

Devenir et impact des substances médicamenteuses dans l'environnement : des thématiques de recherche d'importance croissante au sein du réseau

En France, la médecine humaine et vétérinaire utilise de grandes quantités de médicaments. Ces composés, sous forme de molécules-mères et de métabolites, sont excrétés par les organismes traités et leurs résidus sont transférés vers les eaux, l'air et les sols. Les médicaments sont par nature des substances douées d'activité biologique, et la contamination de l'environnement par de tels composés en mélange pose clairement des questionnements concernant leurs impacts écotoxicologique et sanitaire sur le long terme. Face à ces constats d'un fort enjeu sociétal, la communauté scientifique se structure et se mobilise depuis plusieurs années dans le cadre de projets de recherche destinés à mieux comprendre, décrire, prévoir (et orienter) le devenir et les impacts des substances médicamenteuses dans l'environnement.

Nous présentons ici quelques exemples (la liste étant bien évidemment non exhaustive) de projets et d'actions impliquant des membres du réseau Ecotox.

Quelques exemples de programmes de recherche

Devenir des contaminants organiques (résidus de médicaments, perturbateurs endocriniens) au cours des traitements biologiques des produits résiduels organiques (PRO) puis après apport des PRO sur les sols (Projet ANR Digestate 2016-2020, projet Ademe IMoPolDyn 2015-2018, projet PHC Toubkal 2016-2017).

Les interactions contaminants/phases organiques et minérales des produits résiduels organiques sont les moteurs de la dissipation de ces contaminants au cours du traitement biologique des produits résiduels organiques (PRO) puis dans les sols après apport (Aemig et al., 2016). Ces projets utilisent les procédés de traitement des PRO comme un moyen de modifier ces interactions, de jouer sur les mélanges d'intrants, sur les paramètres intrinsèques des procédés comme la température, les temps de séjour pour modifier la réactivité des phases porteuses afin d'en évaluer l'impact sur les mécanismes de dissipation des contaminants, pour *in fine* piloter leur devenir au cours des procédés et *a posteriori* dans les sols après retour au sol des PRO. L'ensemble des données acquises permet la construction de modèles dynamiques de co-évolution de ces phases et des contaminants au cours des traitements permettant de tester différents scénarii et apporte des critères objectifs de choix et de conduite des procédés pour minimiser les impacts liés à la présence de ces contaminants dans les PRO.

Impact des systèmes de traitement des eaux usées sur les transferts de résidus médicamenteux et de souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération dans les eaux douces de surface et souterraines (CIREC, projet soutenu par l'ANSES, Programme National de Recherche en Environnement Santé Travail 2013-2016).

Les souches d'*Escherichia coli* produisant des bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) de type CTX-M émergent en médecine communautaire à l'échelle mondiale. Elles posent des problèmes thérapeutiques et sont souvent multirésistantes (BMR). La valorisation en agriculture de déchets organiques sous la forme d'amendements pour les sols ou l'utilisation d'effluents traités pour l'irrigation des cultures peut contribuer à la dissémination de ces souches dans l'environnement. L'objectif de ce projet est la caractérisation de la prévalence de ces souches produisant des BLSE de type CTX-M dans les effluents aqueux et dans les boues issues du traitement des eaux usées et les

risques de transfert de ces souches dans les eaux de surface et l'environnement agricole. Les bilans hydriques et le fonctionnement hydro(géo)logique et hydrochimique du bassin de l'Ouche seront analysés pour proposer les voies de transferts possibles des bactéries vers les ressources en eaux. Une comparaison par génotypage des souches isolées de l'environnement et des souches cliniques permet de mieux appréhender les sources de contamination.

Occurrence des résidus médicamenteux vétérinaire et traceurs de contamination fécale dans les eaux de surface dans deux bassins versants en contexte d'élevage intensif (Projets REMEDES ONEMA INRA et CREAM AELB).

La contamination des eaux par les résidus médicamenteux vétérinaires (RMV) a été peu étudiée en contexte d'élevage intensif. La plupart des molécules sont à usage mixte humain et animal. Des prélèvements d'eau de rivière sont réalisés depuis 2013 i) sur l'Observatoire de Recherche en Environnement (ORE) Agrhys Kervidy Naizin (Morbihan), bassin versant (BV) de 4,9 km², et ii) sur plusieurs bassins emboîtés de 2 à 80 km², en Ille et Vilaine en contexte de contaminations agricoles diffuses et ponctuelle (STEP). Les prélèvements sont réalisés manuellement tous les mois et par préleveur automatique sur l'ORE (sept crues). La liste des molécules à rechercher a été établie après enquêtes menées auprès de vétérinaires. L'origine des contaminations fécales est caractérisée par les stanols (humaine, bovine, ou porcine). Sur Kervidy-Naizin, trois antibiotiques le triméthoprim, l'oxytétracycline et l'enrofloxacin (molécule critique), sont les plus fréquemment quantifiés (de 57 à 42%), les concentrations moyennes (12 à 80 ng/l) et maxi (20 à 230 ng/l) sont comparables en crue ou non. Sur le BV d'Ille et Vilaine, des molécules à usage spécifiquement humain sont fréquemment quantifiées, diclofénac (77%) et carbamazépine (55%), des molécules à usage vétérinaire et humain flunixin (69 %), lincomycine (56%), fluméquine (55%) et spécifique vétérinaire sulfaméthazine (67%). La STEP n'est pas la seule source de RM sur le BV car les contaminations sont déjà quantifiées sur les têtes de bassins versants en amont de la station. Les teneurs cumulées varient de 1 à 3178 ng/L sur Kervidy-Naizin et de 8 à 2500 ng/L sur le BV d'Ille et Vilaine. Les teneurs maximales de RMV sur les deux sites correspondent au transfert préférentiel d'une ou deux molécules, souvent des antiparasitaires, et sont associées à des contaminations fécales fortes. Mais toutes les fortes contaminations fécales ne s'accompagnent pas systématiquement d'une contamination par les RMV.

Exposition chronique aux antibiotiques et métaux dans les sols : impact sur les processus microbiens incluant la dynamique de l'antibio-résistance (Projet CEMABS 2013-2016, soutenu par l'ANR CESA).

Les objectifs de ce programme sont de comprendre comment la dispersion conjointe des antibiotiques et des métaux, conduisant à une exposition chronique des organismes, peut affecter l'antibiorésistance et le fonctionnement microbien des sols agricoles amendés. Il s'agit donc de comprendre le déterminisme de facteurs édaphiques et pratiques d'épandage (ex : typologie des amendements) sur la biodisponibilité microbienne des antibiotiques et les effets associés en termes d'émergence de nouveaux mécanismes de résistance et de modifications de la diversité structurale et fonctionnelle des communautés. Des approches expérimentales (ex : doses-réponses) et des suivis de sites expérimentaux à long-terme doivent permettre de déterminer les concentrations effectives critiques ou non au regard du fonctionnement des communautés microbiennes et de la dynamique de prévalence de l'antibiorésistance, dans un contexte d'évaluation du risque. Le programme concerne le développement de méthodes d'extraction des composés pour quantifier leurs fractions totales et biodisponibles dans les sols, l'étude de leur devenir et transport du sol aux eaux souterraines, leurs transformations biologiques, mais également le développement de bioindicateurs microbiens d'effet à court terme (modification fonctionnelle) et de réponse à long-terme (tolérance des communautés et marqueurs d'antibiorésistance).

Les résultats disponibles indiquent la présence de divers familles d'antibiotiques dans certains amendements organiques (composts de boues, Fumier) à des doses variant de la dizaine de $\mu\text{g kg}^{-1}$ à quelques mg kg^{-1} matière sèche selon les antibiotiques considérés (ex : fluoroquinolones, sulfonamides, macrolides). Ces même antibiotiques sont aussi retrouvés dans des sols amendés ou irrigués, mais à des teneurs n'excédant pas quelque dizaine de $\mu\text{g kg}^{-1}_{\text{sol-sec}}$. Ces données concernent les teneurs totales, en revanche les teneurs (bio)disponibles sensées mieux décrire l'exposition des microorganismes dans les sols sont bien plus faibles. Les teneurs biodisponibles diminuent rapidement suite à l'apport initial au sol et elles ne sont plus quantifiables au bout de quelques semaines pour des doses totales théoriques jugées environnementalement réalistes (inférieures à $100 \mu\text{g kg}^{-1}_{\text{sol}}$). Ce sont principalement des processus d'adsorption (très variables selon les familles d'antibiotiques et le pH et la MO des sols) qui expliquent cette dissipation ; la biodégradation par voie microbienne restant limitées dans les sols agricoles étudiés. Egalement, même si à des concentrations totales supérieures au $\text{mg kg}^{-1}_{\text{sol}}$, des sulfonamides favorisent le maintien d'antibiorésistance jusqu'à 100 jours après les apports, ainsi que des effets néfastes sur les communautés microbiennes impliqués dans le cycle de l'azote dans les sols, ces impacts ne sont que transitoires ($< 1\text{mois}$) pour des doses avoisinant 100 à $200 \mu\text{g kg}^{-1}_{\text{sol}}$ et non détectés en dessous de $50 \mu\text{g kg}^{-1}_{\text{sol}}$ de sulfonamides ou fluoroquinolones.

Ecoconception de médicaments incorporant une structure auto-immolable (Projet Edifis, soutenu par l'ANR JCJC 2017-2020).

Pour limiter la contamination des eaux naturelles voire des eaux potables, les médicaments persistants pourraient être substitués par des molécules plus éco-compatibles. Le projet EDIFIS vise à proposer une méthodologie pour l'écoconception de substituts, basée sur l'insertion dans la molécule d'une structure auto-immolable. Cette structure doit permettre de conserver les propriétés physico-chimiques et stériques du médicament de départ pour préserver ses qualités thérapeutiques, tout en pouvant être désactivée par des réactions prévisibles de métabolisation, hydrolyse et/ou oxydation. Le médicament original et des analogues éco-conçus seront synthétisés puis leur évaluation pharmacologique sera réalisée. Par ailleurs, leurs dégradations seront comparées en termes de cinétique, de schémas de dégradation et d'évolution des produits de transformation, dans des conditions de traitement des eaux potables comme des eaux usées. Enfin, l'impact du médicament, des analogues et des produits de transformation sera évalué sur différents organismes. Ce travail débouchera sur une meilleure connaissance du lien entre structure, activité et réactivité des analogues dans des conditions environnementales, voire sur l'intégration de structures auto-immolables lors de la conception de nouveaux médicaments.

Détection et caractérisation d'AntiBiotiques dans des sols agricoles français et impact des amendements organiques sur l'AntibioRESistance (Projet DABARES 2017-2018, soutenu par le Plan EcoAntibio 2017).

La forte utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire est susceptible d'entraîner l'émergence de bactéries résistantes et leur dissémination dans l'environnement, lors du pâturage ou suite à la valorisation par épandage des lisiers et fumiers. Le projet DABARES a pour objectifs i) la quantification des teneurs totales et (bio)disponibles en antibiotiques dans des sols agricoles soumis à des apports de déchets organiques d'origine animale et ii) l'étude de la dynamique de prévalence des phénotypes et des gènes de résistance aux antibiotiques au sein des communautés bactériennes. Il s'appuiera sur des études menées au champ en ciblant des sites ayant des historiques d'amendements d'épandage de biofertilisants (par exemple fumier de bovins) différents tant en terme de fréquence et d'abondance des amendements mais également de pré-traitements subis par les amendements (par exemple compostage).

Des dispositifs d'observation et d'expérimentation en partie dédiés à la problématique des médicaments

Le SOERE PRO

Le SOERE-PRO est un réseau de sites d'observation et d'expérimentation de longue durée, dédiés à l'étude des effets d'apports réguliers de produits résiduels organiques (PRO) dans des agrosystèmes (www.allenvi.fr/groupe-transversaux/infrastructures-de-recherche/pro). Le retour au sol des PRO permet la valorisation des nutriments qu'ils contiennent, se substituant ainsi aux engrais minéraux. Il permet aussi la valorisation de la matière organique qu'ils contiennent, contribuant ainsi à l'entretien des stocks de matière organique des sols. Cependant ces PRO, en particulier ceux provenant des élevages ou ceux issus de déchets urbains comme les boues d'épuration peuvent contenir des contaminants organiques tels que des résidus pharmaceutiques et leur épandage sur sols agricoles pourraient contribuer à la dissémination de ces contaminants dans l'environnement.

Dans 3 sites au champ du SOERE PRO (QualiAgro en Ile de France, PROspective en Alsace et La Mare à La Réunion), le suivi de ces résidus pharmaceutiques est réalisé dans les PRO épandus, les sols recevant les PRO depuis plus de 15 ans parfois, et les eaux circulant dans les sols. Les PRO analysés incluent des boues de station d'épuration urbaine, des composts, des lisiers de porc et fumiers de volaille.

Dans les PRO urbains, les concentrations détectées allaient de quelques $\mu\text{g/kg}$ de matière sèche (MS) (i.e. 37 et 7.6 $\mu\text{g/kg}$ carbamazépine dans la boue et le compost de boue, respectivement) jusqu'à quelques centaines à milliers de $\mu\text{g/kg}$ MS (i.e. 4411 et 347 $\mu\text{g/kg}$ ofloxacine dans la boue et le compost de boue, respectivement). Dans les effluents d'élevage, des pharmaceutiques étaient également quantifiés, dans des concentrations allant de 9 $\mu\text{g/kg}$ à 196 mg/kg MS de sulfaméthazine et doxycycline dans le lisier de porc. Dans les sols recevant les PRO, seules quelques molécules sont détectées dans des concentrations inférieures à 10 $\mu\text{g/kg}$ sol sec. Ces concentrations augmentent transitoirement immédiatement après l'épandage. Dans les lixiviats de sol, la fréquence de détection des pharmaceutiques est inférieure à 11%, et celle de quantification inférieure à 1%, sans différence entre traitements organiques et témoin.

En conclusion, même si les PRO peuvent présenter des concentrations assez élevées de molécules pharmaceutiques, leurs concentrations dans les sols sont faibles et elles sont très rarement quantifiées dans les eaux de drainage des sols. Des travaux sont en cours pour déterminer si ces faibles concentrations détectées pourraient avoir des effets écotoxiques.

Le dispositif de Bretenières

Ce dispositif est localisé sur le domaine expérimental de l'INRA de Dijon à Bretenières. Il vise à déterminer l'impact de résidus d'ATB et métaux sur les communautés microbiennes et l'émergence de gènes de résistance aux ATB. Les sols sont irrigués avec des effluents de STEP et des solutions d'antibiotiques et Zn à différentes concentrations. Le dispositif est constitué de 48 micro parcelles de 1 m^2 disposées en 3 blocs. 4 traitements d'irrigation : a) contrôle eau, b) effluent traité de la STEP de Chevigny (Dijon), c) ciprofloxacine sulfométhazole 10 $\mu\text{g/l}$ Zn 0,5 mg/l , et d) ciprofloxacine sulfométhazole 100 $\mu\text{g/l}$ Zn 5 mg/l . Deux apports de 20 l (équivalent à 20 mm) sont réalisés chaque année depuis 2013 sur chaque parcelle. Des prélèvements de sols sont réalisés en début d'année avant irrigation puis 15 jours après chaque irrigation sur deux profondeurs 0-10cm et 10-20 cm.



Un outil de structuration de la communauté scientifique concernée, le GIS « Médicaments dans l'environnement »

La proposition de création d'un Groupement d'intérêt scientifique (GIS) « Médicaments dans l'environnement », regroupant des unités de recherche de plusieurs instituts et universités s'inscrit dans un objectif de réflexion et de réponses aux questions identifiées dans les plans nationaux Santé-Environnement (PNSE2 et PNSE3) et dans le 2^{ème} Plan National sur les micropolluants dans l'eau, élaboré par les ministères en charge de l'Écologie, de la Santé et de l'Alimentation avec l'appui des parties prenantes concernées. Le GIS articulera ses travaux autour de 4 axes de recherche : lien entre les usages et la présence de résidus de médicaments dans l'environnement, mécanismes d'action des résidus de médicaments sur les organismes non cibles exposés aux doses environnementales et développement des outils de diagnostics, perception de la problématique et acceptabilité des mesures de gestion et des risques, approches technologiques et socio-économiques pour réduire la présence de résidus de médicaments dans l'environnement.

Les réseaux nationaux, comme Ecotox et le RTP Ecotoxicomic sont également des outils d'animation scientifique qui interagissent avec le GIS.

Valorisation des compétences et des résultats de la recherche

Expertise collective Mafor : Valorisation des matières fertilisantes d'origine résiduaire sur les sols à usages agricole ou forestier

Les pouvoirs publics se trouvent aujourd'hui confrontés à de plus en plus de questions sur l'évaluation des bénéfices et des risques associés à l'utilisation des matières fertilisantes d'origine résiduaire (composts d'ordures ménagères, boues de station d'épuration, effluents d'élevage...). L'adaptation des réglementations à l'évolution des matières destinées à l'épandage sur sols agricoles, notamment au regard des contaminations potentielles connues ou émergentes, demande à être fondée sur une analyse scientifique actualisée et partagée. Dans ce contexte, en vue d'améliorer leurs connaissances sur l'intérêt agronomique et l'impact en termes de contamination de l'environnement, le ministère de l'Agriculture et le ministère de l'Ecologie ont demandé au CNRS, à l'INRA et à IRSTEA, de conduire une expertise sur les impacts de l'épandage de Mafor et les capacités des sols à les recevoir. Plus d'informations sur : <https://www6.paris.inra.fr/depe/Projets/Mafor>

La Revue Systématique sur les solutions efficaces pour lutter contre la contamination des milieux naturels en antibiotiques, résidus et bactéries résistantes

Soutenu par la Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité et le Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer, ce projet est piloté par l'Inserm et mobilise de nombreux partenaires au niveau national. Son objectif est la rédaction d'une revue systématique des connaissances qui vise d'une part, à faire un état des connaissances sur la relation existante entre l'antibiorésistance et l'environnement, et d'autre part de s'intéresser aux solutions efficaces proposées, ou expérimentées *in situ* le cas échéant, pour lutter contre la contamination des milieux naturels. Une revue systématique est définie comme une approche standardisée pour synthétiser des données scientifiques (*publiées ou issues de la littérature grise*) afin de repérer, évaluer et synthétiser les preuves scientifiques permettant de répondre à une question de recherche de façon systématique et explicite¹.



Fiche rédigée par :

- Pierre Benoit, Olivier Couzet, Sabine Houot, Christian Mougin, Sylvie Nélieu (UMR ECOSYS, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78026, Versailles, France)
- Florence Gélet (EA BTSB, Institut National Universitaire Champollion, 81 012 Albi Cedex, France)
- Alain Hartmann (UMR Agroécologie, INRA, AgroSup Dijon, Université de Bourgogne-Franche Comté, 21065 Dijon Cedex, France)
- Anne Jaffrézic (UMR SAS, INRA, Agrocampus Ouest, 35042 Rennes, France)
- Sylvie Nazaret (UMR LEM, CNRS, INRA, VetAgro Sup, Université Claude Bernard Lyon1, 69622 Villeurbanne cedex, France)
- Dominique Patureau (UR LBE, INRA, 11100 Narbonne, France)

Quelques éléments de bibliographie

- Aemig, Q., Chéron, C., Delgenès, N., Jimenez, J., Houot, S., Steyer, J.P., Patureau, D. (2016) Partition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in sludge organic matter pools as a driving force of their fate during anaerobic digestion. *Waste Management*, 48, 389-396.
- Ardo S., Nélieu S., Ona-Nguema G., Delarue G., Brest J., Pironin E., Morin G., 2015. Oxidative degradation of nalidixic acid by nano-magnetite via Fe^{2+}/O_2 -mediated reactions. *Environmental Science and Technology*, 49(7): 4506–4514.
- Bourdat-Deschamps M., Leang S., Bernet N., Daudin J.J., Nélieu S. (2014) Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction - ultra-high-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry: optimisation and matrix effects reduction by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe extraction. *Journal of Chromatography A*, 1349: 11-23.
- Chabauty F., Pot V., Bourdat-Deschamps M., Bernet N., Labat C., Benoit P. 2016. Transport of organic contaminants in subsoil horizons and effects of dissolved organic matter related to organic waste recycling practices. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 6907-6918.
- Chantemesse B, Betelli L, Solanas S, Vienney F, Bollache L, Hartmann A, et al. 2017. A nitrocefin-based amperometric assay for the rapid quantification of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in wastewaters. *Water Res.* 109:375-381.
- Ferhi, S., Bourdat-Deschamps, M., Daudin, J.J., Houot, S., Nélieu, S., 2016. Factors influencing the extraction of pharmaceuticals from sewage sludge and soil: an experimental design approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(22): 6153-6168.
- Geng C., Bergheaud V., Garnier P., Zhu Y.G., Haudin C.S., 2016. Impact of liming and drying municipal sewage sludge on the amount and availability of 14C-acetyl sulfamethoxazole and 14C-acetaminophen residues. *Water Research*, 88, 1, 156–163.
- Goulas A. 2016. Devenir et biodisponibilité des antibiotiques entrant dans les sols agricoles lors du recyclage des matières fertilisantes d'origine résiduaire. PhD Thesis.
- Goulas A., Haudin C.S., Bergheaud V., Dumeny V., Ferhi S., Nélieu S., Bourdat-Deschamps M., Benoit P., 2016. A new extraction method to assess the environmental availability of ciprofloxacin in agricultural soils amended with exogenous organic matter. *Chemosphere*, 165: 460-469.
- Houot S., Bourdat-Deschamps M., Ferhi S., Bernet N., Mercier V., Montenach D., Feder D., Moussard G., Patureau D., 2016. Repeated applications of organic waste products in field conditions hardly impact pharmaceutical concentrations in soil and soil leachates. Poster et Résumé, P048, 1st International conference on risk assessment of pharmaceuticals in the environment. ICRAPHE, 8-9 Septembre, Paris, France.
- Rochelet M, Solanas S, Betelli L, Chantemesse B, Vienney F, Hartmann A. 2015. Rapid amperometric detection of *Escherichia coli* in wastewater by measuring beta-D glucuronidase activity with disposable carbon sensors. *Anal Chim Acta*. 892:160-166.
- Rochelet M, Solanas S, Betelli L, Neuwirth C, Vienney F, Hartmann A. 2015. Amperometric detection of extended-spectrum beta-lactamase activity: application to the characterization of resistant *E. coli* strains. *Analyst*. 140(10):3551-3556.
- Vivant A-L, Boutin C, Prost-Boucle S, Papias S, Hartmann A, Depret G, et al. 2016. Free water surface constructed wetlands limit the dissemination of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in the natural environment. *Water Res.* 104:178-188.