

# DES AVANCÉES SCIENTIFIQUES SUR LES **CONTAMINANTS CHIMIQUES** :

origines, transferts et impacts dans les milieux aquatiques

LUNDI 12  
DÉCEMBRE  
2022

9H30 > 17H00

LYON  
L'EMBARCADÈRE

**SAUVONS !  
L'EAU !**

**Utilisation des communautés microbiennes aquatiques naturelles comme sentinelles de l'exposition aux substances pharmaceutiques et de ses conséquences écologiques dans des cours d'eau agricoles et urbains** (projet Pharmatox)

- **Stéphane Pesce**  
Directeur de recherche, INRAE UR RiverLy

# > Contexte scientifique

La contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques est un problème mondial...

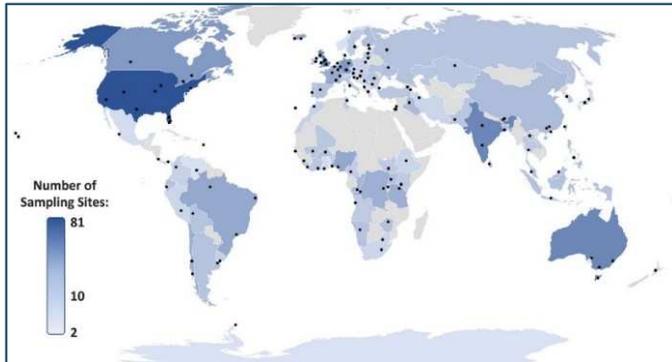
## Pharmaceutical pollution of the world's rivers

PNAS

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

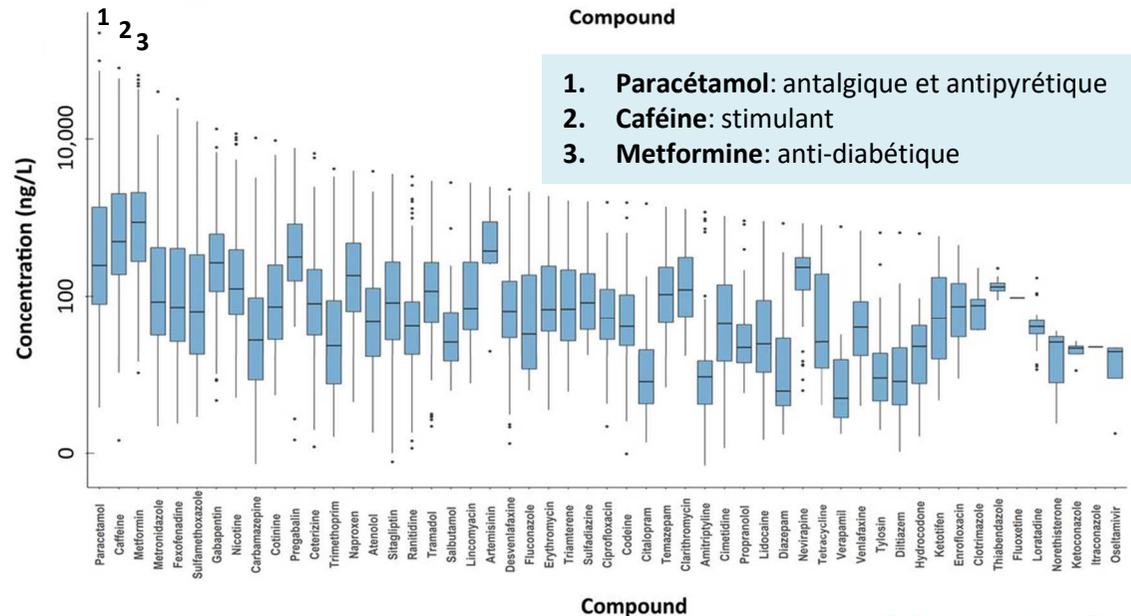
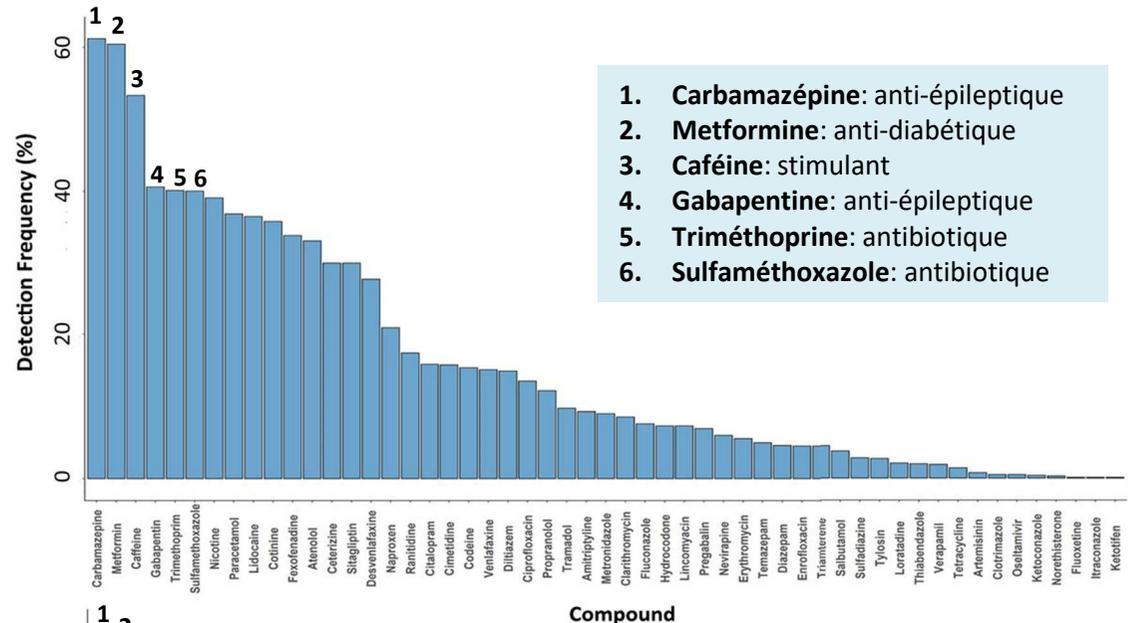
(>120 auteurs) – Février 2022

<https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>



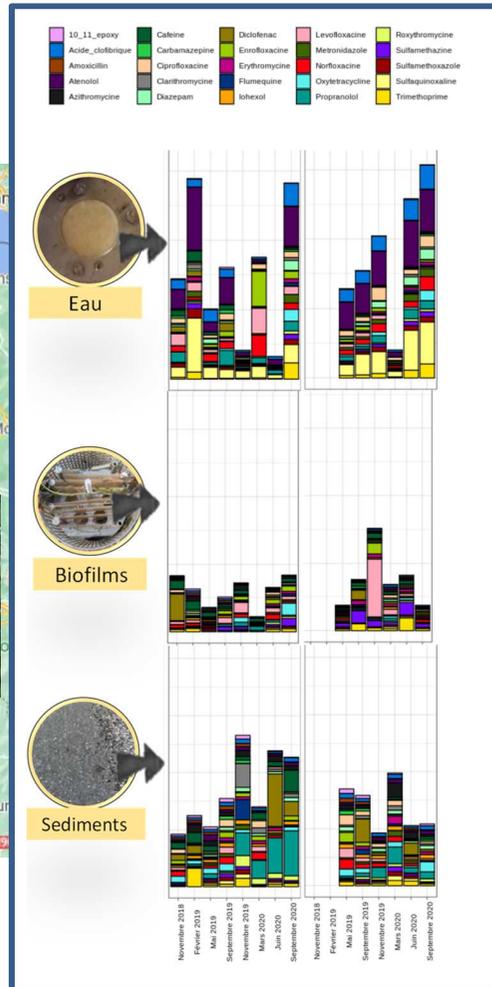
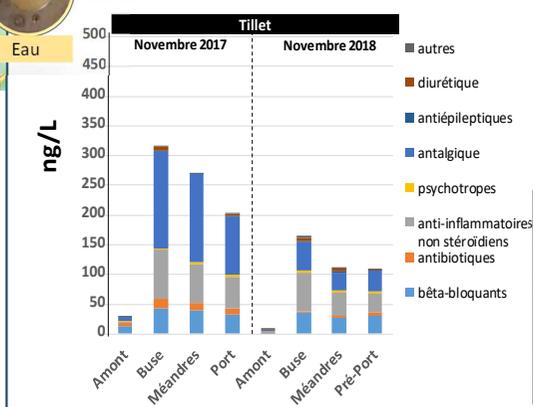
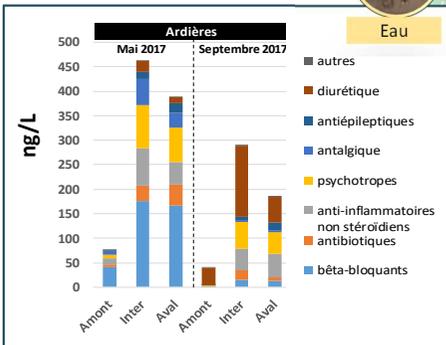
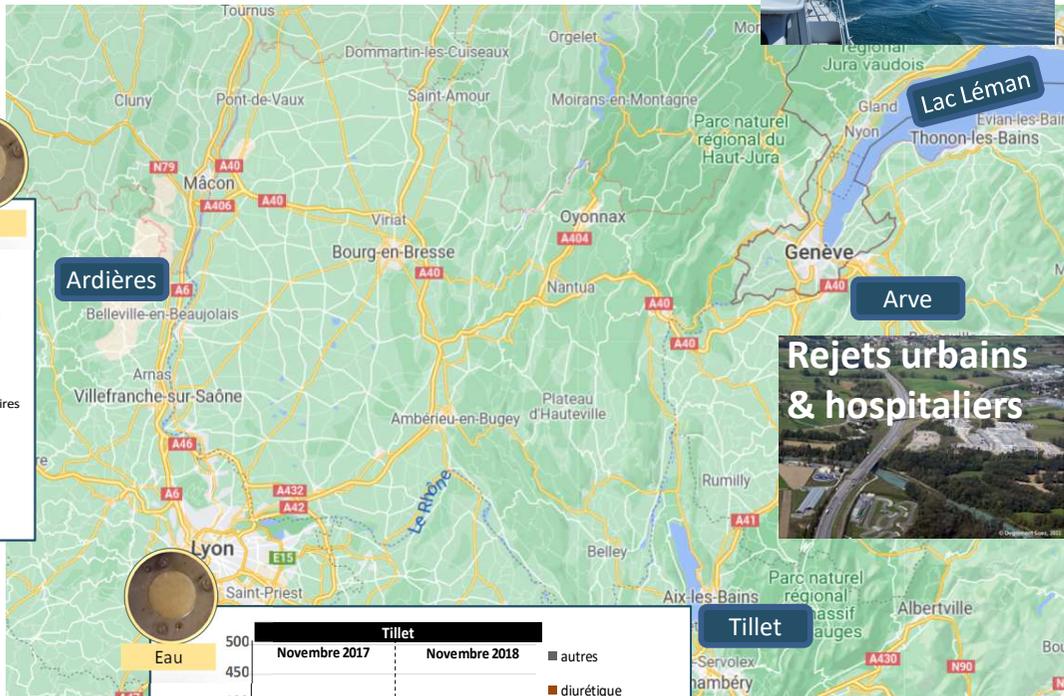
258 rivières dans 104 pays  
1052 échantillons

61 substances pharmaceutiques  
(antibiotiques, anti-inflammatoires, analgésiques, antihistaminiques...)



# ➤ Contexte scientifique

La contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques est un problème mondial... qui concerne nos écosystèmes



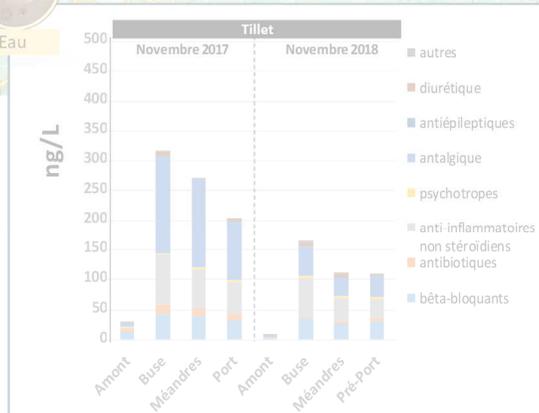
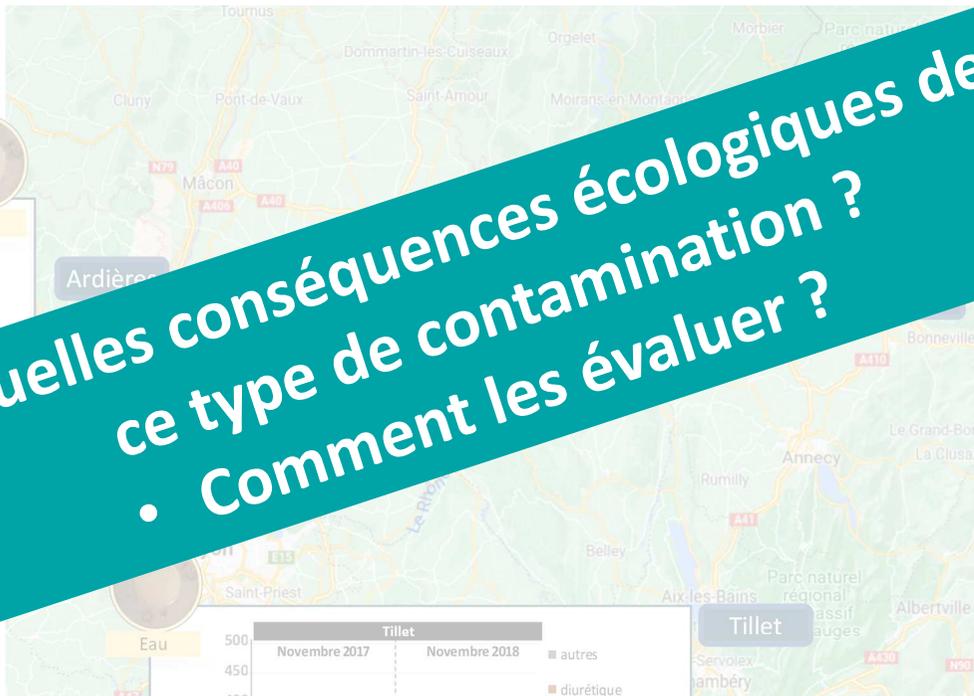
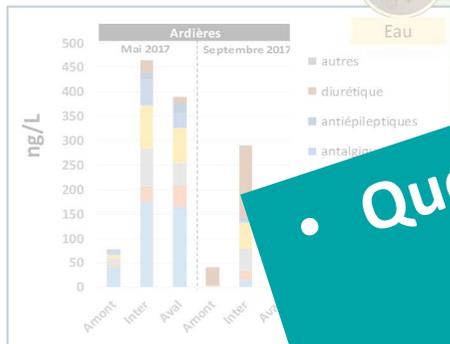
Données projet CommuSED ZABR/AE RM&C 2017-19 Pesce *et al.*

Données projet ANTIBIOTOOLS ANSES 2018-22 Bonneau *et al.*

# ➤ Contexte scientifique

La contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques est un problème mondial... qui concerne nos écosystèmes

- Quelles conséquences écologiques de ce type de contamination ?
- Comment les évaluer ?



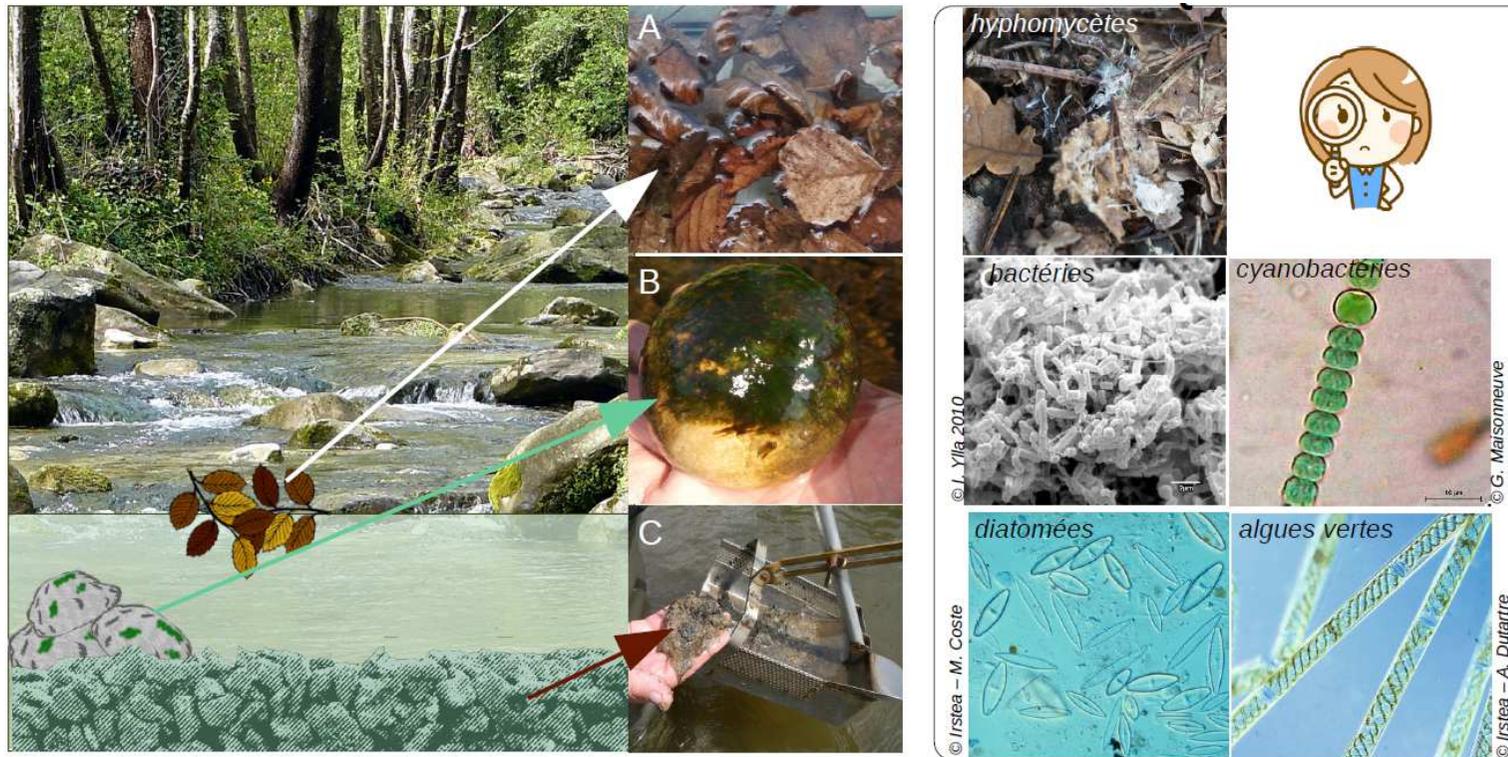
Données projet CommuSED  
ZABR/AE RM&C 2017-19  
Pesce et al.



« Watch-List » directive cadre sur l'eau  
(version 22 juillet 2022)

- **4 antibiotiques** (Clindamycine, Ofloxacine, Sulfamethoxazole, Triméthoprime)
- **3 antimycosiques** (Clotrimazole, Fluconazole, Miconazole)
- **1 antidiabétique** (Metformine)
- **1 antidépresseur** (Venlafaxine)
- **1 antiparasitique** (Fipronil)
- **2 produits de transformation** (O-desmethylvenlafaxine, Guanylurea)

# ➤ Modèle d'étude: les communautés microbiennes aquatiques



- assemblages naturels de microorganismes présents dans tous les milieux aquatiques
- niveaux d'abondance et de biodiversité énormes
- larges gammes de sensibilités aux toxiques



**1 gramme de sédiment:**

- Plusieurs milliards de microorganismes
- Plusieurs milliers d'espèces

Illustration: Pesce et al. (2021) Sciences Eaux & Territoires N° 37; doi: 10.14758/SET-REVUE.2021.4.17

## ➤ Modèle d'étude: les communautés microbiennes aquatiques



### Projet PharmaTOX:

← Communautés périphytiques

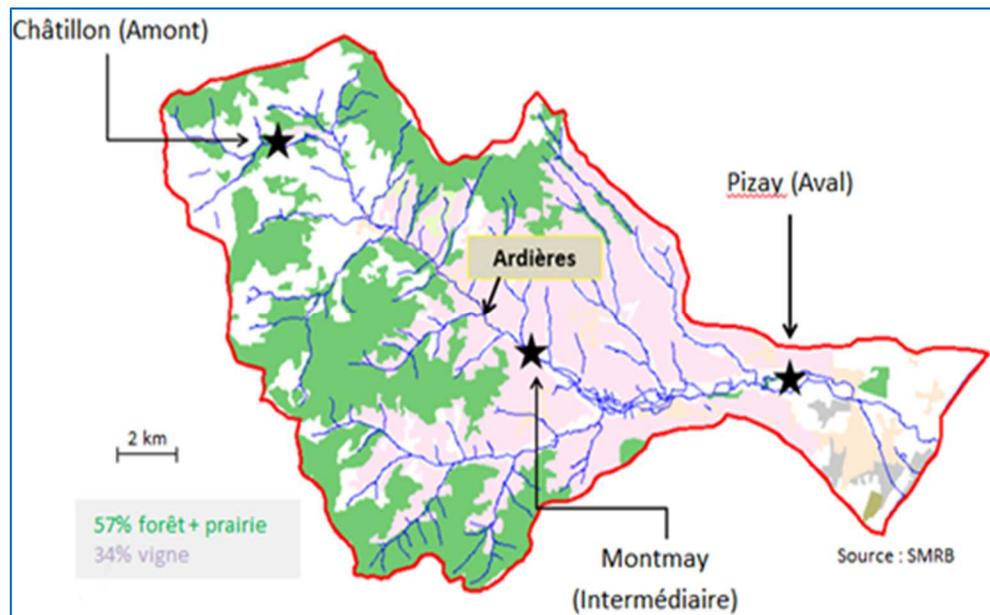
← Communautés sédimentaires

### Sentinelles de l'exposition chronique aux substances pharmaceutiques ?

- acquisition d'une tolérance à ces substances ? (approche PICT)
- développement des mécanismes de résistances ? (gènes de résistances)

# ➤ Sites d'étude: l'Ardières et le Tillet

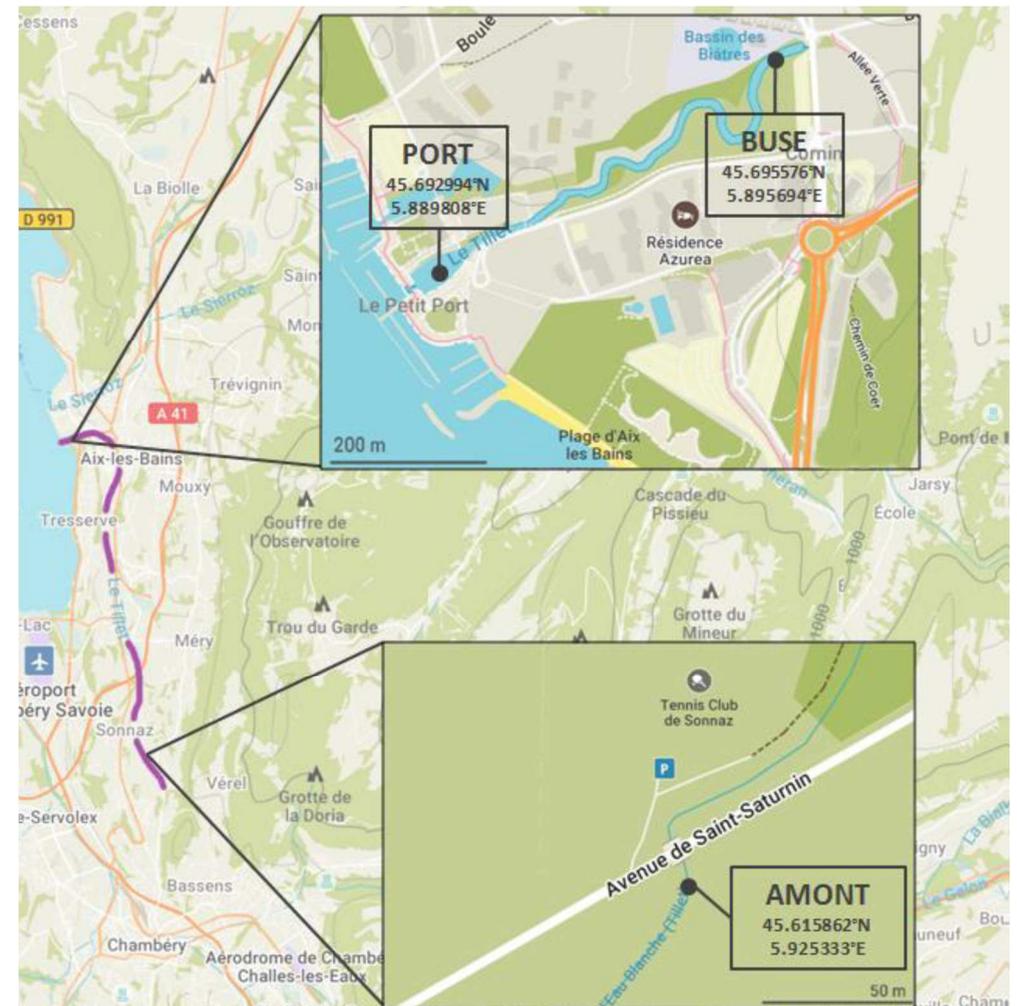
## Ardières: Amont/Intermédiaire/Aval



**Bassin versant majoritairement viticole**

**10 communes** dont Beaujeu (~2000 habitants)

## Tillet: Amont/Buse/Port

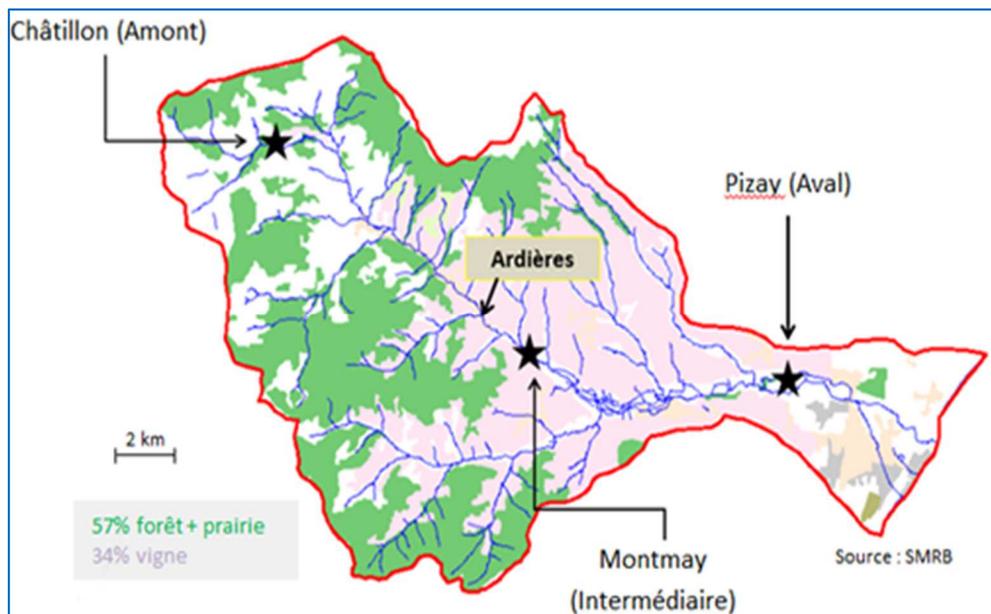


**Zone aval urbaine**

Aix-les-Bains (>30000 habitants)

# ➤ Sites d'étude: l'Ardières et le Tillet

## Ardières: Amont/Intermédiaire/Aval



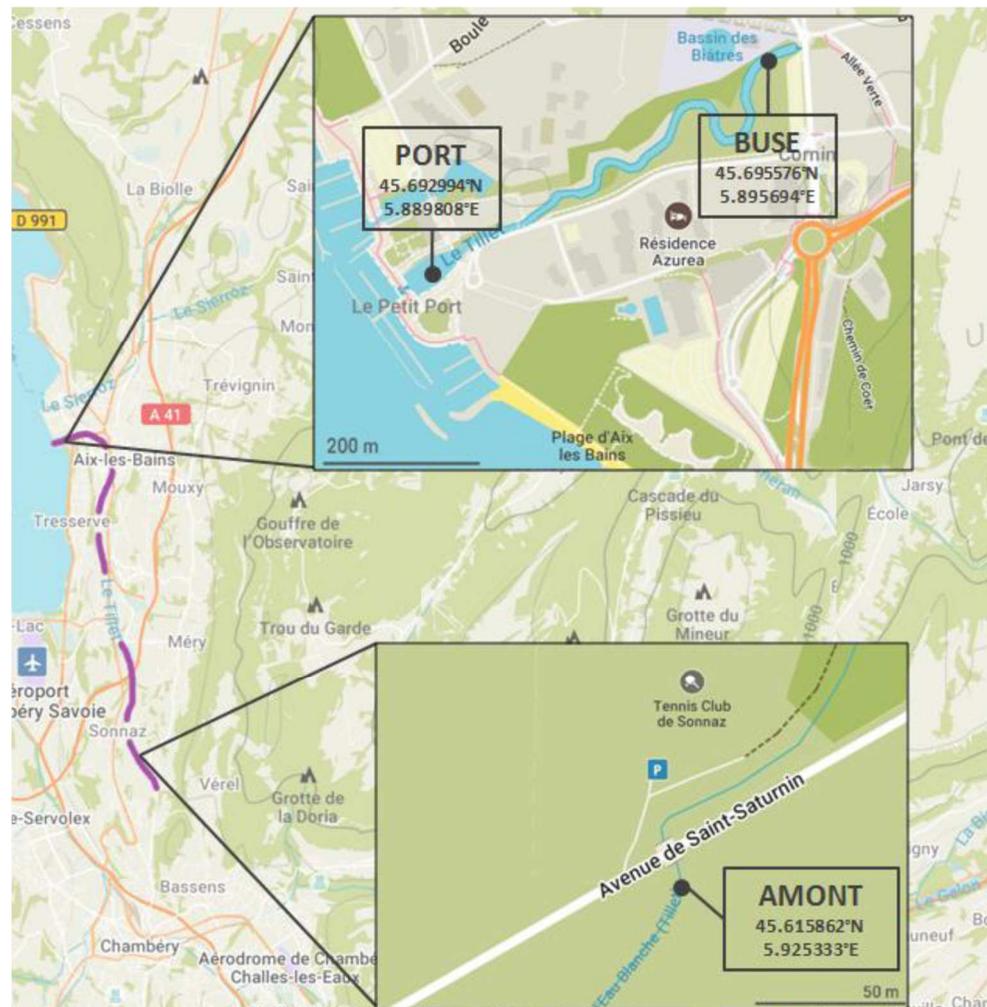
**Bassin versant majoritairement viticole**

**10 communes** dont Beaujeu (~2000 habitants)

**Deux suivis par rivière :**

- **Ardières**: Mai et Septembre 2021
- **Tillet**: Mars et Novembre 2021

## Tillet: Amont/Buse/Port



**Zone aval urbaine**

Aix-les-Bains (>30000 habitants)

# > Etat de la contamination

**Analyses ciblées:  
45 substances pharmaceutiques**

■ cateine	stimulant
■ acetylsulfamethoxazole	produits de transformation
■ norfluoxetine	
■ acide fenofibrique	hypolipémiant
■ carbamazepine epoxyde	
■ gemfibrozil	diurétique
■ fenofibrate	
■ bezafibrate	bronchodilatateur
■ furosemide	
■ theophylline	bêta-bloquant
■ salbutamol	
■ sotalol	psychotrope
■ propranolol	
■ metoprolol	anti-inflammatoire
■ celiprolol	
■ atenolol	antihypertenseur
■ acebutolol	
■ oxazepam	anti-épileptique
■ nordiazepam	
■ diazepam	antidiabétique
■ alprazolam	
■ naproxen	antidépresseur
■ ketoprofen	
■ diclofenac	anticancéreux
■ acide niflumique	
■ irbesartan	antibiotique
■ lamotrigine	
■ carbamazepin	antiarythmique
■ metformin	
■ venlafaxine	antalgique
■ fluoxetine	
■ amitriptyline	
■ amisulpride	
■ cyclophosphamide	
■ trimethoprim	
■ sulfamethoxazole	
■ ofloxacin	
■ norfloxacin	
■ metronidazole	
■ erythromycine	
■ clindamicyne	
■ clarithromycine	
■ ciprofloxacin	
■ flecainide	
■ paracetamol	

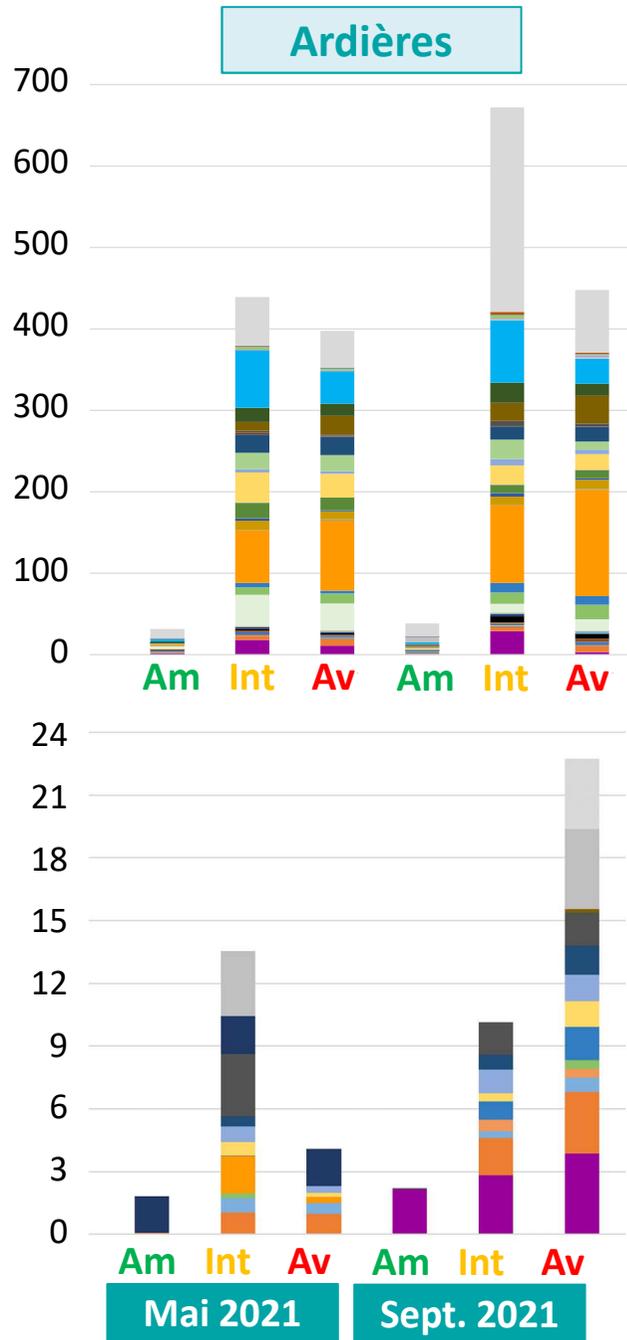
# > Etat de la contamination



eau de surface  
(ng.L<sup>-1</sup>)



sédiment de surface  
(ng.g<sup>-1</sup>)



Apports principaux  
entre stations  
Amont et Inter  
⇒ ville de Beaujeu

- cateine stimulant
- acetylsulfaméthoxazole produits de transformation
- norfluoxétine
- acide fenofibrrique hypolipémiant
- carbamazépine époxyde
- gemfibrozil
- fenofibrate
- bezafibrate diurétique
- furosemide bronchodilatateur
- théophylline
- salbutamol
- sotalol
- propranolol
- metoprolol bêta-bloquant
- celiprolol
- atenolol
- acebutolol
- oxazepam psychotrope
- nordiazepam
- diazepam
- alprazolam
- naproxen
- ketoprofen anti-inflammatoire
- diclofenac
- acide niflumique
- irbesartan antihypertenseur
- lamotrigine anti-épileptique
- carbamazépin
- metformin antidiabétique
- venlafaxine
- fluoxétine antidépresseur
- amitriptyline
- amisulpride
- cyclophosphamide anticancéreux
- triméthoprim
- sulfaméthoxazole
- ofloxacine
- norfloxacine
- metronidazole antibiotique
- érythromycine
- clindamycine
- clarithromycine
- ciprofloxacine
- flecaïnide antiarythmique
- paracétamol antalgique

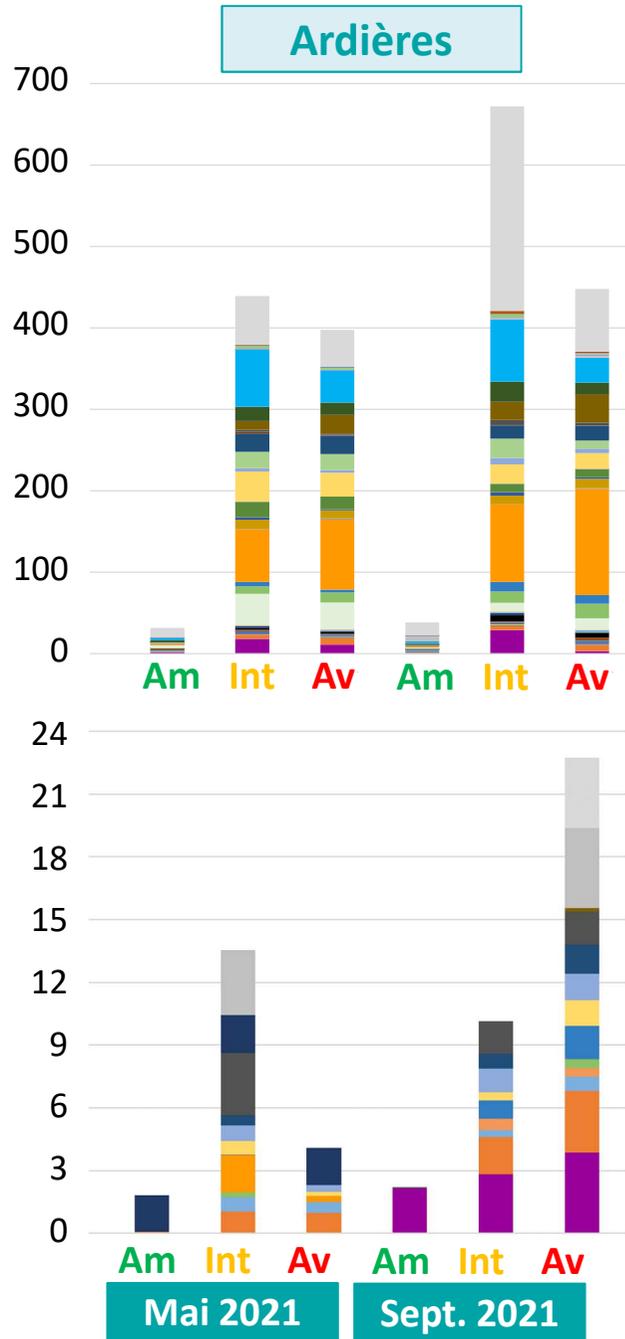
# > Etat de la contamination



eau de surface  
(ng.L<sup>-1</sup>)



sédiment de surface  
(ng.g<sup>-1</sup>)



- cateine stimulant
- acetylsulfaméthoxazole produits de transformation
- norfluoxétine produits de transformation
- acide fenofibrique hypolipémiant
- carbamazépine époxyde hypolipémiant
- gemfibrozil hypolipémiant
- fenofibrate hypolipémiant
- bezafibrate diurétique
- furosemide diurétique
- theophylline bronchodilatateur
- salbutamol bronchodilatateur
- sotalol bêta-bloquant
- propranolol bêta-bloquant
- metoprolol bêta-bloquant
- celiprolol bêta-bloquant
- atenolol bêta-bloquant
- acebutolol bêta-bloquant
- oxazepam psychotrope
- nordiazepam psychotrope
- diazepam psychotrope
- alprazolam psychotrope
- naproxen anti-inflammatoire
- ketoprofen anti-inflammatoire
- diclofenac anti-inflammatoire
- acide niflumique anti-inflammatoire
- irbesartan antihypertenseur
- lamotrigine anti-épileptique
- carbamazépin anti-épileptique
- metformin antidiabétique
- venlafaxine antidépresseur
- fluoxétine antidépresseur
- amitriptyline antidépresseur
- amisulpride antidépresseur
- cyclophosphamide anticancéreux
- triméthoprim antibiotique
- sulfaméthoxazole antibiotique
- ofloxacine antibiotique
- norfloxacine antibiotique
- metronidazole antibiotique
- erythromycine antibiotique
- clindamycine antibiotique
- clarithromycine antibiotique
- ciprofloxacine antibiotique
- flecainide antiarythmique
- paracétamol antalgique

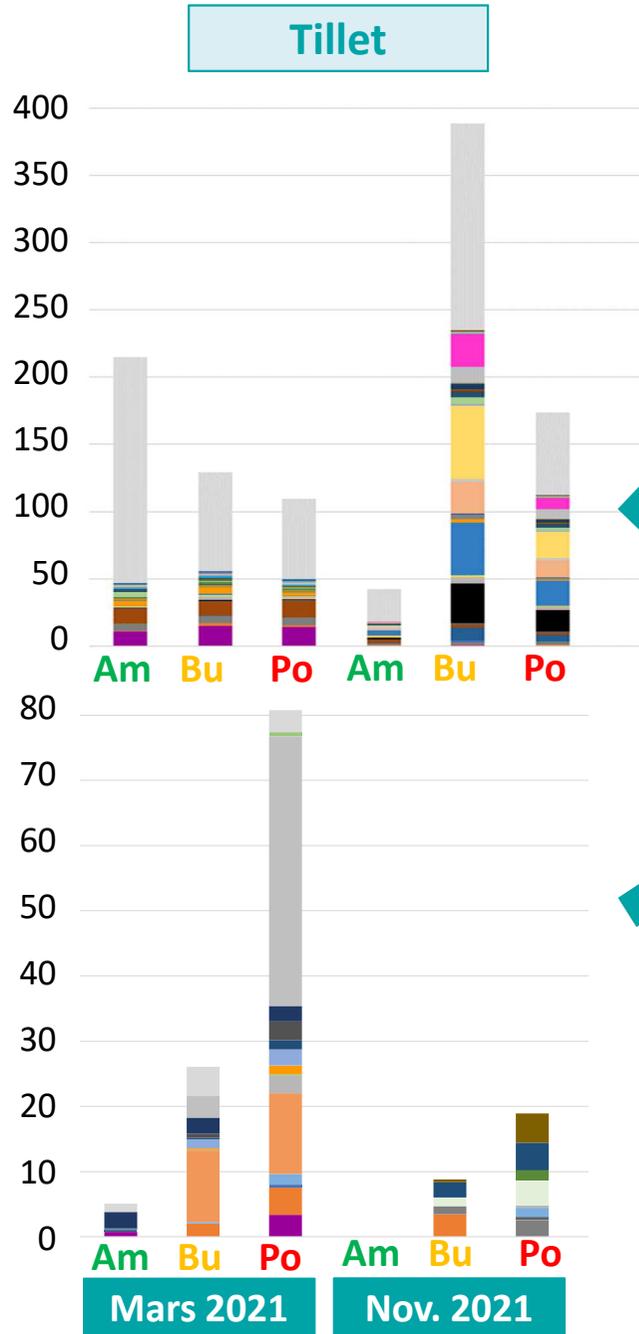
# > Etat de la contamination



eau de surface  
(ng.L<sup>-1</sup>)



sédiment de surface  
(ng.g<sup>-1</sup>)



Apports principaux au niveau de la buse  
⇒ Aix-les-Bains  
(rejets domestiques, thermes, hippodrome)

- cateine stimulant
- acetylsulfaméthoxazole produits de transformation
- norfluoxétine produits de transformation
- acide fenofibrrique hypolipémiant
- carbamazépine époxyde hypolipémiant
- gemfibrozil hypolipémiant
- fenofibrate hypolipémiant
- bezafibrate diurétique
- furosemide diurétique
- theophylline bronchodilatateur
- salbutamol bronchodilatateur
- sotalol bêta-bloquant
- propranolol bêta-bloquant
- metoprolol bêta-bloquant
- celiprolol bêta-bloquant
- atenolol bêta-bloquant
- acebutolol bêta-bloquant
- oxazepam psychotrope
- nordiazepam psychotrope
- diazepam psychotrope
- alprazolam psychotrope
- naproxen anti-inflammatoire
- ketoprofen anti-inflammatoire
- diclofenac anti-inflammatoire
- acide niflumique anti-inflammatoire
- irbesartan antihypertenseur
- lamotrigine anti-épileptique
- carbamazépin anti-épileptique
- metformin antidiabétique
- venlafaxine antidépresseur
- fluoxétine antidépresseur
- amitriptyline antidépresseur
- amisulpride antidépresseur
- cyclophosphamide anticancéreux
- triméthoprim antibiotique
- sulfaméthoxazole antibiotique
- ofloxacine antibiotique
- norfloxacine antibiotique
- metronidazole antibiotique
- erythromycine antibiotique
- clindamycine antibiotique
- clarithromycine antibiotique
- ciprofloxacine antibiotique
- flecainide antiarythmique
- paracétamol antalgique

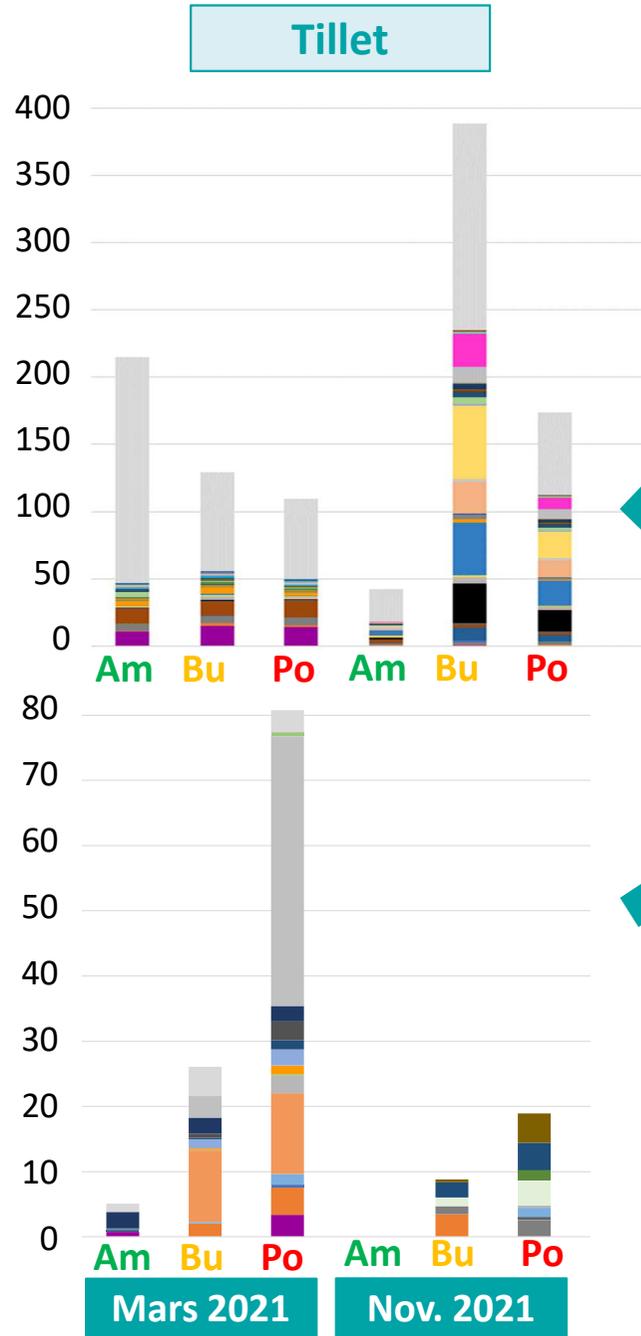
# > Etat de la contamination



eau de surface  
(ng.L<sup>-1</sup>)



sédiment de surface  
(ng.g<sup>-1</sup>)



Pas/peu d'apports en mars 2021: fermeture thermes + hippodrome (COVID) ?

Apports principaux au niveau de la buse  
⇒ Aix-les-Bains (rejets domestiques, thermes, hippodrome)

Accumulation dans les sédiments du port

- cateine stimulant
- acetylsulfamethoxazole produits de transformation
- norfluoxetine produits de transformation
- acide fenofibrique hypolipémiant
- carbamazepine epoxyde hypolipémiant
- gemfibrozil hypolipémiant
- fenofibrate hypolipémiant
- bezafibrate diurétique
- furosemide diurétique
- theophylline bronchodilatateur
- salbutamol bronchodilatateur
- sotalol bêta-bloquant
- propranolol bêta-bloquant
- metoprolol bêta-bloquant
- celiprolol bêta-bloquant
- atenolol bêta-bloquant
- acebutolol bêta-bloquant
- oxazepam psychotrope
- nordiazepam psychotrope
- diazepam psychotrope
- alprazolam psychotrope
- naproxen anti-inflammatoire
- ketoprofen anti-inflammatoire
- diclofenac anti-inflammatoire
- acide niflumique anti-inflammatoire
- irbesartan antihypertenseur
- lamotrigine anti-épileptique
- carbamazepin anti-épileptique
- metformin antidiabétique
- venlafaxine antidépresseur
- fluoxetine antidépresseur
- amitriptyline antidépresseur
- amisulpride antidépresseur
- cyclophosphamide anticancéreux
- trimethoprim antibiotique
- sulfamethoxazole antibiotique
- ofloxacin antibiotique
- norfloxacin antibiotique
- metronidazole antibiotique
- erythromycine antibiotique
- clindamicyne antibiotique
- clarithromycine antibiotique
- ciprofloxacin antibiotique
- flecainide antiarythmique
- paracetamol antalgique

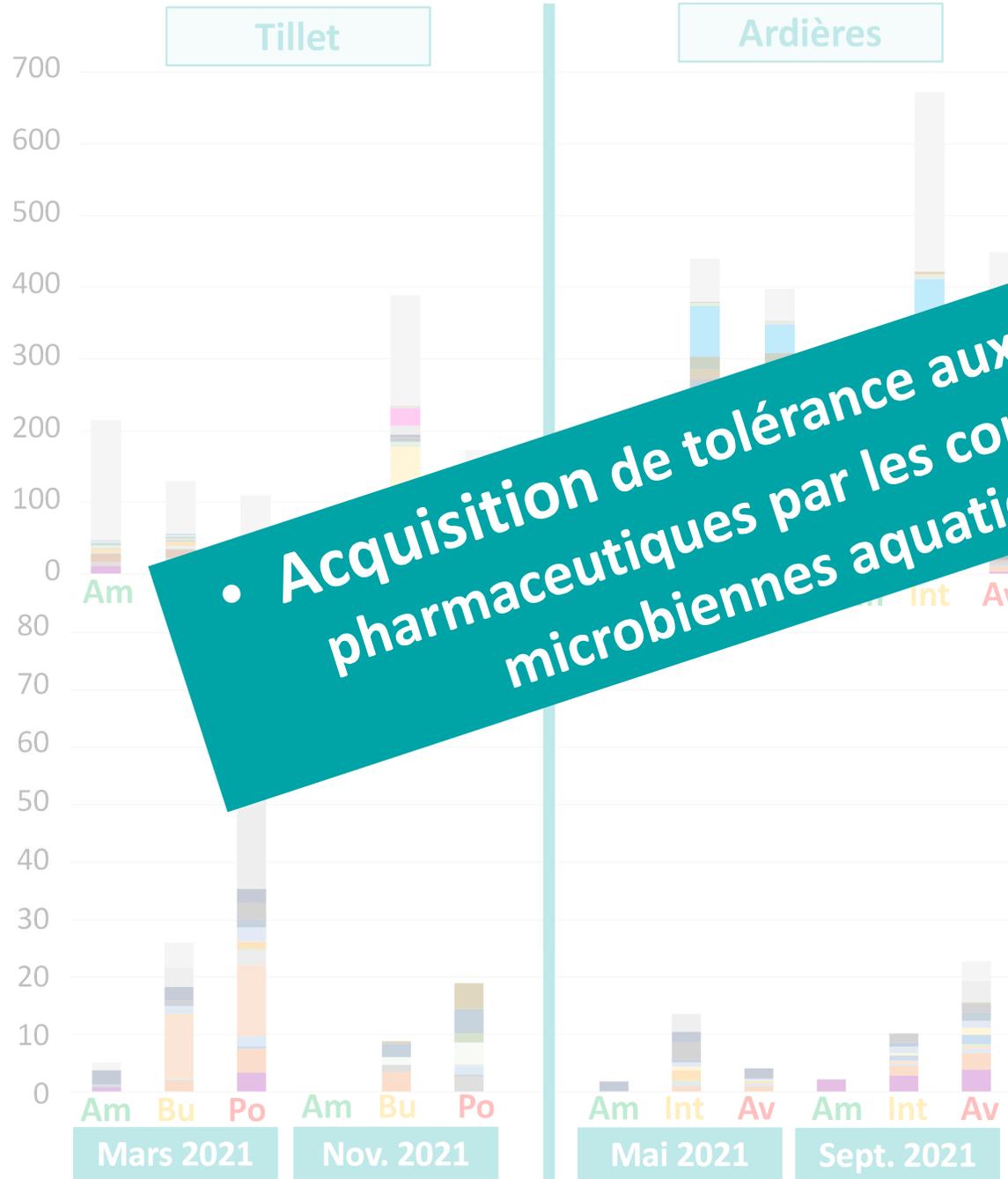
# > Etat de la contamination



eau de surface  
(ng.L<sup>-1</sup>)



sédiment de surface  
(ng.g<sup>-1</sup>)



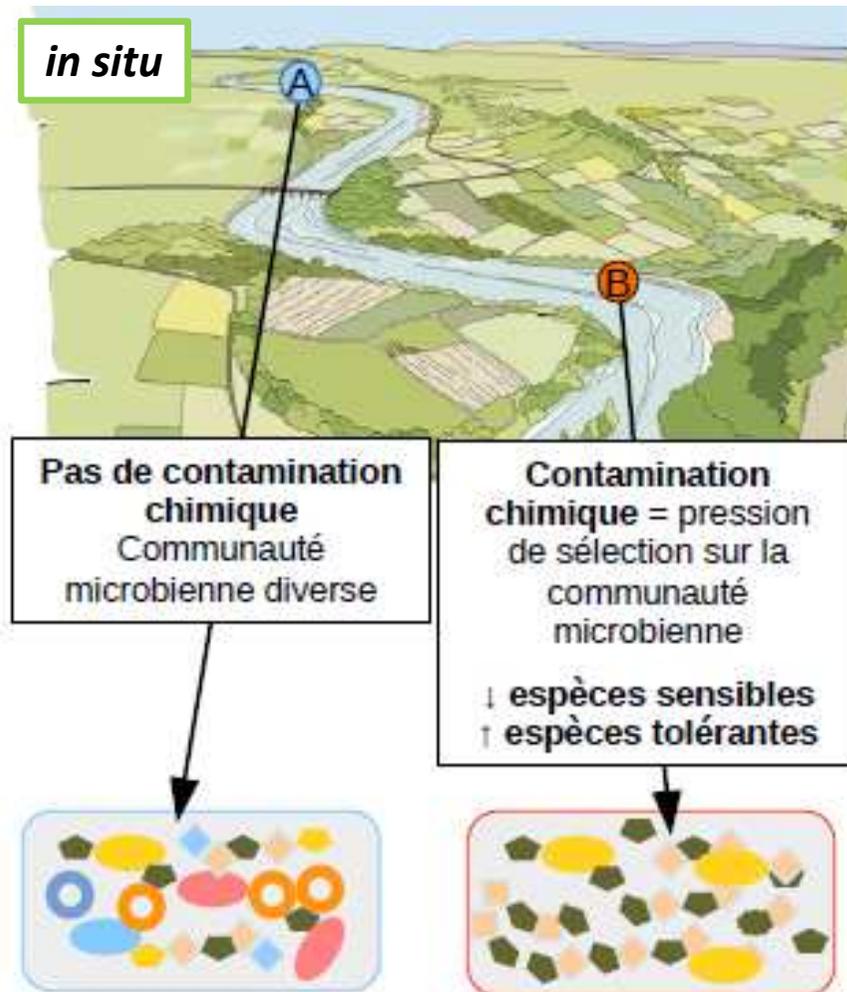
• Acquisition de tolérance aux substances pharmaceutiques par les communautés microbiennes aquatiques ?

cateine	stimulant
acetylsulfamethoxazole	produits de transformation
norfluoxetine	produits de transformation
acide fenofibrique	hypolipémiant
carbamazepine epoxyde	hypolipémiant
gemfibrozil	hypolipémiant
fenofibrate	hypolipémiant
bezafibrate	diurétique
furosemide	diurétique
theophylline	bronchodilatateur
salbutamol	bronchodilatateur
sotalol	beta-bloquant
propranolol	beta-bloquant
amoxicilline	antibiotique
ketoprofen	anti-inflammatoire
diclofenac	anti-inflammatoire
acide niflumique	antihypertenseur
irbesartan	antihypertenseur
lamotrigine	anti-épileptique
carbamazepin	antidiabétique
metformin	antidiabétique
venlafaxine	antidépresseur
fluoxetine	antidépresseur
amitriptyline	antidépresseur
amisulpride	antidépresseur
cyclophosphamide	anticancéreux
trimethoprim	antibiotique
sulfamethoxazole	antibiotique
ofloxacin	antibiotique
norfloxacin	antibiotique
metronidazole	antibiotique
erythromycine	antibiotique
clindamicyne	antibiotique
clarithromycine	antibiotique
ciprofloxacin	antibiotique
flecainide	antiarythmique
paracetamol	antalgique

# ➤ Acquisition de tolérance: approche PICT

# ➤ Acquisition de tolérance: approche PICT

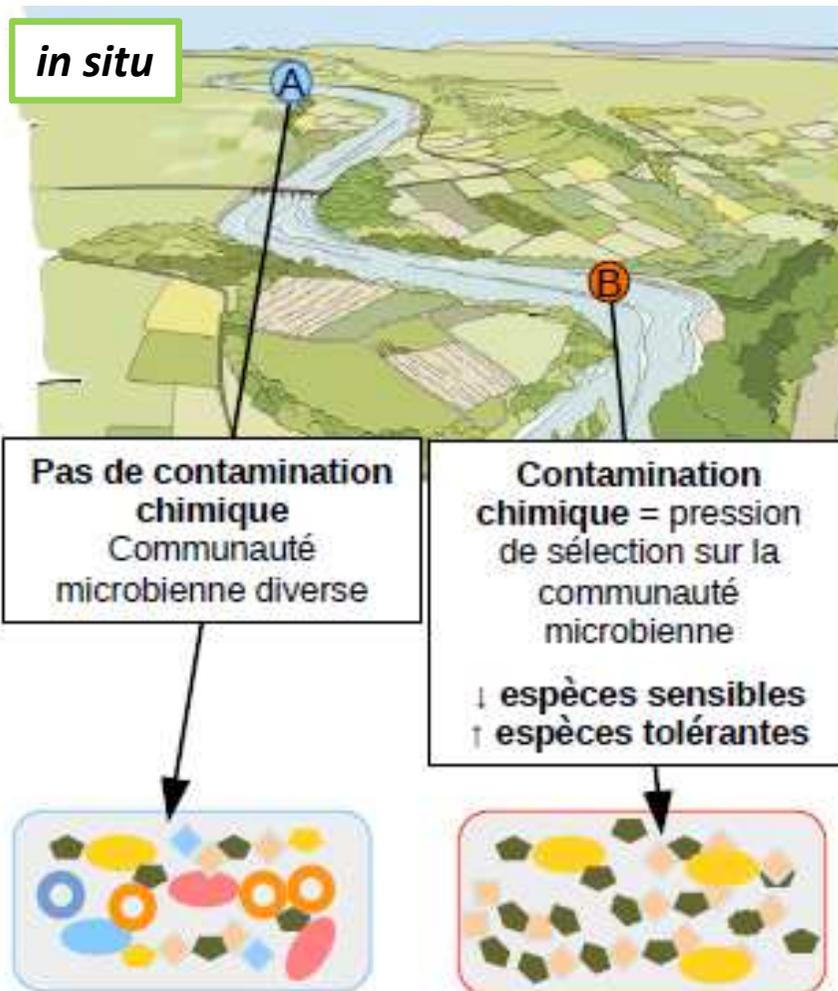
PICT = Pollution Induced Community Tolerance



# ➤ Acquisition de tolérance: approche PICT

**PICT = Pollution Induced Community Tolerance**

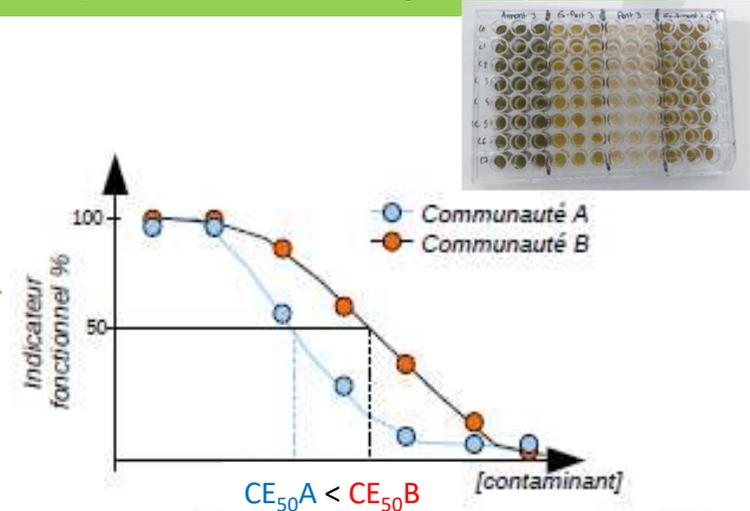
**Estimation et comparaison des seuils de tolérance (au laboratoire):** Réalisation de tests de toxicité aigüe avec le(s) contaminant(s) d'intérêt à partir de mesures fonctionnelles réalisées à l'échelle de la communauté microbienne



transport des communautés au laboratoire



Réalisation de tests de toxicité aigüe et analyse des résultats (courbes dose-réponse)



La communauté B est plus tolérante au contaminant que la communauté A. B a donc été exposé de manière plus intense à ce contaminant que A. C'est l'acquisition de tolérance induite par la contamination.

# ➤ Acquisition de tolérance: approche PICT

PICT = Pollution Induced Community Tolerance

Différents tests de toxicité mis au point durant le projet

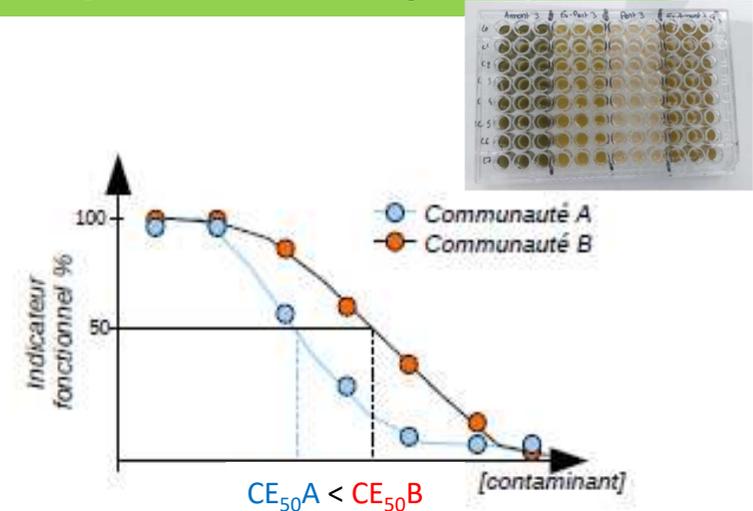


Activité photosynthétique  
Croissance algale



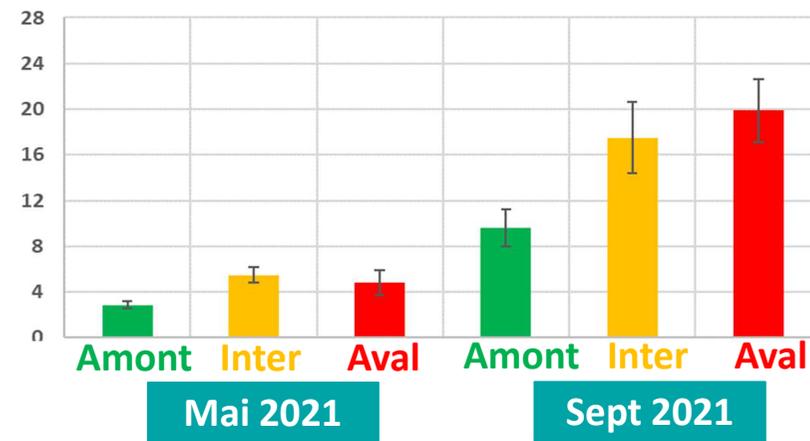
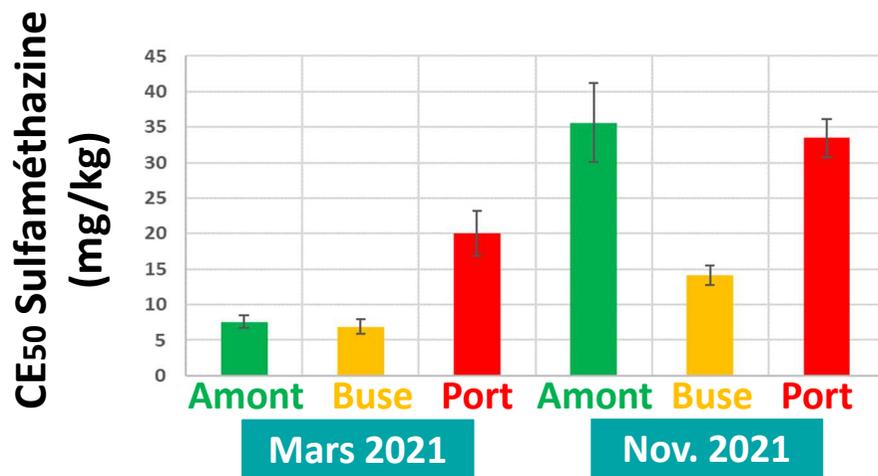
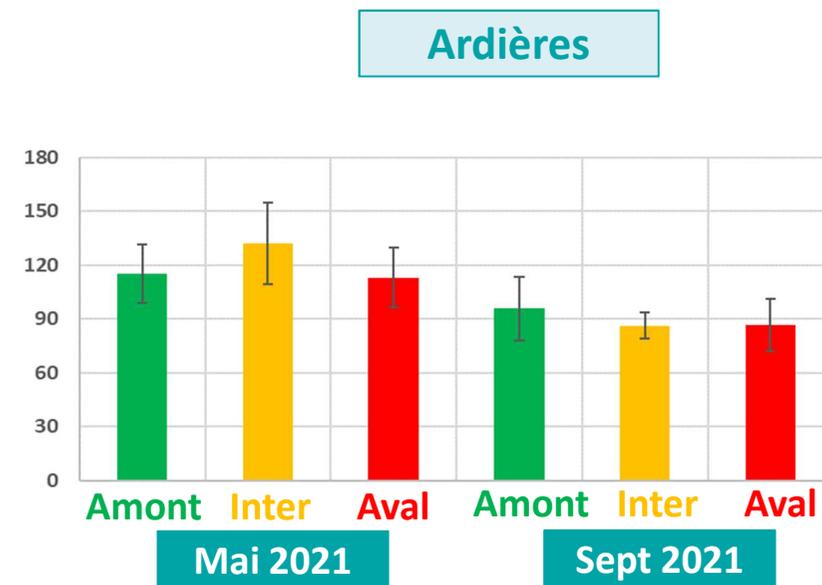
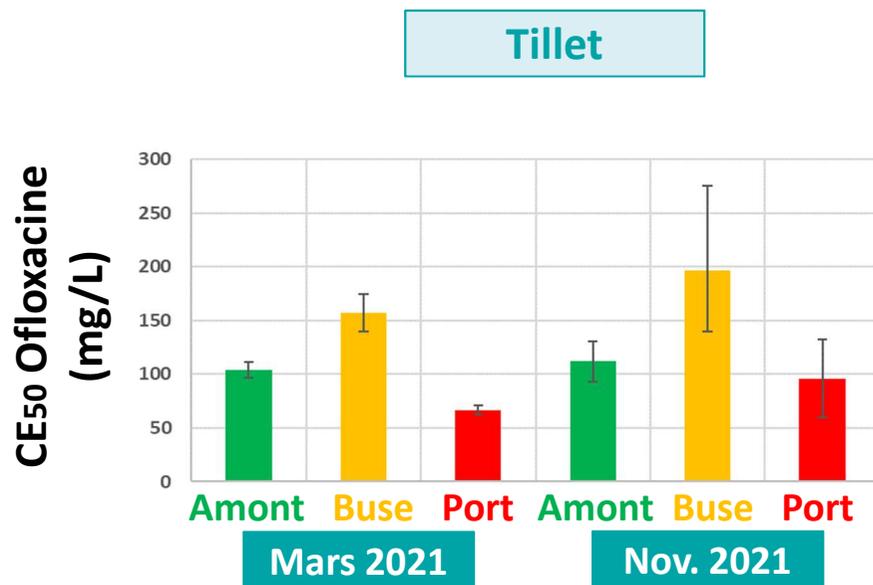
Activité enzymatique  $\beta$ -glucosidase

Réalisation de tests de toxicité aigüe et analyse des résultats (courbes dose-réponse)



# ➤ Acquisition de tolérance: approche PICT

Exemples de résultats: Ofloxacine (périphyton) – Sulfaméthazine (sédiment) /  $\beta$ -glucosidase



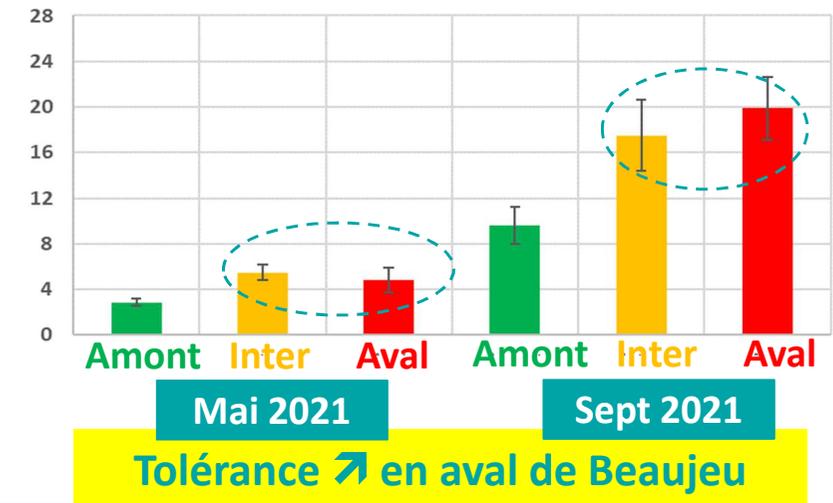
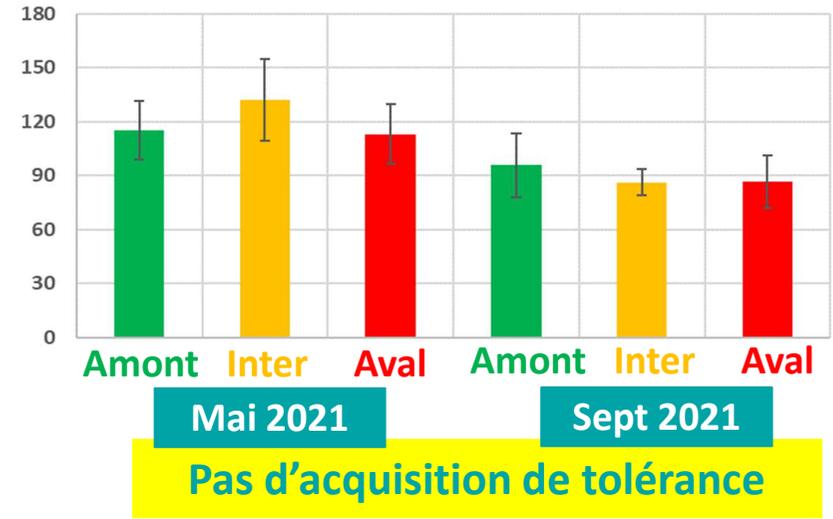
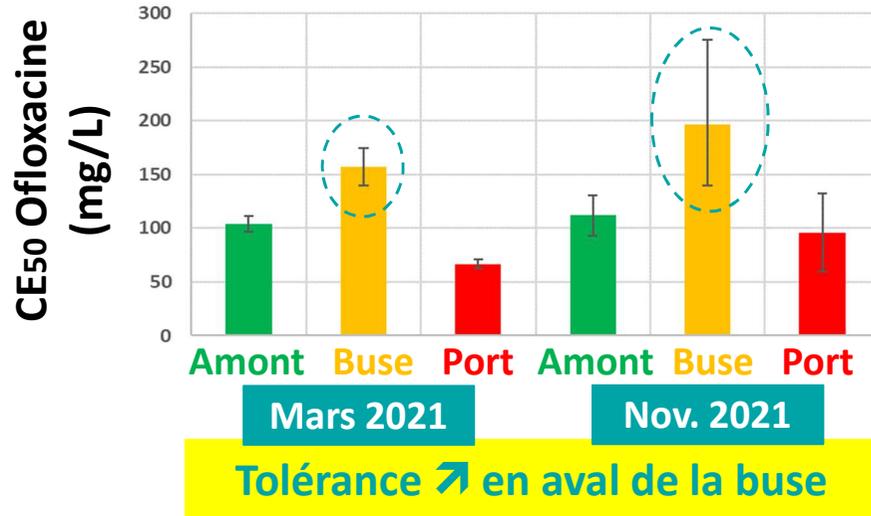
# ➤ Acquisition de tolérance: approche PICT

Exemples de résultats: Ofloxacine (périphyton) – Sulfaméthazine (sédiment) /  $\beta$ -glucosidase



Tillet

Ardières

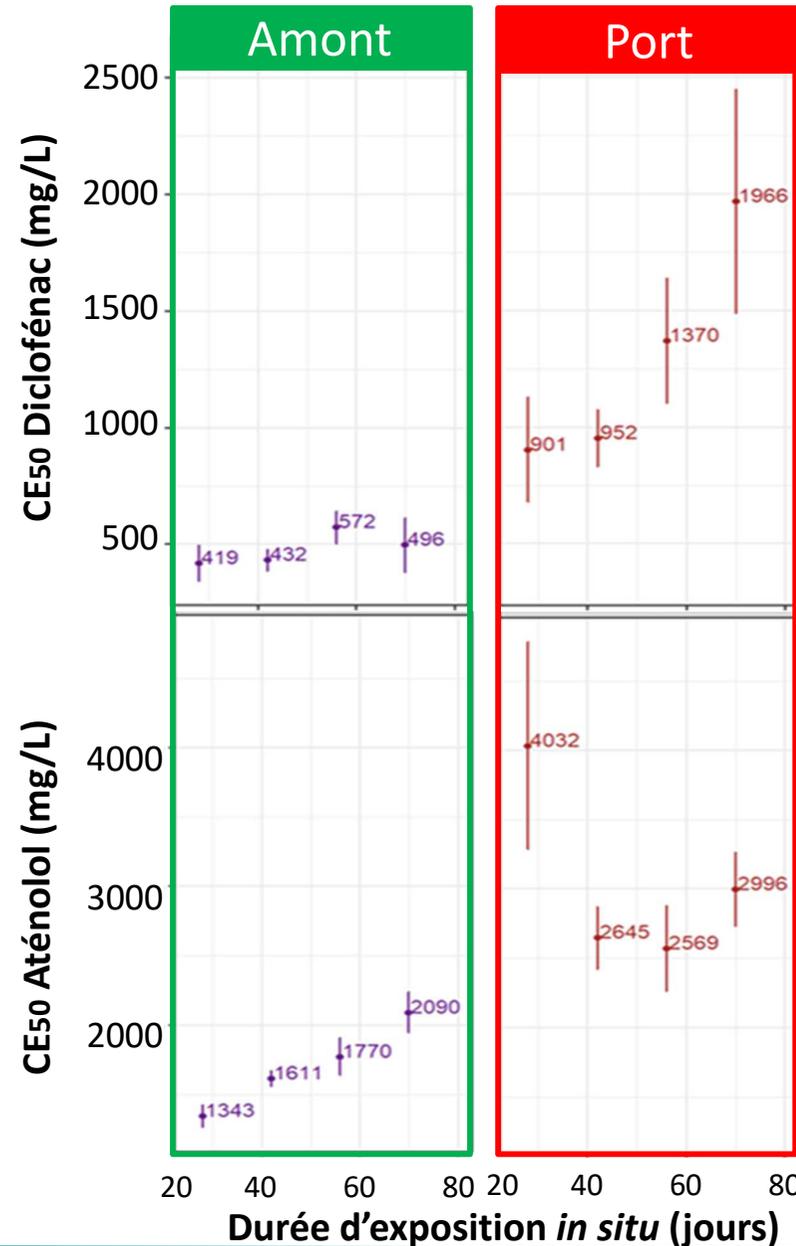


# ➤ Acquisition de tolérance: approche PICT

**Exemples de résultats:** Dynamique de la tolérance (activité photosynthétique)



**Tillet**  
Février-Avril 2022



Tolérance  
aval (port)  
>  
Tolérance  
amont

**Dynamique temporelle**  
variable suivant la station  
et la substance considérées

# ➤ Acquisition de tolérance: approche PICT

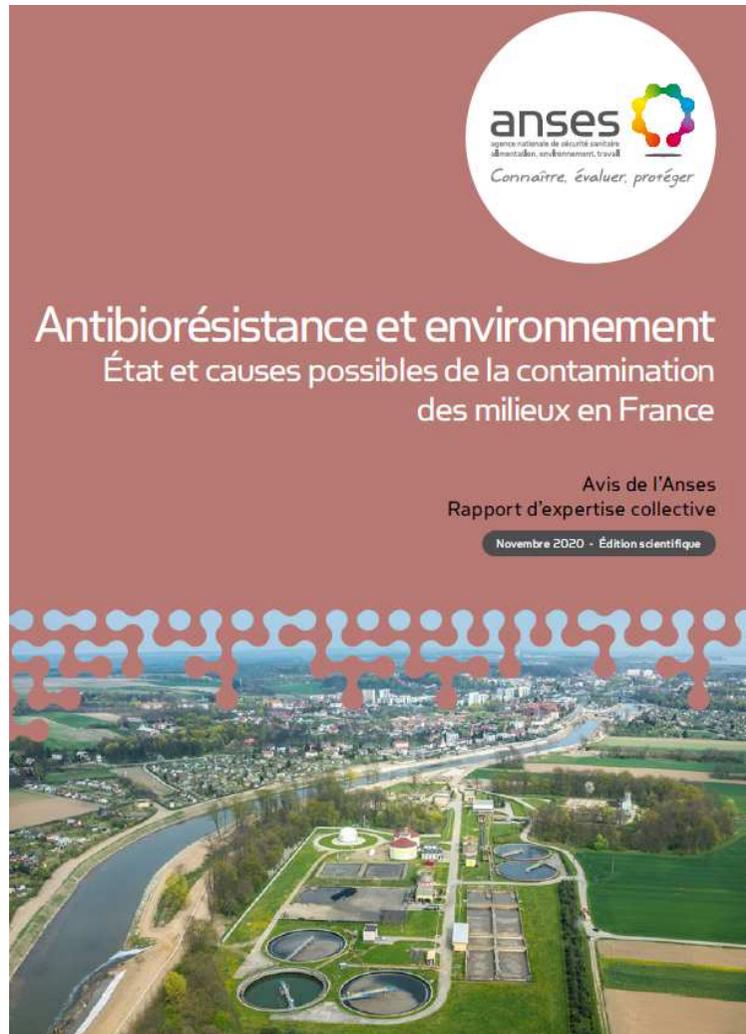
**Augmentation de la tolérance à certaines substances pharmaceutiques**  
dans les stations les plus contaminées



Présence de microorganismes dotés de **capacités de résistance spécifiques ?**

# ➤ Développement de capacités spécifiques de résistance

## Résistance aux antibiotiques



Risque environnemental et  
sanitaire majeur

# ➤ Développement de capacités spécifiques de résistance

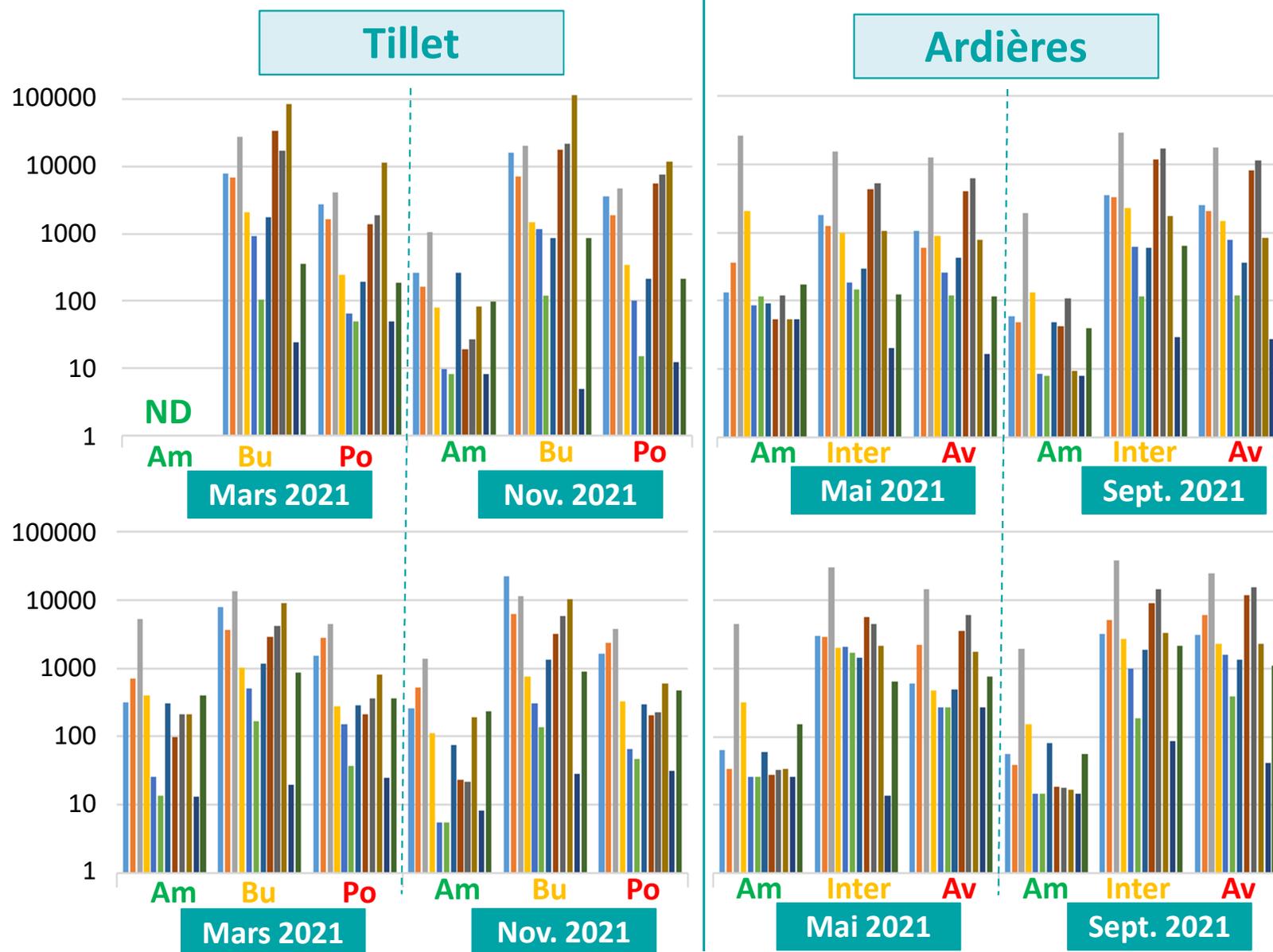
■ <i>sul1</i>	}	sulfonamides
■ <i>sul2</i>		
■ <i>strA</i>	}	streptomycine
■ <i>strB</i>		
■ <i>ermB</i>	}	erythromycine
■ <i>ermF</i>		
■ <i>tetA</i>	→	tetracycline
■ <i>mphE</i>	}	macrolides
■ <i>msrE</i>		
■ <i>blaoxA20</i>		carbapénèmes
■ <i>CMY2</i>	→	bêta-lactamine
■ <i>aadA</i>	→	streptomycine/spectinomycine

# ➤ Développement de capacités spécifiques de résistance

**Résistance aux antibiotiques:** quantification de l'abondance relative de gènes porteurs

Nombre de copies par million copies gène  
ADNr 16S

- *sul1*
- *sul2*
- *strA*
- *strB*
- *ermB*
- *ermF*
- *tetA*
- *mphE*
- *msrE*
- *bla<sub>oxA20</sub>*
- *CMY2*
- *aadA*

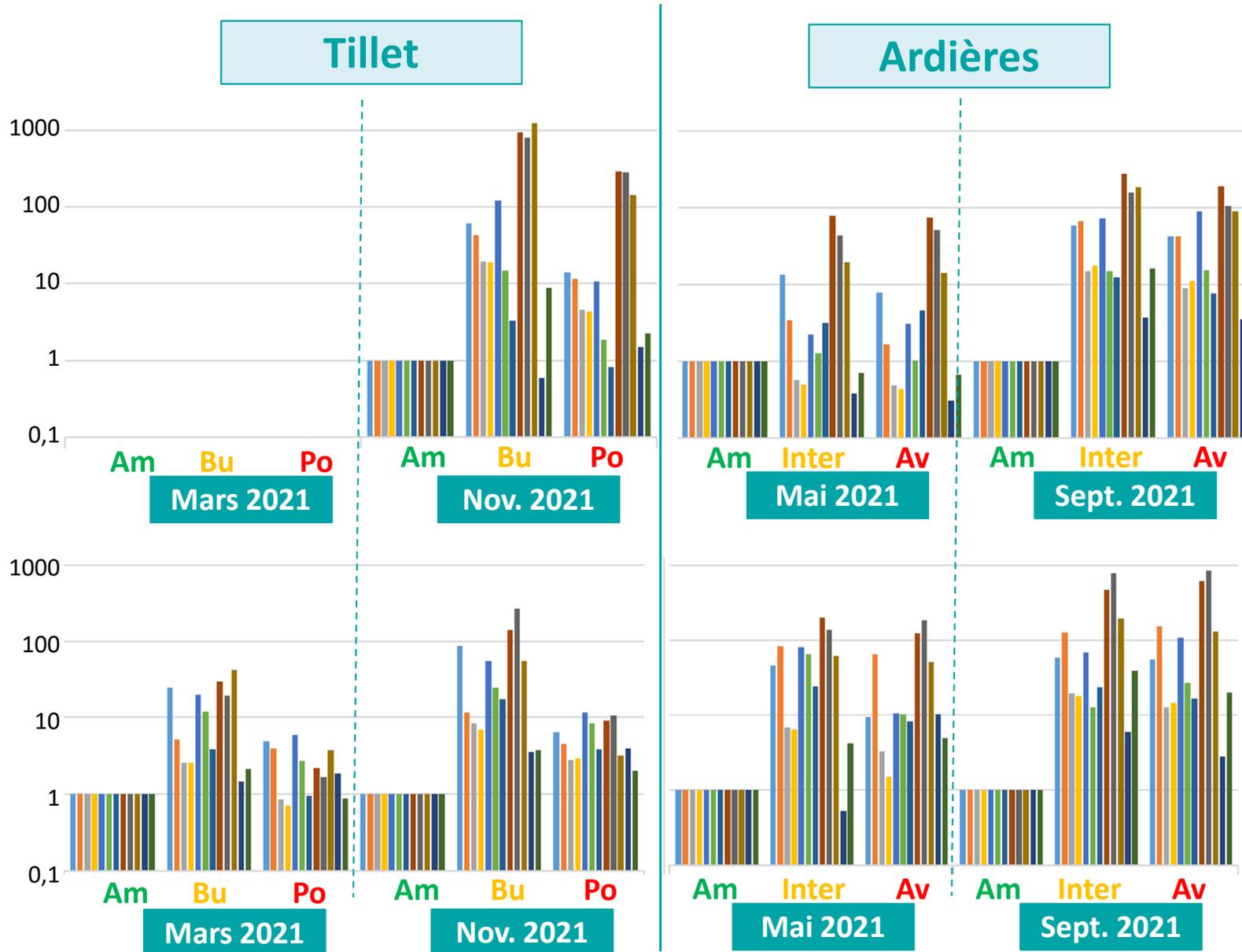


# ➤ Développement de capacités spécifiques de résistance

**Résistance aux antibiotiques:** quantification de l'abondance relative de gènes porteurs

Ratio nombre de copies / Amont

- *sul1*
- *sul2*
- *strA*
- *strB*
- *ermB*
- *ermF*
- *tetA*
- *mphE*
- *msrE*
- *bla<sub>oxA20</sub>*
- *CMY2*
- *aadA*

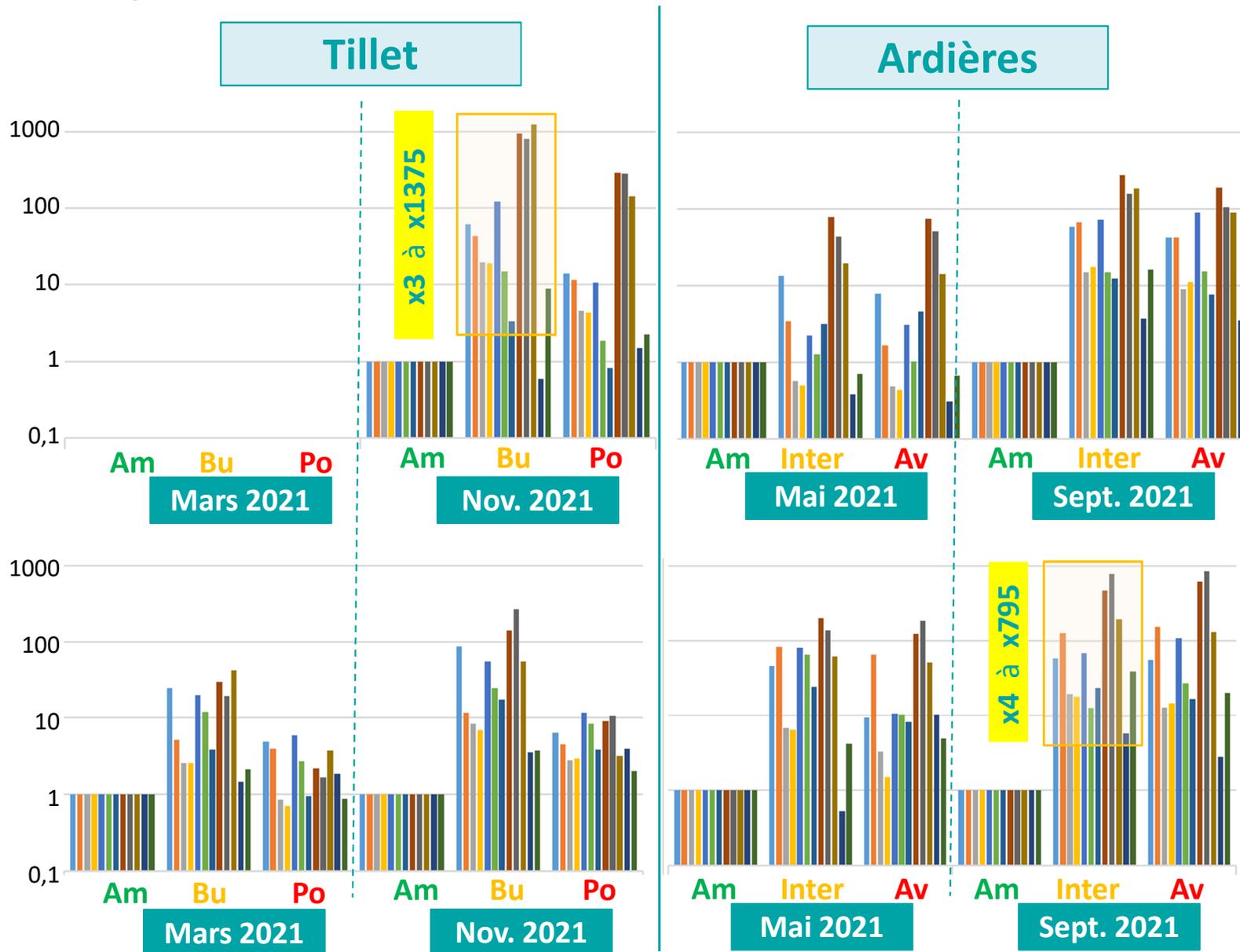


# ➤ Développement de capacités spécifiques de résistance

**Résistance aux antibiotiques:** quantification de l'abondance relative de gènes porteurs

Ratio nombre de copies / Amont

- *sul1*
- *sul2*
- *strA*
- *strB*
- *ermB*
- *ermF*
- *tetA*
- *mphE*
- *msrE*
- *bla<sub>oxA20</sub>*
- *CMY2*
- *aadA*



## > Ce qu'il faut retenir...

- Les communautés microbiennes du Tillet et de l'Ardières sont exposées chroniquement à des mélanges de substances pharmaceutiques (dans l'eau de surface et les sédiments)
- Dans les zones les plus contaminées, ces communautés sont plus tolérantes à certaines de ces substances (ou certaines familles de substances)
- Dans les zones les plus contaminées, l'abondance relative des gènes de résistance à différents antibiotiques augmente très significativement

## > Ce qu'il faut retenir...

- Les communautés microbiennes du Tillet et de l'Ardières sont exposées chroniquement à des mélanges de substances pharmaceutiques (dans l'eau de surface et les sédiments)

- Dans les zones les plus contaminées, ces communautés sont plus tolérantes à certaines de ces substances (ou certaines familles de substances)

- Dans les zones les plus contaminées, l'abondance relative des gènes de résistance à différents antibiotiques augmente très significativement



Résultante de l'exposition chronique aux substances pharmaceutiques dans la rivière ?

**et/ou**

Résultante d'apports concomitants de microorganismes adaptés qui s'installent dans les communautés aquatiques ?

## > Ce qu'il faut retenir...

- Les communautés microbiennes du Tillet et de l'Ardières sont exposées chroniquement à des mélanges de substances pharmaceutiques (dans l'eau de surface et les sédiments)

- Dans les zones les plus contaminées, ces communautés sont plus tolérantes à certaines de ces substances (ou certaines familles de substances)

- Dans les zones les plus contaminées, l'abondance relative des gènes de résistance à différents antibiotiques augmente très significativement



Résultante de l'exposition chronique aux substances pharmaceutiques dans la rivière ?  
**et/ou**

Résultante d'apports concomitants de microorganismes adaptés qui s'installent dans les communautés aquatiques ?

Application de l'approche PICT pour le diagnostic de la pression chimique par les substances pharmaceutiques ?

# > Des projets à venir pour répondre à ces questions



**PharmOneHealth (2023-26):** Exposition et adaptation des communautés microbiennes aux substances pharmaceutiques et agents microbiologiques dans les milieux aquatiques : Conséquences sur le développement et la dissémination des pathogènes et des structures génétiques impliquées dans l'antibiorésistance



**DiagnoPICT (2023-27):** Etude de la potentialité des approches PICT, couplées à des approches de metabarcoding (ADN microbien) et d'empreintes chimiques, pour fournir un référentiel d'analyse pour la biosurveillance et la caractérisation de la pression toxique dans les milieux aquatiques



Résultante de l'exposition chronique aux substances pharmaceutiques dans la rivière ?  
**et/ou**

Résultante d'apports concomitants de microorganismes adaptés qui s'installent dans les communautés aquatiques ?

1

Application de l'approche PICT pour le diagnostic de la pression chimique par les substances pharmaceutiques ?

2

# > Une volonté de transférer les méthodes et les résultats

Organisation séminaire « multi-acteurs »  
**PharmaAQUA**  
(Annecy, 9-11 mars 2022)

**Une journée avec des chercheurs et des  
partenaires socio-économiques franco-Suisses**

Contamination des milieux aquatiques par les  
substances pharmaceutiques  
**ENJEUX, CONNAISSANCES ET PERSPECTIVES**

**Une soirée Science et Société**

**Antibiorésistance et Eau** : caractériser et réduire  
l'impact de nos pratiques de soin sur notre  
environnement... et sur notre santé !



# > Une volonté de transférer les méthodes et les résultats

Organisation séminaire « multi-acteurs »  
**PharmaAQUA**  
(Annecy, 9-11 mars 2022)

**Une journée avec des chercheurs et des partenaires socio-économiques franco-Suisses**

Contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques  
**ENJEUX, CONNAISSANCES ET PERSPECTIVES**

**Une soirée Science et Société**

**Antibiorésistance et Eau** : caractériser et réduire l'impact de nos pratiques de soin sur notre environnement... et sur notre santé !



Organisation d'une journée « pêche aux outils »  
**Outils pour le diagnostic de la contamination des eaux de surface**  
(INRAE Villeurbanne, 22 octobre 2022)



# > Une volonté de transférer les méthodes et les résultats

Organisation séminaire « multi-acteurs »  
**PharmaAQUA**  
(Annecy, 9-11 mars 2022)

Une journée avec des chercheurs et des  
partenaires socio-économiques franco-Suisses

Contamination des milieux aquatiques par les  
substances pharmaceutiques  
**ENJEUX, CONNAISSANCES ET PERSPECTIVES**

Une soirée Science et Société

**Antibiorésistance et Eau** : caractériser et réduire  
l'impact de nos pratiques de soin sur notre  
environnement... et sur notre santé !



Organisation d'une journée « pêche aux  
outils »  
**Outils pour le diagnostic de la  
contamination des eaux de surface**  
(INRAE Villeurbanne, 22 octobre 2022)



Expertise et aide  
à la décision



Diagnostic des sources de  
contamination du lac du  
Bourget par les substances  
pharmaceutiques

# > Remerciements

Ensemble des partenaires  
et personnels impliqués



## EMA

C. Bonneau  
B. Volat  
B. Motte  
C. Rosy  
S. Poulalion  
H. Rogue

## LAMA

C. Miège  
M. Masson  
C. Margoum  
A. Dabrin  
A. Daval  
P. Boutet  
C. Guillemain  
C. Brosse  
L. Dherret  
*et al.*



E. Lyautey  
N. Tissot



E. Naffrechoux  
N. Cottin



Agriculture and  
Agri-Food Canada

E. Topp  
Y.-C. Tien

Nos partenaires locaux

Nos  
financeurs

