. Plusieurs effets ont été observés sur l'expression génique chez les palourdes exposées à la Gabapentine, qui est un antiépileptique quantifié dans l'environnement à des concentrations non négligeables (Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009 et résultats **Chapitre 4**). Cependant, il faut noter qu'aucune variation génique significative n'a été observée pour la Carbamazépine testée individuellement alors qu'en mélange avec des pesticides ou d'autres médicaments, un stress oxydatif et des effets sur le métabolisme mitochondrial ont été identifiés. Cette étude montre donc l'intérêt d'étudier les effets mélange des contaminants sur les organismes aquatiques, comme ce qui peut être retrouvé dans l'environnement, afin d'envisager des possibles effets additifs, synergiques ou antagonistes (Cleuvers et al, 2003; Quinn et al, 2009).

4.4. Publication 4

Molecular and cellular responses of *Corbicula fluminea* after contamination with pharmaceuticals and pesticides.

Authors: J. Pédelucq [a, b], P. Gonzalez [c], M. Baudrimont [c], C. Tissandier [c], H. Bijoux [b], C. Daffe [c], P. Mazellier [b], M. Fournier [a], H. Budzinski [b]

[a] Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier (INRS-IAF), 31 Des Prairies Blvd., Laval, Quebec, Canada H7V 1B7
[b] Université de Bordeaux, EPOC-LPTC, UMR 5805, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France
[c] Université de Bordeaux, EPOC-EA, UMR CNRS 5805, Place du Dr B. Peyneau, 33120 Arcachon, France

Abstract

This study aims to evaluate the molecular and cellular responses of Asian clam (*Corbicula fluminea*) after exposure to gabapentin and carbamazepine alone and mixed with others pharmaceuticals (abacavir and cyclophosphamide) and pesticides (S-metolachlore, metolachlore-ESA and metolacholre-OA). No effect was observed in the carbamazepine condition but several responses on the gene expression were analyzed when it was mixed with others pharmaceuticals or pesticides. Gabapentin and "carbamazepine + others pharmaceuticals" conditions induced a disturbance of mitochondrial metabolism to T7 but that is compensated after the 14 days of exposure. "Carbamazepine + 3 pesticides" condition induced suppression of mitochondrial metabolism genes to T7 and T14 so the cell cannot fight against this contamination. This study shows the importance of studying the effects of contaminants when they are mixed.

Keywords : *metallothionein; gene expression; Corbicula fluminea; mixture of contaminants.*

1. Introduction

Water contamination by organic compounds as pharmaceuticals and pesticides has been demonstrated by several studies (Kummerer et *al*., 2009; Lapworth et *al*., 2012; Caldas et *al*., 2015; Gonzalez-Rey et *al*., 2015). The massive use of pesticides and their increasing detection in the environment lead to the establishment of strict rules to minimize their impact (Herrero-Hernandez et *al*., 2013). The pharmaceuticals are continually introduced into the receiving environment by the wastewater treatment plant (WWTP) (Kummerer, 2001), because the applied treatments are inefficient for the elimination of this pollutant group (Ternes, 1998; Petrović et *al*., 2003). In consequence a wide spectrum of compounds belonging to several therapeutic families were detected in aqueous compartments at concentrations from $ng.L^{-1}$ to $\mu g.L^{-1}$ range (Devier et *al*., 2013; Peysson and Vulliet, 2013; Ferrer and Thurman, 2012; Petrović et *al*., 2014).
Several studies have also shown that these compounds can be toxic for aquatic organisms even at environmental concentrations (DeLorenzo et *al*., 2001; Santos et *al*., 2010; Boxall et *al*., 2012;

Papadakis et *al*., 2015). They can therefore become potentially problematic for the human health and the quality of the environment.

Bivalves are often used to assess the quality of the aquatic environment. They are sedentary and filter large amounts of water for respiratory and nutritional needs. The Asian clam *Corbicula fluminea* is a freshwater specie and can be considered as a good model organism because it is very widespread, abundant and it can be easily kept in laboratory conditions. In addition, *C. fluminea* has been used in several studies to assess the toxic impact of metals, pharmaceuticals or pesticides (Doherty, 1990; Baudrimont et *al*., 1997; Cooper and Bidwell, 2006; Bigot et *al*., 2011; Chen et *al*., 2014; Aguirre-Martinez et *al*., 2015).

In the presence of contaminants, aquatic organism's cells can produce Reactive Oxygen Species (ROS). In response to this oxidative stress, several detoxification mechanisms exist to regulate the level of ROS (Hermes-Lima, 2005) such as metallothionein (MT) and antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) or glutathione S-transferase (GST) (Deisseroth and Dounce, 1970; Ketterer et al., 1983; Fridovich, 1989; Bigot et *al*., 2011). At the DNA level, both *12s* and *coxI* genes also allow to characterize the damage affecting the mitochondrial integrity and thus respiratory metabolism (Wang et *al*., 2004).

The objective of this study was to determine the molecular and cellular responses of Asian clam after exposure to gabapentin and carbamazepine alone but also mixed with others pharmaceuticals (abacavir and cyclophosphamide) and pesticides (S-metolachlore, metolachlore-ESA and metolacholre-OA). Concentration of MTs and possible gene (*12s*, *coxI*, *cat*, *gst*, *sod(mt)* and *mt*) expression alteration were analyzed in gills and visceral mass of clams exposed. In addition, a chemical analysis of waters in each condition were performed by LC-MS/MS to determinate the presence of psychotropic drugs and their concentration level.

2. Materials and Methods

2.1 Pharmaceuticals solutions

All pharmaceuticals (gabapentin, carbamazepine, abacavir and cyclophosphamide) and pesticides (S-metolachlore, metolachlore-ESA and metolacholre-OA) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The concentrations of compounds used in this *in vivo* study are those that can be found in the surface water, effluent WWTP and influent WWTP. The compounds used for the two mixtures are those classically found in the waters of the Gironde Estuary.

All compounds were solubilized in acetonitrile (ACN) and the final concentration of the solvent was 0.01%. A solvent control was included in the experiment. The stock solutions used for each condition were stored at -20°C.

2.2 Clam handling and exposure

Asian clam were collected in the Cazaux-Sanguinet lake (Aquitaine, South West France), a place which is not subjected to any sources of pollution. Once in the laboratory, the animals were acclimatized during 3 weeks in tap water (15°C) previously dechlorinated and supplied with constant aeration. The clams were fed once a week with green algae (*Scenedesmus subspicatus*) only during the acclimatization and exposure period.

The experiment was conducted in laboratory using glass aquaria of 60cm×50cm×40cm filled with 40 L of tap water dechlorinated aerated by a diffuser system. A 3 cm layer of ultra-pure

sand (SilaQ, 0.8-14 mm) allowed the clams to bury. Plastic coverings (polyethylene) were placed over inside walls to avoid contamination and to minimize adsorption on walls. The temperature was fixed at 15°C and the photoperiod was fixed at 12 h using a timer and artificial light sources. Five experimental units (EUs) were used for each exposure condition with 95 animals (20-30mm length) per EU: Control ACN; carbamazepine; gabapentin; Mixture 1 (carbamazepine + abacavir + cyclophosphamide); Mixture 2 (carbamazepine + S-metolachlore + metolachlore-ESA + metolacholre-OA). The concentrations of compounds tested are represented in the Table 1.

Table 1. Characteristic and targeted concentrations of compounds used in this study.

Compounds	CAS number	Family	Class	Mass (g/mol)	Targeted concentration (µg/L)		
					Compound tested alone	Mixture 1	Mixture2
Carbamazepine	298-46-4	Pharmaceuticals	Antiepileptic	236.3	1	1	1
Gabapentin	60142-96-3	Pharmaceuticals	Antiepileptic	171.2	5	-	-
Abacavir	136470-78-5	Pharmaceuticals	Antiretroviral	286.3	-	0.03	-
Cyclophosphamide	6055-19-2	Pharmaceuticals	Anticancer	261.1	-	0.03	-
S-Metolachlor	87392-12-9	Pesticide	Chloroacetamine	283.8	-	-	2
Metolachlor-ESA	947601-85-6	Pesticide	Chloroacetamine	351.4	-	-	1
Metolachlor-OA	152019-73-3	Pesticide	Chloroacetamine	279.3	-	-	1

Metolachlor-ESA (metolachlor ethane sulfonic acid); Metolachlor-OA (metolachlor oxanilic acid)

A permanent flowing system was set-up using a clean water tank of 350 L and peristaltic pumps. Uncontaminated and dechlorinated water was then delivered in the 5 EUs. An overflow system maintained a stable volume so that 50% of the total volume was renewed daily. Contaminated waters have been transferred to another EU using another peristaltic pump where it was cleaned by passing through activated carbon before being discharged into the sewage network.
The 5 EUs were contaminated with a continuous contamination system using a multichannel syringe pumps to keep the contamination pressure throughout the experiment, taking into account a daily replacement of 50% of the total volume of EUs water.

2.3 Sampling procedure

At each sampling time: 0 day (T0), 3 days (T3), 7 days (T7) and 14 days (T14), five replicates were taken from the EU. A replicate consists of two pooled clams (n = 10 per EU and per time). Animals were dissected in order to separate gills and visceral mass. Samples of gills and visceral mass were stored in microtubes filled of RNA-latter at -80°C for the genetic analyses and -20°C under nitrogen atmosphere for metallothionein analyses.

2.4 Chemical analysis

Every day of the experimentation, a water sample was taken from each EU and stored at -20°C. Two analytical procedures were used on these samples for the chemical characterization. One for the analysis of antiepileptics (carbamazepine), antiretroviral (abacavir) and anticancers (cyclophosphamide) using a LC (liquid chromatography) Agilent Technologies 1200 HPL system coupled to an Agilent Technologies 6410 triple quadrupole mass spectrometor equipped with an electrospray ionization (ESI). The chromatographic separation was achieved with an Agilent Zorbax SB-C18 column (50 x 2.1 mm, 1.8 µm). Another one for the pesticides (S-metolachlore, metolachlore-ESA and metolacholre-OA) using a HPLC (High Performance Liquid Chromatog-

raphy) infinity (Agilent 1290) coupled to mass spectrometer detector (Agilent 6460). The chromatographic separation was achieved with a Kinetex C18 column (100 × 2.1 mm; 1.7µm).
Instrumental blanks were performed between each sample in order to prevent any contamination. The instrumental method was validated through estimation of linearity, repeatability and sensitivity.

2.5 Metallothionein quantification

The levels of total MT proteins in the gills and the visceral mass (50 to 150 mg) were determined by mercury-saturation assay using cold inorganic mercury (Dutton et *al*., 1993 ; Baudrimont et *al*., 2003). This method is based on the quantification of Hg bound to the saturated MTs. The tissues were crushed (T10-IKA Ultra-Turrax) and homogenized under a nitrogen atmosphere on ice with 1 mL of 25 mM Tris-HCl buffer (Sigma-Aldrich, pH 7.2 at 20°C) to liberate MT proteins in the soluble fraction. After centrifugation (1h ; 20 000 g ; at 4°C), 200 µL of supernatant were transferred into 1.5 mL microtube and supplemented by 200 µL of $HgCl_2$ solution (Merck) at 50 mg $Hg.L^{-1}$ in 10% of TCA, in order to saturate MTs with Hg and to precipitate high molecular proteins. After 10 min of incubation at room temperature, the excess of Hg not bound to the MTs was scavenged with 400 µL of a porcine haemoglobin solution (1g of porcine lyophilized hemoglobin (Sigma-Aldrich) prepared in 40 mL of 30 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2, at 20°C) and rapidly centrifuged at 20 000 g for 20 min to precipitate it. The final supernatant containing the metallothionein fraction was then quantitatively recovered for indirect analysis of MT. Analyses were conducted on each organ on five replicates per times and per exposure conditions, the saturation assay being repeated twice per replicate. Three references samples (blanks) were also prepared to monitor the Hg complexation efficiency of the hemoglobin. Likewise, three samples of purified rabbit liver MT (Alexis biochemicals ALX-202-071) were prepared as described above to determine a recovery percentage. Hg concentrations were measured by flameless atomic absorption spectrometry (AMA 254, Altec, Prague, Czech Republic) with a detection limit of 0.01 ng Hg. MT concentrations in *Corbicula fluminea* samples were expressed in nmol Hg binding sites/g of fresh weight (FW). The mean of the three blank values at each analytical run was deducted from the Hg burdens measured in each sample.

2.6 Genetic analysis

2.6.1 Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from 20-40 mg of gills and visceral mass (n=5 per exposure conditions and per times), using the “Absoluty RNA Miniprep Kit” (Agilent), according to the manufacturer’s instructions. 14µL (3-5 µg) of total RNA were used for the reverse transcription of RNAs using the Stratascript First-Strand Synthesis System (Agilent) according to the manufacturer’s instructions. The cDNA samples were conserved at -20°C until real-time PCR amplification was performed.

2.6.2 Real-time quantitative PCR

Real-time PCR reactions were performed in a Stratagene MX 3000P, using Brillant III Ultra fast SYBR green QPCR Master Mix (Agilent) according to the manufacturer’s instructions and specific primer-pairs for each studied gene (Table 2). The amplification program began by one cycle at 95°C for 10 min, then 40 amplification cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C. Cycle thresholds (C_t) were obtained with MxPro-Mx3000P software (Stratgene 2007). Relative

quantification of each gene expression level was normalized according to the β-actin gene expression. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method as described by Livak and Schmittgen (2001). ΔC_t represents the difference between the cycle threshold (C_t) of specific gene and the cycle threshold of the β-actin. Mean Fold Induction of gene expression was calculated between each exposure condition and its respective control when significant differences of expressions were obtained following this equation:

$MFI = 2^{-\Delta Ct \text{ exposure condition}} / 2^{-\Delta Ct \text{ control}}$

Table 2. Functions, accession numbers and specific primer pairs of genes used.

Gene	Accession number	Function	Sequence 5'- 3'
β-actin	A4L694	Reference	CCTTTACCACAACAGCCGA[a] AGCATAGCCTCAGGGCA[b]
coxI	AF20666	Mitochondrial metabolism	GTTGAGATGGTGCTGGG[a] TGTAGTCCGAATTAGCTTTTGCG[b]
12s	EF446612	Mitochondrial metabolism	AGCATTACTATGTTACGACTTACCTCA[a] AGTTCAGGTAGACGTGTAGGG[b]
cat	A4L695	Oxidative stress	CCTTCAGTGCGTAGTCTGG[a] CCTGTTCTCTGACCGTGG[b]
sod(mt)	A4L697	Oxidative stress	CTGTAGGTAGTAAGCGTGCTCC[a] GGATCATTTGACGAGATGAAGGC[b]
mt	A2IB16	Detoxification	CGGCTATCTCCCGCGA[a] AGCTTTTACCAGAACCAAACAGT[b]
gst	A4L696	Metabolization	GCCAGGCTATCCGCTATCT[a] TGTCCACCTTTAGGGCCTC[b]

[a] Forward primer
[b] Upstream primer

2.7 Statistical analysis

The data were expressed as mean ± standard deviation (*n* = 5 pools of 2 clams). Statistical analysis was carried out using the XL-Stat software (Addinsoft 2013). A non-parametrical Kruskal-Wallis test was performed to identify groups that differed significantly from solvent control. Significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Chemical analysis

The chemical analyses of the water sampled in the different EUs are presented in the Table 3.

The measured concentrations of the compounds individually tested are similar to the targeted concentrations. The concentration of gabapentin is slightly lower, 2.8 ± 0.4 $\mu g.L^{-1}$ instead of 5 $\mu g.L^{-1}$, but corresponds to concentration level found in the environment or in WWTP effluent (Kasprzyk-Hordern et *al*., 2009).

In Mixture 1, the measured concentrations of carbamazepine and abacavir are three times lower than expected whereas the concentration of the cyclophosphamide fits with the targeted levels.

In Mixture 2, the concentration calculated of carbamazepine is twice greater than targeted one, 2.0 ± 0.5 µg.L^{-1} instead of 1 µg.L^{-1}, whereas the concentrations of the pesticides correspond to those referred previously.

Table 3. Mean concentrations of the test compounds measured in each experimental unit.

Compounds	Exposure conditions			
	Carbamazepine	Gabapentin	Mixture 1	Mixture 2
	µg/L			
Carbamazepine	1.3 ± 0.2	-	0.29 ± 0.096	2.0 ± 0.5
Gabapentin	-	2.8 ± 0.4	-	-
Abacavir	-	-	0.01 ± 0.008	-
Cyclophosphamide	-	-	0.03 ± 0.005	-
S-Metolachlor	-	-	-	1.6 ± 0.4
Metolachlor-ESA	-	-	-	1.1 ± 0.3
Metolachlor-OA	-	-	-	1.2 ± 0.2

3.2 Metallothionein response

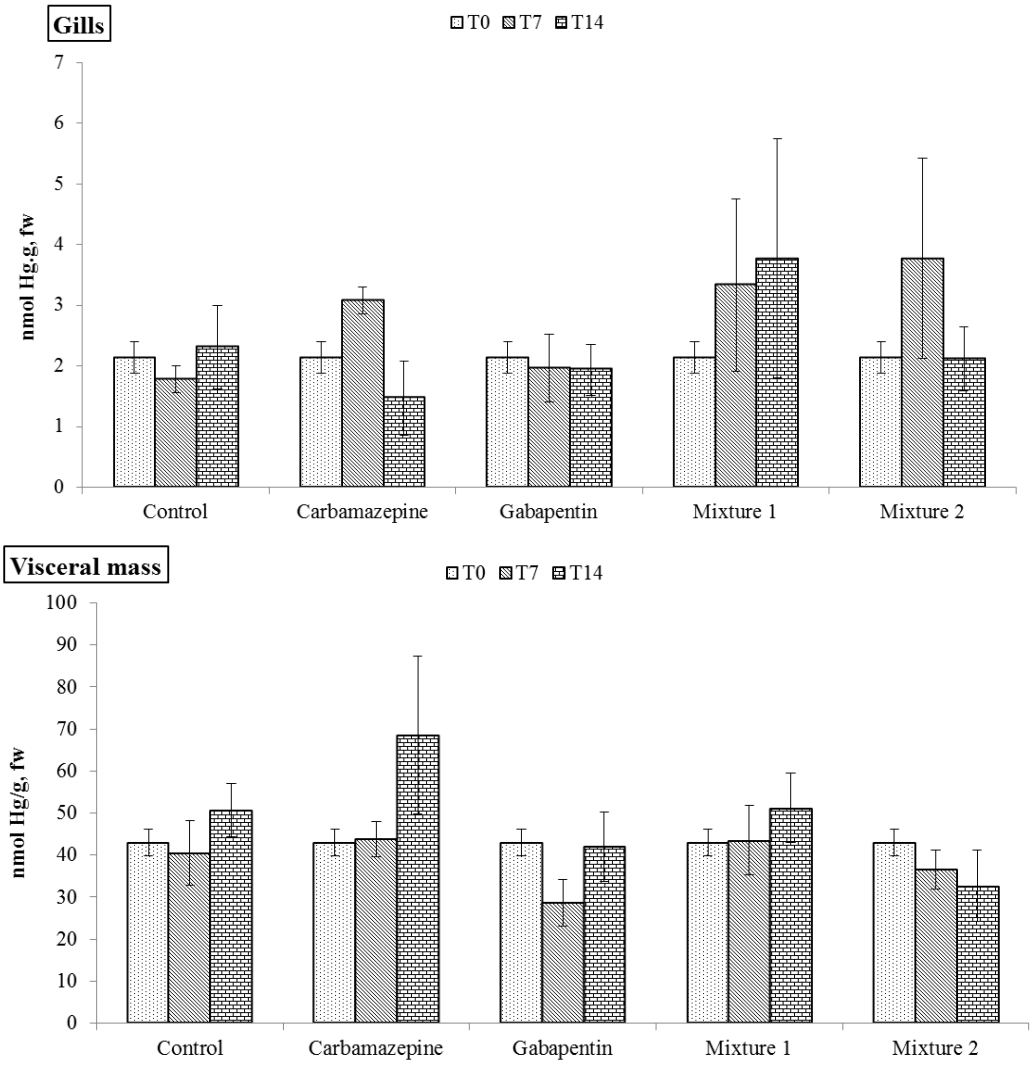


Figure 1. Metallothionein mean concentration measured in the gills and visceral mass (n=5, mean ± SD).

The Figure 1 presents the MTs concentrations in the gills and visceral mass of the exposed clams. For the analysis of MTs, only the times T0, T7 and T14 were used.

The MTs concentrations in the gills vary from 1.47 ± 0.61 (EU carbamazepine at T14) to 3.77 ± 1.97 nmol Hg/g, fw (Mixture 1 at T14). In visceral mass values are ranged from 28.61 ± 5.59 (EU gabapentin at T7) to 68.57 ± 18.74 nmol Hg/g, fw (EU carbamazepine at T14).

However, statistical analysis didn't show any effect of time or compounds on MTs concentration in the two organs.

3.3 Gene expression

Tables 4 and 5 present the differential gene expression observed in gills and visceral mass of *Corbicula fluminea*.

In the gills and visceral mass of clams exposed to Carbamazepine no significant fluctuation of the expression of the 6 genes studied was observed.

In the gills, after 3 days of exposure to Gabapentin, a significant induction of gene *mt* (4.5) was observed. In the EUs of Gabapentine, Mixture 1 and Mixture 2, a significant repression of gene *coxI* was noticed in clams after 7 days of exposure. But no response of genetic expression was measured at time T14.

Table 4. Differential gene expression observed in gills of Asian clams exposed to different EUs.

Metabolic function	Genes	Carbamazepine			Gabapentin			Mixture 1 (Carbamazepine + Abacavir + Cyclophosphamide)			Mixture 2 (Carbamazepine + S-Metolachlor + Meto. ESA + Meto. OA)		
Gills		T3	T7	T14	T3	T7	T14	T3	T7	T14	T3	T7	T14
Mitochondrial metabolism													
	coxI	/	/	/	/	0.02	/	/	0.01	/	/	0.02	/
	12s	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Oxidative stress													
	cat	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	sod(mt)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Detoxification													
	mt	/	/	/	4.5	/	/	/	/	/	/	/	/
Metabolization													
	gst	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Results are given as significant induction (> 1) or repression (< 1) factors as compared to control clams. "/": indicates no significant variation to control clams.

In the visceral mass, the first effect on the expression of genes studied was observed in the EUs of Mixture 1 and Mixture 2, after 7 days of exposure. The gene *12s* was repressed in the Mixture 1 (0.3) and Mixture 2 (0.2) and a repression of gene *mt* (0.2) was detected in the Mixture 2. Moreover, in the second mixture, the down-regulation of genes *12s* (0.1) and *mt* (0.1) persist until the fourteenth day of exposure.

In the EU of Gabapentin and Mixture 1, the genes *coxI* and *sod(mt)* were overexpressed after 14 days of contamination. Finally, a significant induction of the cat gene (6) was observed in the Gabapentin condition.

Table 5. Differential gene expression observed in visceral mass of Asian clams exposed to different EUs.

Metabolic function	Genes	Carbamazepine			Gabapentin			Mixture 1 (Carbamazepine + Abacavir + Cyclophosphamide)			Mixture 2 (Carbamazepine + S-Metolachlor + Meto. ESA + Meto. OA)		
Visceral mass		T3	T7	T14	T3	T7	T14	T3	T7	T14	T3	T7	T14
Mitochondrial metabolism													
	coxI	/	/	/	/	/	137	/	/	115	/	/	/
	12s	/	/	/	/	/	/	/	0.3	/		0.2	0.1
Oxidative stress													
	cat	/	/	/	/	/	6	/	/	/	/	/	/
	sod(mt)	/	/	/	/	/	11	/	/	7	/	/	/
Detoxification													
	mt	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.2	0.1
Metabolization													
	gst	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Results are given as significant induction (> 1) or repression (< 1) factors as compared to control clams. "/": indicates no significant variation to control clams.

4. Discussion

The main purpose of this study was to assess the biological response of *C. flumuinea* facing environmental relevant concentrations of organic contaminants. The studied pollutants were tested individually or in mixtures.

Organic compounds may however present unexpected chemical behavior (hydrolysis, complexation, degradation, photolysis, adsorption…). Monitoring their concentration in the different EU is therefore important, especially at such low levels which are technically challenging to maintain.

Thus, we can observe that for a few compounds like gabapentin or carbamazepine in Mixture 1, the targeted concentrations are not reached. That's why it is important to analyze the contaminated water of EUs, in order to identify the concentration levels that can potentially induce a response of the tested biomarkers.

One of these biomarkers is the concentration of MTs. The biological role of MTs in response to organic and inorganic compounds is a cell defense system against oxidative stress in which MTs are involved in ROS scavenging. Nevertheless, these proteins sensitive to the metal contamination can be induced by other environmental factors, such as hormones, cytotoxic agents, physical stress, inflammation (Kaïgi et *al*., 1991; Stegeman et *al*., 1992). The studies of Quinn et *al*. (2011) and Schmidt et *al*. (2011), showed that some pharmaceuticals (diclofenac and gemfibrozil) can induce MTs expression in the marine mussel (*Mytilus spp*.) and the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). In our study, the experimental concentrations tested have not induced a significant response on the MTs concentration. Nonetheless, the levels measured in gills and visceral mass of clams exposed are in agreement with the values found in the literature (Baudrimont et *al*., 2003; Arini et *al*., 2014). Perhaps by increasing the exposure time, effects would be observed on the level of MTs in gills and visceral mass of clams.

Despite the fact that no effect was detected on the concentration of these proteins, a response was observed for the *mt* gene in the gills at T3 in the gabapentin condition and in the visceral mass after 7 and 14 days of exposure to the condition Mixture 2. This can be explained by a discrepancy between mRNA and MT protein responses. There are post-translational regulations that will shift in time the answer on protein. Increasing the time of the experimentation would allow to see effects on the concentration of MTs.

The gills represent the first barrier involved in the absorption of compounds in the dissolved phase, by the direct exposure route, due to its large exchange area in direct contact with the environment. Indeed, the first effect on the genetic expression was after 3 days of exposure in the *mt* gene, ensuring detoxification mechanisms, in the gabapentin condition. Nevertheless this effect is not extended over time, suggesting a possible adaptation of the organism against this contaminant.

In the EUs Gabapentin, Mixture 1 and Mixture 2, the *coxI* gene was repressed in the gills of the clams exposed after 7 days of exposure. This result shows a disruption of mitochondrial metabolism in the presence of these contaminants but it does not continue until the 14th days of exposure.

The visceral mass is the major site of xenobiotic uptake and plays an important role in detoxification (Bigot et *al*., 2009). After 7 days of exposure, the repression of the *12s* gene further emphasizes the disturbance of the mitochondrial metabolism in clams exposed to the Mixtures 1 and 2. This result highlights the decreasing number of mitochondria and certainly the disruption of mitochondrial system by the potential ROS production. This repression is maintained until the 14th day of exposure in clams exposed to the Mixture 2 highlighting that cell cannot regulated the perturbation induced by the mixture of carbamazepine and the pesticides. In the same exposure condition, the *mt* gene is also repressed in clams collected at T7 and T14. These results show that carbamazepine mixed with S-metolachlor, metolachlor-ESA and metolachlor-OA at environmental concentrations is toxic to exposed individuals. The study of Mai et *al*. (2014) shows that S-metolachlor and metolachlor-ESA, individually tested at environmental concentrations, repressed *12s* (0.1) and *mt* (0.2) genes, in oyster embryos. Our results are consistent with the observations of May et al. (2014), however, we cannot conclude whether the observed responses are only due to pesticides or mixtures of different pollutants, producing an additive effect.

Different responses were observed in the visceral mass of clams exposed to gabapentin and Mixture 1. Indeed a significant overexpression of *sod (mt)* and *coxI* was observed after 14 days of exposure. This can be explained by the struggle of the cell against the impacts of the pollutants contained in the mixture. This stress causes increased energy demand for the functioning of the mitochondrial respiratory chain thus to meet demand and to overcome oxidative stress the cells overexpressing these genes.

Thereby the cells of clams exposed in these two EUs set up a compensatory mechanism to the 14th day of exposure in response to the potential presence of ROS and degradation of mRNAs observed in the gills at T7.

Our study show that gabapentin and the mixture carbamazepine + 2 antivirals have a toxic effect on the clams collected at T7 but a detoxification mechanism is set up after 14 days of exposure by the cells in order to face the pollutants effects. Moreover our results show that the mixture carbamazepine + 3 pesticides is the exposure condition with the strongest biological effects because the cells of the clams exposed are not able to overcome the deleterious effects of the mixture during 14 days of exposure.

At the time of exposure, other mechanisms are probably in place, but it is impossible to observe them with the number of genes available to us.

To conclude, this work proves that the compounds at environmental concentrations have a toxic impact on the aquatic organisms. Several effects were observed on the gene expression in clams exposed to Gabapentin which is an antiepileptic found in the environment at high concentrations (Kasprzyk-Hordern et al., 2009). In addition, it must be emphasized that no significant gene variation was observed for Carbamazepine individually whereas an oxidative stress and effects on mitochondrial metabolism have been identified when it is mixed with pesticides or antivirals. Therefor it is necessary to study the effects of contaminants in a mixture as found in the aquatic environment, to examine as possible additive, synergistic or antagonistic effects (Cleuvers et *al*., 2003; Quinn et *al*., 2009).

Acknowledgments

This study has been carried out with financial support from the “Région Aquitaine”, the ARS (Regional Health Agency Aquitaine), the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

5. Conclusion

Les bivalves ont le système immunitaire inné, constitué de processus de réponses cellulaires et humorales assurant toutes les fonctions de défenses de l'organisme. Le système immunitaire cellulaire est effectué uniquement par les hémocytes qui ont pour rôle majeur de phagocyter les particules étrangères. Les composantes humorales de l'immunité des bivalves sont composées de médiateurs chimiques appartenant au système neuroendocrine. Un de ces médiateurs est un réseau de cytokines (interleukine-1, 2, 6 et le TNF α (Tumor Necrosis Factor α)), influencé par des récepteurs d'opioïde, qui va jouer un rôle dans la coordination et la régulation des réponses immunitaires. La libération d'interleukine et du TNF α pendant l'inflammation peut alors réduire l'activité de la phagocytose. Le système neuroendocrine et immunitaire des bivalves seraient donc liés. Ainsi, les psychotropes pourraient moduler le système immunitaire des moules d'eau douce par l'intermédiaire de médiateurs chimiques du système neuroendocrine. C'est pourquoi certains biomarqueurs de l'immunité ont été étudiés dans ces différentes expositions aux psychotropes.

Exposition in vitro des hémocytes d'Elliptio complanata aux psychotropes individuels et en mélange.

Cette première expérience a été mise en place afin d'évaluer le potentiel immunotoxique de 9 psychotropes seuls ou en mélange. Ce test *in vitro*, facile d'utilisation et reproductible, a permis d'exposer les hémocytes de moule d'eau douce à plusieurs psychotropes et à de fortes concentrations sur de courtes durées.
L'exposition à des concentrations, de l'ordre du $mg.L^{-1}$ et même de la centaine de $mg.L^{-1}$, à la Carbamazépine, la Gabapentine, au Sulpiride, au Tiapride et à l'Amisulpride n'a engendré aucun effet sur le système immunitaire des hémocytes d'*Elliptio complanata*. La nature hydrophile de ces composés les rend peu biodisponible et donc moins toxique que les composés liposolubles comme la Venlafaxine, la Paroxétine, le Citalopram ou encore la Fluoxétine. En mélange, ces 9 psychotropes vont moduler les biomarqueurs de l'immunité testés à des concentrations plus faibles que lorsqu'ils sont exposés individuellement. Un effet mélange ou synergique des composés entre eux est alors possible. Même si les réponses du système immunitaire face à ces contaminants sont complexes, nous avons pu observer qu'il était impacté lors d'un stress chimique, et encore plus, quand les composés étaient en mélange.
Ce test *in vitro* a permis de justifier l'utilisation de biomarqueurs de l'immunité pour l'exposition *in vivo* d'organismes entiers aux psychotropes.

Exposition in vivo d'Elliptio complanata aux psychotropes individuels et en mélange.

A partir des résultats obtenus avec l'expérience *in vitro*, nous avons choisi d'exposer des moules d'eau douce à des composés seuls et en mélange, à des concentrations retrouvées dans les eaux usées de STEP et dans l'environnement. Bien que, le Citalopram et la Gabapentine aient eu des comportements contraires lors des expositions *in vitro*, de par leur nature hydrosoluble différente, elles ont toutes les deux engendré une réponse sur les biomarqueurs testés lors de cette exposition *in vivo*.

En plus d'être immunotoxique, les composés utilisés seuls ou en mélange ont un potentiel génotoxique sur les hémocytes de la moule d'eau douce.
Cette expérience montre que le Citalopram a des effets immunotoxiques et génotoxiques à une concentration de 100 ng.L^{-1} correspondant à des concentrations retrouvées dans les effluents urbains alors que la Gabapentine engendre des effets à une concentration environnementale de 250 ng.L^{-1}. Donc, même si la Gabapentine est une molécule très hydrophile, lorsqu'elle est utilisée sur les organismes entiers et sur un temps d'exposition long, elle est tout aussi toxique que le Citalopram qui est un composé liposoluble.
En mélange ces composés vont induire des effets sur les marqueurs testés, à des niveaux de concentrations pouvant être quantifiées dans les eaux de surface. Ainsi, ces molécules vont interagir entre elles pour produire une activité biologique et/ou toxique plus intense à des concentrations plus faible qu'en étant seules. On retrouve alors le même phénomène d'effet mélange ou synergie que dans l'étude *in vitro*.
Ceci suggère que dans l'environnement, où le mélange des contaminants est plus complexe, avec la présence de plusieurs familles de polluants, les effets toxiques sur le système immunitaire des bivalves pourraient être plus intense et avoir lieu à de plus faible niveaux de concentrations.

Exposition in vivo d'Elliptio complanata à des eaux usées avant et après ozonation.

Les résultats des expériences précédentes ont montré qu'en mélange les psychotropes avaient un potentiel immunotoxique et génotoxique sur les hémocytes de moules d'eau douce (*Elliptio complanata*). De plus, ces deux études ont permis de constater qu'en mélange ces composés avaient un impact toxique à des concentrations plus faibles (niveaux environnementaux), que lorsqu'ils sont testés individuellement. Donc, le but de cette troisième expérience est d'évaluer le potentiel immunotoxique et génotoxique d'un mélange de composés pharmaceutiques plus complexe, retrouvés dans les eaux usées brutes et traitées de STEP. Mais aussi d'évaluer si l'ozone, qui est un traitement tertiaire permettant d'améliorer la qualité des eaux usées traitées, peut être toxique pour les organismes aquatiques comme *Elliptio complanata*.
Les analyses chimiques ont montré qu'il y avait un effet de l'ozone sur la dégradation des composés, présents dans les eaux traitées, qui diffère selon la dose utilisée. Au niveau biologique, nous avons observé que les doses d'ozone n'étaient pas toxiques pour la moule d'eau douce, pour les biomarqueurs testés. Au contraire, nous avons constaté que les effluents de sortie traités à l'ozone étaient moins toxiques que les effluents d'entrée et de sortie des STEP étudiées. Il semblerait que l'ozone améliorerait la qualité des eaux usées traitées qui sont rejetés dans l'environnement. Ce résultat est alors validé par les analyses chimiques.
Les effluents d'entrée et de sortie de STEP sont constitués de contaminants organiques et inorganiques mais aussi des microorganismes pathogènes, qui vont créer un mélange complexe provoquant des effets différents sur les hémocytes de moules d'eau douce et rendant l'interprétation des analyses biologiques plus difficiles.

Exposition in vivo de Corbicula fluminea à des médicaments et des pesticides.

Les précédentes études étaient sur *Elliptio complanata* qui est un organisme d'eau douce largement retrouvé au Québec. Nous allons alors voulu étudier l'impact des psychotropes sur une

espèce d'eau douce retrouvée dans les eaux de l'estuaire de la Gironde ; la palourde asiatique (*Corbicula fluminea*). Cette dernière étude a permis d'observer l'impact de certains psychotropes seuls ou en mélange avec des pesticides ou d'autres médicaments, qui sont retrouvés dans la Garonne estuarienne.
Aucune fluctuation n'a été observée au niveau des concentrations de MT cependant une réponse significative a été observée sur l'expression du gène *mt* dans les branchies des palourdes exposées à la condition Gabapentine et Mélange 2 (Carbamazépine + 3 pesticides). Ceci peut être expliqué par un décalage entre les réponses de l'ARNm et de la protéine. Car il existe des régulations post-traductionnelles pouvant décaler, dans le temps, la réponse sur la protéine.
Des fluctuations dans l'expression des gènes étudiés ont été constatées dans les branchies à T3 et T7 puis dans la masse viscérale à T14 des palourdes exposées à la Gabapentine, au Mélange 1 (Carbamazépine + 2 autres médicaments) et au Mélange 2. Effectivement les branchies sont les premières voies d'entrée des contaminants dans l'organisme, en raison de leur grande surface d'échange en contact direct avec l'environnement.
Notre étude montre que la Gabapentine et le mélange « Carbamazépine + Abacavir + Cyclophosphamide » ont un effet toxique à T7 sur les palourdes exposées, mais un mécanisme de détoxication est mis en place à T14 par les cellules afin de lutter contre la contamination. De plus, ces travaux montrent que le mélange « Carbamazépine + S-Métolachlore + Métolachlore-OA + Métolachlore-ESA » est la condition d'exposition ayant les effets biologiques les plus forts sur les palourdes exposées car les cellules des individus ne sont pas en mesure de surmonter les effets toxiques du mélange au cours des 14 jours d'exposition. Cependant, aucun effet n'a été observé sur les palourdes asiatiques exposées à la condition la Carbamazépine seule. Donc, nous ne pouvons pas conclure si les réponses observées, pour le Mélange 2, sont dues seulement aux pesticides ou au mélange des différents polluants produisant un effet additif.

Sur nos deux études d'exposition *in vivo* à des psychotropes seuls ou en mélange, nous avons observé que la Gabapentine avait un impact sur *Elliptio complanata* et *Corbicula fluminea* à des concentrations retrouvées dans les effluents de sortie de STEP et dans l'environnement.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse avaient pour objectif dans un premier temps de développer et valider des méthodes analytiques et d'échantillonnage permettant de détecter les psychotropes dans la phase dissoute. Ces méthodes ont ainsi permis dans un deuxième temps, d'étudier la présence, le comportement et le devenir de cette classe de composés dans les effluents d'entrée et de sortie de station d'épuration françaises et québécoises et dans les eaux de la Garonne en France et du fleuve Saint Laurent au Québec. Ce suivi de la contamination en psychotropes entre la France et le Québec a permis de comparer ces deux pays qui diffèrent au niveau des habitudes de prescription et de consommation des médicaments, au niveau des traitements épuratoire mis en place dans les STEP mais aussi au niveau de leur hydrosystème récepteur. Enfin, l'analyse des niveaux de concentrations des psychotropes détectés dans les eaux usées, les eaux traitées et les eaux de surface ont servi dans un troisième temps, à évaluer l'éventuel impact toxique de ces composés, à partir de tests *in vitro* et *in vivo*, sur deux espèces de bivalves d'eau douce.

1. Développement et validation de méthodes analytiques et d'échantillonnage.

Les outils analytiques ont été développés pour l'analyse multi-résidus de 47 psychotropes dans la matrice liquide. Les méthodes instrumentales et d'extraction ont été validées à l'aide de plusieurs paramètres : la linéarité, la sensibilité et la robustesse. Sur l'ensemble des molécules étudiées, 32 psychotropes ont une limite de quantification inférieure à 1 $ng.L^{-1}$ ainsi, cette méthode permet l'analyse de composés présents à l'état de trace dans les eaux de surface telles que la Garonne ou le fleuve Saint Laurent. La méthode de caractérisation des échantillons d'eau a donné de bons rendements de quantification compris entre 70 et 120 % pour 33 des psychotropes étudiés. L'utilisation de seulement 7 étalons internes pour l'ensemble des psychotropes choisis peut expliquer que certains composés aient des rendements inférieurs à 70% et supérieurs à 120%. L'emploi d'étalons internes adaptés, idéalement les homologues isotopiquement marqués des composés étudiés, permettrait de mieux compenser les pertes de composés lors de la SPE ou encore les effets de matrices et ainsi, d'assurer une quantification plus juste et plus précise pour l'ensemble des composés. Ces problèmes pourraient, pour certaines molécules, être résolus avec l'utilisation d'une technique d'extraction semi-automatisé tel que la SPE en ligne qui diminuerait les manipulations, pouvant entrainer des pertes de molécule, grâce à l'emploi de faibles volumes extraits et de s'affranchir des volumes de fuite. Mais aussi grâce à l'absence d'étape de reconcentration sous flux restreint qui limiterait les pertes par dégradation ou adsorption.

Néanmoins ces méthodes analytiques ont permis de mettre en évidence la présence de plusieurs psychotropes dans les eaux usées et les eaux de surface en plus de ceux qui sont étudiés habituellement comme la Carbamazépine, l'Oxazépam ou la Fluoxétine. Ainsi d'après nos recherches bibliographiques sur les 19 composés peu étudiés, nous en retrouvons 14 (Zolpidem, Clobazam, Clorazépate, Prazépam, Milnacipran, Miansérine, Duloxétine, Clomipramine, Sulpiride, Tiapride, Amisulpride, Lévétiracétam, Lamotrigine et Hydroxyzine) et sur les 6 composés jamais recherchés nous détectons le Zopiclone, la Cyamémazine et le Valpromide.

Enfin, nous avons constaté pour la première fois que la Gabapentine est omniprésente dans les eaux usées et les eaux de surface en France et au Québec avec des concentrations supérieures à celles de la Carbamazépine.

Le développement d'un échantillonneur intégratif, le POCIS, pour cette classe de composés a permis d'abaisser les limites de quantification et d'obtenir des valeurs de concentrations inférieures au nanogrammes par litre. Cette hausse de sensibilité a permis alors de détecter des psychotropes qui n'étaient pas mis en évidence par échantillonnage ponctuel comme le Clomipramine, le Milnacipran ou encore le Clorazépate. Néanmoins il a été aussi observé, dans ces travaux de développement, que certaines molécules comme la Gabapentine ou le Lévétiracétam ne s'accumulent pas dans le POCIS, alors qu'elles sont bien retrouvées dans les échantillons ponctuels d'eau. Ce phénomène est sûrement corrélé au faible log Kow de ces molécules (inférieur à 0). Ceci démontre une fois de plus que cet outil n'est pas adapté pour les molécules très hydrophiles.
De plus, nous avons pu observer pour plusieurs psychotropes, que l'équilibre était rapidement atteint. Pour ces composés, le POCIS devrait être modifié au niveau de la phase ou des membranes ou encore au niveau des PRC ou de leur temps d'exposition. Plusieurs calibrations pourraient permettre de tester tous ces paramètres, mais aussi le rôle des facteurs environnementaux car nous avons pu constater que de faibles températures pouvaient limiter l'utilisation du POCIS seulement à son aspect qualitatif.
Cependant, le POCIS est généralement utilisé pour détecter la présence d'un grand panel de composés appartenant à plusieurs familles différentes (pesticides, médicaments, alkylphénols, hormones, etc…) donc le rendre spécifique à une famille de composés changerait sa fonction première et les avantages de son utilisation.

2. Présence et devenir des psychotropes en station d'épuration et dans le milieu

Cette étude a permis de montrer la présence d'un grand nombre de psychotropes dans les stations d'épurations françaises et québécoises et dans les milieux récepteurs. Elle a permis de documenter leur niveaux de concentrations moyens, qui varient de quelques $ng.L^{-1}$ à plus de 3 $\mu g.L^{-1}$ dans les effluents d'entrée et de sortie de STEP et jusqu'à la dizaine de $ng.L^{-1}$ dans la Garonne et le Saint Laurent.
Nous avons pu constater que ces composés sont généralement réfractaires aux traitements mis en place dans les stations étudiées. De plus, nous avons pu constater que le traitement primaire mis en place dans les stations québécoises était encore moins efficace que le traitement secondaire utilisés dans les STEP bordelaises, bien que ce dernier ne soit lui-même pas très performant pour ce type de molécules. Il serait intéressant de tester l'utilisation d'un traitement tertiaire par UV ou ozone pour estimer leur efficacité sur l'élimination des psychotropes.
Nous avons observé que les niveaux environnementaux en psychotropes sont liés aux niveaux dans les effluents et aux apports amonts mais aussi aux comportements conservatifs ou dégradables de ces composés.
Pour de prochaines études, il serait alors intéressant d'approfondir les recherches sur les métabolites de ces composés car nous avons pu constater que l'Oxazépam qui est un métabolite de plusieurs autres benzodiazépines était plus présents dans les effluents de sortie de STEP que

dans les effluents d'entrée. Ainsi, lors des différents traitements mis en place dans les STEP, il pourrait y avoir un phénomène de déconjugaison ou de dégradation entrainant l'apparition de métabolites ou de composés parents. De plus, l'analyse pourrait être plus poussée en étudiant aussi les boues produites lors de ces traitements épuratoires.

En France, nous avons pu constater que la présence des psychotropes dans les effluents d'entrée des STEP pouvait être liée aux données de consommation de ces médicaments. Cependant pour certaines molécules, il existe une perte par rapport à ce qui est attendu dans les STEP. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la présence de ces composés dans le réseau d'assainissement en amont des STEP mais aussi en sortie des hôpitaux ou des réseaux domestiques. Cette étude permettrait d'avoir un suivi sur la présence et le devenir de ces molécules de leur entrée dans le réseau à leur sortie de STEP.

Au niveau des flux de sortie de STEP nous avons pu constater que l'apport local de ces rejets n'était pas majoritaire dans les deux hydrosystèmes étudiés. La Gironde estuarienne et le Saint Laurent reçoivent majoritairement leur apport en psychotropes de l'amont du bassin versant.
En comparant les concentrations de la Gabapentine dans la Gironde et dans le Saint Laurent nous avons constaté qu'elles sont équivalentes. Cependant, en termes de flux celui de la Gabapentine est 17 fois plus élevé dans le Saint Laurent que dans la Garonne. Donc, nous pouvons supposer que ce psychotrope est beaucoup plus consommé et présent dans le Saint Laurent que dans la Gironde estuarienne. Il serait intéressant d'obtenir les valeurs de consommation en psychotropes au Québec pour valider cette hypothèse.
Pour finir, en évaluant les risques environnementaux des psychotropes retrouvés dans les deux compartiments aquatiques étudiés, il a été constaté qu'aucun des composés ne représentait un risque pour l'environnement, aux concentrations détectées. Cependant, il faudrait encore affiner la méthodologie de ce paramètre pour une meilleure évaluation.

3. Evaluation de l'impact toxique des psychotropes sur des bivalves d'eau douce

Nous avons pu observer que les psychotropes étaient présents dans les eaux usées et la plupart des composés étudiés sont résistants aux traitements mis en place dans les stations d'épuration françaises et québécoises. C'est pourquoi, elles sont ensuite retrouvées dans le milieu récepteur et donc en contact avec les organismes aquatiques. Ainsi dans cette partie nous avons voulu évaluer le potentiel toxique de certains psychotropes sur les bivalves d'eau douce. Tout d'abord, nos études se sont portées sur des tests *in vitro* qui sont des tests rapides, faciles d'utilisation et reproductibles et qui permettent ensuite de faire des choix pour l'application de tests *in vivo* qui sont des tests plus longs nécessitant plus de logistique.
Les tests *in vitro*, qui ont été menés sur les hémocytes de moule d'eau douce, nous ont permis de montrer que sur les 9 psychotropes étudiés (à différentes gamme de concentrations) seulement la Paroxétine, le Citalopram, la Fluoxétine et la Venlafaxine pouvaient moduler les biomarqueurs immunitaires étudiés à des concentrations poche de la centaine de $mg.L^{-1}$. Les concentrations ne sont pas représentatives de celles qui peuvent être retrouvées dans l'environnement ou même dans les stations d'épuration mais l'objectif, dans un premier temps, était d'observer si

ces composés pouvaient engendrer des effets sur le système immunitaire de la moule d'eau douce *Elliptio complanata* et d'essayer de comprendre les mécanismes mis en jeux.
Des essais ont aussi été effectués sur un mélange contenant les 9 psychotropes sélectionnés pour les tests individuels. Nous avons alors pu observer qu'en mélange les psychotropes provoquaient des impacts toxiques sur les hémocytes de moule à des concentrations plus faibles que lorsqu'ils étaient exposés seuls, on parle alors d'effet mélange.

A la suite de ces tests *in vitro*, des tests *in vivo* ont été menés pour évaluer l'impact des psychotropes seuls et en mélange sur les individus entier. Au cours de cette expérience, nous avons pu observer que sur du long terme, les psychotropes avaient un effet immunotoxique et génotoxique sur les moules d'eau douce à des concentrations environnementales ou à des concentrations retrouvées en STEP. Nous avons encore observé qu'en mélange ces composés étaient toxiques, pour les individus, à des concentrations plus faibles que lorsqu'ils sont testés individuellement. Donc, nous pouvons supposer que dans les stations d'épurations ou dans l'environnement le mélange en contaminants étant plus complexe, les effets toxiques sur le système immunitaire des bivalves pourraient être plus importants.

Des études cherchent à étudier les meilleurs traitements épuratoires permettant d'éliminer en sortie de STEP les composés pharmaceutiques comme les psychotropes. Pour ensuite, améliorer la qualité des effluents de sortie et donc la qualité des milieux récepteurs.
Ainsi, une troisième étude a été menée afin d'évaluer le potentiel immunotoxique et génotoxique d'un mélange de composés pharmaceutiques plus complexe tel que les eaux usées brutes et traitées de STEP. Mais aussi, de savoir si le traitement tertiaire à l'ozone, encore très peu utilisé dans les stations d'épuration, pouvaient être toxiques pour les espèces aquatiques.
Les effluents d'entrée et de sortie de STEP sont des mélanges complexes provoquant des effets différents sur les hémocytes de moules d'eau douce et rendant l'interprétation des analyses biologiques plus difficiles. Néanmoins, cette étude a montré qu'en plus d'améliorer l'élimination des psychotropes après un traitement primaire, l'ozone diminuait la toxicité des effluents de sortie des stations d'épuration qui sont rejetés dans l'environnement.

Dans cette dernière étude, nous avons souhaité étudier l'impact des psychotropes seuls et en mélange avec d'autres contaminants trouvés dans la Garonne estuarienne, sur autre une espèce d'eau douce ; la palourde asiatique (*Corbicula fluminea*).
Cette exposition montre qu'en mélange, à des concentrations environnementales, les composés ont un impact toxique plus fort sur les organismes aquatiques. Plusieurs effets ont été identifiés sur l'expression génique, le stress oxydatif et sur le métabolisme mitochondrial des palourdes asiatiques exposées.
Cette étude montre encore une fois l'intérêt d'étudier les effets mélange des contaminants sur les organismes aquatiques mais aussi sur d'autres biomarqueurs tels que la modulation de l'expression de gènes.

Ces études ont permis de montrer que les psychotropes pouvaient avoir des effets toxiques sur les bivalves d'eau douce, qu'ils soient exposés seuls ou en mélange. Lorsqu'ils sont en mélange avec d'autres composés appartenant à la même famille thérapeutique ou avec des composés

de familles de polluants différents, leur impact apparait à des concentrations plus faibles comme celles retrouvées dans l'environnement.
Nous avons aussi constaté que la Gabapentine, qui est très consommée en France et qui est retrouvée dans le mileu à des concentrations non négligeables, avait un impact toxique sur la moule d'eau douce et la palourde asiatique. Cependant, d'après le rapport MEC/PNEC, ce composé ne présentait pas de risque environnemental. Au vu de ces différents résultats, il serait intéressant de continuer le suivi et les études biologiques sur ce composé, pour mieux connaitre ces modes d'action et ces impacts sur les organismes auqatiques.

Il serait intéressant aussi de tester des métabolites et de nouveaux mélanges, sur des périodes plus longues et d'étudier de nouveaux biomarqueurs en lien avec les mécanismes des psychotropes (AchE, sérotonine, dopamine, puce à ADN, etc…). Mais aussi, d'exposer directement ces espèces d'eau douce dans la Garonne estuarienne et le fleuve Saint Laurent, pour s'assurer que les contaminants en mélange ne soient pas toxiques au long terme pour les individus exposés. En parallèle, il serait bien d'étudier la bioaccumulation des psychotropes dans les organismes.
Enfin, l'utilisation de traitements tertiaires par les stations d'épurations pourrait diminuer la toxicité des effluents, diminuer les concentrations en psychotropes, améliorer la qualité des eaux de surface et donc limiter l'impact toxique sur les organismes aquatiques.

Notre étude illustre bien le fait que les pollutions engendrées par les activités humaines ont des conséquences à court et long terme sur les animaux vivants dans notre environnement. Même si l'Homme se trouve au sommet des chaines alimentaires, il n'est pas directement impacté par cette pollution.
Il accumule, tout de même, au long de sa vie de grandes charges de contaminants engendrant des maladies liées aux facteurs environnementaux, comme certains cancers ou des problèmes reproducteurs. C'est pourquoi, ces résultats doivent être considérés pour aider à la mise en place de mesures afin de limiter les problèmes sur l'environnement et *in fine* sur l'Homme.

ANNEXES

***Annexe 1**. Liste des composés prioritaires établie par la DCE.*

Numéro	Numéro CAS (1)	Numéro UE (2)	Nom de la substance prioritaire (3)	Identifiée comme substance dangereuse prioritaire
(1)	15972-60-8	240-110-8	Alachlore	
(2)	120-12-7	204-371-1	Anthracène	X
(3)	1912-24-9	217-617-8	Atrazine	
(4)	71-43-2	200-753-7	Benzène	
(5)	sans objet	sans objet	Diphényléthers bromés	X (4)
(6)	7440-43-9	231-152-8	Cadmium et ses composés	X
(7)	85535-84-8	287-476-5	Chloroalcanes, C_{10-13}	X
(8)	470-90-6	207-432-0	Chlorfenvinphos	
(9)	2921-88-2	220-864-4	Chlorpyrifos (éthylchlorpyrifos)	
(10)	107-06-2	203-458-1	1,2-dichloroéthane	
(11)	75-09-2	200-838-9	Dichlorométhane	
(12)	117-81-7	204-211-0	Di(2-ethylhexyle)phthalate (DEHP)	X
(13)	330-54-1	206-354-4	Diuron	
(14)	115-29-7	204-079-4	Endosulfan	X
(15)	206-44-0	205-912-4	Fluoranthène	
(16)	118-74-1	204-273-9	Hexachlorobenzène	X
(17)	87-68-3	201-765-5	Hexachlorobutadiène	X
(18)	608-73-1	210-168-9	Hexachlorocyclohexane	X
(19)	34123-59-6	251-835-4	Isoproturon	
(20)	7439-92-1	231-100-4	Plomb et ses composés	
(21)	7439-97-6	231-106-7	Mercure et ses composés	X
(22)	91-20-3	202-049-5	Naphtalène	
(23)	7440-02-0	231-111-4	Nickel et ses composés	
(24)	sans objet	sans objet	Nonylphénols	X (5)
(25)	sans objet	sans objet	Octylphénols (6)	
(26)	608-93-5	210-172-0	Pentachlorobenzène	X
(27)	87-86-5	201-778-6	Pentachlorophénol	
(28)	sans objet	sans objet	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (7)	X
(29)	122-34-9	204-535-2	Simazine	
(30)	sans objet	sans objet	Composés du tributylétain	X (8)

Numéro	Numéro CAS (1)	Numéro UE (2)	Nom de la substance prioritaire (3)	Identifiée comme substance dangereuse prioritaire
(31)	12002-48-1	234-413-4	Trichlorobenzène	
(32)	67-66-3	200-663-8	Trichlorométhane (chloroforme)	
(33)	1582-09-8	216-428-8	Trifluraline	X
(34)	115-32-2	204-082-0	Dicofol	X
(35)	1763-23-1	217-179-8	Acide perfluorooctanesulfonique et ses dérivés (perfluoro-octanesulfonate PFOS)	X
(36)	124495-18-7	sans objet	Quinoxyfène	X
(37)	sans objet	sans objet	Dioxines et composés de type dioxine	X (9)
(38)	74070-46-5	277-704-1	Aclonifène	
(39)	42576-02-3	255-894-7	Bifénox	
(40)	28159-98-0	248-872-3	Cybutryne	
(41)	52315-07-8	257-842-9	Cypermethrine (10)	
(42)	62-73-7	200-547-7	Dichlorvos	
(43)	sans objet	sans objet	Hexabromocyclododécanes (HBCDD)	X (11)
(44)	76-44-8/1024-57-3	200-962-3/ 213-831-0	Heptachlore et époxyde d'heptachlore	X
(45)	886-50-0	212-950-5	Terbutryne	

(1) CAS: Chemical Abstracts Service.

(2) Numéro UE: Inventaire européen des produits chimiques commercialisés (Einecs) ou Liste européenne des substances chimiques notifiées (Elincs).

(3) Lorsque des groupes de substances ont été sélectionnés, sauf indication expresse, des représentants typiques de ce groupe sont définis aux fins de l'établissement des normes de qualité environnementale.

(4) Uniquement le tétrabromodiphényléther (n° CAS 40088-47-9), le pentabromodiphényléther (n° CAS 32534-81-9), l'hexabromodiphényléther (n° CAS 36483-60-0) et l'heptabromodiphényléther (n° CAS: 68928-80-3).

(5) Nonylphénol (n° CAS 25154-52-3; n° UE 246-672-0), y compris les isomères 4-nonylphénol (n° CAS 104-40-5; n° UE 203-199-4) et 4-nonylphénol (ramifié) (n° CAS 84852-15-3; n° UE 284-325-5).

(6) Octylphénol (n° CAS 1806-26-4; n° UE 217-302-5), y compris l'isomère 4-(1,1',3,3'- tétraméthylbutyl)-phénol (n° CAS 140-66-9; n° UE 205-426-2).

(7) Y compris le benzo(a)pyrène (n° CAS 50-32-8; n° UE 200-028-5), le benzo(b)fluoranthène (n° CAS 205-99-2; n° UE 205-911-9), le benzo(g,h,i)perylène (n° CAS 191-24-2; n° UE 205-883-8), le benzo(k)fluoranthène (n° CAS 207-08-9; n° UE 205-916-6) et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène (n° CAS 193-39-5; n° UE 205-893-2), mais à l'exception de l'anthracène, du fluoranthène et du naphtalène, qui sont énumérés séparément.

(8) Y compris le tributylétain-cation (n° CAS: 36643-28-4).

(9) Se rapporte aux composés suivants:
sept dibenzo-p-dioxines polychlorées (PCDD): 2,3,7,8-T4CDD (n° CAS 1746-01-6), 1,2,3,7,8-P5CDD (n° CAS 40321-76-4), 1,2,3,4,7,8-H6CDD (n° CAS 39227-28-6), 1,2,3,6,7,8-H6CDD (n° CAS 57653-85-7), 1,2,3,7,8,9-H6CDD (n° CAS 19408-74-3), 1,2,3,4,6,7,8-H7CDD (n° CAS 35822-46-9), 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDD (n° CAS 3268-87-9);
dix dibenzofurannes polychlorés (PCDF): 2,3,7,8-T4CDF (CAS 51207-31-9), 1,2,3,7,8-P5CDF (CAS 57117-41-6), 2,3,4,7,8-P5CDF (CAS 57117-31-4), 1,2,3,4,7,8-H6CDF (CAS 70648-26-9), 1,2,3,6,7,8-H6CDF (CAS 57117-44-9), 1,2,3,7,8,9-H6CDF (CAS 72918-21-9), 2,3,4,6,7,8-H6CDF (CAS 60851-34-5), 1,2,3,4,6,7,8-H7CDF (CAS 67562-39-4), 1,2,3,4,7,8,9-H7CDF (CAS 55673-89-7), 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDF (CAS 39001-02-0)
douze biphényles polychlorés de type dioxine (PCB-TD): 3,3',4,4'-T4CB (PCB 77, n° CAS 32598-13-3), 3,3',4',5-T4CB (PCB 81, n° CAS 70362-50-4), 2,3,3',4,4'-P5CB (PCB 105, n° CAS 32598-14-4), 2,3,4,4',5-P5CB (PCB 114, n° CAS 74472-37-0), 2,3',4,4',5-P5CB (PCB 118, n° CAS 31508-00-6), 2,3',4,4',5'-P5CB (PCB 123, n° CAS 65510-44-3), 3,3',4,4',5-P5CB (PCB 126, n° CAS 57465-28-8), 2,3,3',4,4',5-H6CB (PCB 156, n° CAS 38380-08-4), 2,3,3',4,4',5'-H6CB (PCB 157, n° CAS 69782-90-7), 2,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 167, n° CAS 52663-72-6), 3,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 169, n° CAS 32774-16-6), 2,3,3',4,4',5,5'-H7CB (PCB 189, n° CAS 39635-31-9).

(10) Le n° CAS 52315-07-8 se rapporte à un mélange d'isomères de cyperméthrine, d'alpha-cyperméthrine (n° CAS 67375-30-8), de bêta-cyperméthrine (n° CAS 65731-84-2), de thêta-cyperméthrine (n° CAS 71697-59-1) et de zêta-cyperméthrine (n° CAS 52315-07-8).

(11) Se rapporte au 1,3,5,7,9,11-hexabromocyclododécane (n° CAS: 25637-99-4), le 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane (n° CAS 3194-55-6), l'α-hexabromocyclododécane (n° CAS: 134237-50-6), le β-Hexabromocyclododécane (n° CAS 134237-51-7) et le γ-hexabromocyclododécane (n° CAS 134237-52-8).».

***Annexe 2**. Valeurs seuils à ne pas dépasser pour les composés prioritaires (NQE, NQE-CMA, NQE-MA).*

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
N°	Nom de la substance	Numéro CAS (1)	NQE-MA (2) Eaux de surface intérieures (3)	NQE-MA (2) Autres eaux de surface	NQE-CMA (4) Eaux de surface intérieures (3)	NQE-CMA (4) Autres eaux de surface	NQE Biote (12)
(1)	Alachlore	15972-60-8	0,3	0,3	0,7	0,7	
(2)	Anthracène	120-12-7	0,1	0,1	0,1	0,1	
(3)	Atrazine	1912-24-9	0,6	0,6	2,0	2,0	
(4)	Benzène	71-43-2	10	8	50	50	
(5)	Diphényléthers bromés (5)	32534-81-9			0,14	0,014	0,0085
(6)	Cadmium et ses composés (suivant les classes de dureté de l'eau) (6)	7440-43-9	≤ 0,08 (classe 1) 0,08 (classe 2) 0,09 (classe 3) 0,15 (classe 4) 0,25 (classe 5)	0,2	≤ 0,45 (classe 1) 0,45 (classe 2) 0,6 (classe 3) 0,9 (classe 4) 1,5 (classe 5)	≤ 0,45 (classe 1) 0,45 (classe 2) 0,6 (classe 3) 0,9 (classe 4) 1,5 (classe 5)	
(6 *bis*)	Tétrachlorure de carbone (7)	56-23-5	12	12	sans objet	sans objet	
(7)	Chloroalcanes C10-13 (8)	85535-84-8	0,4	0,4	1,4	1,4	
(8)	Chlorfenvin-phos	470-90-6	0,1	0,1	0,3	0,3	
(9)	Chlorpyrifos (éthylchlorpyri-fos)	2921-88-2	0,03	0,03	0,1	0,1	
(9 *bis*)	Pesticides cyclodiènes: Aldrine (7) Dieldrine (7) Endrine (7) Isodrine (7)	309-00-2 60-57-1 72-20-8 465-73-6	Σ = 0,01	Σ = 0,005	sans objet	sans objet	

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
N°	Nom de la substance	Numéro CAS (1)	NQE-MA (2) Eaux de surface intérieures (3)	NQE-MA (2) Autres eaux de surface	NQE-CMA (4) Eaux de surface intérieures (3)	NQE-CMA (4) Autres eaux de surface	NQE Biote (12)
(9 *ter*)	DDT total (7), (9)	sans objet	0,025	0,025	sans objet	sans objet	
	para-para-DDT (7)	50-29-3	0,01	0,01	sans objet	sans objet	
(10)	1,2-dichloroéthane	107-06-2	10	10	sans objet	sans objet	
(11)	Dichlorométhane	75-09-2	20	20	sans objet	sans objet	
(12)	Di(2-ethylhexyle)-phthalate (DEHP)	117-81-7	1,3	1,3	sans objet	sans objet	
(13)	Diuron	330-54-1	0,2	0,2	1,8	1,8	
(14)	Endosulfan	115-29-7	0,005	0,0005	0,01	0,004	
(15)	Fluoranthène	206-44-0	0,0063	0,0063	0,12	0,12	30
(16)	Hexachlorobenzène	118-74-1			0,05	0,05	10
(17)	Hexachlorobutadiène	87-68-3			0,6	0,6	55
(18)	Hexachlorocyclohexane	608-73-1	0,02	0,002	0,04	0,02	
(19)	Isoproturon	34123-59-6	0,3	0,3	1,0	1,0	
(20)	Plomb et ses composés	7439-92-1	1,2 (13)	1,3	14	14	
(21)	Mercure et ses composés	7439-97-6			0,07	0,07	20
(22)	Naphtalène	91-20-3	2	2	130	130	
(23)	Nickel et ses composés	7440-02-0	4 (13)	8,6	34	34	
(24)	Nonylphénols (4-nonylphénol)	84852-15-3	0,3	0,3	2,0	2,0	
(25)	Octylphénols (4-(1,1',3,3'-tétraméthylbutyl)-phénol)	140-66-9	0,1	0,01	sans objet	sans objet	
(26)	Pentachlorobenzène	608-93-5	0,007	0,0007	sans objet	sans objet	

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
N°	Nom de la substance	Numéro CAS (1)	NQE-MA (2) Eaux de surface intérieures (3)	NQE-MA (2) Autres eaux de surface	NQE-CMA (4) Eaux de surface intérieures (3)	NQE-CMA (4) Autres eaux de surface	NQE Biote (12)
(27)	Pentachloro-phénol	87-86-5	0,4	0,4	1	1	
(28)	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (11)	sans objet	sans objet	sans objet	sans objet	sans objet	
	Benzo(a)pyrène	50-32-8	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$	0,27	0,027	5
	Benzo(b)fluor-anthène	205-99-2	voir note 11	voir note 11	0,017	0,017	voir note 11
	Benzo(k)fluor-anthène	207-08-9	voir note 11	voir note 11	0,017	0,017	voir note 11
	Benzo(g,h,i)pe-rylène	191-24-2	voir note 11	voir note 11	$8,2 \times 10^{-3}$	$8,2 \times 10^{-4}$	voir note 11
	Indeno(1,2,3-cd)-pyrène	193-39-5	voir note 11	voir note 11	sans objet	sans objet	voir note 11
(29)	Simazine	122-34-9	1	1	4	4	
(29 *bis*)	Tétrachloro-éthylène (7)	127-18-4	10	10	sans objet	sans objet	
(29 *ter*)	Trichloro-ethy-lène (7)	79-01-6	10	10	sans objet	sans objet	
(30)	Composés du tributylétain (tributylétain-cation)	36643-28-4	0,0002	0,0002	0,0015	0,0015	
(31)	Trichloro-benzène	12002-48-1	0,4	0,4	sans objet	sans objet	
(32)	Trichloro-méthane	67-66-3	2,5	2,5	sans objet	sans objet	
(33)	Trifluraline	1582-09-8	0,03	0,03	sans objet	sans objet	
(34)	Dicofol	115-32-2	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-5}$	sans objet (10)	sans objet (10)	33
(35)	Acide perfluo-rooctane-sulfo-nique et ses dérivés (per-fluoro-octane-sulfonate PFOS)	1763-23-1	$6,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$	36	7,2	9,1
(36)	Quinoxyfène	124495-18-7	0,15	0,015	2,7	0,54	

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
N°	Nom de la substance	Numéro CAS (1)	NQE-MA (2) Eaux de surface intérieures (3)	NQE-MA (2) Autres eaux de surface	NQE-CMA (4) Eaux de surface intérieures (3)	NQE-CMA (4) Autres eaux de surface	NQE Biote (12)
(37)	Dioxines et composés de type dioxine	Voir note de bas de page 10 de l'annexe X de la directive 2000/60/CE			sans objet	sans objet	Somme de PCDD + PCDF + PCB-TD 0,0065 $\mu g.kg^{-1}$ TEQ (14)
(38)	Aclonifène	74070-46-5	0,12	0,012	0,12	0,012	
(39)	Bifénox	42576-02-3	0,012	0,0012	0,04	0,004	
(40)	Cybutryne	28159-98-0	0,0025	0,0025	0,016	0,016	
(41)	Cyperméthrine	52315-07-8	8×10^{-5}	8×10^{-6}	6×10^{-4}	6×10^{-5}	
(42)	Dichlorvos	62-73-7	6×10^{-4}	6×10^{-5}	7×10^{-4}	7×10^{-5}	
(43)	Hexabromo-cyclododécane (HBCDD)	Voir note de bas de page 12 de l'annexe X de la directive 2000/60/CE	0,0016	0,0008	0,5	0,05	167
(44)	Heptachlore et époxyde d'heptachlore	76-44-8/ 1024-57-3	2×10^{-7}	1×10^{-8}	3×10^{-4}	3×10^{-5}	$6,7 \times 10^{-3}$
(45)	Terbutryne	886-50-0	0,065	0,0065	0,34	0,034	

(1) CAS: Chemical Abstracts Service.

(2) Ce paramètre est la norme de qualité environnementale exprimée en valeur moyenne annuelle (NQE-MA). Sauf indication contraire, il s'applique à la concentration totale de tous les isomères.

(3) Les eaux de surface intérieures comprennent les rivières et les lacs et les masses d'eau artificielles ou sérieusement modifiées qui y sont reliées.

(4) Ce paramètre est la norme de qualité environnementale exprimée en concentration maximale admissible (NQE-CMA). Lorsque les NQE-CMA sont indiquées comme étant "sans objet", les valeurs retenues pour les NQE-MA sont considérées comme assurant une protection contre les pics de pollution à court terme dans les rejets continus, dans la mesure où elles sont nettement inférieures à celles définies sur la base de la toxicité aiguë.

(5) Pour le groupe de substances prioritaires dénommé "Diphényléthers bromés" (n° 5), les NQE renvoient à la somme des concentrations des congénères portant les numéros 28, 47, 99, 100, 153 et 154.

(6) Pour le cadmium et ses composés (n° 6), les valeurs retenues pour les NQE varient en fonction de la dureté de l'eau telle que définie suivant les cinq classes suivantes: classe 1: < 40 mg $CaCO_3$/l; classe 2: 40 à < 50 mg $CaCO_3$/l; classe 3: 50 à < 100 mg $CaCO_3$/l; classe 4: 100 à < 200 mg $CaCO_3$/l et classe 5: ≥ 200 mg $CaCO_3$/l.

(7) Cette substance n'est pas une substance prioritaire mais un des autres polluants pour lesquels les NQE sont identiques à celles définies dans la législation qui s'appliquait avant le 13 janvier 2009.

(8) Aucun paramètre indicatif n'est prévu pour ce groupe de substances. Le ou les paramètres indicatifs doivent être déterminés par la méthode d'analyse.

(9) Le DDT total comprend la somme des isomères suivants: 1,1,1-trichloro-2,2 bis (p-chlorophényl)éthane (n° CAS: 50-29-3; n° UE: 200-024-3); 1,1,1-trichloro-2 (o-chlorophényl)-2-(p-chlorophényl)éthane (n° CAS: 789-02-6; n° UE: 212-332-5); 1,1-dichloro-2,2 bis (p-chlorophényl)éthylène (n° CAS: 72-55-9; n° UE: 200-784-6); et 1,1-dichloro-2,2 bis (p-chlorophényl)éthane (n° CAS: 72-54-8; n° UE: 200-783-0).

(10) Les informations disponibles ne sont pas suffisantes pour établir une NQE-CMA pour ces substances.

(11) Pour le groupe de substances prioritaires dénommé "hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)" (n° 28), la NQE pour le biote et la NQE-MA dans l'eau correspondante se rapportent à la concentration de benzo(a)pyrène, sur la toxicité duquel elles sont fondées. Le benzo(a)pyrène peut être considéré comme un marqueur des autres HAP et, donc, seul le benzo(a)pyrène doit faire l'objet d'une surveillance aux fins de la comparaison avec la NQE pour le biote ou la NQE-MA dans l'eau correspondante.

(12) Sauf indication contraire, la NQE pour le biote se rapporte aux poissons. En lieu et place, un autre taxon de biote, ou une autre matrice, peut faire l'objet de la surveillance pour autant que la NQE appliquée assure un niveau de protection équivalent. Pour les substances n^{os} 15 (fluoranthène) et 28 (HAP), la NQE pour le biote se rapporte aux crustacés et mollusques. Aux fins de l'évaluation de l'état chimique, la surveillance du fluoranthène et des HAP chez les poissons n'est pas appropriée. Pour la substance n° 37 (dioxines et composés de type dioxine), la NQE pour le biote se rapporte aux poissons, crustacés et mollusques, en conformité avec l'annexe, section 5.3, du règlement (UE) n° 1259/2011 de la Commission du 2 décembre 2011 modifiant le règlement (CE) n° 1881/2006 en ce qui concerne les teneurs maximales en dioxines, en PCB de type dioxine et en PCB autres que ceux de type dioxine des denrées alimentaires (JO L 320 du 3.12.2011, p. 18).

(13) Ces NQE se rapportent aux concentrations biodisponibles des substances.

(14) PCDD: dibenzo-p-dioxines polychlorées; PCDF: dibenzofurannes polychlorés; PCB-TD: biphényles polychlorés de type dioxine; TEQ: équivalents toxiques conformément aux facteurs d'équivalence toxique 2005 de l'Organisation mondiale de la santé.»

***Annexe 3**. Liste de vigilance relative aux composés soumis à surveillance à l'échelle de l'Union, établie conformément à l'article 8 ter de la directive 2008/105/CE.*

Nom de la substance/du groupe de substances	Numéro CAS (1)	Numéro UE (2)	Méthode d'analyse indicative (3) (4) (5)	Limite maximale acceptable de détection de la méthode (en ng/l)
17-alpha-éthinylestradiol (EE2)	57-63-6	200-342-2	SPE Grand volume — LC-MS-MS	0,035
17-bêta-estradiol (E2), estrone (E1)	50-28-2, 53-16-7	200-023-8	SPE — LC-MS-MS	0,4
Diclofénac	15307-86-5	239-348-5	SPE — LC-MS-MS	10
2,6-ditert-butyl-4-méthylphénol	128-37-0	204-881-4	SPE — GC-MS	3 160
4-méthoxycinnamate de 2-éthylhexyle	5466-77-3	226-775-7	SPE — LC-MS-MS ou GC-MS	6 000
Antibiotiques macrolides (6)			SPE — LC-MS-MS	90
Méthiocarbe	2032-65-7	217-991-2	SPE — LC-MS-MS ou GC-MS	10
Néonicotinoïdes (7)			SPE — LC-MS-MS	9
Oxadiazon	19666-30-9	243-215-7	LLE/SPE — GC-MS	88
Triallate	2303-17-5	218-962-7	LLE/SPE — GC-MS ou LC-MS-MS	670

(1) Chemical Abstracts Service.
(2) Numéro Union européenne — n'existe pas pour toutes les substances.
(3) Pour assurer la comparabilité des résultats obtenus par les différents États membres, la surveillance de toutes les substances doit avoir lieu sur des échantillons d'eau entiers.
(4) Méthodes d'extraction:
LLE — extraction liquide-liquide;
SPE — extraction en phase solide.
Méthodes d'analyse:
GC-MS — chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse.
LC-MS-MS — chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse triple quadripolaire (en tandem).
(5) Pour la surveillance du 4-méthoxycinnamate de 2-éthylhexyle dans des particules en suspension ou dans un sédiment (taille < 63 µm), la méthode d'analyse suivante est indiquée: SLE (extraction solide-liquide) — GC-MS, avec une limite maximale de détection de 0,2 mg/kg.
(6) Érythromycine (numéro CAS 114-07-8, numéro UE 204-040-1), clarithromycine (nº CAS 81103-11-9), azithromycine (nº CAS 83905-01-5, nº UE 617-500-5)
(7) Imidaclopride (nº CAS 105827-78-9/138261-41-3, nº UE 428-040-8), thiaclopride (nº CAS 111988-49-9), thiaméthoxame (nº CAS 153719-23-4, nº UE 428-650-4), clothianidine (nº CAS 210880-92-5, nº UE 433-460-1), acétamipride (nº CAS 135410-20-7/160430-64-8).

***Annexe 4**. Tableau des différentes classes de molécules établies sur la base des valeurs de PEC (Besse et Garic, 2007).*

Classe IV	Classe III	Classe IIB	Classe IIA	Classe IB	Classe IA
molécules nécessitant une révision en fonction des données biologiques					molécules retenues comme prioritaires
PEC phase 2A inférieure à 10 ng/l	PEC phase 2B inférieure à 10 ng/l	PEC phase 2A inférieure à 100 ng/l , pas de données de métabolisme	10 ng/l < PEC 2A < 100 ng/l et PEC 2B > 10ng/l	PEC phases 2A supérieure à 100 ng/l, pas de données de métabolisme	PEC phases 2A et 2B supérieures à 100 ng/l
alprazolam	amlodipine	fluvoxamine	azithromycine	acétylcystéine	acide valproïque
betaméthasone	bromazepam	hydrocortisone	baclofène	acide clavulanique	allopurinol
buprénoprhine	clorazepate	levomépromazine	bisoprolol	amiodarone	amoxicilline
carvedilol	diazepam	loratadine	ceftazidime	aspirine	amphotéricine B
clonazepam	dompéridone	loxapine	cétirizine	atorvastatine	aténolol
escitalopram	fluoxétine	méthylprednisolone	citalopram	benfluorex	bézafibrate
halopéridol	glibenclamide	miansérine	clarithromycine	carbamazepine	buflomédil
ipratropium	métoclopramide	prednisolone	dextropropoxyphène	carbocistéine	cefpodoxime
levothyroxine	nicardipine	prednisone	diclofénac	cyamémazine	ceftriaxone
lopéramide	oméprazole		fluconazole	diosmine	ciprofloxacine
midazolam	pantoprazole		josamycine	fénofibrate	doxycycline
nordazepam	paroxétine		lorazepam	heptaminol	fosfomycine
ondansetron	perindopril		métoprolol	hydroxyzine	furosémide
oxprénolol	piroxicam		nadolol	levodopa	ibuprofène
tropatépine	prazepam		ofloxacine	naftidrofuryl	kétoprofène
teicoplanine	ramipril		phénobarbital	trimébutine	metformine
terbutaline	rifampicine		propranolol	trimétazidine	métronidazole
trihexyphénidyle	tianeptine		roxythromycine	troxérutine	naproxène
tropatépine	zolpidem		sertraline	pravastatine	oxazepam
	zopiclone		tazobactam	pristinamycine	paracétamol
			triméthoprime	simvastatine	pipéracilline
			vancomycine		ranitidine
					sulfaméthoxazole
					tramadol

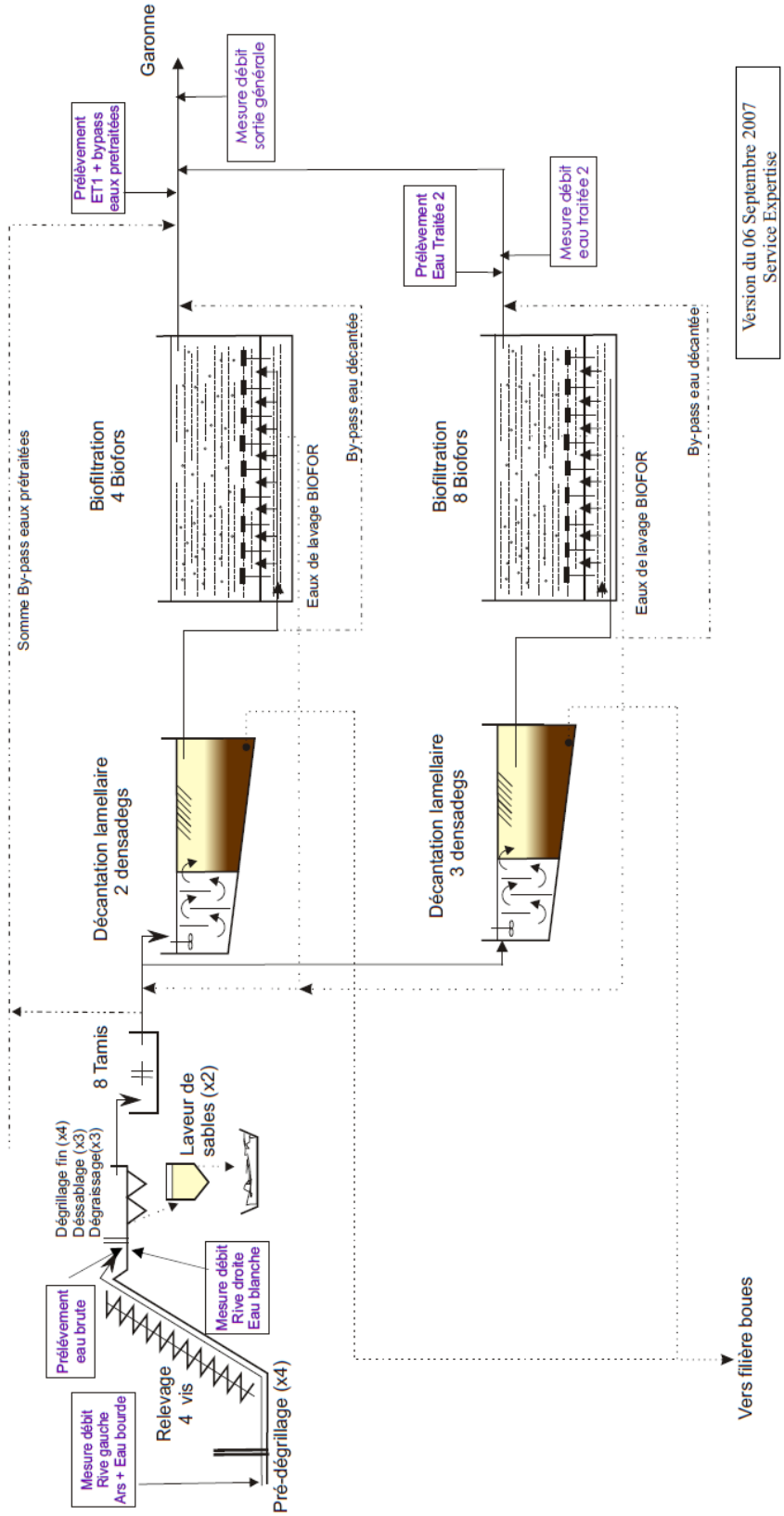
***Annexe 5**. Tableau des consommations globales et annuelles de psychotropes, liées à l'ensemble des prescripteurs (villes + hôpitaux) en mg/an/hab et en nombre de boîtes remboursées.*

Consommation globale annuelle de psychotropes remboursés, liée à l'ensemble des prescripteurs (villes + hôpitaux) en mg/an/hab							
Hab France : 65,8 millions	**2012**	Hab France : 66 millions	**2013**	Hab France : 66,3 millions	**2014**	Hab France : 66,6 millions	**2015**
GABAPENTINE	680	LEVETIRACETAM	716	LEVETIRACETAM	773	LEVETIRACETAM	840
LEVETIRACETAM	644	GABAPENTINE	686	GABAPENTINE	705	GABAPENTINE	723
CARBAMAZEPINE	368	CARBAMAZEPINE	361	CARBAMAZEPINE	353	CARBAMAZEPINE	418
VALPROMIDE	321	VALPROMIDE	318	VALPROMIDE	315	VALPROMIDE	307
AMITRIPTYLINE	237	AMITRIPTYLINE	242	AMITRIPTYLINE	246	AMITRIPTYLINE	243
VENLAFAXINE	182	VENLAFAXINE	190	VENLAFAXINE	194	VENLAFAXINE	218
AMISULPRIDE	178	AMISULPRIDE	151	AMISULPRIDE	144	OXAZEPAM	132
PRAZEPAM	155	OXAZEPAM	126	OXAZEPAM	130	LAMOTRIGINE	122
OXAZEPAM	120	LAMOTRIGINE	103	LAMOTRIGINE	112	HYDROXYZINE	86
LAMOTRIGINE	94	HYDROXYZINE	87	HYDROXYZINE	91	AMISULPRIDE	80
HYDROXYZINE	86	PRAZEPAM	80	PRAZEPAM	73	CYAMEMAZINE	67
CYAMEMAZINE	71	CYAMEMAZINE	71	CYAMEMAZINE	69	CLOMIPRAMINE	63
PAROXETINE	60	PAROXETINE	60	PAROXETINE	61	PAROXETINE	57
SERTRALINE	52	SERTRALINE	52	SERTRALINE	53	DULOXETINE	56
TIAPRIDE	50	DULOXETINE	50	DULOXETINE	53	SERTRALINE	56
DULOXETINE	46	TIAPRIDE	48	ESCITALOPRAM	47	ESCITALOPRAM	46
ESCITALOPRAM	46	ESCITALOPRAM	46	TIAPRIDE	45	TIAPRIDE	43
ZOLPIDEM	46	ZOLPIDEM	44	ZOLPIDEM	43	ZOLPIDEM	40
CLOMIPRAMINE	36	CLOMIPRAMINE	36	CLOMIPRAMINE	36	MIANSERINE	36
FLUOXETINE	34	FLUOXETINE	34	MIANSERINE	35	FLUOXETINE	34
MIANSERINE	33	MIANSERINE	33	FLUOXETINE	34	PRAZEPAM	27
BROMAZEPAM	30	BROMAZEPAM	28	BROMAZEPAM	27	BROMAZEPAM	25
ZOPICLONE	25	ZOPICLONE	24	ZOPICLONE	23	ZOPICLONE	22
CITALOPRAM	23	CITALOPRAM	22	CITALOPRAM	21	CITALOPRAM	19
SULPIRIDE	21	SULPIRIDE	19	PRIMIDONE	18	PRIMIDONE	18
PRIMIDONE	18	PRIMIDONE	19	SULPIRIDE	17	MIRTAZAPINE	18
MILNACIPRAN	17	MIRTAZAPINE	16	MIRTAZAPINE	17	SULPIRIDE	15
TIANEPTINE	17	MILNACIPRAN	15	MILNACIPRAN	14	METHADONE	13
MIRTAZAPINE	15	CLORAZEPATE	12	METHADONE	12	MILNACIPRAN	12
MEPROBAMATE	13	METHADONE	12	CLORAZEPATE	11	DIAZEPAM	11
CLORAZEPATE	13	DIAZEPAM	10	DIAZEPAM	11	CLORAZEPATE	10
METHADONE	11	TIANEPTINE	8	OLANZAPINE	6	OLANZAPINE	6
DIAZEPAM	9	CLOBAZAM	6	CLOBAZAM	6	CLOBAZAM	6
CLOBAZAM	7	OLANZAPINE	6	TIANEPTINE	5	LORAZEPAM	5
OLANZAPINE	6	LORAZEPAM	6	LORAZEPAM	5	TINAEPTINE	4
LORAZEPAM	6	CHLORPROMAZINE	5	CHLORPROMAZINE	5	ALPRAZOLAM	3
CHLORPROMAZINE	5	MAPROTILINE	3	MAPROTILINE	3	CHLORPROMAZINE	3
MAPROTILINE	4	ALPRAZOLAM	3	ALPRAZOLAM	3	MAPROTILINE	3
ALPRAZOLAM	3	NORDIAZEPAM	2	NORDIAZEPAM	2	NORDIAZEPAM	2
NORDIAZEPAM	2	BUSPIRONE	2	BUSPIRONE	2	BUSPIRONE	2
BUSPIRONE	2	DOXEPINE	1	DOXEPINE	1	DOXEPINE	1
IMIPRAMINE	2	IMIPRAMINE	1	CLONAZEPAM	1	CLONAZEPAM	1
DOXEPINE	1	CLONAZEPAM	1	IMIPRAMINE	0,2	IMIPRAMINE	0,4
CLONAZEPAM	1	MEPROBAMATE	0,2	PIMOZIDE	0,1	PIMOZIDE	0,1
TEMAZEPAM	0,4	PIMOZIDE	0,1	TEMAZEPAM	0,03	TEMAZEPAM	0,04
PIMOZIDE	0,1	FLUNITRAZEPAM	0,03	MEPROBAMATE	0,01	MEPROBAMATE	0,001
FLUNITRAZEPAM	0,04	TEMAZEPAM	0,01	FLUNITRAZEPAM	0,0005	FLUNITRAZEPAM	0,00001

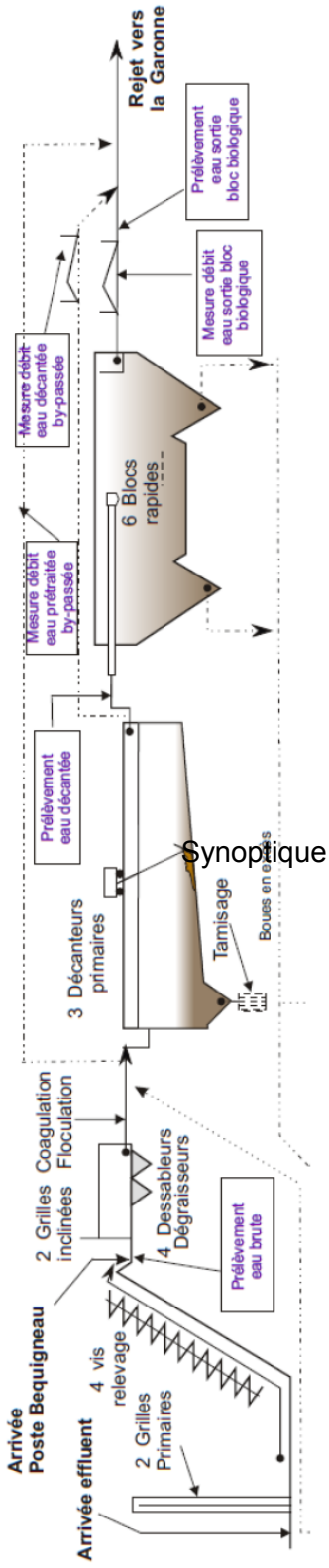
Consommation annuelle globale de psychotropes, liée à l'ensemble des prescripteurs (villes + hôpitaux) en nombre de boîtes remboursées

2 012		2 013		2 014		2015	
ZOLPIDEM	21 469 998	ZOLPIDEM	20 834 489	ZOLPIDEM	20 270 798	ALPRAZOLAM	19 236 705
ALPRAZOLAM	18 298 437	ALPRAZOLAM	18 794 500	ALPRAZOLAM	19 265 367	ZOLPIDEM	19 085 961
ZOPICLONE	15 725 850	ZOPICLONE	15 191 224	ZOPICLONE	14 824 154	METHADONE	14 325 786
METHADONE	15 534 728	METHADONE	15 053 933	METHADONE	14 725 801	ZOPICLONE	14 067 646
PAROXETINE	12 672 280	PAROXETINE	12 750 938	PAROXETINE	13 095 958	PAROXETINE	13 369 244
BROMAZEPAM	10 928 337	OXAZEPAM	11 671 245	OXAZEPAM	12 445 567	OXAZEPAM	12 992 755
OXAZEPAM	10 886 932	BROMAZEPAM	10 331 921	ESCITALOPRAM	9 961 732	ESCITALOPRAM	9 768 665
ESCITALOPRAM	9 791 743	ESCITALOPRAM	9 993 993	BROMAZEPAM	9 869 121	BROMAZEPAM	9 249 516
LORAZEPAM	8 600 119	LORAZEPAM	8 173 614	HYDROXYZINE	8 150 090	VENLAFAXINE	7 787 602
VENLAFAXINE	7 318 184	HYDROXYZINE	7 732 459	LORAZEPAM	7 840 936	HYDROXYZINE	7 684 512
HYDROXYZINE	7074070	VENLAFAXINE	7 398 280	VENLAFAXINE	7 571 761	LORAZEPAM	7 425 530
FLUOXETINE	6 692 565	FLUOXETINE	6 590 685	FLUOXETINE	6 690 134	FLUOXETINE	6 646 200
PRAZEPAM	5185881	PRAZEPAM	4 929 250	PRAZEPAM	4 772 082	PRAZEPAM	4 531 049
CYAMEMAZINE	4 056 435	CYAMEMAZINE	4 093 811	SERTRALINE	4 106 357	SERTRALINE	4 406 918
SERTRALINE	3 710 082	SERTRALINE	3 819 655	CYAMEMAZINE	4 041 514	CYAMEMAZINE	3 988 707
MIANSERINE	3 418 736	MIANSERINE	3 534 860	MIANSERINE	3 715 805	MIANSERINE	3 899 232
CLORAZEPATE	3 014 906	AMITRIPTYLINE	3 028 911	AMITRIPTYLINE	3 075 276	LAMOTRIGINE	3 174 908
AMITRIPTYLINE	2 973 231	CLORAZEPATE	2 879 903	DIAZEPAM	3 030 864	DIAZEPAM	3 173 768
TIANEPTINE	2 953 211	DIAZEPAM	2 699 885	LAMOTRIGINE	2 905 847	AMITRIPTYLINE	3 064 372
CITALOPRAM	2 692 861	LAMOTRIGINE	2 682 811	CLORAZEPATE	2 695 420	DULOXETINE	2 776 600
CARBAMAZEPINE	2 669 753	CARBAMAZEPINE	2 631 089	DULOXETINE	2 622 554	MIRTAZAPINE	2 612 092
LAMOTRIGINE	2 463 535	CITALOPRAM	2 588 829	CARBAMAZEPINE	2 592 898	CARBAMAZEPINE	2 577 535
DIAZEPAM	2 457 519	DULOXETINE	2 418 457	CITALOPRAM	2 497 485	CLORAZEPATE	2 528 742
VALPROMIDE	2 344 167	VALPROMIDE	2 330 080	MIRTAZAPINE	2 433 571	CITALOPRAM	2 307 976
DULOXETINE	2 226 563	MIRTAZAPINE	2 272 353	VALPROMIDE	2 323 871	VALPROMIDE	2 268 361
MIRTAZAPINE	2 162 506	OLANZAPINE	1 854 394	OLANZAPINE	1 850 439	OLANZAPINE	1 854 878
OLANZAPINE	1 865 430	CLOMIPRAMINE	1 824 080	CLOMIPRAMINE	1 818 044	LEVETIRACETAM	1 836 458
CLOMIPRAMINE	1 838 608	CLOBAZAM	1 633 677	LEVETIRACETAM	1 709 060	CLOMIPRAMINE	1 786 064
CLOBAZAM	1 701 665	LEVETIRACETAM	1 573 081	CLOBAZAM	1 575 532	GABAPENTINE	1 527 449
LEVETIRACETAM	1 421 810	TIANEPTINE	1 438 839	GABAPENTINE	1 454 272	CLOBAZAM	1 473 466
CLONAZEPAM	1 396 504	GABAPENTINE	1 373 704	TIAPRIDE	1 195 057	TIAPRIDE	1 116 842
TIAPRIDE	1 352 600	TIAPRIDE	1 273 299	TIANEPTINE	1 024 013	TIANEPTINE	807 125
GABAPENTINE	1 337 762	CLONAZEPAM	904 091	CLONAZEPAM	834 890	CLONAZEPAM	779 564
SULPIRIDE	873 606	SULPIRIDE	785 941	AMISULPRIDE	720 165	AMISULPRIDE	705 498
AMISULPRIDE	750 615	AMISULPRIDE	737 615	SULPIRIDE	711 833	SULPIRIDE	647 414
BUSPIRONE	733 758	BUSPIRONE	691 638	BUSPIRONE	638 637	BUSPIRONE	635 521
NORDIAZEPAM	484 071	NORDIAZEPAM	449 502	NORDIAZEPAM	422 890	NORDIAZEPAM	391 095
MILNACIPRAN	468 363	MILNACIPRAN	416 868	MILNACIPRAN	370 466	MILNACIPRAN	334 414
FLUNITRAZEPAM	339 254	FLUNITRAZEPAM	245 081	CHLORPROMAZINE	189 013	CHLORPROMAZINE	187 840
TEMAZEPAM	202 028	CHLORPROMAZINE	189 779	MAPROTILINE	115 235	MAPROTILINE	107 953
CHLORPROMAZINE	193 592	MAPROTILINE	120 328	DOXEPINE	106 537	DOXEPINE	103 980
MAPROTILINE	160 004	DOXEPINE	109 062	PRIMIDONE	97 895	PRIMIDONE	97 557
MEPROBAMATE	153 760	PRIMIDONE	98 862	PIMOZIDE	79 553	PIMOZIDE	76 255
DOXEPINE	119 159	PIMOZIDE	83 215	TEMAZEPAM	13 449	TEMAZEPAM	20 953
PRIMIDONE	97 356	IMIPRAMINE	24 680	IMIPRAMINE	5 997	IMIPRAMINE	15 040
PIMOZIDE	86 894	TEMAZEPAM	2 475	FLUNITRAZEPAM	4 627	FLUNITRAZEPAM	85
IMIPRAMINE	65 880	MEPROBAMATE	2 243	MEPROBAMATE	170	MEPROBAMATE	14

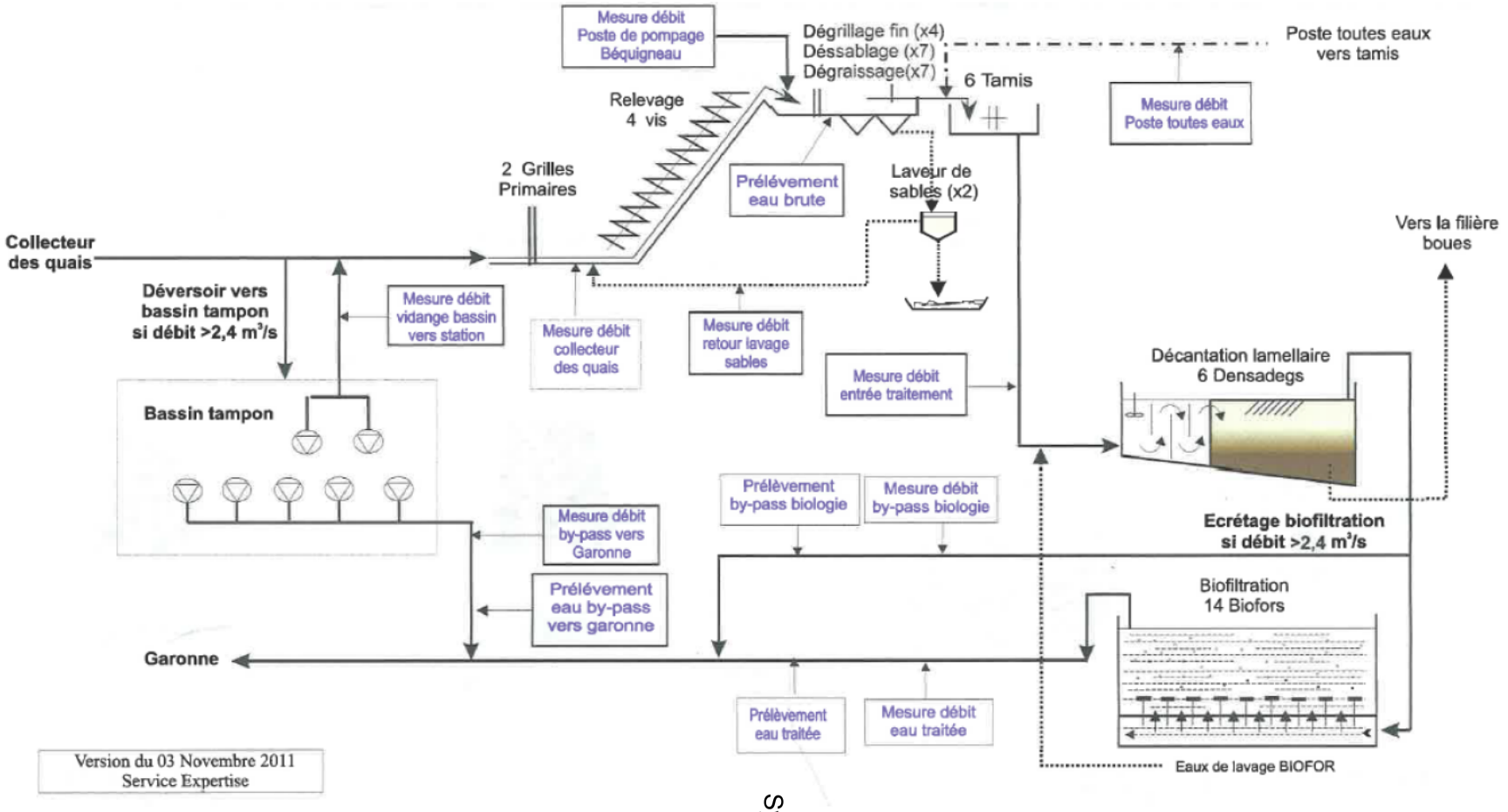
***Annexe 6**. Synoptique de la STEP Clos de Hilde.*



***Annexe 7**. Synoptique de la STEP Louis Fargue.*



Synoptique LF avant décembre 2011



Synoptique LF après décembre 2011

***Annexe 8**. Photos des sites échantillonnés sur l'estuaire de la Gironde.*

Cadaujac

Saint Macaire

La Réole

Pessac sur Dordogne

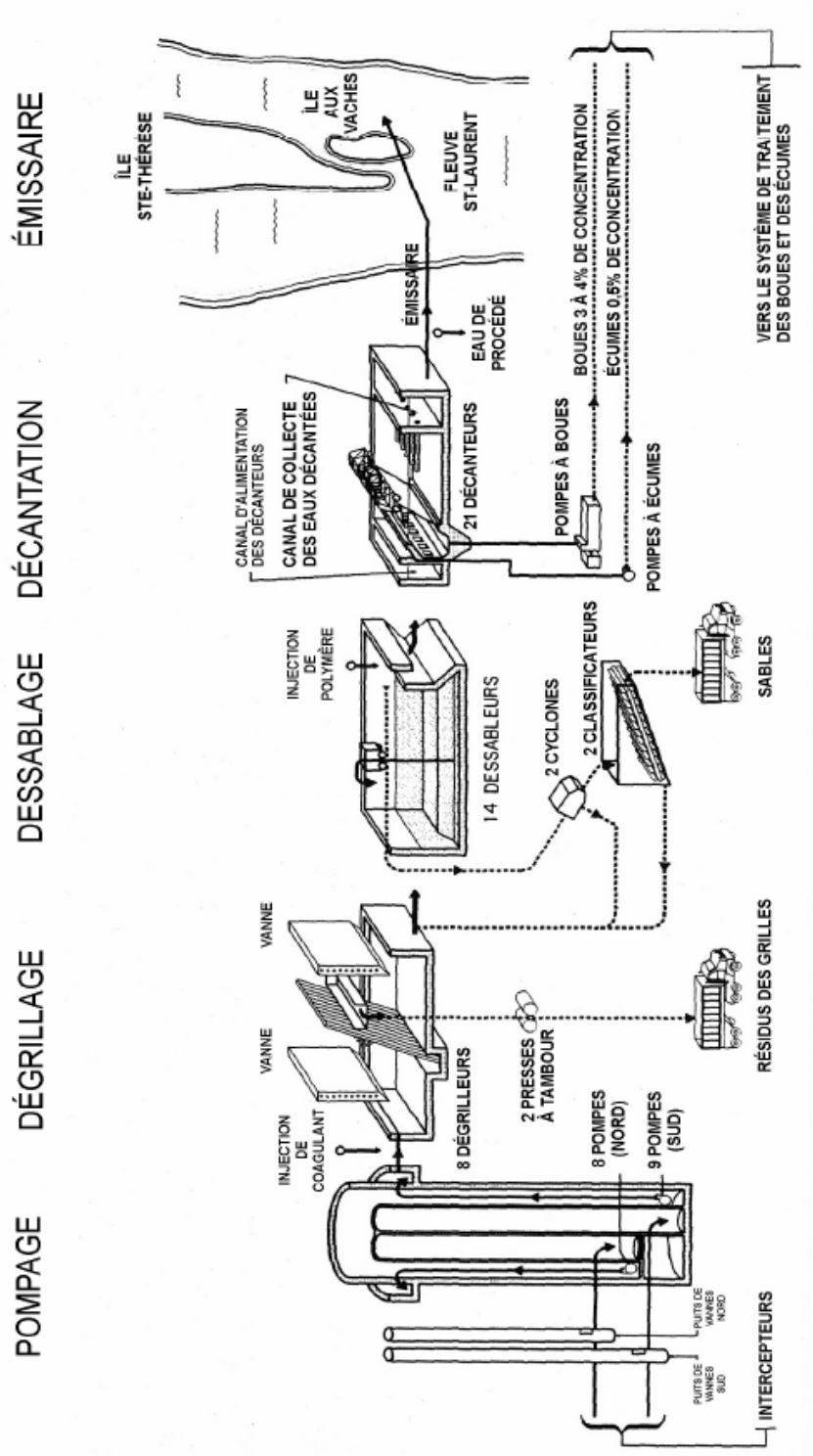
Guîtres

Blanquefort

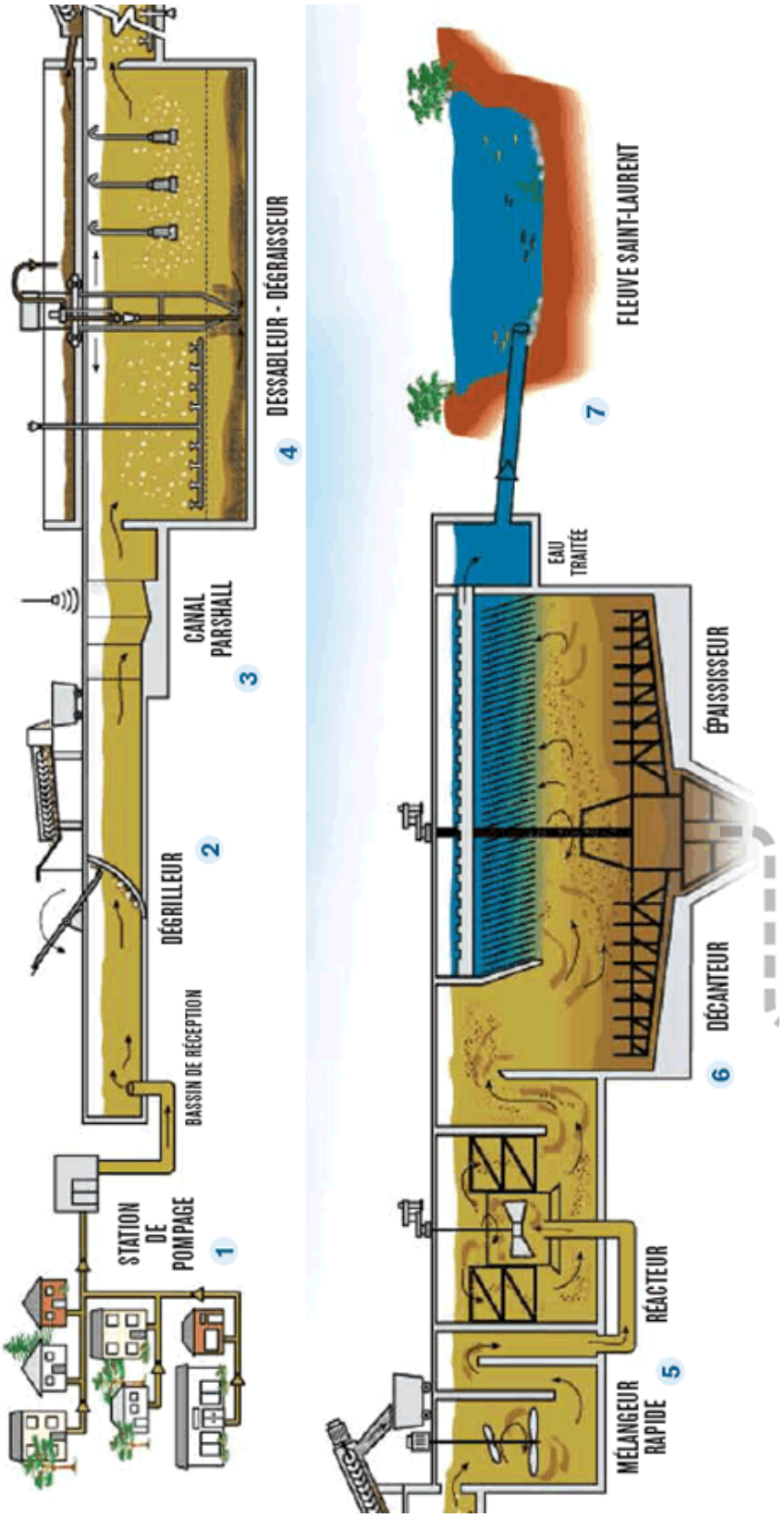
***Annexe 9**. Photos des sites échantillonnés sur la Jalle de Blanquefort.*

***Annexe 10**. Les deux réseaux d'intercepteur d'eaux brutes de la STEP Jean Marcotte de Montréal (Source : Bélanger, 2010).*

Annexe 11. *Synoptique de la STEP Jean Marcotte (Montréal).*



***Annexe 12**. Synoptique de la STEP Ile Lebel.*



***Annexe 13**. Tableau des fournisseurs des composés natifs et des étalons internes utilisés lors de ces travaux de recherche.*

Composés natifs

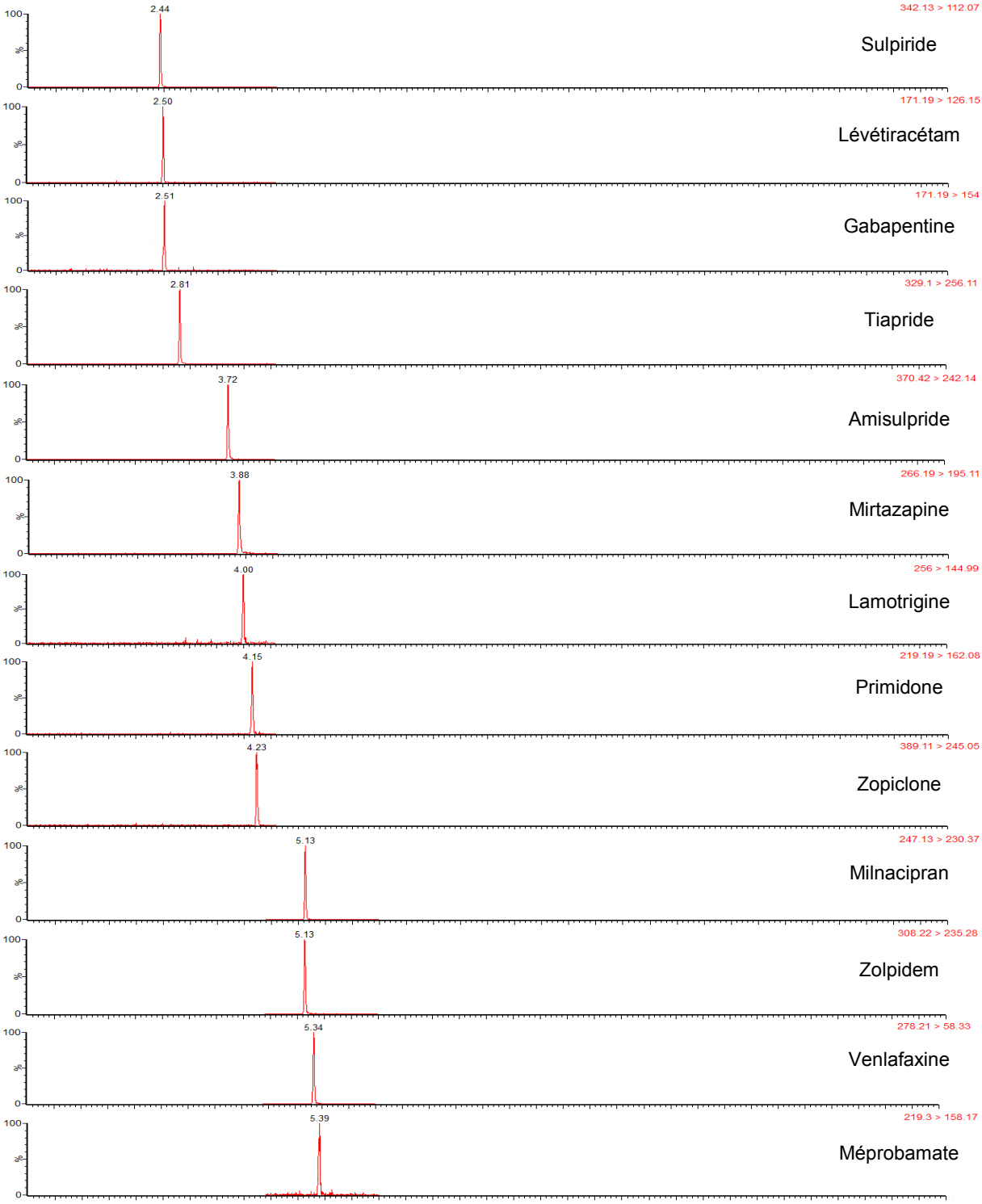
Composés	Fournisseurs
Zopiclone	Sigma-Aldrich
Zolpidem	
Desmethyldiazépam	
Oxazépam	
Alprazolam	
Bromazépam	
Clobazam	
Clonazépam	
Clorazépate	
Diazépam	
Lorazépam	
Flunitrazépam	
Témazépam	
Prazépam	
Mirtazapine	
Milnacipran	
Miansérine	
Amoxapine	
Tianeptine	
Paroxétine	
Imipramine	
Maprotiline	
Amitriptyline	
Fluoxétine	
Doxépine	
Norfluoxétine	
Clomipramine	
Sulpiride	
Chlorpromazine	
Tiapride	
Amisulpride	
Pimozide	
Gabapentine	
Valpromide	
Carbamazépine	
Lamotrigine	
Méprobamate	
Buspirone	
Méthadone	
Citalopram	Alsachim
Sertraline	
Cyamémazine	
Hydroxyzine	
Venlafaxine	Toronto Research Chemical
Lévétiracétam	
Duloxétine	Santa Cruz Biotech.
Primidone	LGC standard

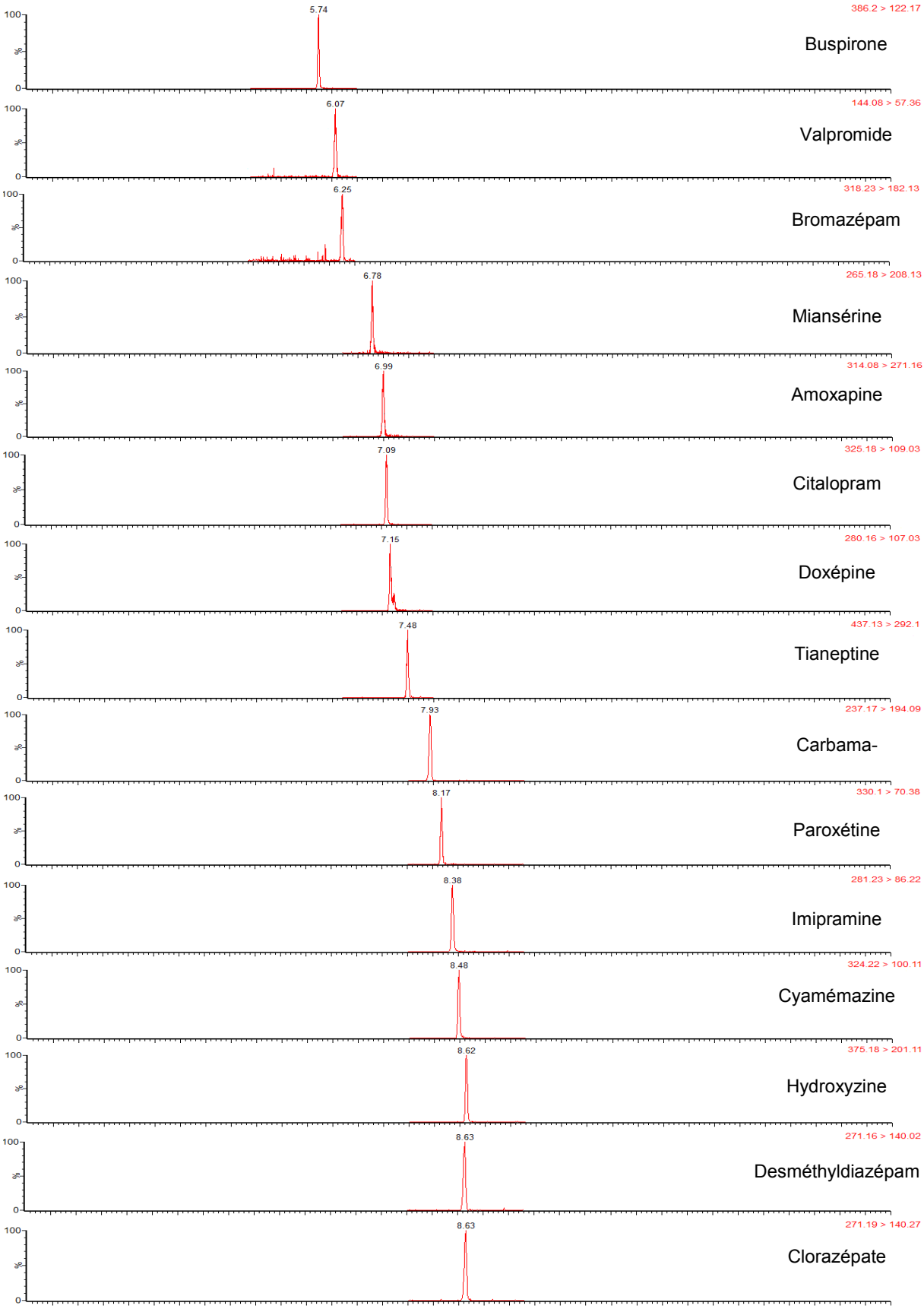
Etalons internes

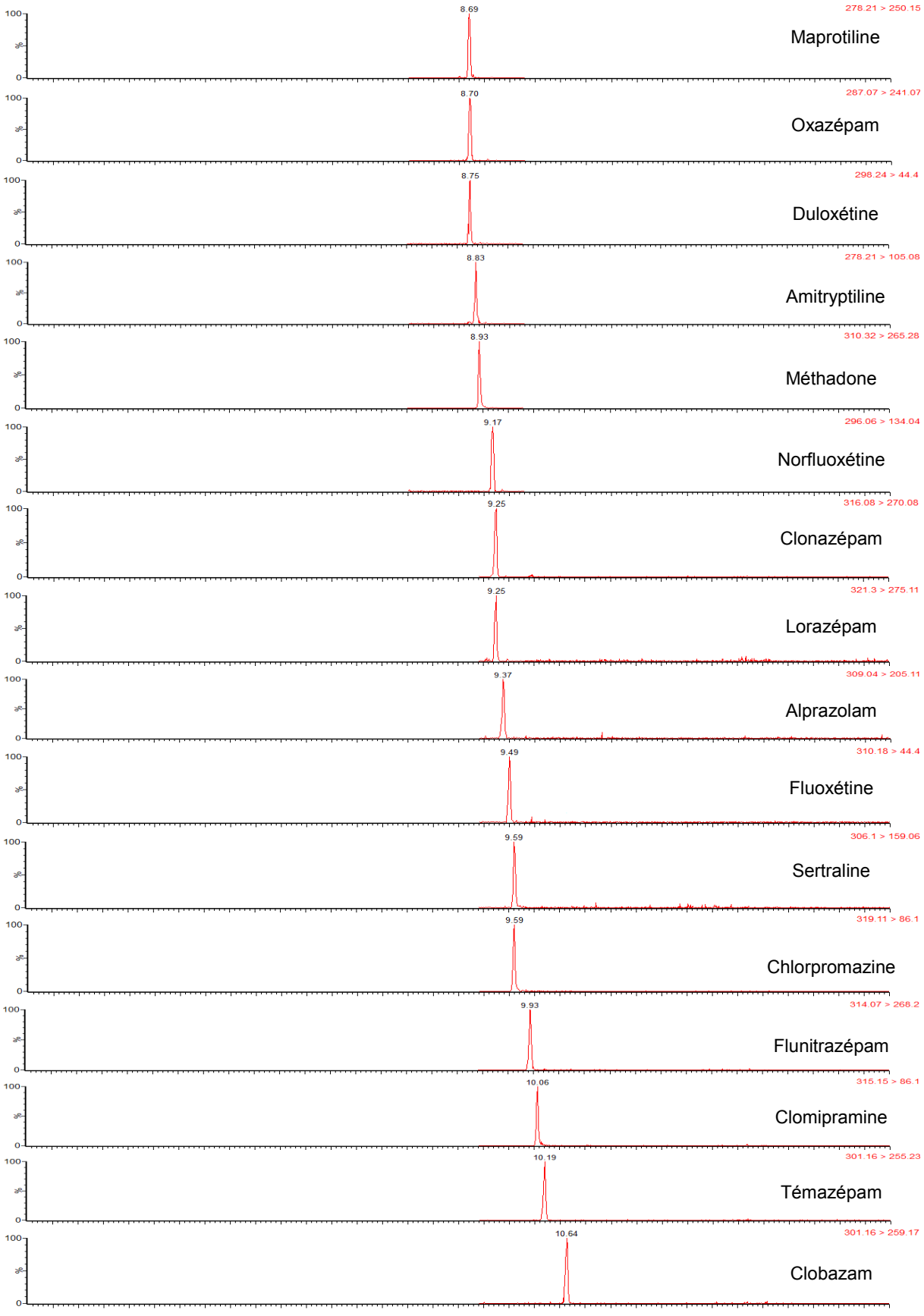
Composés	Fournisseurs
Carbamazépine d10	Cluzeau Info Lab
Diazépam d5	
Nordiazépam d5	
Oxazépam d5	
Bromazépam d4	Toronto Research Chemical
Fluoxétine d5	
Amitryptiline d6	LGC standard

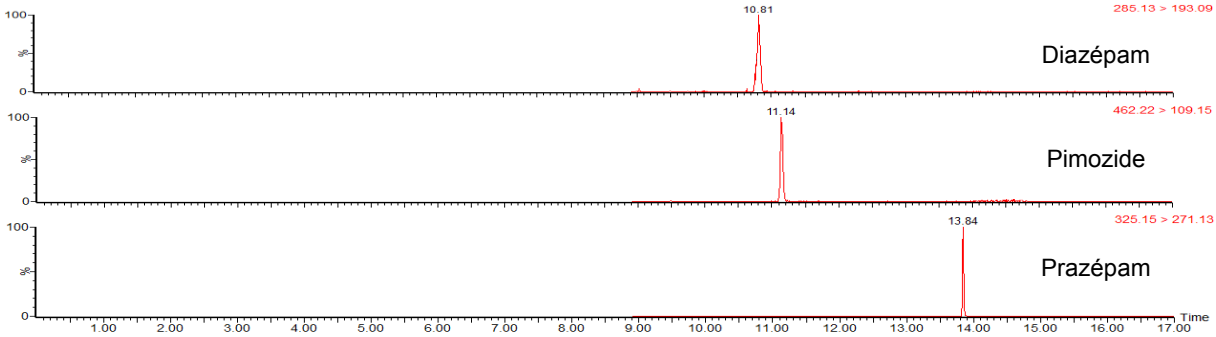
***Annexe 14**. Chromatogramme des transitions de quantifications des composés natifs et des étalons internes étudiés.*

Composés natifs

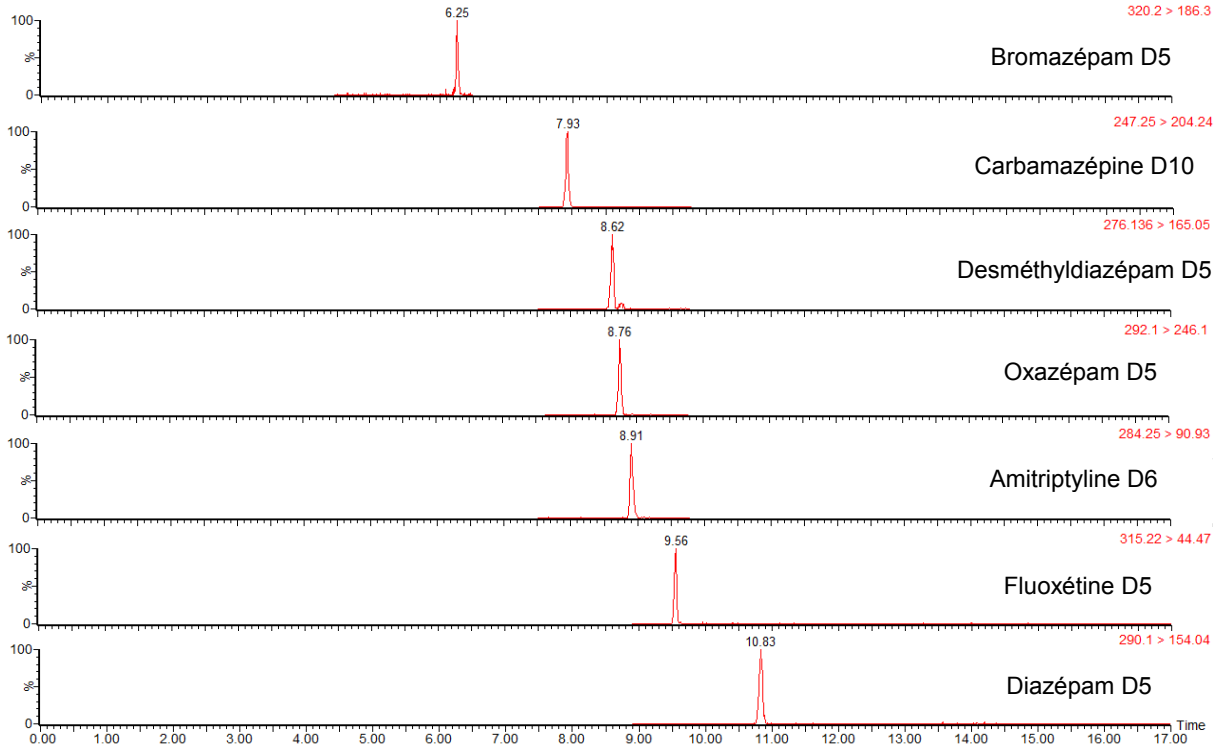



386.2 > 122.17
5.74
Buspirone
144.08 > 57.36
6.07
Valpromide
318.23 > 182.13
6.25
Bromazépam
265.18 > 208.13
6.78
Miansérine
314.08 > 271.16
6.99
Amoxapine
325.18 > 109.03
7.09
Citalopram
280.16 > 107.03
7.15
Doxépine
437.13 > 292.1
7.48
Tianeptine
237.17 > 194.09
7.93
Carbama-
330.1 > 70.38
8.17
Paroxétine
281.23 > 86.22
8.38
Imipramine
324.22 > 100.11
8.48
Cyamémazine
375.18 > 201.11
8.62
Hydroxyzine
271.16 > 140.02
8.63
Desméthyldiazépam
271.19 > 140.27
8.63
Clorazépate


8.69
278.21 > 250.15
Maprotiline
8.70
287.07 > 241.07
Oxazépam
8.75
298.24 > 44.4
Duloxétine
8.83
278.21 > 105.08
Amitryptiline
8.93
310.32 > 265.28
Méthadone
9.17
296.06 > 134.04
Norfluoxétine
9.25
316.08 > 270.08
Clonazépam
9.25
321.3 > 275.11
Lorazépam
9.37
309.04 > 205.11
Alprazolam
9.49
310.18 > 44.4
Fluoxétine
9.59
306.1 > 159.06
Sertraline
9.59
319.11 > 86.1
Chlorpromazine
9.93
314.07 > 268.2
Flunitrazépam
10.06
315.15 > 86.1
Clomipramine
10.19
301.16 > 255.23
Témazépam
10.64
301.16 > 259.17
Clobazam

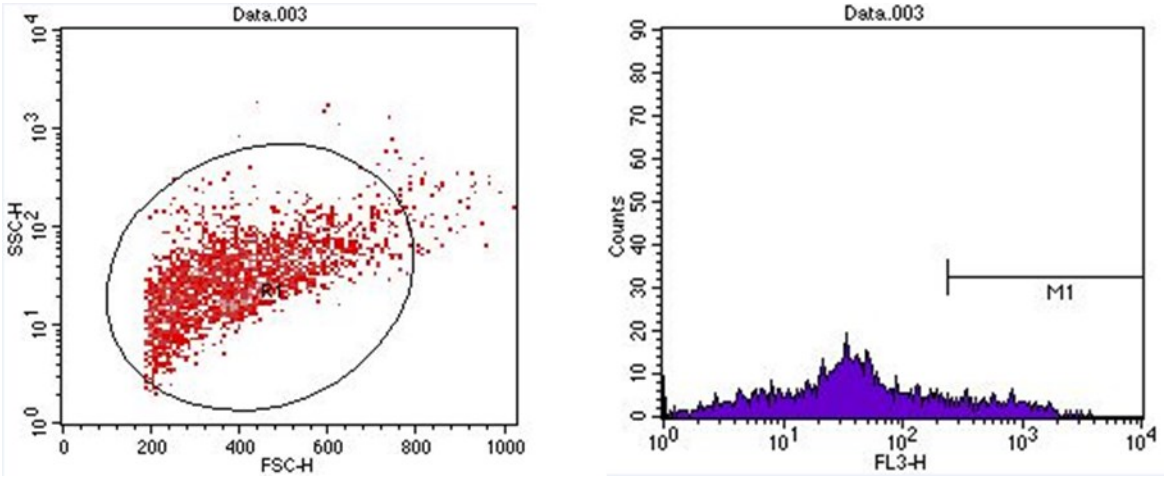


Etalons internes



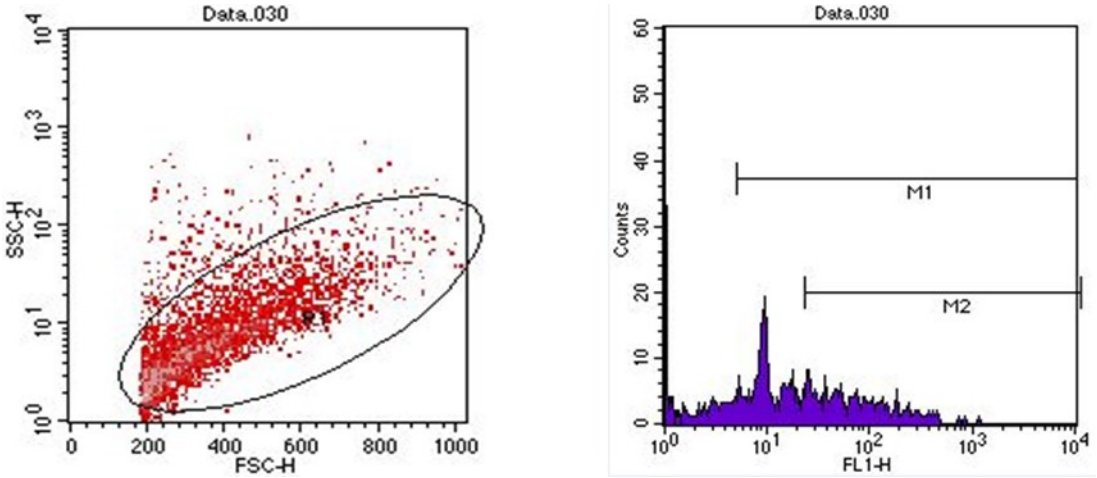
***Annexe 15**. Exemples de graphiques obtenus par cytométrie en flux.*

a) La viabilité cellulaire



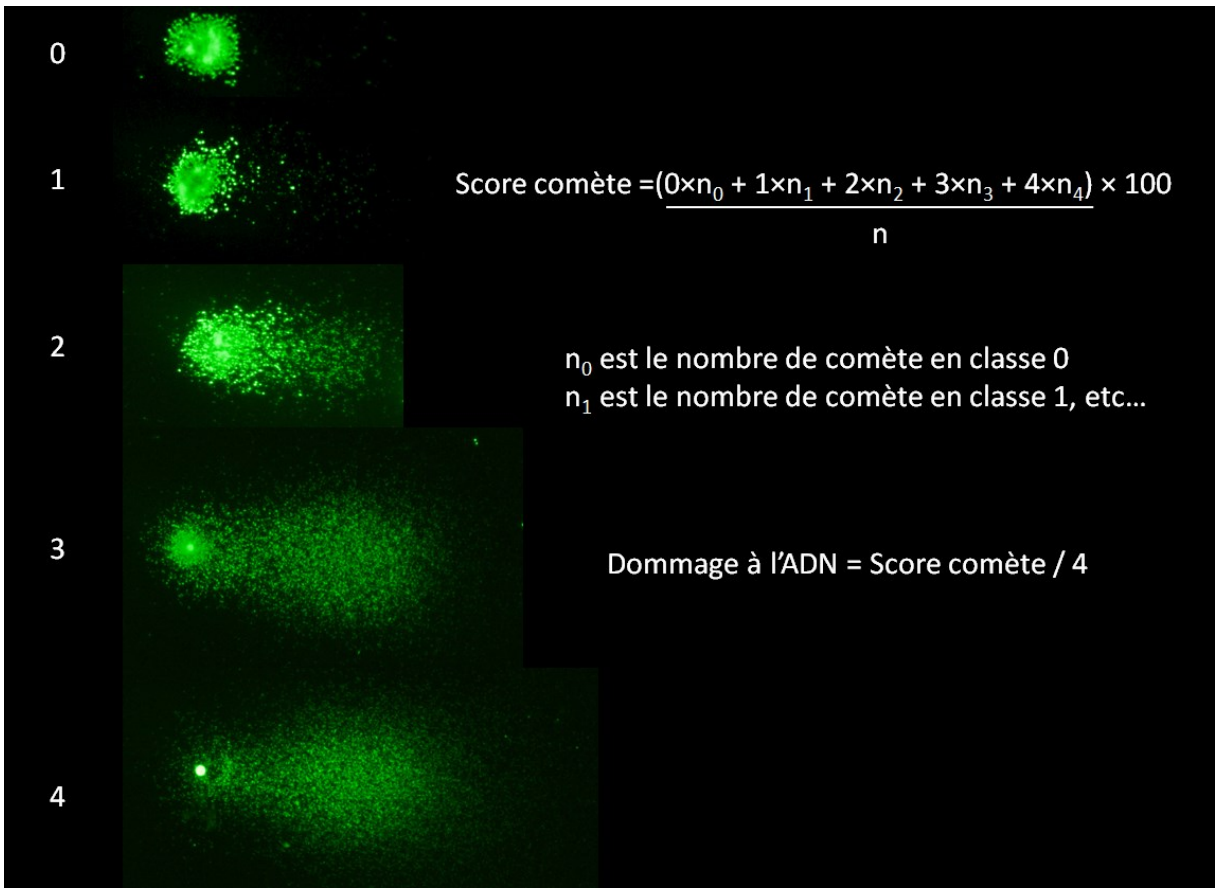
Exeple de cytogramme permettant de déterminer la proportion d'hémocytes morts et donc d'en déduire le nombre de cellules vivantes.
La marque M1 indique les hémocytes morts marqués à l'IP.

b) La phagocytose hémocytaire



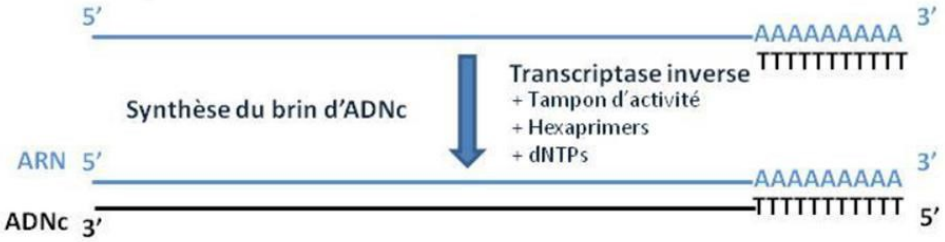
Exemple de cytogramme permettant de déterminer le pourcentage de phagocytose.
La marque M1 indique les hémocytes qui ont phagocytés 1 bille et plus, c'est l'immunocapacité.
La marque M2 indique les hémocytes qui ont phagocytés 3 bille et plus, c'est l'immunoefficacité.

***Annexe 16**. Les 5 catégories de classement des comètes selon Azqueta et al., 2011 (photos de Emilie Lacaze).*

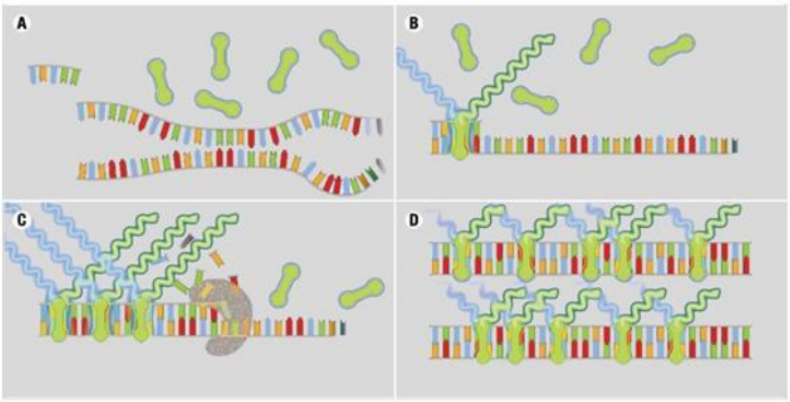


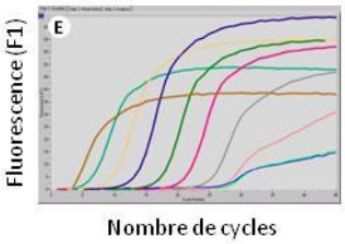
***Annexe 17**. Protocole de qPCR en temps réel (adaptée de Paul-pont, 2010).*

1. Extraction des ARN et synthèse des ADNc



2. Amplification du gène d'intérêt par qPCR en temps réel





A. Dénaturation : Séparation des 2 brins par augmentation de la Température (96°C). Le SYBR Green en solution émet peu de fluorescence.

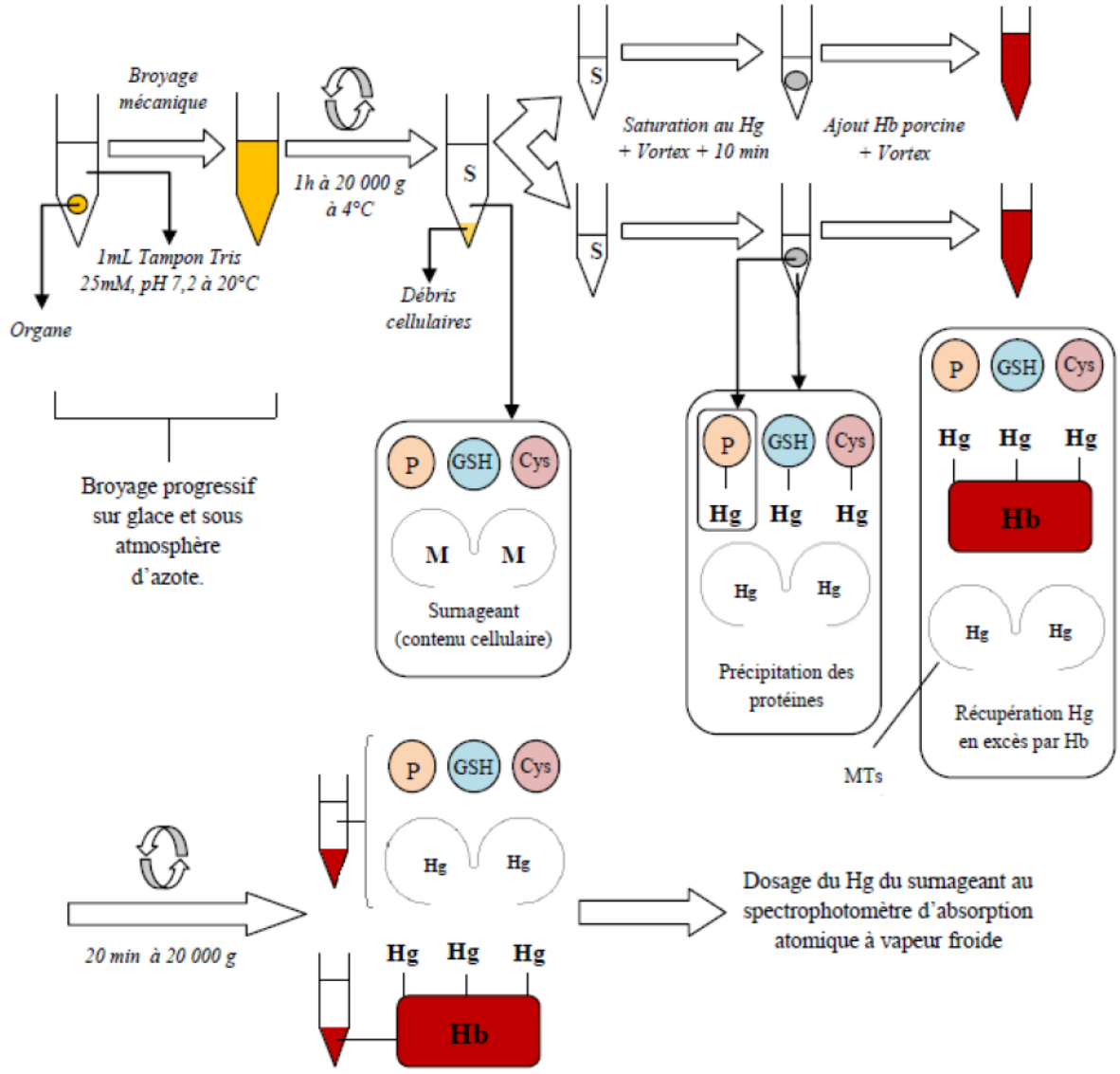
B. Annealing : Fixation des amorces et intercalation du SYBR Green entre les 2 brins d'ADN. Légère émission de fluorescence.

C. Elongation : Synthèse du brin complémentaire par la *Taq* polymerase avec incorporation progressive du SYBR Green augmentant ainsi la fluorescence. Le signal de fluorescence est mesuré par le thermocycleur à la fin de chaque phase d'élongation.

D. Cycle après cycle : Augmentation du signal de fluorescence à chaque cycle en relation avec l'augmentation d'ADNc synthétisé.

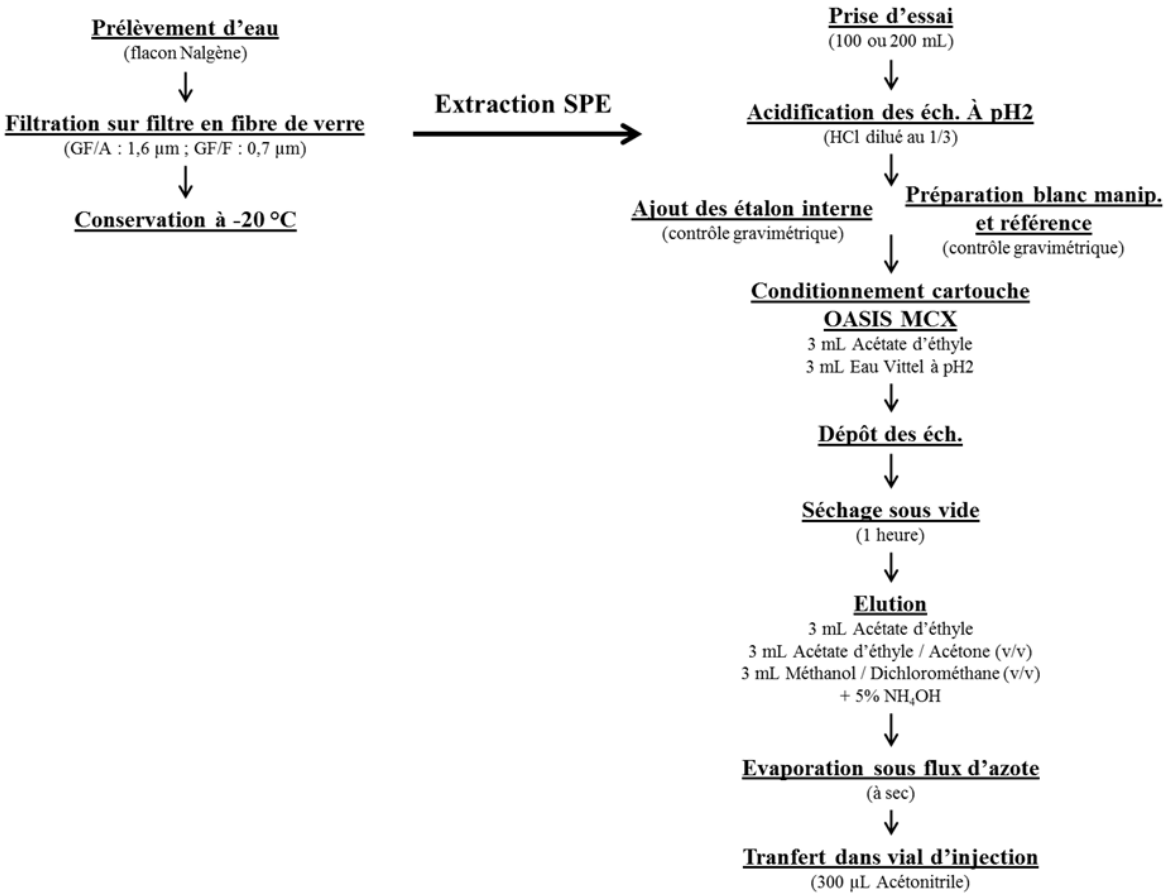
E. Evolution de la fluorescence en fonction du nombre de cycle de PCR

***Annexe 18**. Protocole d'extraction des métallothionéines (source : Bijoux, 2014).*



P : Protéines ; GSH : Glutathion ; Cys : Cystéine ; M : Métal ; Hg : Mercure ; Hb : Hémoglobine ; S : Surnageant

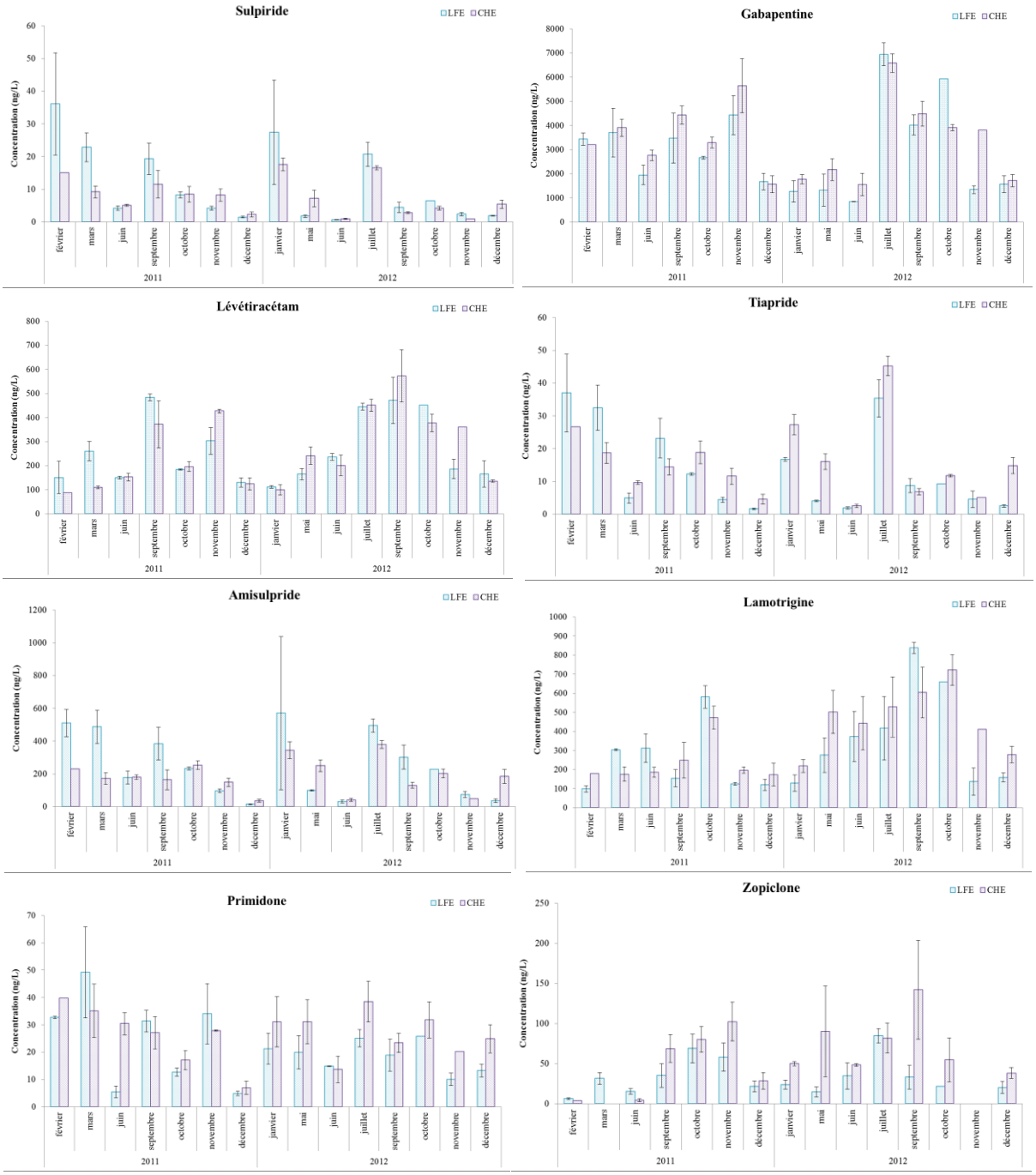
***Annexe 19**. Protocole SPE pour les 47 psychotropes étudiés.*

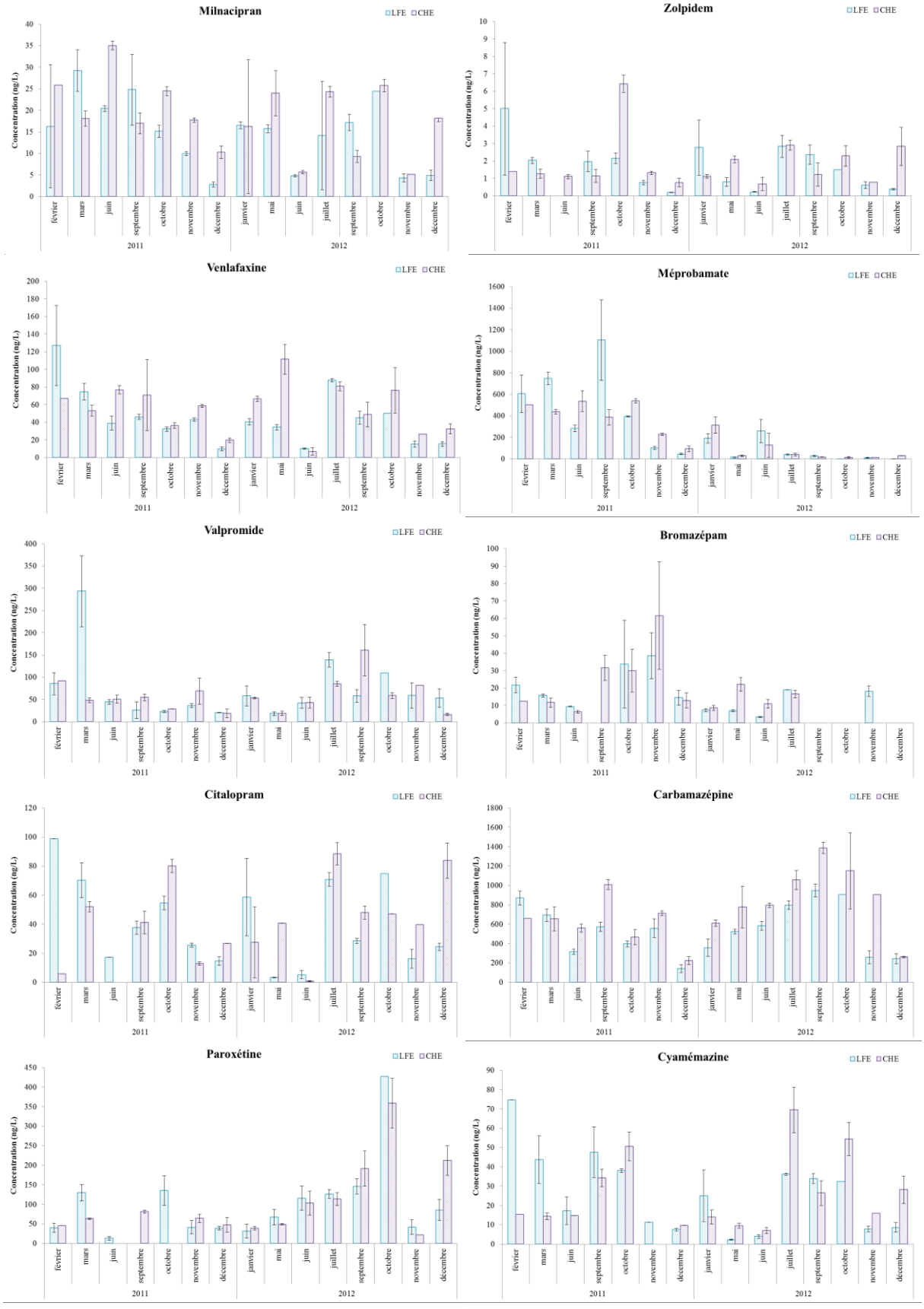


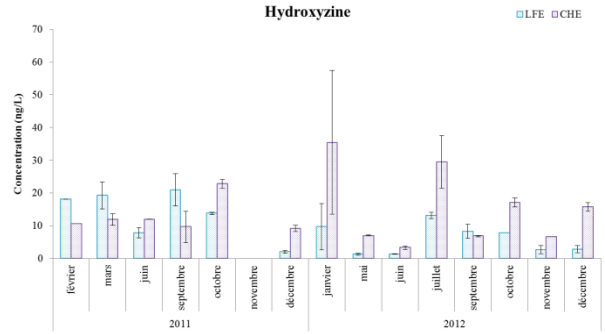
***Annexe 20**. Tableau des concentrations des composés détectés dans les eaux et les POCIS (en ng/L) dans 3 sites de la Jalle de Blanquefort.*

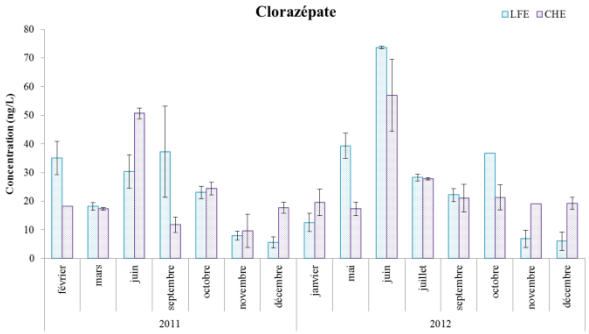
Composés	Amont		Moulin blanc (1,1 km)		Pont des religieuses (9,2 km)	
	Eau (ng/L)	POCIS (ng/L)	Eau (ng/L)	POCIS (ng/L)	Eau (ng/L)	POCIS (ng/L)
Benzodiazépines						
Zopiclone	1,3	3,4	11,6	4,4	11,9	4,6
Nordiazépam	0,3	0,6	2,1	2,3	1,5	1,3
Oxazépam	22,1	20,7	149,3	80,3	139,1	53,3
Alprazolam	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Bromazépam	< LDM	< LDM	< LDM	0,9	< LDM	1,2
Clobazam	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Clonazépam	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Clorazépate	1,0	0,7	0,9	3,4	1,3	1,6
Diazépam	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Lorazépam	48,7	-	31,4	-	47,8	-
Flunitrazépam	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Témazépam	< LDM	0,3	3,0	2,6	2,2	0,7
Prazépam	0,2	0,2	0,8	0,4	1,3	0,4
Antidépresseurs						
Mirtazapine	3,2	0,8	1,2	1,1	3,5	1,0
Milnacipram	1,7	6,8	5,4	35,4	5,7	11,6
Venlafaxine	4,0	4,6	16,7	22,0	16,0	7,1
Miansérine	0,1	0,2	1,3	0,9	0,8	0,3
Amoxapine	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Citalopram	1,3	3,4	11,6	4,4	11,9	4,6
Tianeptine	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Paroxétine	0,4	0,6	4,4	0,8	3,5	0,4
Imipramine	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
Maprotiline	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Duloxetine	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Amitryptiline	0,4	0,7	3,4	2,1	3,1	0,8
Fluoxétine	< LDM	0,2	< LDM	0,1	< LDM	0,2
Doxépine	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Clomipramine	0,2	0,1	0,6	0,5	0,4	0,1
Antipsychotiques - Neuroleptiques						
Sulpiride	1,1	1,5	5,4	8,8	5,2	3,0
Cyamémazine	< LDM	0,5	0,7	0,8	0,8	0,8
Tiapride	0,3	0,8	2,9	8,4	2,7	2,6
Amisulpuride	3,8	17,4	37,9	116,7	41,4	48,0
Pimozide	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Antiépileptiques						
Gabapentine	206,7	-	338,8	-	311,2	-
Valpromide	4,1	0,6	6,2	4,1	2,7	1,0
Carbamazépine	12,6	15,9	112,2	72,5	107,1	51,2
Lévétiracétam	1,3	-	5,3	-	3,2	-
Lamotrigine	16,3	12,5	158,2	53,2	110,4	45,1
Primidone	0,5	0,9	8,1	6,5	5,7	2,7
Anxiolytiques						
Méprobamate	33,8	18,4	63,7	61,4	63,5	16,1
Buspirone	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Hydroxyzine	0,2	1,1	0,7	0,8	0,5	0,8
Substituts aux opiacés						
Méthadone	0,2	0,4	0,8	0,3	0,5	0,4

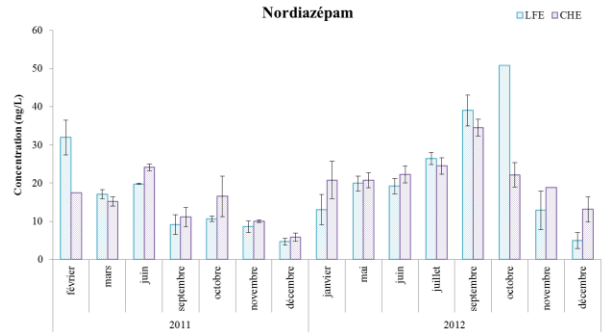
***Annexe 21**. Evolution annuelle des concentrations de psychotropes retrouvés dans les effluents d'entrée de Clos de Hilde et Louis Fargue.*

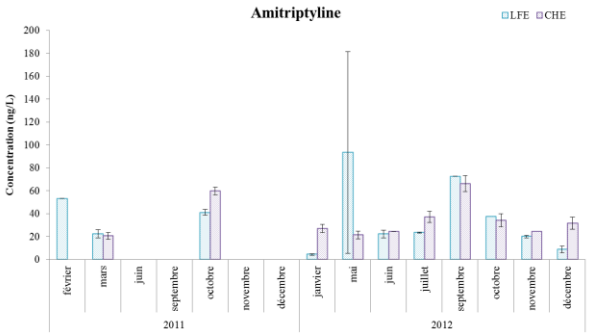


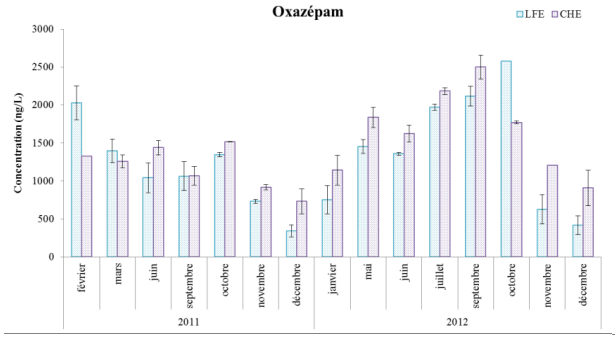

Milnacipran
Zolpidem
Venlafaxine
Méprobamate
Valpromide
Bromazépam
Citalopram
Carbamazépine
Paroxétine
Cyamémazine
LFE
CHE
Concentration (ng/L)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juillet
2011
2012

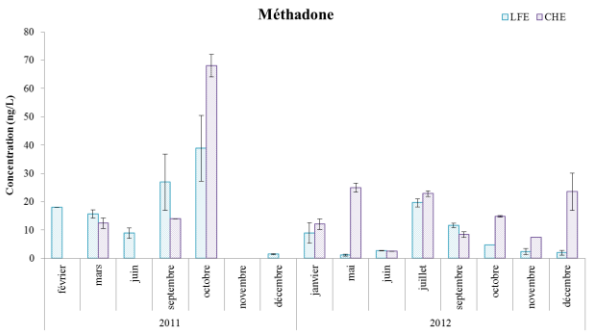

Hydroxyzine
LFE CHE
Concentration (ng/L)
0 10 20 30 40 50 60 70
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012

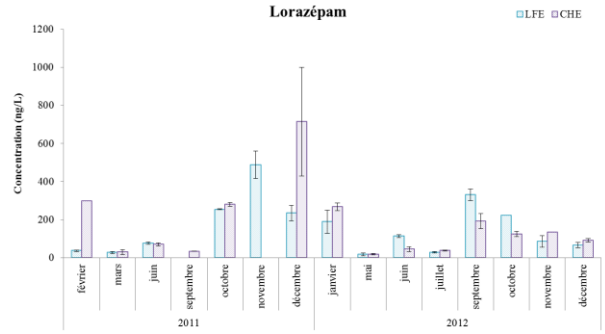

Clorazépate
LFE CHE
Concentration (ng/L)
0 10 20 30 40 50 60 70 80
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012

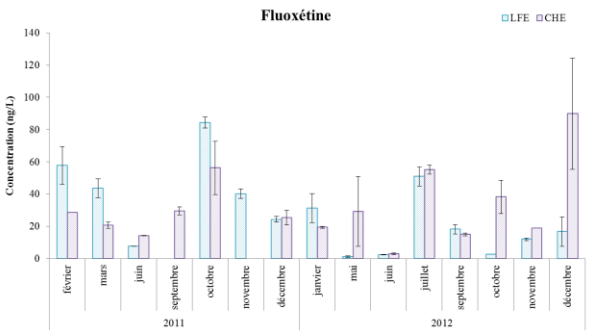

Nordiazépam
LFE CHE
Concentration (ng/L)
0 10 20 30 40 50 60
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012

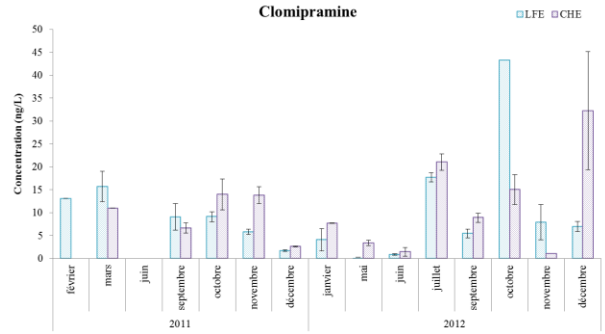

Amitriptyline
LFE CHE
Concentration (ng/L)
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012

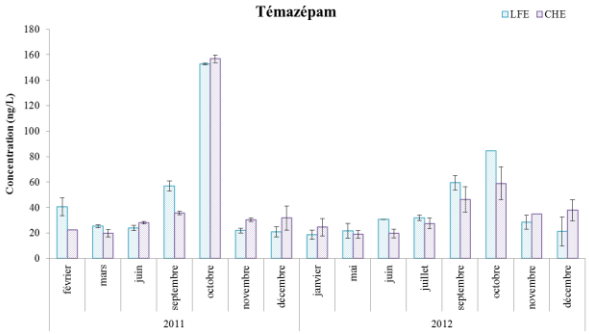

Oxazépam
LFE CHE
Concentration (ng/L)
0 500 1000 1500 2000 2500 3000
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012

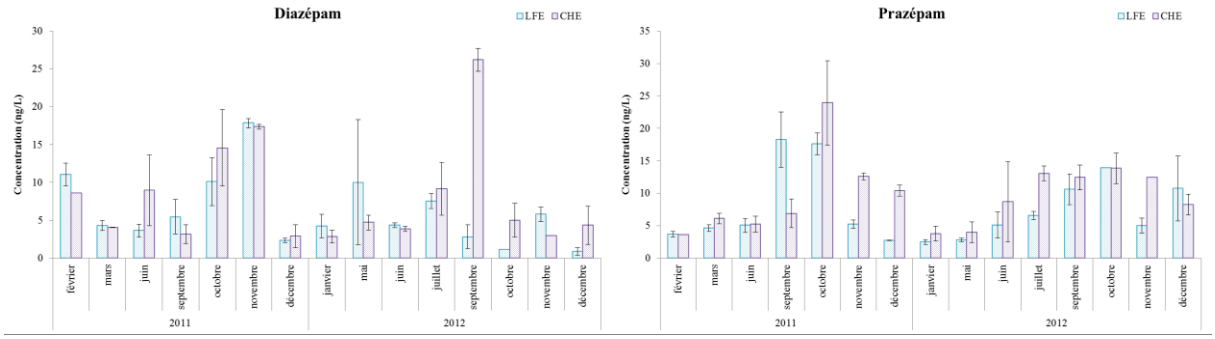

Méthadone
LFE CHE
Concentration (ng/L)
0 10 20 30 40 50 60 70 80
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012


Lorazépam
LFE CHE
Concentration (ng/L)
0 200 400 600 800 1000 1200
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012

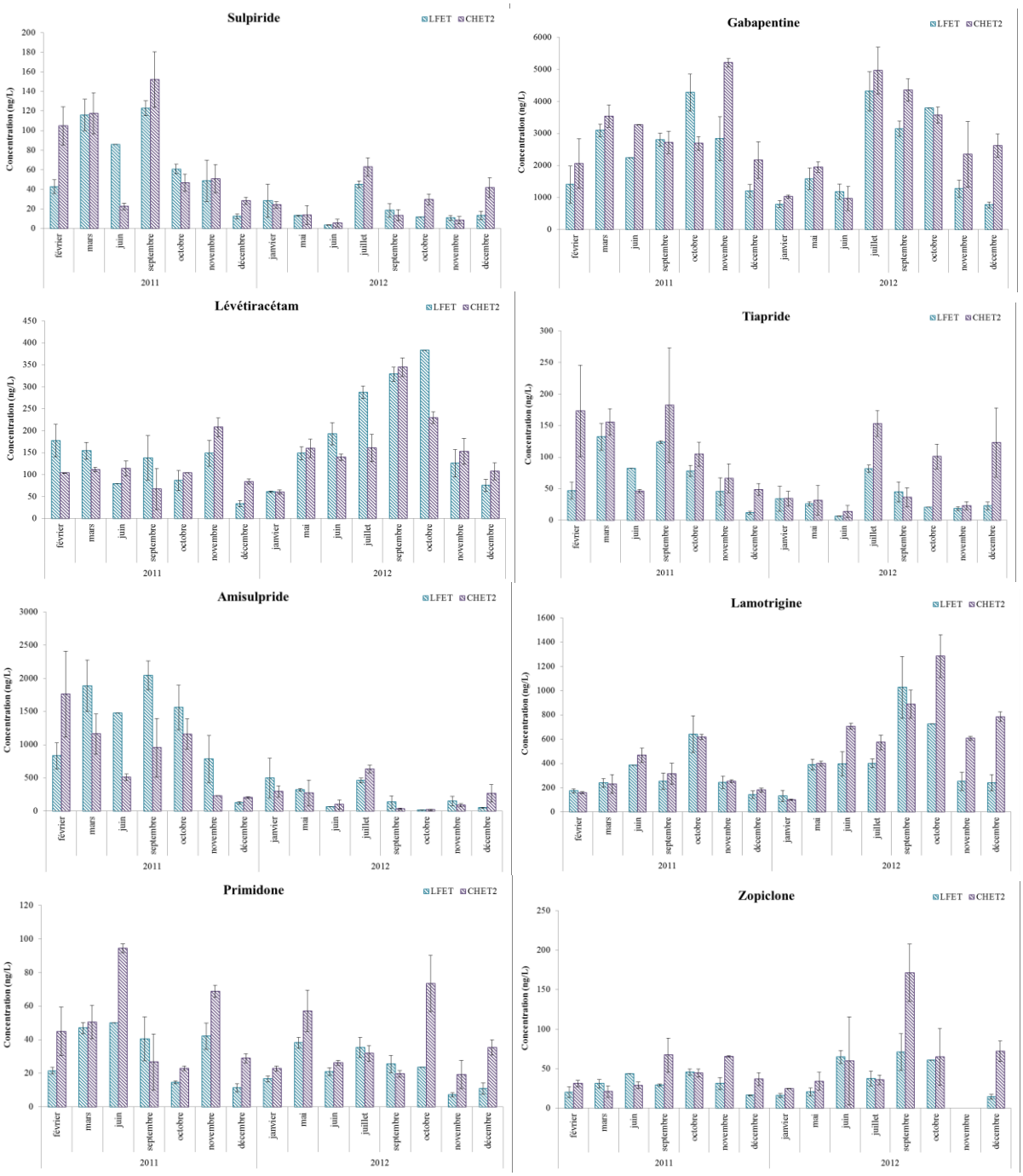

Fluoxétine
LFE CHE
Concentration (ng/L)
0 20 40 60 80 100 120 140
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012

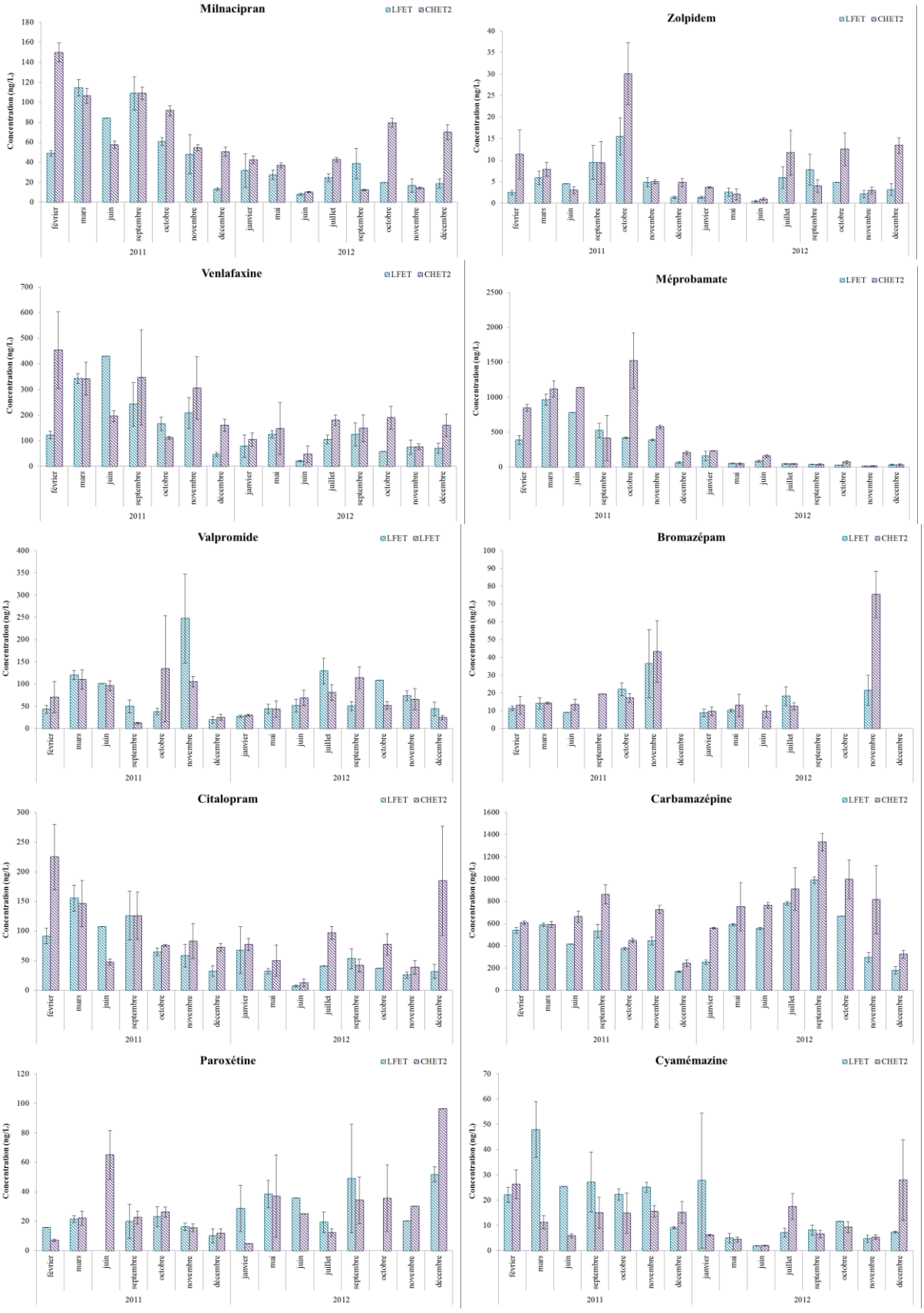

Clomipramine
LFE CHE
Concentration (ng/L)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012

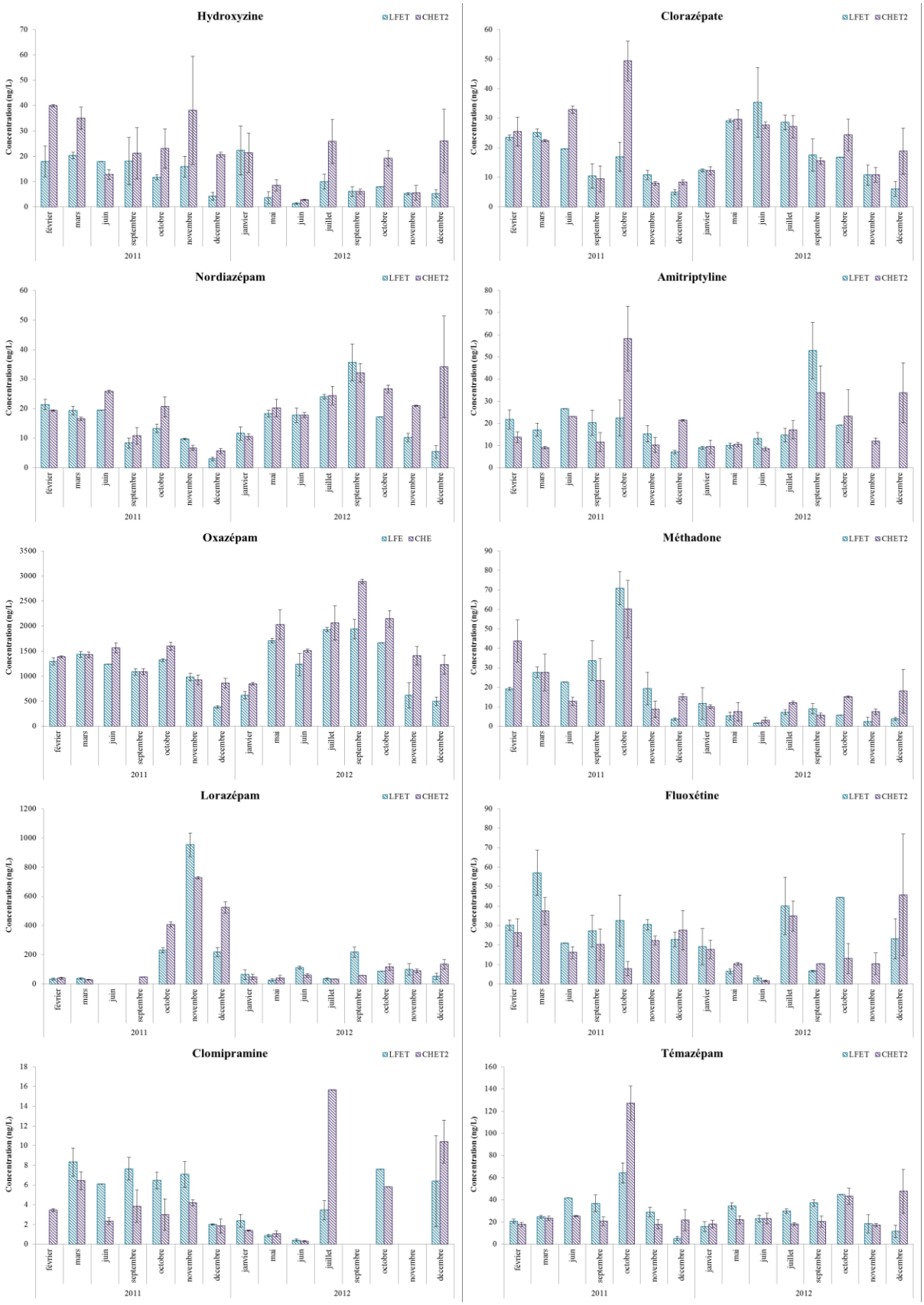

Témazépam
LFE CHE
Concentration (ng/L)
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012

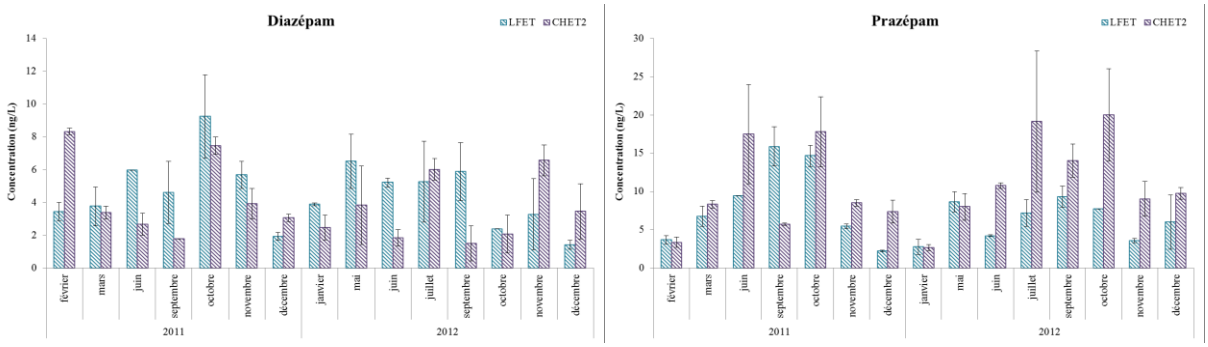

Diazépam
LFE
CHE
Concentration (ng/L)
30
25
20
15
10
5
0
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012
Prazépam
LFE
CHE
Concentration (ng/L)
35
30
25
20
15
10
5
0
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

***Annexe 22**. Evolution annuelle des concentrations de psychotropes retrouvés dans les effluents de sortie de Clos de Hilde et Louis Fargue.*

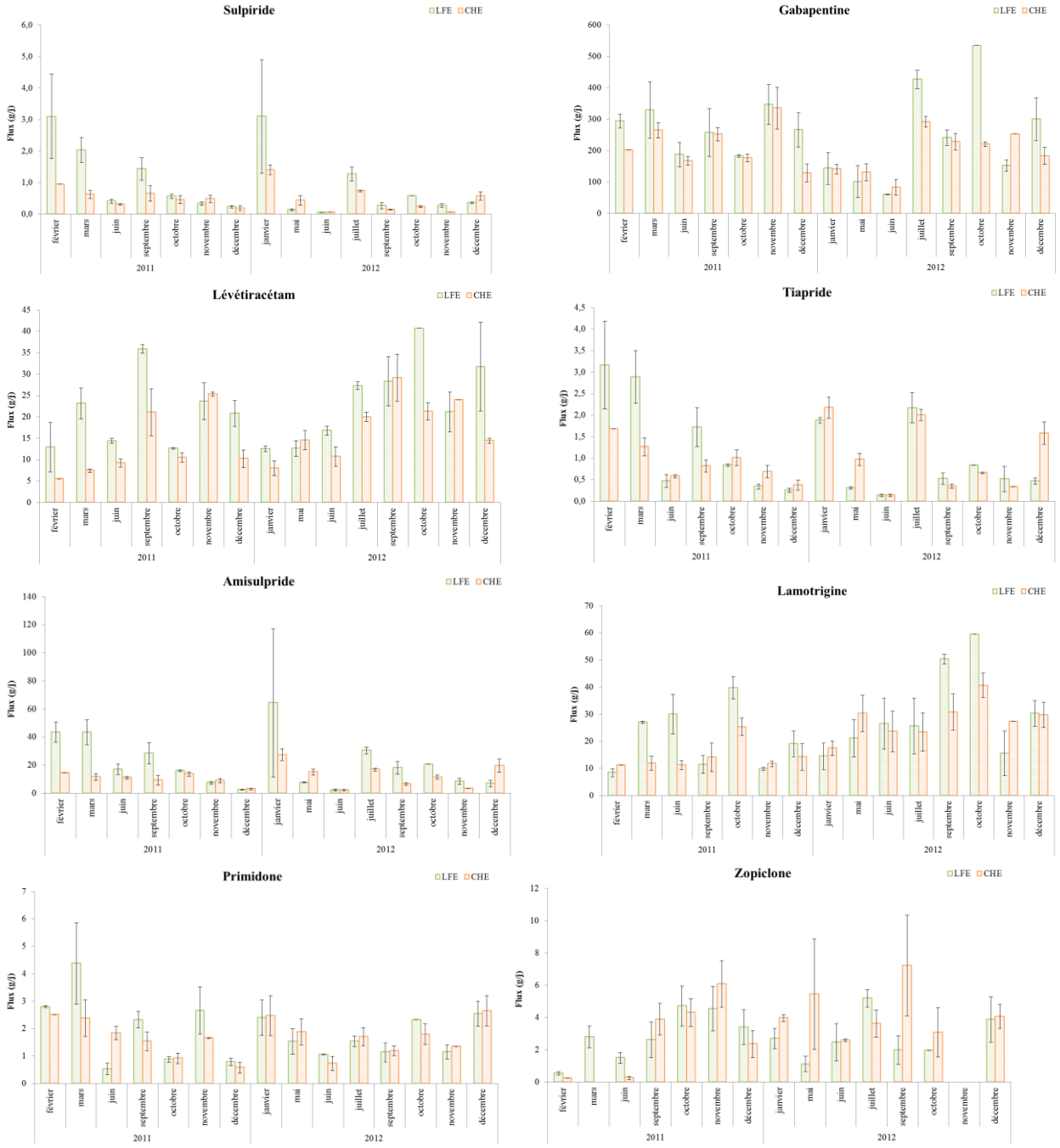


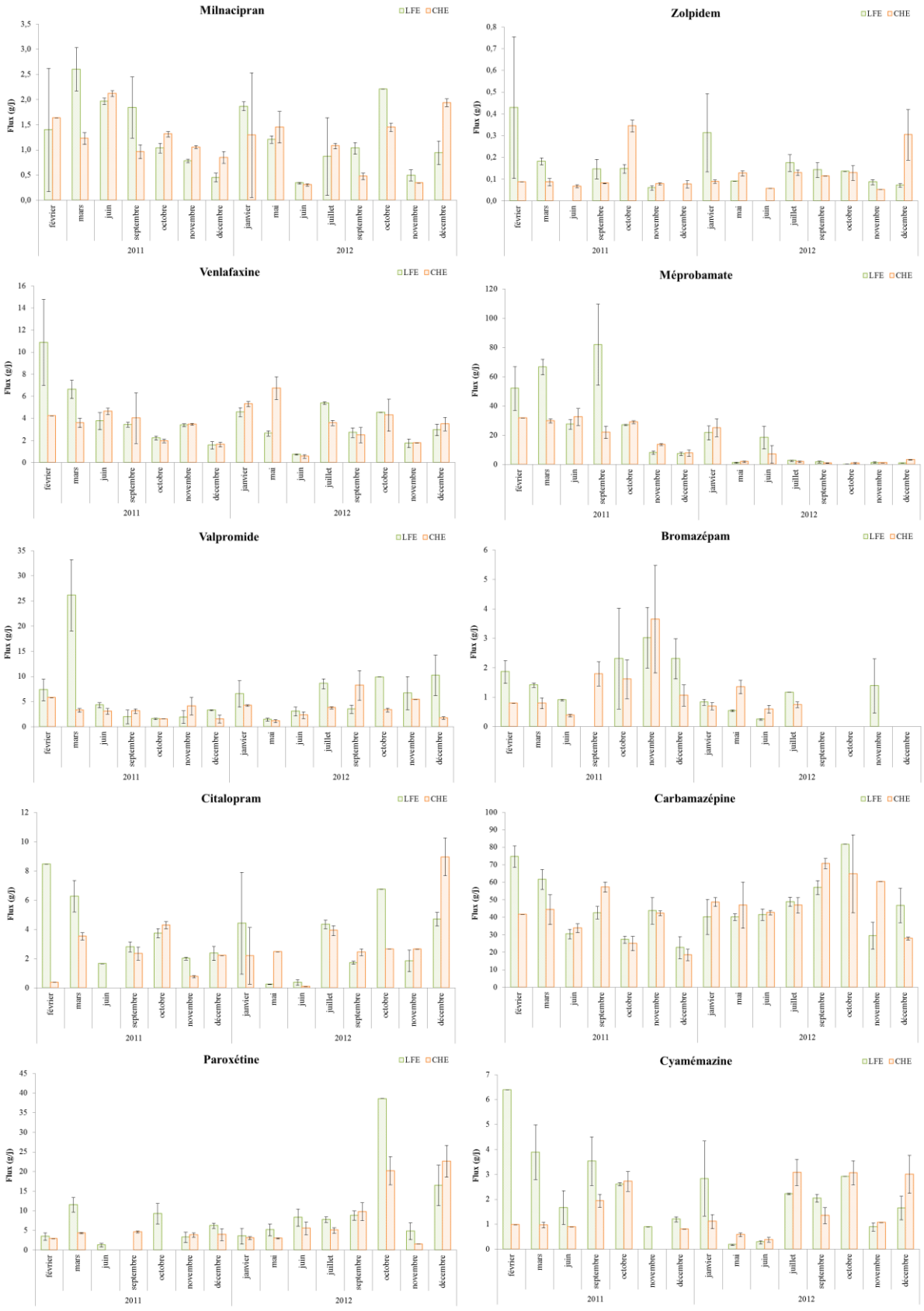

Milnacipran
LFET CHET2
Concentration (ng/L)
Zolpidem
Venlafaxine
Méprobamate
Valpromide
LFET LFET
Bromazépam
Citalopram
Carbamazépine
Paroxétine
Cyamémazine
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011
2012

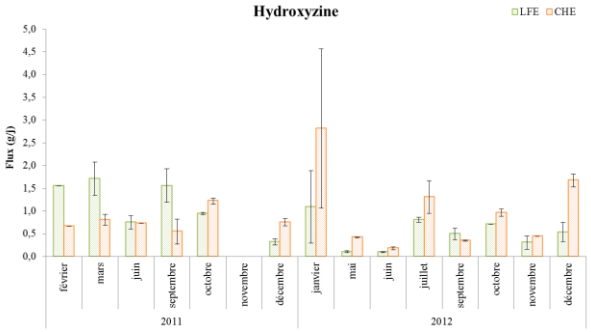

Hydroxyzine
LFET CHET2
Concentration (ng/L)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Clorazépate
LFET CHET2
Concentration (ng/L)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Nordiazépam
LFET CHET2
Concentration (ng/L)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Amitriptyline
LFET CHET2
Concentration (ng/L)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Oxazépam
LFE CHE
Concentration (ng/L)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Méthadone
LFET CHET2
Concentration (ng/L)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Lorazépam
LFET CHET2
Concentration (ng/L)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Fluoxétine
LFET CHET2
Concentration (ng/L)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Clomipramine
LFET CHET2
Concentration (ng/L)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Témazépam
LFET CHET2
Concentration (ng/L)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012

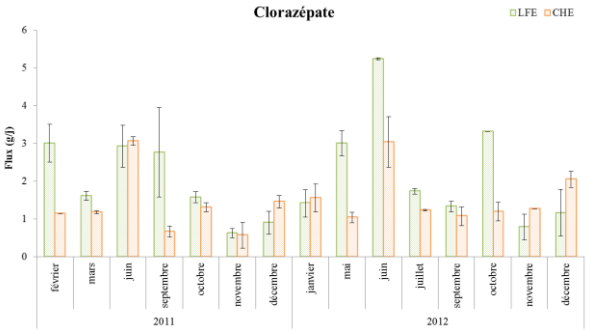

Diazépam
LFET
CHET2
Concentration (ng/L)
14
12
10
8
6
4
2
0
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012
Prazépam
LFET
CHET2
Concentration (ng/L)
30
25
20
15
10
5
0
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

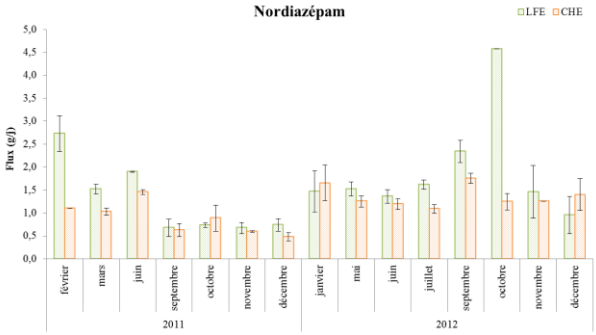
***Annexe 23**. Evolution annuelle des flux de psychotropes retrouvés dans les effluents d'entrée de Clos de Hilde et Louis Fargue.*

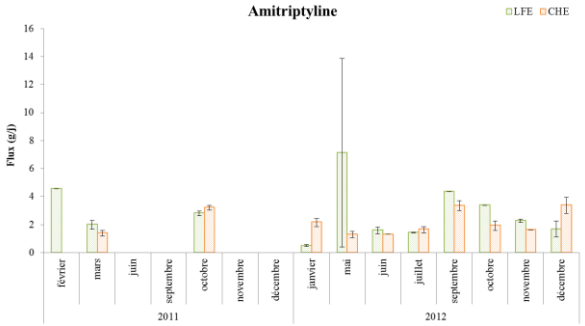


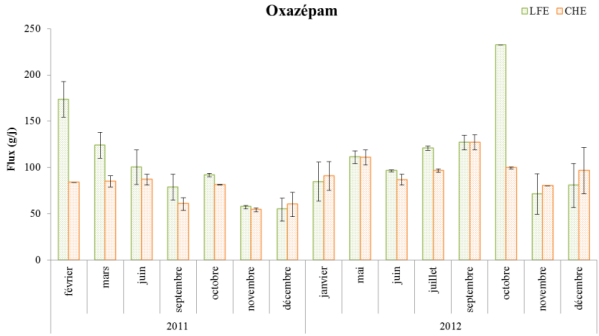

Milnacipran
LFE CHE
Flux (g/j)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Zolpidem
LFE CHE
Flux (g/j)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Venlafaxine
LFE CHE
Flux (g/j)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Méprobamate
LFE CHE
Flux (g/j)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Valpromide
LFE CHE
Flux (g/j)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Bromazépam
LFE CHE
Flux (g/j)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Citalopram
LFE CHE
Flux (g/j)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Carbamazépine
LFE CHE
Flux (g/j)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Paroxétine
LFE CHE
Flux (g/j)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012
Cyamémazine
LFE CHE
Flux (g/j)
février mars juin septembre octobre novembre décembre janvier mai juin juillet septembre octobre novembre décembre
2011 2012

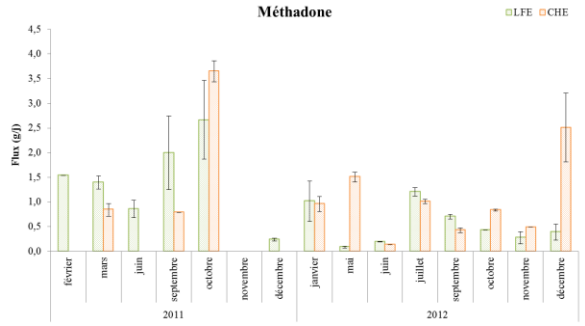

Hydroxyzine
LFE
CHE
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

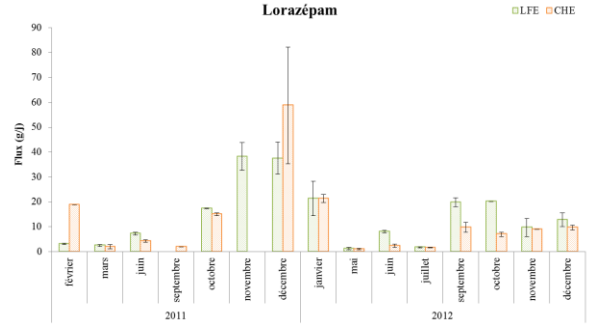

Clorazépate
LFE
CHE
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

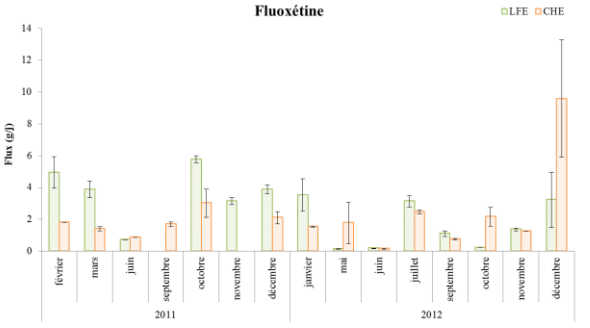

Nordiazépam
LFE
CHE
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

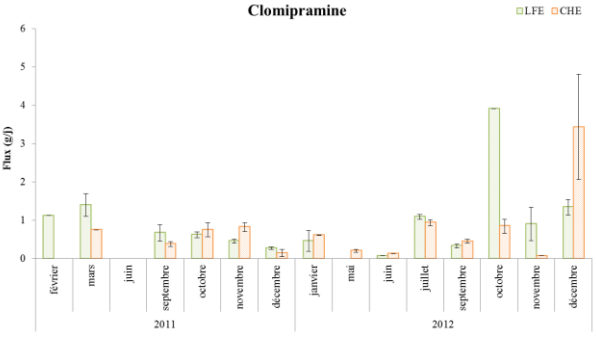

Amitriptyline
LFE
CHE
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

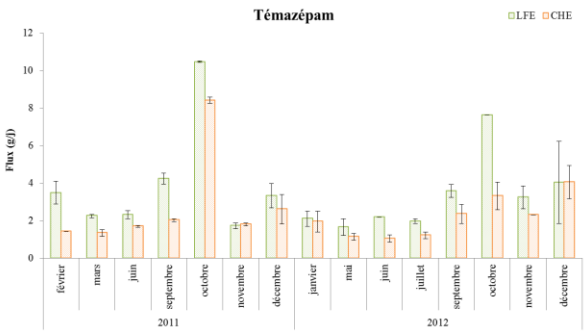

Oxazépam
LFE
CHE
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

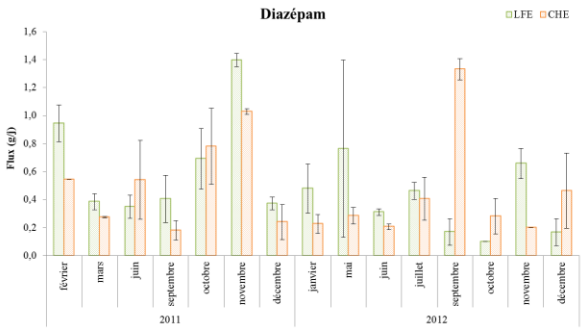

Méthadone
LFE
CHE
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

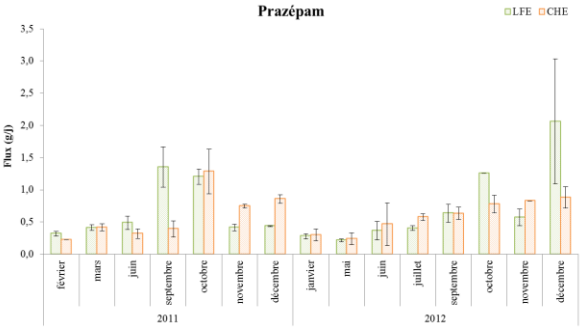

Lorazépam
LFE
CHE
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012


Fluoxétine
LFE
CHE
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

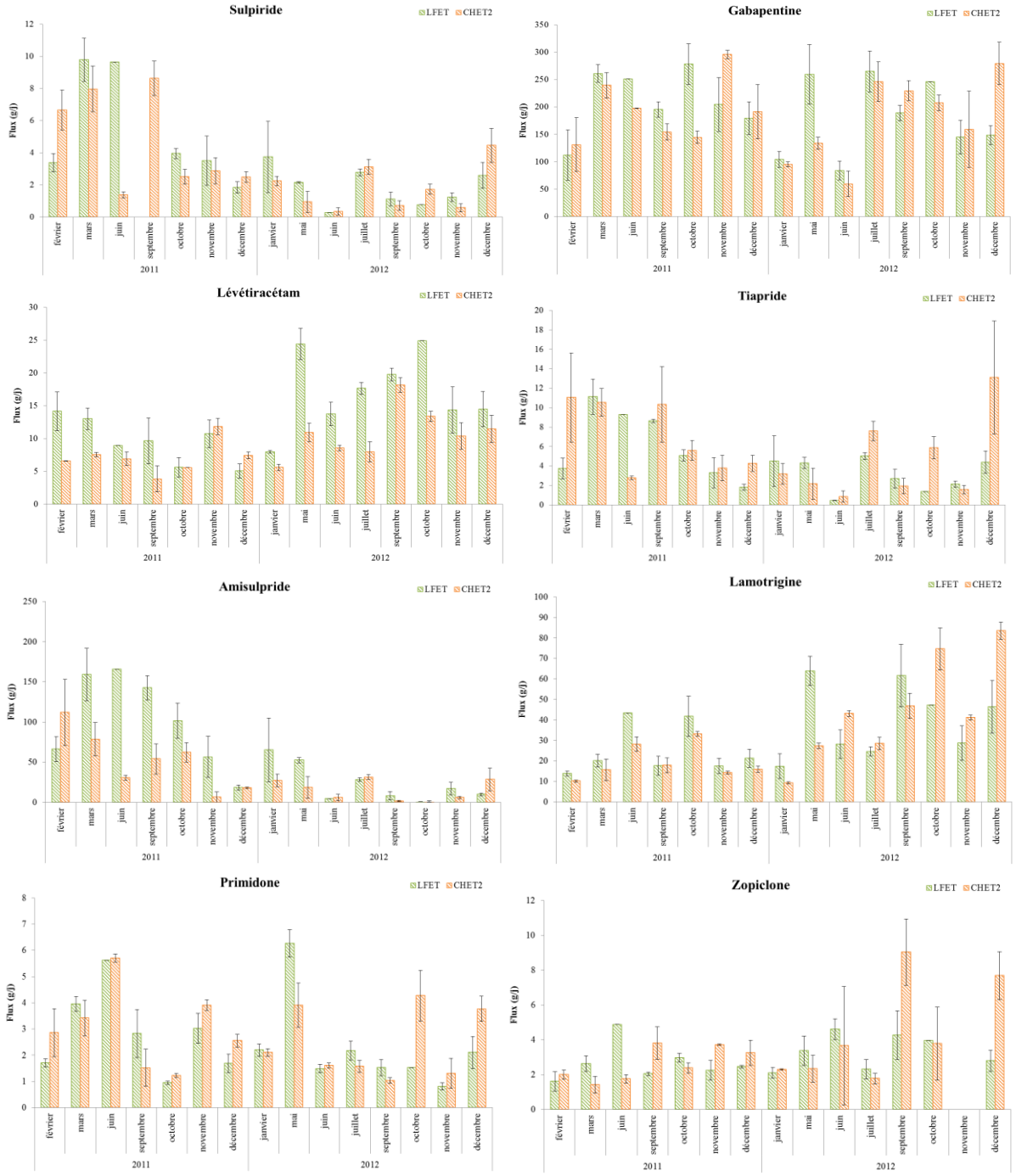

Clomipramine
LFE
CHE
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

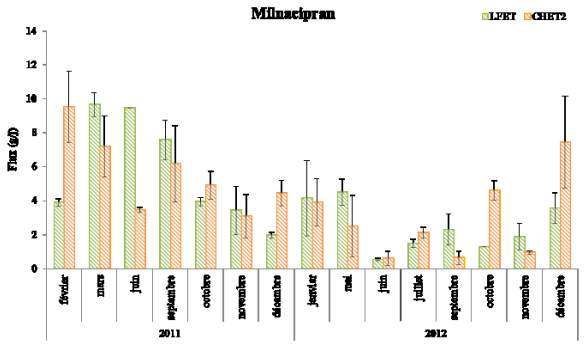

Témazépam
LFE
CHE
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

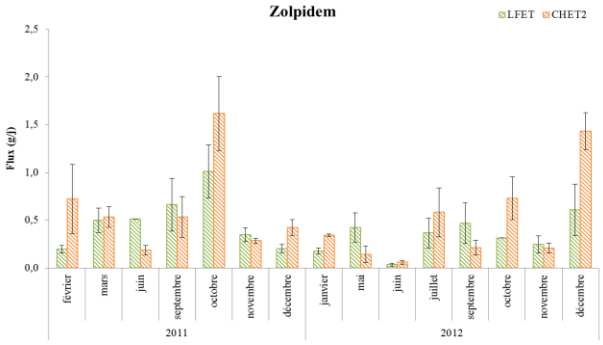

Diazépam
LFE
CHE
Flux (g/j)
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
decembre
2011
2012

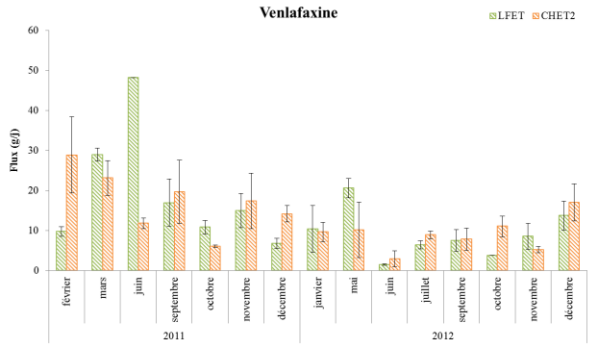

Prazépam
LFE
CHE
Flux (g/j)
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

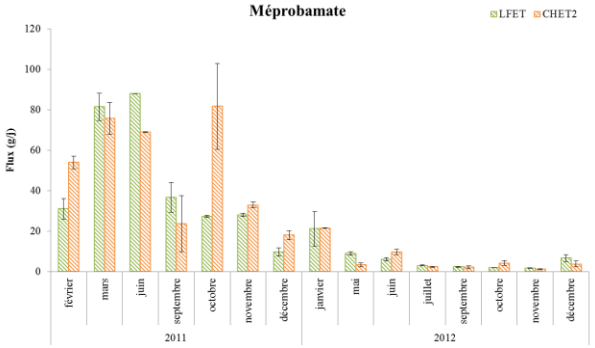
***Annexe 24**. Evolution annuelle des flux de psychotropes retrouvés dans les effluents de sortie de Clos de Hilde et Louis Fargue.*

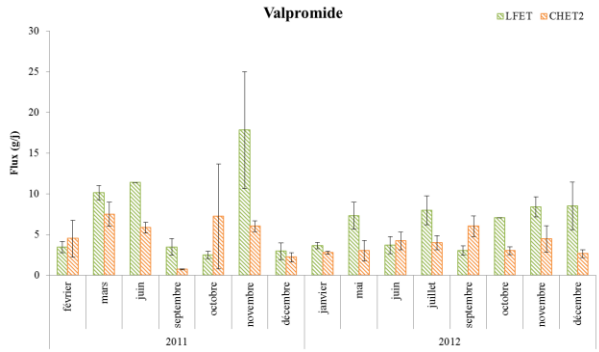


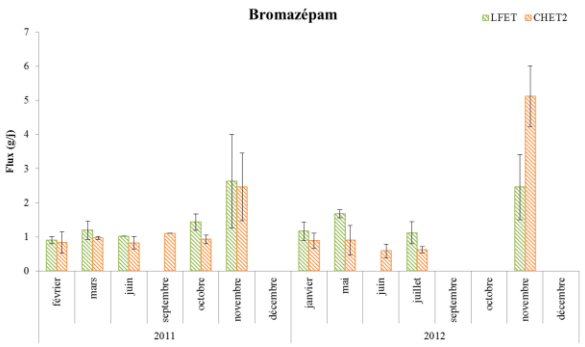

Milnacipran
LFET
CHET2
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

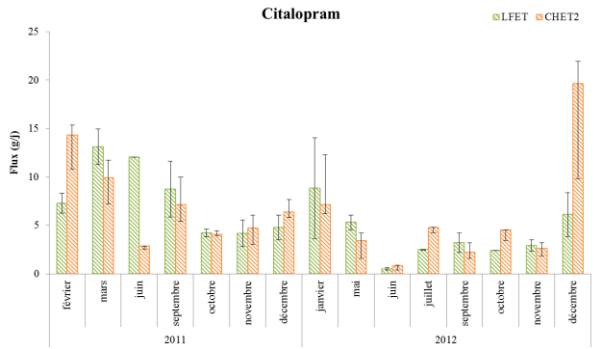

Zolpidem
LFET
CHET2
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

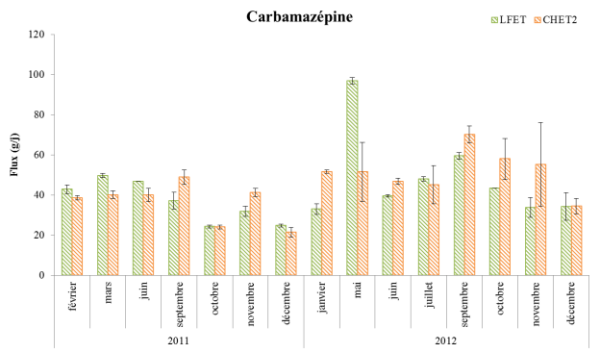

Venlafaxine
LFET
CHET2
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

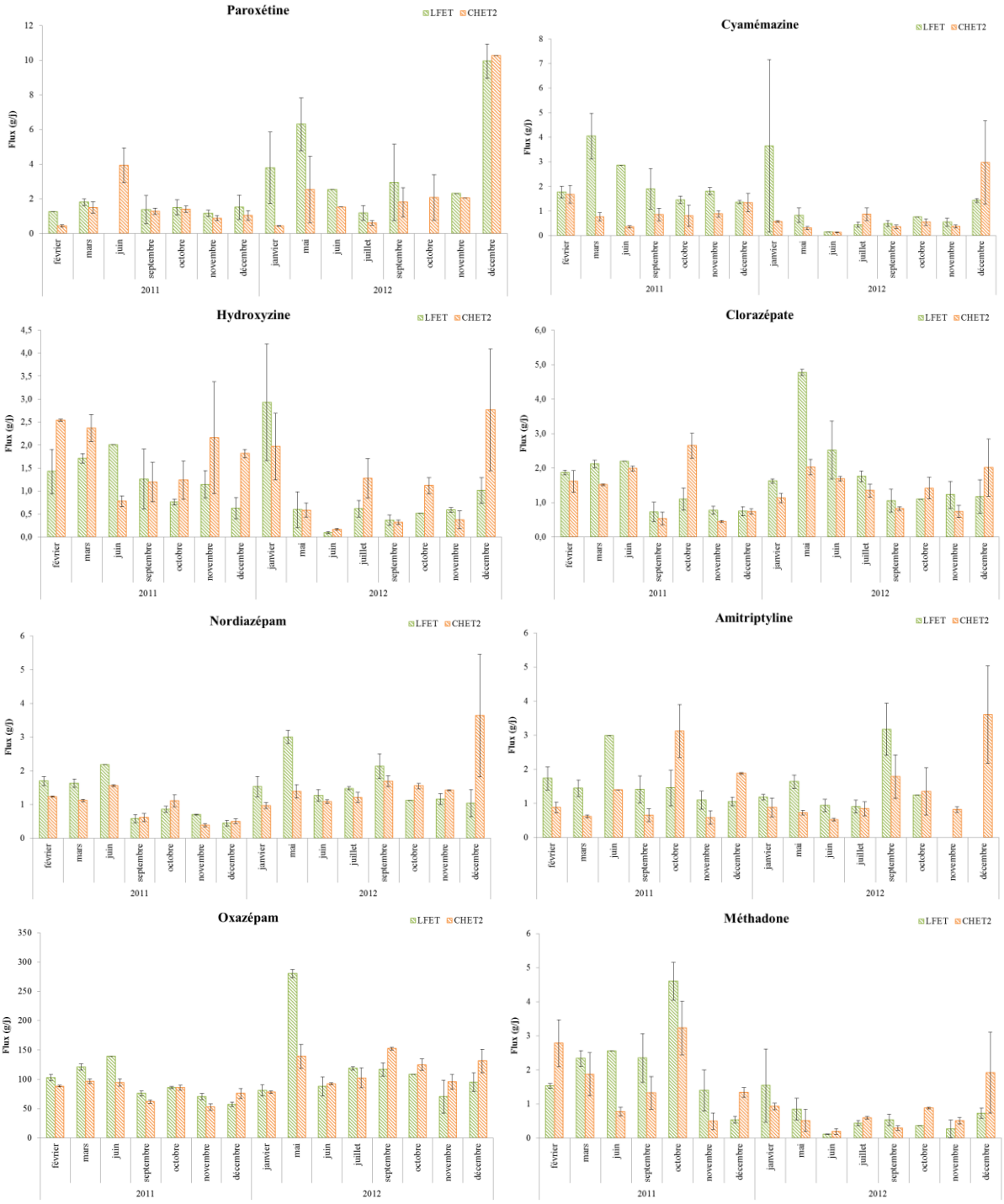

Méprobamate
LFET
CHET2
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012

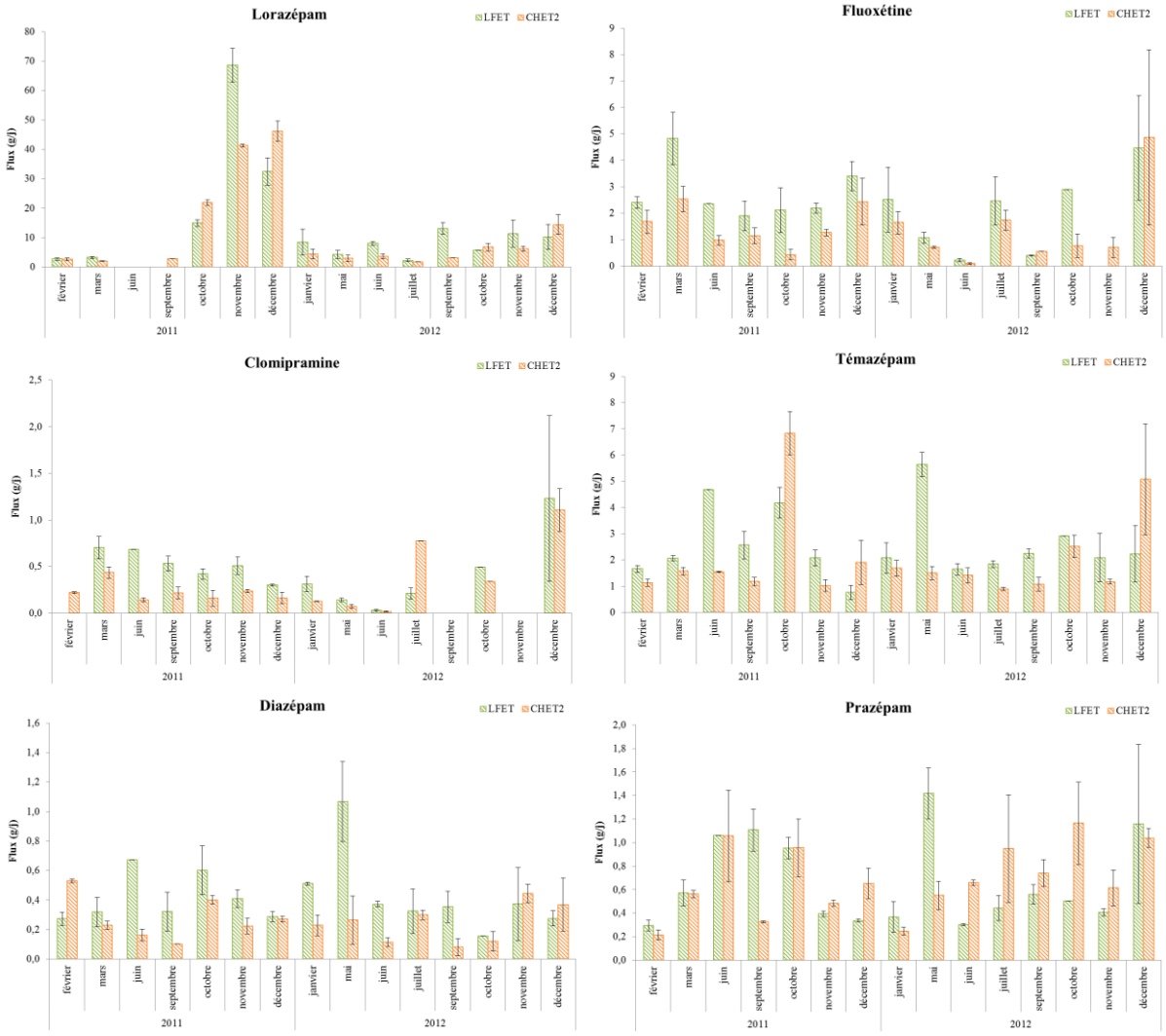

Valpromide
LFET
CHET2
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012


Bromazépam
LFET
CHET2
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012


Citalopram
LFET
CHET2
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012


Carbamazépine
LFET
CHET2
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012


Paroxétine
LFET
CHET2
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juillet
2011
2012
Cyamémazine
Hydroxyzine
Clorazépate
Nordiazépam
Amitriptyline
Oxazépam
Méthadone


Lorazépam
LFET
CHET2
Flux (g/j)
février
mars
juin
septembre
octobre
novembre
décembre
janvier
mai
juin
juillet
septembre
octobre
novembre
décembre
2011
2012
Fluoxétine
Clomipramine
Témazépam
Diazépam
Prazépam

***Annexe 25**. Concentrations moyennes (en ng/L) mesurées lors du suivi dans l'estuaire de la Gironde.*

Classes thérapeutiques	Composés	Pauillac		Libourne		Bordeaux		Bègles		Cadaujac		Saint Macaire	
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Benzodiazépines	Zopiclone	0,6	0,3	0,7	0,2	0,7	0,3	0,6	0,3	0,7	0,4	0,6	0,3
	Zolpidem	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1
	Nordiazépam	0,4	0,2	0,6	0,3	0,8	0,3	0,7	0,4	0,5	0,3	0,5	0,2
	Oxazépam	11,5	4,3	20,8	14,5	30,4	11,8	19,2	8,2	20,2	9,5	19,6	8,3
	Alprazolam	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Bromazépam	0,7	0,3	0,9	0,5	1,3	1,0	0,9	0,4	1,3	1,1	0,8	0,4
	Clobazam	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Clonazépam	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Clorazépate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Diazépam	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Lorazépam	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Flunitrazépam	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Témazépam	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Prazépam	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1
Antidépresseurs	Mirtazapine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Milnacipran	2,9	2,6	0,7	0,3	1,9	1,1	1,7	1,0	1,9	1,6	4,3	3,6
	Venlafaxine	2,6	2,2	1,6	0,9	3,0	2,4	2,0	1,2	2,5	1,6	5,3	5,1
	Miansérine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Amoxapine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Citalopram	0,6	0,5	0,4	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	1,5	1,5
	Tianeptine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Paroxétine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Imipramine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Maprotiline	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Duloxétine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Amitriptyline	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Fluoxétine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Sertraline	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Doxépine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Norfluoxétine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Clomipramine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Antipsychotiques - Neuroleptiques	Sulpiride	0,9	0,6	0,8	0,5	1,6	1,3	1,0	0,6	1,1	0,7	2,0	1,4
	Cyamémazine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Chlorpromazine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Tiapride	2,2	1,8	1,2	0,8	3,3	2,8	2,8	1,8	2,8	1,6	7,4	6,5
	Amisulpride	3,7	3,1	1,9	1,2	7,2	6,5	3,8	2,2	3,5	2,1	9,3	7,8
	Pimozide	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Antiépileptiques	Gabapentine	11,5	7,4	29,5	23,2	59,2	34,3	30,0	17,4	40,8	28,0	31,0	19,5
	Valpromide	1,7	0,8	3,3	2,0	2,6	1,6	1,5	0,7	2,2	1,9	1,2	0,5
	Carbamazépine	5,9	3,3	7,8	4,9	13,0	6,7	8,4	3,8	9,6	6,3	8,4	4,1
	Lévétiracétam	0,6	0,4	2,5	2,1	2,3	1,4	1,2	0,7	1,0	0,7	0,8	0,4
	Lamotrigine	10,8	6,4	10,9	5,1	14,0	6,5	13,7	9,6	19,9	17,4	7,8	5,1
	Primidone	4,4	4,6	2,4	1,9	1,7	0,8	1,4	0,7	2,3	1,3	2,5	1,8
Anxiolytiques	Méprobamate	3,7	1,2	3,0	0,0	5,3	2,6	3,8	0,9	3,2	0,7	4,2	0,7
	Buspirone	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Hydroxyzine	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Substituts aux opiacés	Méthadone	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1

***Annexe 26**. Concentrations moyennes (en ng/L) mesurées lors du suivi dans le fleuve Saint Laurent.*

Classes thérapeutiques	Composés	Rivière l'Assomption		Rivière des Prairies				Fleuve Saint Laurent (côté Repentigny)				Fleuve Saint Laurent (côté Montréal)					
		Site 1		Site 10		Site 2		Site 3		Site 4		Site 5		Site 6		Site 7		Site 8		Site 9	
		Conc. moy.	± ET	Conc. moy.	± ET	Conc. moy.	± ET	Conc. moy.	± ET	Conc. moy.	± ET	Conc. moy.	± ET	Conc. moy.	± ET	Conc. moy.	± ET	Conc. moy.	± ET	Conc. moy.	± ET
Benzodiazépines	Zopiclone	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Zolpidem	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Nordiazépam	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Oxazépam	6,8 ± 2,6		6,8 ± 1,6		6,8 ± 1,4		6,0 ± 1,3		5,7 ± 1,1		6,9 ± 0,7		nd		nd		nd		nd	
	Alprazolam	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Bromazépam	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Clobazam	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Clonazépam	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Clorazépate	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Diazépam	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Lorazépam	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Flunitrazépam	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Témazépam	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Prazépam	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
Antidépresseurs	Mirtazapine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Milnacipran	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Venlafaxine	4,5 ± 3,7		0,5 ± 0,1		3,7 ± 3,2		3,9 ± 3,4		4,6 ± 3,4		2,2 ± 1,5		1,1 ± 1,0		0,6 ± 0,5		0,7 ± 0,6		0,6 ± 0,5	
	Miansérine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Amoxapine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Citalopram	0,7 ± 0,3		0,1 ± 0,01		0,7 ± 0,5		0,8 ± 0,4		0,7 ± 0,5		0,5 ± 0,3		0,8 ± 0,2		0,2 ± 0,1		0,5 ± 0		0,2 ± 0,1	
	Tianeptine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Paroxétine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Imipramine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Maprotiline	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Duloxétine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Amitriptyline	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Fluoxétine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Sertraline	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Doxépine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Norfluoxétine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Clomipramine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
Antipsychotiques – Neuroleptiques	Sulpiride	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Cyamémazine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Chlorpromazine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Tiapride	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Amisulpride	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Pimozide	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
Antiépileptiques	Gabapentine	54,8 ± 14,8		62,2 ± 17,0		56,2 ± 14,5		56,8 ± 12,4		48,7 ± 18,0		62,7 ± 38,9		18,8 ± 4,1		23,7 ± 4,0		24,0 ± 1,9		22,7 ± 2,9	
	Valpromide	0,9 ± 0,4		1,2 ± 0,5		1,5 ± 0,5		1,1 ± 0,2		0,7 ± 0,3		1,2 ± 0,3		1,2 ± 0,7		0,8 ± 0,4		1,2 ± 0,2		0,9 ± 0,2	
	Carbamazépine	5,6 ± 2,2		5,6 ± 0,9		5,0 ± 1,9		5,4 ± 2,0		4,6 ± 1,1		5,9 ± 2,4		1,1 ± 0,3		1,7 ± 0,9		1,6 ± 0,3		1,6 ± 0,3	
	Lévétiracétam	0,6 ± 0,1		0,6 ± 0,4		0,7 ± 0,4		0,6 ± 0,2		0,7 ± 0,2		0,4 ± 0,2		0,3 ± 0,2		0,3 ± 0,2		0,3 ± 0,1		0,4 ± 0,3	
	Lamotrigine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Primidone	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
Anxiolytiques	Méprobamate	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Buspirone	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
	Hydroxyzine	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	
Substituts aux opiacés	Méthadone	nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd		nd	

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUES

Abou Mrad, N. (2011). Développements méthodologiques pour l'échantillonnage et l'analyse des hydrocarbures dans les systèmes aquatiques : application dans des expérimentations en conditions semi-contrôlées et dans le milieu environnemental. Université Bordeaux 1.

Abril, G., Nogueira, M., Etcheber, H., Cabeçadas, G., Lemaire, E., Brogueira, M.J. (2002). Behaviour of organic carbon in nine contrasting European estuaries. Estuar. Coast. Shelf Sci. 54, 241–262.

Académie nationale de Pharmacie (2008). Médicaments et environnement.

Achard, M. (2004). Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. Aquatic Toxicology 67, 347–357.

Aguirre-Martínez, G.V., Buratti, S., Fabbri, E., DelValls, A.T., Martín-Díaz, M.L. (2013). Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. Journal of Environmental Sciences 25, 1408–1418.

Ahlford (2007). Environmental Risk Assessment of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) Fluoxetine, Citalopram, Sertraline, Paroxetine and the Benzodiazepine Oxazepam. UPPSALA University.

Akaishi, F., Stjean, S., Bishay, F., Clarke, J., Rabitto, I., Ribeiro, C. (2007). Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. Aquatic Toxicology 82, 1–14.

Allen, G.P. (1972). Etude des processus sédimentaires dans l'estuaire de la Gironde. Université de Bordeaux 1.

Allen, G.P., Sauzay, G., Castaing, P., Jouanneau, J.M. (1977). Transport and deposition of suspended sediment in the Gironde Estuary, France. Estuarine processes, New York, U.S.A., Academic Press, 63–81.

Alvarez, D. (1999). « Development of an integrative sampling device for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments ». Thèse de doctorat, Université de Missouri-Columbie, Columbie, Etats Unis.

Alvarez, D.A., Petty, J.D., Huckins, J.N., Jones-Lepp, T.L., Getting, D.T., Goddard, J.P., Manahan, S.E. (2004). Development of a passive, *in situ*, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. Environ. Toxicol. Chem. 23, 1640–1648.

Alvarez, D.A., Stackelberg, P.E., Petty, J.D., Huckins, J.N., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T. (2005). Comparison of a novel passive sampler to standard water-column sampling for organic contaminants associated with wastewater effluents entering a New Jersey stream. Chemosphere 61, 610–622.

Aminot, Y. (2013). Etude de l'impact des effluents urbains sur la qualité des eaux de la Garonne estuarienne : application aux composés pharmaceutiques et aux filtres UV. Université Bordeaux 1.

Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. Chemosphere 50, 1319–1330.

Anses (2011). Campagne nationale d'occurrence des résidus de médicaments dans les eaux destinée à la consommation humaine.

ANSM (2012). Analyse des ventes de médicaments en France en 2011.

ANSM (2013a). Analyse des ventes de médicaments en France en 2012.

ANSM (2013b). État des lieux de la consommation des benzodiazépines en France.

ANSM (2014). Analyses des ventes de médicaments en France en 2013.

Arini A. (2011). Décontamination métallique et capacités de récupération de deux composantes biologiques d'un hydrosystème naturel-Biofilms diatomiques et bivalves filtreurs-après remédiation d'un site industriel. Université Bordeaux 1.

Arini, A., Daffe, G., Gonzalez, P., Feurtet-Mazel, A., Baudrimont, M. (2014). Detoxification and recovery capacities of *Corbicula fluminea* after an industrial metal contamination (Cd and Zn): A one-year depuration experiment. Environmental Pollution 192, 74–82.

Arrêté du 08/01/98 (1998). Arrêté du 08/01/98 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 08/12/97 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées | AIDA.

Audry, S., Blanc, G., Schäfer, J. (2004). Cadmium transport in the Lot-Garonne River system (France) - temporal variability and a model for flux estimation. Sci. Total Environ. 319, 197–213.

Auffret, M. & Oubella, R. (1997). Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comparative Biochemistry and Physiology, part A 118, 705–712.

Azqueta, A., Meier, S., Priestley, C., Gutzkow, K.B, Brunborg, G., Sallette, J., Soussaline, F., Collins, A. (2011). The Influence of Scoring Method on Variability in Results Obtained with the Comet Assay. Mutagenesis 26, 393–399.

Baker, D.R., Kasprzyk-Hordern, B. (2011). Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1218, 1620–1631.

Baker, D.R., Kasprzyk-Hordern, B. (2013). Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments. Science of The Total Environment 454-455, 442–456.

Baker, D.R., Barron, L., Kasprzyk-Hordern, B. (2014). Illicit and pharmaceutical drug consumption estimated via wastewater analysis. Part A: Chemical analysis and drug use estimates. Science of The Total Environment 487, 629–641.

Barra Caracciolo, A., Topp, E., Grenni, P. (2015). Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 106, 25–36.

Baudrimont, M. (1997). Etude du rôle des métallothionéines à l'égard des mécanismes de bioaccumulationn du cadmium, du mercure et du zinc par les organismes aquatiques (mollusque bivalve d'eau douce : *Corbicula fluminea*, poissons Cyprinidés) : approches expérimentales et *in situ*. Université Bordeaux 1.

Baudrimont, M., Lemaire-Gony, S., Ribeyre, F., Métivaud, J., Boudou, A. (1997). Seasonal Variations of Metallothionein Concentrations in the Asiatic Clam (*Corbicula fluminea*). Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 118, 361–367.

Baudrimont, M., Andres, S., Durrieu, G., Boudou, A. (2003). The key role of metallothioneins in the bivalve (*Corbicula fluminea)* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. Aquatic toxicology 63, 89–102.

Beck, E.T, Zhang, H., Lin, W., Beauregard, K., Habicht. G.S., Truong, N. (2001). Nitric oxide production by coelomocytes of *Asterias forbesi*. Dev. Comp. Immunol. 25, 1–10.

Bedding, N.D., McIntyre, A.E., Perry, R., Lester, J.N. (1982). Organic contaminants in the aquatic environment. I Sources and occurrence. Science of The Total Environment 25, 143–167.

Behera, S.K., Kim, H.W., Oh, J.-E., Park, H.-S. (2011). Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. Science of The Total Environment 409, 4351–4360.

Beijer, K., Gao, K., Jönsson, M.E., Larsson, D.G.J., Brunström, B., Brandt, I. (2013). Effluent from drug manufacturing affects cytochrome P450 1 regulation and function in fish. Chemosphere 90, 1149–1157.

Bélanger P. (2010). Analyse écotoxicologique de l'effluent traité des eaux usées de la ville de Montréal. Université de Sherbrooke.

Belles, A. (2012). Développement et applications environnementales des échantillonneurs passifs pour la surveillance des écosystèmes aquatiques. Université Bordeaux 1.

Belles, A., Pardon, P., Budzinski, H. (2014a). Development of an adapted version of polar organic chemical integrative samplers (POCIS-Nylon). Analytical and Bioanalytical Chemistry 406, 1099–1110.

Belles, A., Tapie, N., Pardon, P., Budzinski, H. (2014b). Development of the performance reference compound approach for the calibration of "polar organic chemical integrative sampler" (POCIS). Analytical and Bioanalytical Chemistry 406, 1131–1140.

Besse, J-P., Garric, J. (2007). Rapport Cémagref. Médicaments à usage humain: risque d'exposition et effets sur les milieux récepteurs.

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. Journal of Human and Ecological Risk Assessment, 14, 665–695.

Besse, J-P. (2010). Impact environnemental des médicaments à usage humain sur le milieu récepteur : évaluation de l'exposition et des effets biologiques pour les écosystèmes d'eau douce. Université de Metz.

Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C., Provini, A. (2009). Cytotoxic and genotoxic effects of in vitro exposure to Triclosan and Trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 150, 50–56.

Bisesi, J.H., Bridges, W., Klaine, S.J. (2014). Effects of the antidepressant venlafaxine on fish brain serotonin and predation behavior. Aquatic Toxicology 148, 130–138.

Boleda, M.R., Galceran, M.T., Ventura, F. (2007). Trace determination of cannabinoids and opiates in wastewater and surface waters by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1175, 38–48.

Bones, J., Thomas, K., Nesterenko, P.N., Paull, B. (2006). On-line preconcentration of pharmaceutical residues from large volume water samples using short reversed-phase monolithic cartridges coupled to LC-UV-ESI-MS. Talanta 70, 1117–1128.

Booij, K., Hofmans, H.E., Fischer, C.V., Van Weerlee, E.M. (2003). Temperature-dependent uptake rates of nonpolar organic compounds by semipermeable membrane devices and low-density polyethylene membranes. Environ. Sci. Technol. 37, 361–366.

Boreen, A.L., Arnold, W.A., McNeill, K. (2003). Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. Aquatic Sciences - Research Across Boundaries 65, 320–341.

Borova, V.L., Maragou, N.C., Gago-Ferrero, P., Pistos, C., Thomaidis, N.S. (2014). Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 406, 4273–4285.

Bouchard, N., Pelletier, E., Fournier, M. (1999). Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves. Environ. Toxicol. Chem. 18,519–522.

Bouchard, B., Gagné, F., Fortier, M., Fournier, M. (2009). An *in-situ* study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Elliptio complanata*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 150, 132–140.

Boudreau, P., Leclerc, M. et Secretan, Y. (2005). Révision des taux de dilution de l'effluent de l'Île-aux-Vaches dans le fleuve Saint-Laurent par simulation numérique. Étude réalisée dans le cadre du Réseau de Recherche en Écotoxicologie du Saint-Laurent en collaboration avec la ville de Montréal (Environnement). Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Québec, Rapport INRS-ÉTÉ #R-794, 34 p.

Bouissou-Schurtz, C., Houeto, P., Guerbet, M., Bachelot, M., Casellas, C., Mauclaire, A.-C., Panetier, P., Delval, C., Masset, D. (2014=. Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. Regulatory Toxicology and Pharmacology 69, 296–303.

Bordeleau, L., Pritchard, Kl., Loprinzi, CL., Ennis, M., Jugovic, O., Warr, D., Haq, R., Goodwin, PJ. (2010). Multicenter, randomized, cross-over clinical trial of venlafaxine versus gabapentin for the management of hot flashes in breast cancer survivors. Clin. Oncol. 28, 5l47–5152.

Bossard, A-E. et Bouhassira, D. (2006). La gabapentine a-t-elle des effets analgésiques ? Le Praticien en Anesthésie Réanimation 10, 187–191.

Boxall, A., Rudd, M.A., Brooks, B.W., Caldwell, D.J., Choi, K., Hickmann, S., Innes, E., Ostapyk, K., Staveley, J.P., Verslycke, T., others (2012). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? Environmental health perspectives 120, 1221–1229.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.Analytical Biochemistry 72, 248–259.

Brambilla, G., Martelli, A. (2009a). Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 681, 209–229.

Brambilla, G., Mattioli, F., Martelli, A. (2009b). Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants. Toxicology 261, 77–88.

Brancotte, V., Vincent, T. (2002). The invasion of French hydrographic system by the molluscs *Corbicula spp*. Details of settlement and main role of ship canals. L'invasion du réseau hydrographique Français par les mollusques *Corbicula spp*. Modalité de colonisation et rôle prépondérant des canaux de navigation, Bull. Fr. PÍche Piscic. 365/366, 325–337.

Brieudes, V., Lardy-Fontan, S., Lalere, B., Vaslin-Reimann, S., Budzinski, H. (2016). Validation and uncertainties evaluation of an isotope dilution-SPE-LC–MS/MS for the quantification of drug residues in surface waters. Talanta 146, 138–147.

Brousseau, P., Payette, Y., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., Tryphomonas, H., Fournier, M. (1998). Manual of Immunological Methods. CRC Press, Boston, USA.

Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Fournier, M. (2000). Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. Toxicol. Letts. 142, 145–156.

Buchberger, W.W. (2007). Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. Analytica Chimica Acta 593, 129–139.

Buerge, I.J., Buser, H.-R., Poiger, T., Müller, M.D. (2006). Occurrence and Fate of the Cytostatic Drugs Cyclophosphamide and Ifosfamide in Wastewater and Surface Waters. Environmental Science & Technology 40, 7242–7250.

Cahill, J.D. Furlong, E.T. Burkhardt M.R. Kolpin D. Anderson L.G. (2004). Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1041, 171–180.

Calisto, V. & Esteves, V.I. (2009). Psychiatric pharmaceuticals in the environment. Chemosphere 77, 1257–1274.

Calisto, V., Domingues, M.R.M., Esteves, V.I. (2011). Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments – Kinetics and photodegradation products. Water Research 45, 6097–6106.

Camacho-Muñoz, D., Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E. (2012). Effectiveness of Conventional and Low-Cost Wastewater Treatments in the Removal of Pharmaceutically Active Compounds. Water, Air, & Soil Pollution 223, 2611–2621.

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C. (2002). Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. Microsc. Res. Tech. 57, 469–476.

Canesi, L., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Betti, M., Guarnieri, T., Tavolari, S., Gallo, G. (2006). Immunomodulation by 17ß-estradiol in bivalve hemocytes. Am. J. Physiol. 291, 664–673.

Canesi, L., Lorusso, L.C., Ciacci, C., Betti, M., Regoli, F., Poiana, G., Gallo, G., Marcomini, A. (2007). Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*. Chemosphere 69, 994–1002.

Capdevila, M., Bofill, R., Palacios, Ò., Atrian, S. (2012). State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. Coord. Chem. Rev. 256, 46–62.

Capdeville, M.-J. (2011). Etudes des cycles biogéochimiques des contaminants organiques dits «émergents» dans les systèmes aquatiques. Université Bordeaux 1.

Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llompart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., Ternes, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. Water Research 38, 2918–2926.

Cardoso, O., Porcher, J.-M., Sanchez, W. (2014). Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant source of aquatic environment contamination: Review of evidence and need for knowledge. Chemosphere 115, 20–30.

Carlsson, G., Örn, S., Larsson, D.G.J. (2009). Effluent from bulk drug production is toxic to aquatic vertebrates. Environmental Toxicology and Chemestry 28, 2656–2662.

Castaing P., Allen G.P, (1981) Mechanisms controlling seaward escape of suspended sediment from the Gironde: a macrotidal estuary in France. Marine Geology, 40, 101–118.

Castelle, S., Schäfer, J., Blanc, G., Audry, S., Etcheber, H., Lissalde, J.-P. (2007). 50-year record and solid state speciation of mercury in natural and contaminated reservoir sediment. Appl. Geochem. 22, 1359–1370.

Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R., Zuccato, E. (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. Journal of Chromatography A 1092, 206–215.

Castiglioni, S., Zuccato, E., Crisci, E., Chiabrando, C., Fanelli, R., Bagnati, R., 2006. Identification and Measurement of Illicit Drugs and Their Metabolites in Urban Wastewater by Liquid Chromatography−Tandem Mass Spectrometry. Analytical Chemistry 78, 8421–8429.

Centre Saint Laurent (1996). Rapport de synthèse de l'état du Saint-Laurent. Volume 2. Etat du Saint-Laurent. Environnement Canda - région du Québec- conservation de l'environnement – et Editions MultiMondes, Montréal. Cool. « BILAN Saint-Laurent ».

Chen, L. Wang, H. Zeng, Q. Xu, Y. Sun, L. Xu, H. Ding L. (2009). On-line coupling of solid-phase extraction to liquid chromatography—a review. Journal of chromatographic science, 47, 614–623.

Chen, H., Zha, J., Liang, X., Li, J., Wang, Z. (2014). Effects of the human antiepileptic drug carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the Asian clam *Corbicula fluminea*. Aquatic Toxicology 155, 1–8.

Cheney M.A., Fiorillo R., Griddle R.S. (1997). Herbicide and Estrogen Effects on the Metabolic Activity of *Elliptio complanata* Measured by Calorespirometry. Camp. Biochem. Physiol. 118C, 159–164.

Chiffre, A., Clérandeau, C., Dwoinikoff, C., Le Bihanic, F., Budzinski, B., Geret, F., Cachot, C. (2014). Psychotropic drugs in mixture alter swimming behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) larvae above environmental concentrations. Environmental Science and Pollution Research 23, 4964–4977.

Chiron, S., Minero, C., Vione, D. (2006). Photodegradation processes of the antiepileptic drug carbamazepine, relevant to estuarine waters. Environmental science & technology 40, 5977–5983.

Choubert, J.M., Martin-Ruel, S., Budzinski, H., Miège, C., Esperanza, M., Soulier, C., Ugarrigue, C., Coquery, M. (2011). Évaluer les rendements des stations d'épuration Apports méthodologiques et résultats pour les micropolluants en filières conventionnelles et avancées. Tech. - Sci. – Methodes n°1/2, 44–62.

CGEDD (2010). Médicament et environnement - La régulation du médicament vis-à-vis du risque environnemental (No. 007058-01).

Cichelli, A. & Pertesana, G.P. (2004). High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: chemometric approach to variety classification. Journal of Chromatography A 1046, 141–146.

Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N. (2004). Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. Water Research 38, 947–954.

Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. Toxicology Letters 142, 185–194.

Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. Ecotoxicology and Environmental Safety 59, 309–315.

Collado, N., Rodriguez-Mozaz, S., Gros, M., Rubirola, A., Barceló, D., Comas, J., Rodriguez-Roda, I., Buttiglieri, G. (2014). Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system. Environmental Pollution 185, 202–212.

Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official Journal of the European Communities L221, Brussels, Belgium, 8–36.

Cooper, N.L., Bidwell, J.R. (2006). Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide. Aquatic Toxicology 76, 258–267.

Coutu, S., Wyrsch, V., Wynn, H.K., Rossi, L., Barry, A. (2013). Temporal dynamics of antibiotics in wastewater treatment plant influent. Science of the Total Environment 458–460, 20–26.

Crane, M., Watts, C., Boucard, T. (2006). Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. Science of the Total Environment 367, 23–41.

Cruz, J. (2015). Etude de la contamination par les pesticides dans des milieux eaux, air et sols. Développement de nouveaux outils et application à l'estuaire de la Gironde. Université de Bordeaux.

CSBE (2012). Les médicaments d'ordonance : état de la situation au Québec. 2nd version, p.316 (http://www.csbe.gouv.qc.ca/).

Dalrymple R.W, Zaitlin B.A, Boyd R. (1992). Estuarines facies models: conceptual basis and stratigraphic implications. Journal of sedimentary Petrology 62, 1130–1146.

Daughton, C.G., Ternes, T.A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? Environmental health perspectives 107, 907–938.

Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. International Journal of Hygiene and Environmental Health 214, 442–448.

Deby, C. (1991). La biochimie de l'oxygène. La Recherche 228: 56–64.

Décisions gouv. (2012). Décision du 12 avril 2012 portant interdiction d'importation, de préparation, de prescription et de délivrance de préparations magistrales, officinales et hospitalières définies à l'article L. 5121-1 du code de la santé publique, y compris de préparations homéopathiques, contenant du clenbutérol, du clonazépam, de l'exénatide, du liraglutide, du méprobamate, de l'orlistat ou de la synéphrine. NOR : AFSX1224680S (http://www.legifrance.gouv.fr).

De Lange, H.J., Noordoven, W., Murk, A.J., Lürling, M., Peeters, E.T.H.M. (2006). Behavioural responses of Gammarus pulex (*Crustacea, Amphipoda*) to low concentrations of pharmaceuticals. Aquatic Toxicology 78, 209–216.

Deloffre J. (2005). La sédimentation fine sur les vasières intertidales en estuaires macrotidaux : Processus, quantification et modélisation de l'échelle semi-diurne à l'échelle annuelle. Université de Rouen.

Del Río, H., Suárez, J., Puertas, J., Ures, P. (2013). PPCPs wet weather mobilization in a combined sewer in NW Spain. Science of The Total Environment 449, 189–198.

Deo, R., Halden, R. (2013). Pharmaceuticals in the Built and Natural Water Environment of the United States. Water 5, 1346–1365.

Deschamps, G. et Breton, G. (2012). Bilan environnemental. Portrait de la qualité des plans d'eau à Montréal. Rapport annuel 2012. Ville de Montréal, Service des infrastructures, du transport et de l'environnement. Direction de l'environnement. Division de la planification et du suivi environnemental, RSMA, 12 p.

Devier, M.-H. Le Menach K. Viglino L. Di Gioia L. Lachassagne P. Budzinski H. (2013). Ultra-trace analysis of hormones, pharmaceutical substances, alkylphenols and phthalates in two French natural mineral waters. Science of The Total Environment 443, 621–632.

Di Poi, C., Bidel, F., Dickel, L., Bellanger, C. (2014). Cryptic and biochemical responses of young cuttlefish *Sepia officinalis* exposed to environmentally relevant concentrations of fluoxetine. Aquatic Toxicology 151, 36–45

Di Poi, C., Evariste, L., Séguin, A., Mottier, A., Pedelucq, J., Lebel, J.M., Serpentini, A., Budzinski, H., Costil, K. (2016). Sub-chronic exposure to fluoxetine in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): uptake and biological effects. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 5002–5018.

Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goïc, N., Lambert, C., Volety, A.K., Soudant, P. (2012). Reactive Oxygen Species in Unstimulated Hemocytes of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: A Mitochondrial Involvement. PLoS ONE 7, e46594.

Dos Santos, K.C., Martinez, C.B.R. (2014). Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup®, alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula fluminea*. Ecotoxicology and Environmental Safety 100, 7–14.

Draz, E.I., Emara, A.M., Saad, K.M., Badaway, A., El-Nabi, H., Abd –Elgelil, H. (2009). Genotoxicity of some commonly used antidepressants (Fluoxetine, Sertraline and Clomipramine). Mansoura J. Forensic Med. Clin. Toxicol. 17, 63–78.

Drouillard, K.G., Chan, S., O'Rourke, S., Douglas Haffner, G., Letcher, R.J. (2007). Elimination of 10 polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners and selected polychlorinated biphenyls (PCBs) from the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. Chemosphere 69, 362–370.

Dubois, C. (1995). Biologie et démo-écologie d'une espèce invasive, *Corbicula fluminea* (Mollusca: Bivalvia) originaire d'Asie: étude in situ (canal latéral à la Garonne, France) et en canal expérimental. Université de Toulouse.

Dubois, A. et Lacouture, L. (2011). Études & documents n°54, octobre 2011. Bilan de présence des micropolluants dans les milieux aquatiques continentaux. Période 2007-2009. Commissariat général au développement durable • Service de l'observation et des statistiques, 58 p.

Duchemin, M.B., Auffret, M., Wessel, N., Fortier, M., Morin, Y., Pellerin, J., Fournier, M. (2008). Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through in vivo, in tubo and in vitro exposures. Environmental Pollution 153, 416–423.

Durán-Álvarez, J.C., Prado-Pano, B., Jiménez-Cisneros, B. (2012). Sorption and desorption of carbamazepine, naproxen and triclosan in a soil irrigated with raw wastewater: Estimation of the sorption parameters by considering the initial mass of the compounds in the soil. Chemosphere 88, 84–90.

Eguchi, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y.S., Goto, K., Hirata, K., Miyamoto, K., Yoshimura, H. (2004). Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. Chemosphere 57, 1733–1738.

Etcheber, H., Schmidt, S., Sottolichio, A., Maneux, E., Chabaux, G., Escalier, J.-M., Wennekes, H., Derriennic, H., Schmeltz, M., Quéméner, L., Repecaud, M., Woerther, P., Castaing, P. (2011). Monitoring water quality in estuarine environments: lessons from the MAGEST monitoring program in the Gironde fluvial-estuarine system. Hydrol. Earth Syst. Sci. 15, 831–840.

Evans, S.E., Davies, P., Lubben, A., Kasprzyk-Hordern, B. (2015). Determination of chiral pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and sludge using microwave assisted extraction, solid-phase extraction and chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 882, 112–126.

Farcy, E., Gagné, F., Martel, L., Fortier, M., Trépanier, S., Brousseau, P., Fournier, M. (2011). Short-term physiological effects of a xenobiotic mixture on the freshwater mussel *Elliptio complanata* exposed to municipal effluents. Environmental Research 111, 1096–1106.

Fent, K., Weston, A., Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology 76, 122–159.

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, 359–370.

Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxetus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J. (2004). Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? Environmental Toxicology and Chemistry 23, 1344–1354.

Ferreira da Silva, B. Jelic, A. López-Serna, R. Mozeto, A.A. Petrović, M. Barceló, D. (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. Chemosphere, 85, 1331–1339.

Ferrer, I., Thurman, E.M. (2012). Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1259, 148–157.

Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R. (2000). A survey of oysters Crassostrea virginica from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. Aquatic Toxicology 51, 115–138.

Flippin, J.L., Huggett, D., Foran, C.M. (2007). Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. Aquatic Toxicology 81, 73–78.

Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Brousseau, P. (2000). Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. Am. Zool. 40, 412–420.

Franchini, A., Conte, A., Ottaviani, E. (1995). Nitric oxide: An ancestral immunocyte effector molecule. Advances in Neuroimmunology 5, 463-478.

Fram, M.S., Belitz, K. (2011). Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. Science of The Total Environment 409, 3409–3417.

Frenette, M., Barbeau, C. et Verrette, J.L. (1989). Aspects quantitatifs, dynamiques et qualitatifs des sédiments du Saint-Laurent. Hydrotech Consultants Inc., Environnement Canada et Gouvernement du Québec. 241 p.

Fujimoto, Y., Sakuma, S., Inoue, T., Uno, E., Fujita, T. (2002). The endocrine disruptor nonylphenol preferentially blocks cyclooxygenase-1. Life sciences 70, 2209–2214.

Gačić, Z., Kolarević, S., Sunjog, K., Kračun-Kolarević, M., Paunović, M., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B. (2014). The impact of *in vivo* and *in vitro* exposure to base analogue 5-FU on the level of DNA damage in haemocytes of freshwater mussels Unio pictorum and Unio tumidus. Environmental Pollution 191, 145–150.

Gagné, F., Blaise, C., Hellou, J. (2004a). Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primary-treated municipal effluent plume for 1 year. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 138, 33–44.

Gagné, F., Bérubé, E., Fournier, M., Blaise, C. (2005). Inflammatory properties of municipal effluents to *Elliptio complanata* mussels — lack of effects from anti-inflammatory drugs. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 141, 332–337.

Gagné, F., Blaise, C., Fournier, M., Hansen, P.D. (2006). Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 143, 179–186.

Gagné, F., Auclair, J., Turcotte, P., Fournier, M., Gagnon, C., Sauvé, S., Blaise, C. (2008). Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. Aquatic Toxicology 86, 333–340.

Gagné, F., Bouchard, B., André, C., Farcy, E., Fournier, M. (2011). Evidence of feminization in wild *Elliptio complanata* mussels in the receiving waters downstream of a municipal effluent outfall. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 153, 99–106.

Gagné, F., André, C., Cejka, P., Hausler, R., Fournier, M. (2011). Alterations in DNA metabolism in *Elliptio complanata* mussels after exposure to municipal effluents. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 154, 100–107.

Gagnon, C, Lajeunesse, A. (2012). Low removal of acidic and hydrophilic pharmaceutical products by various types of municipal wastewater treatment plants. Journal of Xenobiotics volume 2:e3, 13–17.

Galloway T.S, Depledge M.H. (2001). Immunotoxicity in invertebrate: measurement and ecotoxicological relevance. Ecotoxicology 10, 5–17.

Garcia-Ac, A., Segura, P.A., Viglino, L., Fürtös, A., Gagnon, C., Prévost, M., Sauvé, S. (2009). On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water. Journal of Chromatography A 1216, 8518–8527.

Garric, J., Ferrari, B., Fraysse, B., Mons, R., Vollat, B. (2006). Effects of some human pharmaceutical on freshwater organisms (Impact de médicaments à usage humain sur les organismes aquatiques d'eau douce). Environnement, Risques et Sante 5, 290–295.

Garric, J., Morin, S., Vincent-Hubert, F. (2010). Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limites, usages. Des outils pour mesurer l'impact des toxiques sur l'écosystème aquatique n°12. Sciences Eaux & Territoires n°1 (http://www.set-revue.fr/sites/default/files/archives/SET_01_p_12_17.pdf).

Garrison, A.W., Pope, J.D., and Allen, F.R. (1976). Analysis of organic compounds in domestic wastewaters. In: Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water (Keith CH, ed.). Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science Publishers. 517–556.

Gesuale, G., Tremblay, L., Cejka, P.-J., Deslandes, J. C. and Hausler, R. (2010). Ozonation en colonne pour la désinfection des eaux usées de la ville de Montréal 2005-2007. Station d'épuration des eaux usées de la Ville de Montréal, Rapport synthèse, 143 p.

Giebułtowicz, J., Nałęcz-Jawecki, G. (2014). Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata rivers and in tap water in Warsaw (Poland). Ecotoxicology and Environmental Safety 104, 103–109.

Gobel, A., Mcardell, C., Joss, A., Siegrist, H., Giger, W. (2007). Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. Science of The Total Environment 372, 361–371.

Golovko, O., Kumar, V., Fedorova, G., Randak, T., Grabic, R. (2014). Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant. Chemosphere 111, 418–426.

Gómez, M.J., Petrović, M., Fernández-Alba, A.R., Barceló, D. (2006). Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. J. Chromatogr. A 1114, 224–233.

González Alonso, S., Catalá, M., Maroto, R.R., Gil, J.L.R., de Miguel, Á.G., Valcárcel, Y. (2010). Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). Environment International 36, 195–201.

Gorecki, T., & Namiesnik, N. (2002). « Passive sampling ». Trends in Analytical Chemistry 21, 276–291.

Grabic, R., Fick, J., Lindberg, R.H., Fedorova, G., Tysklind, M. (2012). Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in environmental samples using liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. Talanta 100, 183–195.

Gracia-Lor, E. Martínez, M. Sancho, J.V. Peñuela, G. Hernández F. (2012). Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. Talanta 99, 1011–1023.

Gracia-Lor, E., Sancho, J.V. & Hernández, F. (2010). Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1217, 622–632.

Gros, M., Petrović, M., Barceló, D. (2006). Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. Talanta 70, 678–690.

Gross, T.S., Wieser, C.M., Kernaghan, N.J., Ruessler, D.S. (2000). Development and validation of procedures for monitoring endocrine and reproductive function of in freshwater mussels.
URL: http://fl.biology.usgs.gov/posters/Ecotoxicology/Endrocine/endrocine.html

Grundy M., Ratcliffe N.A., Moore M.N. (1996). Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. Marine environmental research 42, 187–190.

Gschwend, M.H. Arnold, P. Ring, J. Martin, W. (2006). Selective and sensitive determination of amisulpride in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with positive electrospray ionisation and multiple reaction monitoring. Journal of Chromatography B 831, 132–139.

Gunnarsson, L., Kristiansson, E., Rutgersson, C., Sturve, J., Fick, J., Förlin, L., Larsson, D.G.J. (2009). Pharmaceutical industry effluent diluted 1:500 affects global gene expression, cytochrome P450 1A activity, and plasma phosphate in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28, 2639–2647.

Gurke, R., Rossmann, J., Schubert, S., Sandmann, T., Rößler, M., Oertel, R., Fauler, J. (2015a). Development of a SPE-HPLC–MS/MS method for the determination of most prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples. Journal of Chromatography B 990, 23–30.

Gurke, R., Rößler, M., Marx, C., Diamond, S., Schubert, S., Oertel, R., Fauler, J. (2015b). Occurrence and removal of frequently prescribed pharmaceuticals and corresponding metabolites in wastewater of a sewage treatment plant. Science of the Total Environment 532, 762–770.

Gust, M., Gélinas, M., Fortier, M., Fournier, M., Gagné, F. (2012). *In vitro* immunotoxicity of environmentally representative antibiotics to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. Environmental Pollution 169, 50–58.

Gust, M., Fortier, M., Garric, J., Fournier, M., Gagné, F. (2013). Effects of short-term exposure to environmentally relevant concentrations of different pharmaceutical mixtures on the immune response of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Science of The Total Environment 445-446, 210–218.

Haag, W.R., Warren M.L. (1999). Mantle displays of freshwater mussels elicit attacks from fish. Freshwater Biology 42, 35–40.

Hagenaars, A., Knapen, D., Meyer, I.J., van der Vena, K., Hoff, P., De Coen, W., 2008. Toxicity evaluation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in the liver of common carp (Cy-prinus carpio). Aquatic Toxicology 88, 155–163.

Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H.C., Jørgensen, S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. Chemosphere 36, 357–393.

Harman, C., Tollefsen, K.-E., Bøyum, O., Thomas, K., Grung, M. (2008). Uptake rates of alkylphenols, PAHs and carbazoles in semipermeable membrane devices (SPMDs) and polar organic chemical integrative samplers (POCIS). Chemosphere 72, 1510–1516.

Harman, C., Reid, M., Thomas, K.V. (2011). In Situ Calibration of a Passive Sampling Device for Selected Illicit Drugs and Their Metabolites in Wastewater, And Subsequent Year-Long Assessment of Community Drug Usage. Environmental Science & Technology 45, 5676–5682.

Hass, U., Duennbier, U., Massmann, G. (2012). Occurrence and distribution of psychoactive compounds and their metabolites in the urban water cycle of Berlin (Germany). Water Research 46, 6013–6022.

Hébert, S., et Belley, J. (2005). *Le Saint-Laurent-La qualité des eaux du fleuve 1990-2003*, Québec, minitère de l'Environnement, Direction du suivi de l'état de l'environnement, Envirodoq n° ENV/2005/0095, collection n° QE/156, 25 p. et 3 annexes.

Héberts S. (2006). La qualité de l'eau du secteur fluvial – Paramètres physico-chimiques et bactériologiques - 2e édition (PDF, 3,6 Mo), Direction du suivi de l'état de l'environnement, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Québec, Fiche d'information de la collection « Suivi de l'état du Saint-Laurent », 4 p.

Helwig, K., Hunter, C., Mcnaughtan, M., Roberts, J., Pahl, O. (2016). Ranking prescribed pharmaceuticals in terms of environmental risk: inclusion of hospital data and the important of regular review. Environmental Toxicology and Chemistry 35, 1043–1050.

Hennion, M.-C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. Journal of Chromatography A 856, 3–54.

Henry, T.B., Kwon, J-W., Armbrust, K.L., Black, M.C. (2004). Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. Environmental Toxicology and Chemistry 23, 2229–2233.

Hernando, M.D. Petrović, M. Fernández-Alba, A.R. Barceló, D. (2004). Analysis by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for β-blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples. Journal of Chromatography A, 1046, 133–140.

Hignite, C. and Azaznoff, D.L. (1977). Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. Life Sci. 20, 337–342.

Hollender, J., Zimmermann, S.G., Koepke, S., Krauss, M., McArdell, C.S., Ort, C., Singer, H., von Gunten, U., Siegrist, H. (2009). Elimination of organic micropollutants in a municipal wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation followed by sand filtration. Environmental Science & Technology 43, 7862–7869.

Huckins, J.N., Petty, J.D., Lebo, J.A., Almeida, F.V., Booij, K., Alvarez, D.A., Cranor, W.L., Clark, R.C., Mogensen, B.B. (2002). Development of the Permeability/Performance Reference Compound Approach for *In Situ* Calibration of Semipermeable Membrane Devices. Environmental Science & Technology 36, 85–91.

Huckins, J.N., Petty, J.D., Orazio, C.E., Lebo, J.A., Clark, R.C., Gibson, V.L., Gala, W.R., Echols, K.R. (1999). Determination of Uptake Kinetics (Sampling Rates) by Lipid-Containing Semipermeable Membrane Devices (SPMDs) for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Water. Environmental Science & Technology 33, 3918–3923.

Huerta-Fontela, M., Galceran, M.T., Ventura, F. (2010). Fast liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. Journal of Chromatography A 1217, 4212–4222.

Hummel, D., Löffler, D., Fink, G., Ternes, T.A. (2006). Simultaneous Determination of Psychoactive Drugs and Their Metabolites in Aqueous Matrices by Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Environmental Science & Technology 40, 7321–7328.

IBL. Serotonin ELISA. Enzyme immunoassay for the quantitative determination in human serum, plasma, platelets, urine, tissue homogenates and cell culture supernatants. Hamburg, Germany: IBL International GmbH; 2008.

Idder, S., Ley, L., Mazellier, P., Budzinski, H. (2013). Quantitative on-line preconcentration-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for the determination of pharmaceutical compounds in water. Analytica Chimica Acta 805, 107–115.

Inza, B., Ribeyre, F., Maury-Brachet, R., Boudou, A. (1997). Tissue distribution of inorganic mercury, methylmercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment. Chemosphere 35, 2817–2836.

ICIS (2014). Institut canadien d'information sur la santé. Dépenses en médicaments prescrits au Canada 2012 : regard sur les régimes publics d'assurance-médicaments. Ottawa, ON.

INCB (2012). Organe International de Contrôle des Stupéfiants. Prévisions des besoins annuels médicaux et scientifiques. Statistiques de 2010. Nation Unies, New-York, 2012.

Jansen W.A, Hanson J.M. (1991). Estimates of the number of glochidia produced by clams (produced by clams (*Anodonta grandis simpsoniana, Anodonta grandis simpsoniana Lea*), attaching to yellow perch (*Perca fl avescens*), and surviving to various ages in Narrow Lake, Alberta. Canadian Journal of Zoology 69, 973–977.

Jelic, A., Gros, M., Ginebreda, A., Cespedes-Sánchez, R., Ventura, F., Petrovic, M., Barcelo, D. (2011). Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. Water Research 45, 1165–1176.

Jouanneau, J.M., Weber, O., Cremer, M., Castaing, P. (1999). Fine-grained sediment budget on the continental margin of the Bay of Biscay. Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr. 46, 2205–2220.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. (2007). Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1161, 132–145.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. (2008). The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–negative electrospray tandem mass spectrometry. Talanta 74, 1299–1312.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. (2009). The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. Water Research 43, 363–380.

Kellner, M., Porseryd, T., Porsch-Hällström, I., Hansen, S.H., Olsén, K.H. (2015). Environmentally relevant concentrations of citalopram partially inhibit feeding in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Aquatic Toxicology 158, 165–170.

Kim, J. Lee, S. In, S. Choi, H. Chung H. (2011). Validation of a simultaneous analytical meth-od for the detection of 27 benzodiazepines and metabolites and zolpidem in hair using LC–MS/MS and its application to human and rat hair. Journal of Chromatography B, 879, 878–886.

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. (2002). Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999−2000: A National Reconnaissance. Environmental Science & Technology 36, 1202–1211.

Komori, K., Suzuki, Y., Minamiyama, M, Harada, A. (2013). Occurrence of selected pharmaceuticals in river water in Japan and assessment of their environmental risk. Environ Monit Assess 185, 4529–4536.

Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., Weijdegard, B., Söderström, H., Larsson, D.G.J. (2011). Pyrosequencing of antibiotic contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfert elements. PLoS ONE 6, 1–7.

Kubo, T., Kuroda, K., Tominaga, Y., Naito, T., Sueyoshi, K., Hosoya, K., Otsuka, K. (2014). Effective determination of a pharmaceutical, sulpiride, in river water by online SPE-LC–MS using a molecularly imprinted polymer as a preconcentration medium. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 89, 111–117.

Kummerer, 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.

Lacaze, E., Devaux, A., Bruneau, A., Bony, S., Sherry, J., Gagné, F. (2014). Genotoxic potential of several naphthenic acids and a synthetic oil sands process-affected water in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology 152, 291–299.

Lacaze, E., Pédelucq, J., Fortier, M., Brousseau, P., Auffret, M., Budzinski, H., Fournier, M. (2015). Genotoxic and immunotoxic potential effects of selected psychotropic drugs and antibiotics on blue mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes. Environmental Pollution 202, 177–186.

Lacoste, A. (2001). Neuroendocrine et neuroimmunologie du stress chez un modèle invertébré, l'huître *Crassostrea gigas*. Université Paris 6.

Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F. (Eds.), Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Masson, Londres, Paris, New York, 393–401.

Lajeunesse, A., Gagnon, C., Sauvé, S. (2008). Determination of Basic Antidepressants and Their N -Desmethyl Metabolites in Raw Sewage and Wastewater Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography−Tandem Mass Spectrometry. Analytical Chemistry 80, 5325–5333.

Lajeunesse, A., Smyth, S.A., Barclay, K., Sauvé, S., Gagnon, C. (2012). Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. Water Research 46, 5600–5612.

Lam, R.W., Levitan, R.D. (2000). Pathophysiology of seasonal affective disorder: a review. Journal of Psychiatry & Neuroscience 25, 469–480.

Lanoux A. (2013). Caractérisation et rôle respectif des apports organiques amont et locaux sur l'oxygénation des eaux de la Garonne estuarienne. Université Bordeaux 1.

Lapaquellerie, Y., Jouanneau, J.M., Maillet, N., Latouche, C. (1995). Pollution en Cd dans les sédiments du Lot (France) et calcul du stock de polluant. Environ. Technol. 16, 1145–1154.

Lardy-Fontan, S., Brieudes, B. (2011) – Les molécules psychotropes : panorama des enjeux environnementaux et analytiques – Rapport AQUAREF 2011 – 52 p.

Le Comparatif Québec–France_Edition (2012)_Institut de la statistique du Québec et Ministère des Relations internationales, de la Francophonie et du Commerce extérieur.

Lee, Y.C., Yang, D. (2002). Determination of lysozyme activities in a microplate format. Analytical Biochemistry 310, 223–224.

Lee, H.B., Peart, T.E., Svoboda, M.L. (2005). Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1094, 122–129.

Lee, R.F., Steinert, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 544, 43–64.

LEEM (2013). Les entreprises du médicament en France. Bilan économique.

Lemaire, N., Pellerin, J., Fournier, M., Girault, L., Tamigneaux, E., Cartier, S., Pelletier, E. (2006). Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *Mytilus spp*. from farm sites of eastern Quebec. Aquaculture 261, 729–751.

Lepage, S. (1997). « Des fleuves dans un fleuve : Bilan des connaissances sur les aspects physiques et chimiques du Saint-Laurent ». L. Lauzon, H. Dion, et C.E. Delisle (éd.), Le Saint- Laurent pour la vie : Actes du 21e Congrès de l'Association des biologistes du Québec, 31 octobre, 1er et 2 novembre 1996, Hôtel Hilton, Québec. Association des biologistes du Québec, Montréal, Collection « Environnement », vol. 23, 65–87.

Li, H., Vermeirssen, E.L.M., Helm, P.A., Metcalfe, C.D. (2010). Controlled field evaluation of water flow rate effects on sampling polar organic compounds using polar organic chemical integrative samplers. Environ. Toxicol. Chem. 29, 2461–2469.

Li, X., Zheng, W., Kelly, W.R. (2013). Occurrence and removal of pharmaceutical and hormone contaminants in rural wastewater treatment lagoons. Science of the Total Environment 445–446, 22-28.

Li, W.C. (2014). Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. Environmental Pollution 187, 193–201.

Lin, A.Y.-C., Wang, X.-H., Lin, C.-F. (2010). Impact of wastewaters and hospital effluents on the occurrence of controlled substances in surface waters. Chemosphere 81, 562–570.

Lindberg, R., Jarnheimer, P.-Å., Olsen, B., Johansson, M., Tysklind, M. (2004). Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. Chemosphere 57, 1479–1488.

LIR-ESSEC (2012). Etude sur l'évolution compare des ventes de médicaments dans 7 pays européens (2000-2011).

Liu, C., Chang, V.W.C., Gin, K.Y.H., Nguyen, V.T. (2014). Genotoxicity of perfluorinated chemicals (PFCs) to the green mussel (*Perna viridis*). Science of The Total Environment 487, 117–122.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25, 402–408.

Löffler, D., Römbke, J., Meller, M., Ternes, T.A. (2005). Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/Sediment Systems. Environmental Science & Technology 39, 5209–5218.

Loprinzi, CL., Kugler, JW., Barton, DL., Dueck, AC., Tschetter, LK., Nelimark, RA., Balcueva, EP., Burger, KN., Novotny, PJ., Carlson, MD., Duane, SF., Corso, SW., Johnson, DB., Jaslowski, AJ. (2007). Phase III trial of gabapentin alone or in conjunction with an antidepressant in the management of hot flashes in women who have inadequate control with an antidepressant alone: NCCTG N03C5. Clin. Oncol. 25, 308-312.

Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G. (2009). EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. Environmental Pollution 157, 561–568.

Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., Balsaa, P., Gans, O., Weiss, S., Blaha, L., Bolchi, M., Gawlik, B.M. (2010). Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in groundwater. Water Research 44, 4115-4126.

Loos, R., Carvalho, R., António, D.C., Comero, S., Locoro, G., Tavazzi, S., Paracchini, B., Ghiani, M., Lettieri, T., Blaha, L., Jarosova, B., Voorspoels, S., Servaes, K., Haglund, P., Fick, J., Lindberg, R.H., Schwesig, D., Gawlik, B.M. (2013). EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. Water Research 47, 6475–6487.

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. Science of The Total Environment 473-474, 619–641.

Lyman, W. J., Reehl, W. F., Rosenblatt, D. H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, McGraw-Hill, New York, 1982

MacLeod, S.L., McClure, E.L., Wong, C.S. (2007). Laboratory calibration and field deployment of the polar organic chemical integrative sampler for pharmaceuticals and personal care products in wastewater and surface water. Environ Toxicol Chem 26, 2517–2529.

Madureira, T.V., Barreiro, J.C., Rocha, M.J., Eduardo Rocha, E., Cass, Q.B., Tiritan, M.E. (2010). Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal). Science of the Total Environment 408, 5513–5520.

Malagoli, D., Casarini, L., Sacchi, S., Ottaviani, E. (2007). Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Fish & Shellfish Immunology 23, 171–177.

MAMROT, (Ministère des Affaires municipales, des Régions et de l'Occupation du territoire) (2013)_évaluation de performances des ouvrages municipaux d'assainissement des eaux pour l'année 2012 [http://www.mamrot.gouv.qc.ca].

Maneux E. (1998). Erosion mécanique des sols et transports fluviaux de matière en suspension : application des systèmes d'information géographique dans les bassins versants de l'Adour, de la Dordogne et de la Garonne. Université Bordeaux 1.

Marcus, S.C., Mark, D.E., Miral, D., Joseph, I. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB Journal 17, 1195–1214.

Margoshes, M., Vallee, B.L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. J. Am. Chem. Soc. 79, 4813–4814.

Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. Journal of Hazardous Materials 239-240, 40–47.

Martin-Diaz, L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E. (2009). Ef-fects of environmental concentrations of the antiepilectic drug carbamazepine on bi-omarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology 94, 177–185.

Martínez-Hernández, V., Meffe, R., Herrera, S., Arranz, E., de Bustamante, I. (2014). Sorption/desorption of non-hydrophobic and ionisable pharmaceutical and personal care products from reclaimed water onto/from a natural sediment. Science of The Total Environment 472, 273–281.

Matsutani, T., Nomura, T. (1987). In vitro effects of serotonin and prostaglandins on release of eggs from the ovary of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. Gen. Comp. Endocrinol. 67, 111–118.

Mazzella, N., Lissalde, S., Moreira, S., Delmas, F., Mazellier, P., Huckins, J.N. (2010). Evaluation of the Use of Performance Reference Compounds in an Oasis-HLB Adsorbent Based Passive Sampler for Improving Water Concentration Estimates of Polar Herbicides in Freshwater. Environmental Science & Technology 44, 1713–1719.

Mazzella N., Coquery, M., Miège, C., Berho, C., Ghestem, J.P., Togola, A., Gonzalez, J.L., Tixier, C., Lardy-Fontan, S. (2011). Applicabilité des échantillonneurs passifs dans le cadre de la DCE. Irstea, 80 p.

McMahon, R.F. (1991). Mollusca : Bivalvia. Pages 315-399 in J. H. Thorp et A. P. Covich (éditeurs). Ecology and classification of North American invertebrates. Academic Press inc. 911 p.

MDDELCC (2005). Entente sur les ressources en eaux durables du bassin des Grands Lacs et du fleuve Saint Laurent. Ministère du Développement Durable, Environnement et Lutte contre les Changements Climatiques, 31p.
http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/grandslacs/2005/entente.pdf

MDDELCC (2011). Rapport synthèse d'évaluation de la Politique nationale de l'eau pour la période 2003-2009. Ministère du Développement Durable, Environnement et Lutte contre les Changements Climatiques, 74p.

Mendoza, A., Rodríguez-Gil, J.L., González-Alonso, S., Mastroianni, N., López de Alda, M., Barceló, D., Valcárcel, Y. (2014). Drugs of abuse and benzodiazepines in the Madrid Region (Central Spain): Seasonal variation in river waters, occurrence in tap water and potential environmental and human risk. Environment International 70, 76–87.

Menon S. (1985). Salmonellae and pollution indicator bacteria in municipal and food processing effluents and the Cornwallis River. Can J Microbiol 31, 98–603.

Metcalfe-Smith J.L, Staton S.K, Mackie G.L, Lane N.M. (1997). Biodiversity of freshwater mussels in the lower Great Lakes Drainage Basin. Ecological Monitoring and Assessment Network (EMAN), 3rd National Meeting , Saskatoon, Saskatshewan, 23 p.

Metcalfe, C., Beddows, P., Bouchot, G., Metcalfe, T., Li, H., Lavieren. H. (2011). Contaminants in the coastal karst aquifer system along the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, Mexico. Environmental Pollution 159, 991–997.

Miège, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., Coquery, M. (2009). Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. Environmental Pollution 157, 1721–1726.

Miège, C., Budzinski, H., Jacquet, R., Soulier, C., Pelte, T., Coquery, M. (2011). Application pour la surveillance des micropolluants organiques dans les eaux résiduaires traitées et les eaux de surface./ Techniques Sciences Méthodes numéro 1/2 - 106e année, 80–94.

Minguez, L., Farcy, E., Ballandonne, C., Lepailleur, A., Serpentini, A., Lebel, J-M., Bureau, R., Halm-Lemeille, M-P. (2014a). Acute toxicity of 8 antidepressants: what are their modes of action? Chemosphere 108, 314–319.

Minguez, L., Halm-Lemeille, M.-P., Costil, K., Bureau, R., Lebel, J.-M., Serpentini, A. (2014b). Assessment of cytotoxic and immunomodulatory properties of four antidepressants on primary cultures of abalone hemocytes (*Haliotis tuberculata*). Aquatic Toxicology 153, 3–11.

Minguez, L., Pedelucq, J., Farcy, E., Ballandonne, C., Budzinski, H., Halm-Lemeille, M-P. (2016). Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 4992–5001.

Moe, M., Wiklund, P., Woldegiorgis; A. (2009). Retrospective environmental risk assessment of human pharmaceuticals in the Nordic countries 1997-2007. Book, 110 p.

Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O. (2009). Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. Environment International 35, 803–814.

Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Cattani, O., Serrazanetti, G., Marin, M. (2007). Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. Fish & Shellfish Immunology 22, 98–114.

Morash B., Bonvin F., Reiser H., Grandjean D., De Alencastro L.F., Perazzolo C., Chèvre N., Kohn T. (2010). Occurrence and fate of micropollutants in the Vidy Bay of Lake Geneva, Switzerland. Part II: Micropollutant removal between wastewater and raw drinking water. Environmental Toxicology and Chemistry 29, 1658–1668.

Morin, N., Miège, C., Coquery, M., Randon, J. (2012). Chemical calibration, performance, validation and applications of the polar organic chemical integrative sampler (POCIS) in aquatic environments. TrAC Trends in Analytical Chemistry 36, 144–175.

Mouthon, J. (2001). Life cycle and population dynamics of the Asian clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) in the Rhône River at Creys-Malville (France). Archiv fur Hydrobiologie 151, 571–589.

Mouthon, J. (1981). Sur la présence en France et au Portugal de *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) originaire d'Asie. Basteria 45, 109–116.

Musolff, A., Leschik, S., Möder, M., Strauch, G., Reinstorf, F., Schirmer, M. (2009). Temporal and spatial patterns of micropollutants in urban receiving waters. Environmental Pollution 157, 3069–3077.

Mydlarz, L.D., Jones, L.E., Harvell, C.D. (2006). Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 37, 251–288.

Nelson, E.D., Do, H., Lewis, R.S., Carr, S.A. (2011). Diurnal variability of pharmaceutical, personal care product, estrogen and alkylphenol concentrations in effluent from a tertiary wastewater treatment facility. Environmental Science & Technology 45, 1228–1234.

Nikinmaa, M., Rytkönen, K.T. (2011). Functional genomics in aquatic toxicology—Do not forget the function. Aquatic Toxicology 105, 16–24.

Norman-ecotox-database.
http://www.normannetwork.com/empodat/ecotox/factsheet_show.php?esub_id=277.

Oliveira, T.S., Murphy, M., Mendola, N., Wong, V., Carlson, D., Waring, L. (2015). Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. Science of the Total Environment 518–519, 459–478.

Ort, C., Lawrence, M.G., Rieckermann, J., Joss, A. (2010). Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: Are your conclusions valid? A critical review. Environ. Sci. Technol. 44, 6024–6035.

Osada, M., Nomura, T. (1989). Estrogen effect on the seasonal levels of catecholamines in the scallop *Patinopecten yessoensis*. Comp. Biochem. Physiol. C 93, 349–353.

Ottaviani, E., Paemen, L.R., Cadet, P., Stefano, G.B. (1993). Evidence for Nitric-Oxide Production and Utilization as a Bacteriocidal Agent by Invertebrate Immunocytes. European Journal of Pharmacology-Environmental Toxicology and Pharmacology Section 248, 319–324.

Ottaviani, E., Franchini, A., Sonetti, D., Stefano, G.B. (1995). Antagonizing effect of morphine on the mobility and phagocytic activity of invertebrate immunocytes. Eur. J. Pharmacol. 276, 35–39.

Padhye, L.P., Yao, H., Kung'u, F.T., Huang, C.-H. (2014). Year-long evaluation on the occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disrupting chemicals in an urban drinking water treatment plant. Water Research 51, 266–276.

Paíga, P., Santos, L.H.M.L.M., Ramos, S., Jorge, S., Silva, J.G, Delerue-Matos, C., 2016. Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. Science of the Total Environment 573, 164–177.

Pal, A., Gin, K.Y.-H., Lin, A.Y.-C., Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. Science of The Total Environment 408, 6062–6069.

Pandya, KJ., Morrow, GR., Roscoe, JA., Zhao, H., Hickok, JT., Pajon, E., Sweeney, TJ., Banerjee, TK., Flynn, PJ. (2005). Gabapentin for hot flashes in 420 women with breast cancer: ran domised double-blind placebo-controlled trial. Lancet, 366, 818–824.

Pereira, A.M.P.T., Silva, L.J.G., Meisel, L.M., Lino, C.M., Pena, A. (2015). Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: geographical and seasonal occurrence, removal and risk assessment. Environmental Research 136, 108–119.

Parrella, A., Lavorgna, M., Criscuolo, E., Russo, C., Isidori, M. (2015). Eco-genotoxicity of six anticancer drugs using comet assay in daphnids. Journal of Hazardous Materials 286, 573–580.

Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Provini, A. (2010). Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Chemosphere 79, 489–498.

Parolini, M., Quinn, B., Binelli, A., Provini, A. (2011). Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. Chemosphere 84, 91–100.

Patetsini, E., Dimitriadis, V.K., Kaloyianni, M. (2013). Biomarkers in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to environmentally relevant levels of the pesticides, chlorpyrifos and penoxsulam. Aquatic Toxicology 126, 338–345.

Paul-Pont I. (2010). Sensibilité et adaptation de populations de bivalves marins soumis à des stress multiples : infestation parasitaire, contamination microbienne et pollution métallique. Université Bordeaux 1.

Pérez, S., Barceló, D. (2007). Fate and occurrence of X-ray contrast media in the environment. Analytical and Bioanalytical Chemistry 387, 1235–1246.

Perillo, G.M.E. (1995). Definitions and geomorphologic classifications of estuaries. In: G.M.E. Perillo (Ed.). Geomorphology andestuaries (pp. 17-47). Developments inmentology, 53. Amsterdam: Elsevier.

Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B. (2014). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. Water Research 62, 180–192.

Petrović, M. Gonzalez, S. Barceló D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22, 685–696.

Petrović, M. Hernando, M.D. Díaz-Cruz, M.S. Barceló, D. (2005). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. Journal of Chromatography A 1067, 1–14.

Petrović, M., Gros, M. & Barcelo, D. (2006). Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1124, 68–81.

Petrović, M. Škrbić, B. Živančev, J. Ferrando-Climent, L. Barceló D. (2014). Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole–linear ion trap in different types of water in Serbia. Science of The Total Environment 468-469, 415–428.

Petty, J.D., Orazio, C.E., Huckins, J.N., Gale, R.W., Lebo, J.A., Meadows, J.C., Echols, K.R., Cranor, W.L. (2000). Considerations involved with the use of semipermeable membrane devices for monitoring environmental contaminants. Journal of Chromatography A 879, 83–95.

Peyrot, C., Gagnon, C., Gagné, F., Willkinson, K.J., Turcotte, P., Sauvé, S. (2009). Effects of cadmium telluride quantum dots on cadmium bioaccumulation and metallothionein production to the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 150, 246–251.

Peysson, W. and Vulliet, E. (2013). Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography–time-of-flight-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1290, 46–61.

Pipe, R.K. (1992). Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Dev. Comp. Immunol. 16, 111–122.

Pipe, R.K., Coles, J.A. (1995). Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. Fish Shellfish Immunol. 5, 581–595.

Pipe, R.K., Farley, S.R., Coles, J.A. (1997). The separation and characterization of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. Cell Tissue Res. 289, 537–545.

Post, A., Crochemore, C., Uhr, M., Holsboer, F., Behl, C. (2000). Differential induction of NF-kappaB activity and neural cell death by antidepressant in vitro. Eur. J. Neurosci. 12, 4331–4337.

Pritchard, D. (1967). What is an estuary: physical point of view: ed. H Lauff, estuaries, AAAS Washington, CD. Pub., v. 83.

Quinn, B., Gagne, F., Blaise, C. (2009). Evaluation of the acute, chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarian, Hydra attenuata. Science of The Total Environment 407, 1072–1079.

Quinn, B., Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R. (2011). Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. Chemosphere 84, 657–663.

Racamonde, I., Rodil, R., Quintana, J.B., Villaverde-de-Sáa, E., Cela, R. (2014). Determination of benzodiazepines, related pharmaceuticals and metabolites in water by solid-phase extraction and liquid-chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1352, 69–79.

Radjenović, J., Petrović, M., Barceló, D. (2009). Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. Water Research 43, 831–841.

Ratola, N. Cincinelli, A. Alves, A. Katsoyiannis, A. (2012). Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment process. A mini review. Journal of Hazardous Materials 239-240, 1–18.

Renault S., Baudrimont M., Mesmer-Dudons N., Gonzalez P., Mornet S., Brisson A. (2008). Impact of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). Gold Bulletin 41, 116–126.

Richards, S.M., Cole, S.E. (2006). A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. Ecotoxicology 15, 647–656.

Richman, L.A., Kolic, T., MacPherson, K., Fayez, L., Reiner, E. (2013). Polybrominated diphenyl ethers in sediment and caged mussels (*Elliptio complanata*) deployed in the Niagara River. Chemosphere 92, 778–786.

Rodrigues, A.P., Santos, L.H.M.L.M., Ramalhosa, M.J., Delerue-Matos, C., Guimarães, L. (2015). Sertraline accumulation and effects in the estuarine decapod *Carcinus maenas*: Importance of the history of exposure to chemical stress. Journal of Hazardous Materials 283, 350–358.

Rogers, H.R. (1996). Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. Science of the Total Environment 185, 3–26.

Romana L.A, Marchand P. (1977). Etude écologique de l'estuaire de la Gironde - Rapport final. http://archimer.ifremer.fr/doc/00104/21525/

Rondeau, B., Cossa, D., Gagnon, P., Bilodeau, L. (2000). Budget and sources of suspended sediment transported in the St. Lawrence River, Canada. Hydrological Processes 14, 21–36.

Rondeau, B. (2005). La qualité de l'eau du secteur fluvial – La contamination par les toxiques - 2e édition. Direction du suivi de l'état de l'environnement, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Québec, Fiche d'information de la collection. Suivi de l'état du Saint-Laurent, 6 p.

Ruff, M., Mueller, M.S., Loos, M., Singer, H.P. (2015). Quantitative target and systematic non-target analysis of polar organic micro-pollutants along the river Rhine using high-resolution mass-spectrometry-Identification of unknown sources and compounds. Water Research 87, 147–154.

Ruttkay-Nedecky, B., Nejdl, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R. (2013). The role of metallothionein in oxidative stress. Int. J. Mol. Sci. 14, 6044–6066.

Sabljic A., Güsten H., Verhaar H., Hermens J. (1995). QSAR modelling of oil sorption. Improvements and systematics of log Koc vs. log Kow correlations. Chemospher 31, 4489–4514.

Sacher, F. Lange, F.T. Brauch, H-J. Blankenhorn, I. (2001). Pharmaceuticals in groundwaters: analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. Journal of Chromatography A, 938, 199–210.

Salgado, R., Noronha, J.P., Oehmen, A., Carvalho, G., Reis, M.A.M. (2010). Analysis of 65 pharmaceuticals and personal care products in 5 wastewater treatment plants in Portugal using a simplified analytical methodology. Water Science & Technology 62, 2862–2871.

Salomon, J.-N. (2002). L'inondation dans la basse vallée de la Garonne et l'estuaire de la Gironde lors de la "tempête du siècle" (27-28 décembre 1999) / Flooding in the Garonne valley and the Gironde estuary caused by the "storm of the century" (27-28 décember 1999). Géomorphologie : relief, processus, environnement 8, 127–134.

Santos, J.L., Aparicio, I., Callejón, M., Alonso, E. (2009). Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). Journal of Hazardous Materials 164, 1509–1516.

Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. Journal of Hazardous Materials 175, 45–95.

Schäfer, J., Blanc, G., Audry, S., Cossa, D., Bossy, C. (2006). Mercury in the Lot-Garonne River system (France): Sources, fluxes and anthropogenic component. Appl. Geochem. 21, 515–527.

Schaff, S. (2012). RESIDUS MEDICAMENTEUX : Prise en compte dans la prescription du devenir environnemental des résidus médicamenteux. Université de Lorraine.

Schaffer, M., Boxberger, N., Börnick, H., Licha, T., Worch, E. (2012). Sorption influenced transport of ionizable pharmaceuticals onto a natural sandy aquifer sediment at different pH. Chemosphere 87, 513–520.

Schlüsener, M., Löffler, D., & Ternes, T. (2008). KNAPPE project - D1.1: List of the relevant PPs.

Schmidt S., Sottolichio A. (2013). MAGEST. Rapport scientifique 2013 (http://www.eptb-dordogne.fr).

Schmitt-Jansen, M., Bartels, P., Adler, N., Altenburger, R. (2007). Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. Analytical and Bioanalytical Chemistry 387, 1389–1396.

Schnell, S., Bols, N.C., Barata, C., Porte, C. (2009). Single and combined toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on the rainbow trout liver cell line RTL-W1. Aquatic Toxicology 93, 244–252.

Schultz, M.M., Furlong, E.T. (2008). Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Aquatic Matrixes by LC/ESI/MS/MS. Analytical Chemistry 80, 1756–1762.

Schultz, M.M., Painter, M.M., Bartell, S.E., Logue, A., Furlong, E.T., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L. (2011). Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. Aquatic Toxicology 104, 38–47.

Schwarzenbach, R.P., Egli, T., Hofstetter, T.B., von Gunten,U., Wehrli1, B. (2010). Global Water Pollution and Human Health. Annu. Rev. Environ. Resour. 35, 109–136.

SDAGE-PDM Dordogne (2014). Synthèse de l'actualisation de l'état des lieux du SDAGE 2016-2021. Commission territoriale Dordogne. Validée par le comité de bassin du 2 décembre 2013, 32 p.

Seethapathy, S., Gorecki, T., Li, X. (2008). Passive sampling in environmental analysis. Journal of Chromatography A 1184, 234–253.

Sheng, L.-H., Chen, H.-R., Huo, Y.-B., Wang, J., Zhang, Y., Yang, M., Zhang, H.-X. (2014). Simultaneous Determination of 24 Antidepressant Drugs and Their Metabolites in Wastewater by Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Molecules 19, 1212–1222.

Silva, B.F. da, Jelic, A., López-Serna, R., Mozeto, A.A., Petrovic, M., Barceló, D. (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. Chemosphere 85, 1331–1339.

Silva, L.J.G., Pereira, A.M.P.T., Meisel, L.M., Lino, C.M., Pena, A. (2014). A one-year follow-up analysis of antidepressants in Portuguese wastewaters: Occurrence and fate, seasonal influence, and risk assessment. Science of the Total Environment 490, 279–287.

Silva, L.J.G., Pereira, A.M.P.T., Meisel, L.M., Lino, C.M., Pena, A. (2015). Reviewing the serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) footprint in the aquatic biota: Uptake, bioaccumulation and ecotoxicology. Environmental Pollution 197, 127–143.

Singh, N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175 (1), 184-91.

Snow, N.H. (2000). Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. Journal of Chromatography A 885, 445–455.

Södergren, A. (1987). Solvent-Filled Dialysis Membranes simulate uptake of pollutants by aquatic organisms. Environmental Science and Technology 21, 855–859.

Sottolichio, A., Castaing, P. (1999). A synthesis on seasonal dynamics of highly-concentrated structures in the Gironde estuary. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IIA-Earth and Planetary Science 329, 795–800.

Soulier, C., gabet, V., Lardy, S., Lemenach, 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. Tech. - Sci. - Methodes 63–77.

Stanley, J.K., Ramirez, A.J., Chambliss, C.K., Brooks, B.W. (2007). Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. Chemosphere 69, 9–16.

Stanton, M.G. (1968). Colorimetric determination of inorganic phosphate in the presence of biological material and adenosine triphosphate. Anal. Biochem. 22, 27–34.

Stefano, G.B., Cadet, P., Dokun, A., Scharrer, B. (1990). A neuroimmunoregulatory-like mechanism responding to stress in the marine bivalve *Mytilus edulis*. Brain Behav. Immun. 4, 323–329.

Stefano, G.B., Digenis, A., Spector, S., Leung, M.K., Bilfinger, T.V., Makman, M.H., Schar-rer, B., Abumrad, N.N. (1993). Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 11099–11103.

Stefano, G.B., Mantione, K., Jones, D., Zhu, W., Casares, F., Cadet, P. (2004). Immunocytes modulate ganglionic nitric oxide release which later affects their activity level. Neuro Endocrinol. Lett. 25, 57–61.

Stein, K., Ramil, M., Fink, G., Sander, M., Ternes, T.M. (2008). Analysis and Sorption of Psychoactive Drugs onto Sediment. Environ. Sci. Technol. 42, 6415–6423.

Subedi, B., Kannan, K. (2015). Occurrence and fate of select psychoactive pharmaceuticals and antihypertensives in two wastewater treatment plants in New York State, USA. Science of The Total Environment 514, 273–280.

Suga, N., Ogo, M., Suzuki, S. (2013). Risk assessment of oxytetracycline in water phase to major sediment bacterial community: A water-sediment microcosm study. Environmental Toxicology and Pharmacology 36, 142–148.

Sui, Q., Huang, J., Deng, S., Chen, W., Yu, G. (2011). Seasonal Variation in the Occurrence and Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Different Biological Wastewater Treatment Processes. Environmental Science & Technology 45, 3341–3348.

Talbot, A. (2006). Enjeux de la disponibilité de l'eau pour le fleuve Saint-Laurent – Synthèse environnementale. Environnement Canada, Montréal, 215 p.

Tang, J., Chen, S., Xu, Y., Zhong, W., Ma, M., Wang, Z. (2012). Calibration and field performance of triolein embedded acetate membranes for passive sampling persistent organic pollutants in water. Environmental Pollution 164, 158–163.

Tapie, N. (2006). Contamination des écosystèmes aquatiques par les PCB et PBDE : application à l'estuaire de la Gironde. Université Bordeaux 1.

Ternes, T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and river. Water Research 32, 3245–3260.

Ternes, T.A. (2001). Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. TrAC Trends in Analytical Chemistry 20, 419–434.

TGD (2003). Technical Guidance Document (TGD) in support of Council Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) 1488/94 on risk assessment for existing substances. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. 2003.

Tiscar, P.G., Mosca, F., 2004. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. Veterinary Research Communications 28, 57–65.

Tissier, C., Morvan, C., Bocquené, G., Grossel, H., James, A., et Marchand, M. (2005). Les Substances Prioritaires de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) - Fiches de synthèse.

Togola, A., Budzinski, H. (2007). Development of polar organic integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems. Anal. Chem. 79, 6734–6741.

Togola, A., Budzinski, H. (2008). Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. Journal of Chromatography A 1177, 150–158.

Toreilles, J., Guérin, M.C., Roch., P. (1996). Espèces oxygénées réactives et systèmes de défense des bivalves marins. C. R. Acad. Sci. 319, 209–218.

Toulis K.A.; Tzellos, T., Kouvelas, D., Goulis, D.G. (2009). Gabapentin for the Treatment of Hot Flashes in Women With Natural or Tamoxifen-Induced Menopause: A Systematic Review and Meta-Analysis. Clinical Therapeutics 31, 221–235.

Unceta, N., Sampedro, M.C., Bakar, N.K.A., Gómez-Caballero, A., Goicolea, M.A., Barrio, R.J. (2010). Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in wastewaters by dual solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1217, 3392–3399.

Vanderford, B.J., Snyder, S.A. (2006). Analysis of Pharmaceuticals in Water by Isotope Dilution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry †. Environmental Science & Technology 40, 7312–7320.

Vasák, M. (1991). Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. Methods in Enzymology 205, 452-458.

Veach, A.M., Bernot, M.J. (2011). Temporal variation of pharmaceuticals in an urban and agriculturally influenced stream. Science of the Total Environment 409, 4553-4563.

Verdon, C.P., Burton, B.A., Prior, R.L. (1995). Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate-deshydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP(þ) when the Griess reaction is used to assay for nitrite. Analytical Biochemistry 224, 502–508.

Verlicchi P., Al Aukidy M., Zambello E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. Science of the Total Environment 429, 123–155.

VGC (2011). Rapport du Vérificateur Général du Canada (VGC), Chapitre 4-La réglementation des médicaments-Santé Canada, automne-2011, 56 p.

Vianna Villela, J.V., Marques de Oliveira, I., da Silva, J., Pegas Henriques, J.A. (2006). DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. Mutation Research 605, 78–86.

Vidal, M.L., Bassères, A., Narbonne, J.F. (2001). Potential biomarkers of trichloroethylene and toluene exposure in Corbicula fluminea. Environmental Toxicology and Pharmacology 9, 87–97.

Vieno, N.M., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2006). Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection. Journal of Chromatography A 1134, 101–111.

Villeneuve, J-P., Rousseau A.N., Duchesne S.D. (1998). Symposium sur la gestion de l'eau, décembre 1997, Montréal. Volume 1 : recueil de textes des conférenciers. INRS-Eau, 283 p.

Viola, G.; Miolo, G.; Vedaldi, D., Dall'acqua, F. (2000). *In vitro* studies of the phototoxic potential of the antidepressant drugs amitriptyline and imipramine. Farmaco. 55, 211–218.

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

Vrana, B., Mills, G.A., Dominiak, E., Greenwood, R. (2006). Calibration of the Chemcatcher passive sampler for the monitoring of priority organic pollutants in water. Environmental Pollution 142, 333–343.

Vrana, B., Mills, G., Kotterman, M., Leonards, P., Booij, K., Greenwood, R. (2007). Modelling and field application of the Chemcatcher passive sampler calibration data for the monitoring of hydrophobic organic pollutants in water. Environmental Pollution 145, 895–904.

Vuković, V., Lovrencić-Huzjan, A., Bosnar-Puretić, M., Demarin, V. (2009). The efficacy of gabapentin in migraine prophylaxis: an observational open label study. Acta Clin Croate 48, 145–151.

Watters G.T., O'dee S.H. (1999). Glochidia of the freshwater mussel *Lampsilis* overwintering on fish hosts. Journal of Molluscan Studies, 65, 453–459.

Weigel, S., Kallenborn, R., Hühnerfuss, H. (2004). Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1023, 183–195.

Williams, P., Balestrieri, M., Tansella, M. (1987). Seasonal variation in affective disorders. Journal of Affecfiue Dworders, 12, 145–152.

Wode, F., van Baar, P., Dünnbier, U., Hecht, F., Taute, T., Jekel, M., Reemtsma, T. (2015). Search for over 2000 current and legacy micropollutants on a wastewater infiltration site with a UPLC-high resolution MS target screening method. Water Research 69, 274–283.

Wootton E.C., Dyrynda E.A., Ratcliffe N.A. (2003). Bivalve immunity: comparaison between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razorshell (*Ensis silique*). Fish & shellfish immunology, 15, 195–199.

Writer, J.H., Ferrer, I., Barber, L.B., Thurman, E.M. (2013). Widespread occurrence of neuroactive pharmaceuticals and metabolites in 24 Minnesota rivers and wastewaters. Science of the Total Environment 461–462, 519–527.

Wu, M., Xiang, J., Que, C., Chen, F., Xu, G. (2015). Occurrence and fate of psychiatric pharmaceuticals in the urban water system of Shanghai, China. Chemosphere 138, 486–493.

Yu, J.T., Bouwer, E.J., Coelhan, M. (2006). Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. Agricultural Water Management 86, 72–80.

Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Honda, Y., Tamura, I., Hirata, Y., Hayashi, A., Sekizawa, J. (2009). Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. Water Research 43, 351–362.

Yuan, S., Jiang, X., Xia, X., Zhang, H., Zheng, S. (2013). Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. Chemosphere 90, 2520–2525.

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Publications

Rault, P., Fortier, M., Pédelucq, J., Lacaze, E., Brousseau, P., Auffret, M., Fournier, M., 2013. **Immunotoxicity of heavy metals (silver, cadmium, mercury and lead) on marine bivalve *Mytilus edulis*: in vitro exposure of hemocytes.** Journal of xenobiotics 3, 20-22.

Lacaze, E., Pédelucq, J., Fortier, M., Brousseau, P., Auffret, M., Budzinski, H., Fournier, M., 2015. **Genotoxic and immunotoxic potential effects of selected psychotropic drugs and antibiotics on blue mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes.** Environmental Pollution 202, 177-186.

Bonnafe, E., Sroda, S., Budzinski, H., Valiere, A., Pedelucq, J., Marty, P., Geret, F., 2015. **Responses of cytochrome P450, GST, and MXR in the mollusk *Corbicula fluminea* to the exposure to hospital wastewater effluents.** Environ. Sci. Pollut. Res. 22: 11033 doi: 10.1007/s11356-015-4309-x.

Minguez, L., Pedelucq, J., Farcy, E., Ballandonne, C., Budzinski, H., Halm-Lemeille, M-P., 2016. **Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France.** Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 4992-5001

Di Poi, C., Evariste, L., Séguin, A., Mottier, A., Pedelucq, J., Lebel, J-M., Serpentini, A., Budzinski, H., Costil, K., 2016. **Subchronic exposure to fluoxetine in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): uptake and biological effects.** Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 5002-18.

En cours de préparation.

Pédelucq, J., Pardon, P., Augagneur, S., Fournier, M., Mazellier, P., Budzinski, H. **Development of a multi-residue analytical method for screening and trace level determination of 47 psycho-tropic compounds in wastewater and surface water.**

Pédelucq, J., Aminot, Y., Devier, M-H., Augagneur, S., Fournier, M., Mazellier, P., Budzinski, H. **Calibration et application d'un échantillonneur passif, le POCIS, pour le suivi de psychotropes dans le milieu aquatique.**

Pédelucq, J., Farcy, E., Pardon, P., Fournier, M., Mazellier, P., Halm-Lemeille, M-P., Budzinski, H. **First monitoring of 140 pharmaceuticals compounds in freshwater and marine water in North of France: comparison between spot and passive sampling.**

Communications orales

J. Pédelucq, M. Baudrimont, P. Gonzalez, F. Gagné, J. Cachot, P. Mazellier, M. Fournier, H. Budzinski.
Etude des résidus médicamenteux en estuaire de Gironde. GAGILAU, 25-26 Septembre 2012, Québec, Canada.

J. Pédelucq, M. Fournier, M. Baudrimont, P. Gonzalez, E. Lacaze, M. Fortier, P. Mazellier, H. Budzinski.
Présence, devenir et impact des composés pharmaceutiques dans les écosystèmes estuariens : regard croisé France - Québec. GAGILAU, 14-16 Mai 2014, Toulouse, France.

J. Pédelucq, G. Gagnon, M. Fournier, H. Budzinski. Présence et devenir des psychotropes dans les écosystèmes estuariens : regard croisé France - Québec. ECOBIM, 30mai-1 juin 2016, Le Havre, France.

Communications par affiche

J. Pédelucq, M. Fournier, P. Mazellier, H. Budzinski.
Médic'Eau : Source, circuit, impact et gouvernance des risques sanitaires et environnementaux des résidus médicamenteux des zones urbaines: Bordeaux / Montréal/ Toulouse. ECOBIM, 6-9 Juin 2011,Mont-Joli, Canada.

J. Pédelucq, P. Pardon, P. Mazellier, M. Fournier, H. Budzinski.
Développement d'une méthode analytique multi-résidus pour le dosage des psychotropes dans les eaux de surface et les eaux usées. ECOBIM, 27-30 Mai 2013, Montréal, Canada.

J. Pédelucq, E. Lacaze, M. Fortier, M. Pallud, P. Mazellier, H. Budzinski, M. Fournier.
Réponses des hémocytes de moule d'eau douce (*Elliptio complanata*) à une exposition *in vitro* aux produits pharmaceutiques. ECOBIM, 27-30 Mai 2013, Montréal, Canada.

J. Pédelucq, M. Blais, E. Lacaze, M. Fortier, P. Rault, P. Mazellier, H. Budzinski, M. Fournier, P. Brousseau.
Évaluation écotoxicologique du traitement des eaux usées par ozonation : étude *in vivo* chez la moule d'eau douce, *Elliptio complanata*. Colloque Armand-Frappier, 14-16 Novembre 2013, Orford, Canada.

J. Pédelucq, B. Barbeau, E. Lacaze, M. Fortier, P. Rault, P. Mazzelier, H. Budzinski, M. Fournier, P. Brousseau.
Effets immunotoxiques et génotoxiques d'un traitement d'eaux usées par ozonation chez la moule d'eau douce (*Elliptio complanata*). GAGILAU, 14-16 Mai 2014, Toulouse, France.

J. Pédelucq, P. Mazzelier, M. Fournier, H. Budzinski.
Etude de la présence des composés psychoactifs dans le fleuve Saint Laurent. GAGILAU, 14-16 Mai 2014, Toulouse, France.

J. Pédelucq, E. Lacaze, M. Fortier, P. Rault, P. Mazellier, H. Budzinski, M. Fournier, P. Brousseau.
Évaluation écotoxicologique du traitement des eaux usées par ozonation : étude *in vivo* chez la moule d'eau douce, *Elliptio complanata.* ECOBIM, 19-22 Mai 2015, Québec, Canada.

J. Pédelucq, E. Lacaze, M. Fortier, P. Mazellier, H Budzinski, M. Fournier
Réponse des hémocytes de moule d'eau douce (*Elliptio complanata*) a une exposition in vitro à 9 psychotropes seuls et en mélange. SEFA, 30 juin et 1er juillet 2015, Bordeaux, France.