

Apport des médicaments par les filières d'eaux usées en milieu marin

Etude de la bioaccumulation de médicaments psychotropes dans les moules *Mytilus Galloprovincialis*

Rapport de stage

Présenté par

Aurélie WIBAUX

le 23 juin 2010

Unité Mixte de Recherche 5569 Hydrosiences Montpellier
UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Montpellier I

Jury

Madame H. Fenet	Maître de Conférences UM1	Directrice de stage
Madame E. Gomez	Maître de Conférences UM I	Co-directrice de stage
Monsieur E. Servat	Directeur de Recherches IRD	Examineur
Monsieur J. Gardon	Chargé de Recherches IRD	Examineur

UM2 - Master Recherche, Eau et Environnement » (R2E) - Mention : Biologie Géosciences Agroressources
Environnement - Spécialité : Science de l'Eau dans l'Environnement Continental

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Hélène FENET et Elena GOMEZ qui m'ont guidée et transmis leur expérience durant ce stage.

Merci également à Claude CASELLAS et Eric SERVAT pour m'avoir permis d'effectuer ce stage à Hydrosiences.

Je voudrais aussi remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes :

Morgane BACHELOT et Zhi LI, qui m'ont enseigné les bons gestes pour les manipulations d'exposition, d'extraction, de purification et d'analyses, et m'ont accordé du temps malgré un emploi du temps chargé. Merci aussi à Nicole WEBER, qui m'a relayée certains jours et aidé dans mon travail à l'Ifremer.

David ROSAIN, Abdel ZNIDAH, Mireille FAURE ainsi que l'ensemble du personnel du DSESP pour leur accueil sympathique et leur coopération tout au long de ce stage.

Dominique MUNARON, Martine FORTUNE et le personnel de l'Ifremer pour leur accueil et leur aide lors de la mise en place de l'expérience à Sète.

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire.....	3
Introduction.....	4
1. Contexte de l'étude.....	6
1.1. A quelles concentrations trouve-t-on les médicaments dans le milieu aquatique?	6
1.2. Quel est le risque associé à la présence de médicaments du Système Nerveux Central dans l'environnement?	8
1.3. Quelles sont les principaux axes de recherches actuellement développés ?	9
1.4. Modèle de bioaccumulation des médicaments dans la <i>Mytilus Galloprovincialis</i>	9
1.5. Intérêt de l'étude	11
2. Matériels et méthodes	12
2.1. Réactifs et solvants.....	12
2.2. Matériels et méthodes.....	12
2.3. Validation de la méthode.....	17
3. Résultats	18
3.1. Validation de la méthode.....	18
3.2. Contrôle des conditions d'exposition	19
3.3. Résultats de la bioconcentration du tétrazépam et du diazépam.....	19
4. Discussion	23
Conclusion	26
Annexe 1 – Propriétés physico-chimiques du tétrazépam et du diazépam	27
Annexe 2 – Détermination des limites de détection et de quantification	31
Bibliographie.....	32

Introduction

L'amélioration récente des techniques de détection a conduit à la mise en évidence de médicaments à des concentrations traces dans l'environnement aquatique. Ces traces sont essentiellement dues à des rejets continus par les eaux usées non spécifiquement pris en charge par les STEP (Fent et al, 2006). Cette détection de substances, actives biologiquement par essence, pose évidemment des questions en termes d'impact environnemental et d'éventuelles conséquences pour la santé humaine. Ces produits peuvent en effet se retrouver dans des produits de consommation humaine (poissons, mollusques) ou dans les eaux de boisson, à des concentrations cependant très inférieures aux doses thérapeutiques. Les données disponibles sont encore largement insuffisantes, et les premières évaluations des risques associés sont à compléter. Il existe environ 3000 médicaments différents en usage dans l'union européenne, et les investigations de médicaments dans l'environnement les plus larges ne concernent qu'une centaine d'entre eux (Fent et al, 2006). De plus, il faut prendre en considération les métabolites associés, excrétés en concentration parfois supérieure aux molécules-mères, et pouvant être actifs et souvent polaires, donc mal pris en charge par les STEP (Ternes, 1998). Il arrive, bien que cela ne soit pas fréquent, que certains médicaments ou métabolites associés soient persistants.

Ce contexte ouvre donc un large champ d'études écotoxicologiques indispensables à l'évaluation du risque. De nombreux auteurs soulignent le manque de données de toxicité chronique pour les médicaments, alors même que le risque environnemental majeur est lié à ce type de toxicité (Fent et al, 2006; Carlsson et al, 2006; Crane et al, 2006). La tâche est considérable et le travail n'en est qu'à son début.

Le laboratoire Hydrosiences a choisi de travailler sur un des aspects de ce problème complexe, à savoir la bioaccumulation de médicaments du Système Nerveux Central dans les moules *Mytilus Galloprovincialis*. En effet, les médicaments sont pour la plupart des molécules polaires et hydrophiles, ce qui permet un passage des médicaments dans l'organisme par le biais du système sanguin. Les médicaments du Système Nerveux Central sont conçus de façon un peu différente, à cause de la nécessité de franchir la barrière hémato-encéphalique. Ceux-ci sont donc souvent plus lipophiles, et peuvent par conséquent être bioaccumulables.

La bioaccumulation des médicaments dans les organismes aquatiques est une donnée largement manquante, et pourtant nécessaire à une bonne évaluation écotoxicologique. En effet, la quantité accumulée, couplée à la connaissance des effets à une certaine concentration permet d'évaluer le risque pour un régime d'exposition particulier (Landrum et al, 1992). L'étude de la bioaccumulation permet également de proposer de nouveaux indicateurs qui pourront être utilisés en surveillance du milieu aquatique, étant donné que la détection et la mesure des polluants est facilitée par sa concentration plus élevée dans les organismes (Voets et al, 2006). Enfin, la moule étant aussi un aliment, il est important de connaître le risque encouru par la consommation de moules contaminées.

Mytilus Galloprovincialis est une espèce de moule courante en Méditerranée. L'étude de cette espèce permettra de comparer les résultats obtenus en laboratoire à un échantillon de moules placé en milieu naturel, plus spécifiquement à l'émissaire des eaux usées récemment installé au large des côtes montpelliéraines. Malgré son accessibilité et sa sédentarité qui facilitent le contrôle des conditions d'étude, la moule a été encore peu utilisée pour tester la bioaccumulation de médicaments, qui a plus été étudiée chez le poisson. Ceci peut peut-être s'expliquer par les préoccupations sanitaires dues à la consommation de poissons, les concentrations augmentant en remontant les chaînes trophiques, entraînant une exposition à l'homme d'autant plus élevée.

L'objet de la présente étude est le suivi de la cinétique de bioconcentration de médicaments dans des moules. Celles-ci sont exposées durant 7 jours à une concentration de 10 µg/L de médicaments, suivi d'une période d'épuration de 7 jours. Les molécules retenues pour cette étude de bioconcentration sont le diazépam (anxolytique) et le tétrazépam (myorelaxant), qui appartiennent tous les deux à la famille des benzodiazépines.

1. Contexte de l'étude

1.1. A quelles concentrations trouve-t-on les médicaments dans le milieu aquatique?

Les sources de contamination du milieu aquatique par les médicaments sont multiples (Mompelat et al., 2009). Les médicaments à usage vétérinaire (aquaculture et élevage) contaminent l'eau soit de façon directe, soit par épandage de boues de stations d'épuration dans les champs. Les médicaments à usage humain sont en grande majorité apportés par les eaux usées (des habitations et des hôpitaux). Selon Gagné et al (2006), les effluents de STEP d'une station de 1,5 millions d'équivalent-habitants rejettent chaque jour dans l'environnement entre 30g et 22 kg de médicaments. Dans son étude, la caféine a été mesurée en sortie de STEP à un niveau atteignant 22 µg/L.

Des concentrations de l'ordre du ng/l ou du µg/l ont été trouvées dans les eaux de sortie de STEP, dans les eaux de surface et dans les eaux souterraines (Fent et al, 2006). Parmi les molécules retrouvées, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont présents du fait de leur consommation très élevée. L'ibuprofène a été trouvé par Ternes (1998) à 3,4 µg/L en sortie de station d'épuration en Allemagne. De l'aspirine a été mesuré à 28 ng/L dans les eaux de surface en France par Budzinski et Togola (2006). Le paracétamol se trouve à une concentration de 1,379 µg/L dans les eaux de surface en Angleterre (Kasprzyk-Hordern et al., 2008). Mais certaines molécules, malgré une présence plus faible, présentent un risque plus élevé pour l'environnement aquatique. Il s'agit par exemple des anticancéreux, comme l'ifosfamide trouvée à 43 ng/L en sortie de station d'épuration en Allemagne, qui est un composé considéré comme persistant et qui possède des propriétés mutagènes, carcinogènes et tératogènes (Kümmerer et al., 1997). Les antibiotiques sont également présents dans l'environnement aquatique, alors que leur présence est nocive pour les micro-organismes, ce qui déstabilise les écosystèmes et peut favoriser l'émergence de résistances. L'étude de Bendz et al (2005), réalisée dans les eaux de surface en Suisse, relève 0,04 µg/L de triméthoprim et 0,07 µg/L de sulfaméthoxazole. Zuccato et al (2000) trouvent même un antibiotique (la tylosine) dans les eaux destinées à la consommation humaine en Italie, à des concentrations de 0,6 et 1,7 ng/L.

La présente étude concerne principalement les médicaments du Système Nerveux Central, qui sont souvent plus lipophiles que les médicaments classiques. Les molécules classiquement retrouvées sont le diazépam et le nordiazépam, la fluoxétine et la norfluoxétine, et la carbamazépine (voir tableau 1). Le diazépam peut se trouver à l'ordre du µg/L en entrée de station d'épuration (Van der Ven et al., 2004), et a été retrouvé par Zuccato et al (2000) dans les eaux de boisson à des concentrations traces (23,5 ng/L). La fluoxétine et son dérivé la norfluoxétine, du fait de leur lipophilie, se trouvent en concentration importante dans la chair de poisson, à l'ordre du ng/g (Chu et Metcalfe, 2007). La carbamazépine est une molécule persistante très utilisée, et se trouve donc ubiquitairement dans l'environnement, comme en témoigne sa présence dans les eaux souterraines en Allemagne, à des concentrations atteignant les 900 ng/L (Sacher et al, 2001).

Tab. 1. Revue de concentrations environnementales des médicaments du Système Nerveux Central

Composé	Concentrations mesurées	Pays	Source des données
Lieu de mesure : Entrée de STEP ¹			
Diazépam	590 ; 1180 ; <100 ng/L	Belgique	Van der Ven et al., 2004
Fluoxétine	11 ± 6 ng/L	Suède	Zorita et al., 2008
Norfluoxétine	11,5 ± 3 ng/L	Suède	Zorita et al., 2008
Lieu de mesure : Sortie de STEP			
Diazépam	<100 ; 660 ng/L	Belgique	Van der Ven et al., 2004
Diazépam	53 ng/L	Allemagne	Ternes et al., 2001
Diazépam	40 ng/L (max)	Allemagne	Ternes, 1998
Nordiazépam	Nd ² – 8,3 ng/L	France	Budzinski et Togola, 2008
Carbamazépine	33 – 137 ng/L	Canada	Gagné et al., 2006
Carbamazépine	6300 ng/L (max)	Allemagne	Ternes, 1998
Lieu de mesure : Eaux de surface			
Diazépam	Nd - 1,2 ng/L	Italie	Zuccato et al., 2000
Diazépam	33 ng/L	Allemagne	Ternes et al., 2001
Diazépam	33,6 ± 7,1 ; 30,8 ± 9,3 ; 27,9 ± 5,1 ng/L	Roumanie	Moldovan, 2006
Diazépam	Nd	Allemagne	Ternes, 1998
Nordiazépam	Nd – 2,4 ng/L	France	Budzinski et Togola, 2008
Lofépramine	<4 ng/L	Royaume-Uni	Thomas et Hilton, 2004
Amitriptyline	<0,5 – 21 ng/L	Royaume-Uni	Kasprzyk-Hordern et al., 2008
Carbamazépine	1100 ng/L (max)	Allemagne	Ternes, 1998
Lieu de mesure : Eaux souterraines			
Carbamazépine	900 ng/L (max)	Allemagne	Sacher et al., 2001
Lieu de mesure : Eaux de boisson			
Diazépam	Nd ; 19,6 ; 23,5 ; 0,2 ng/L	Italie	Zuccato et al., 2000
Nordiazépam	Nd	France	Budzinski et Togola, 2008
Mesures dans les tissus de poissons ³			
Fluoxétine	Nd - 1020 ng/kg	Canada	Chu et Metcalfe, 2007
Norfluoxétine	Nd - 1080 ng/kg	Canada	Chu et Metcalfe, 2007
Paroxétine	Nd - 580 ng/kg	Canada	Chu et Metcalfe, 2007

¹ STEP : Station d'Épuration

² Nd : Non détectable

³ Espèces : *Morone americana*, *Dorosoma cepedianum*, *Ameiurus nebulosus*

1.2. Quel est le risque associé à la présence de médicaments du Système Nerveux Central dans l'environnement?

Certaines molécules du Système Nerveux Central agissent en inhibant la recapture de la sérotonine, un important neurotransmetteur qui participe à différentes fonctions endocriniennes et de régulation, ce qui peut causer des changements dans l'appétit, le système immunitaire, la reproduction et d'autres fonctions comportementales (Santos et al., 2009). C'est par exemple le cas de la fluoxétine, de la fluvoxamine, de la paroxétine et de la sertraline. L'étude menée par Lister et al. (2009) montre que l'exposition de poissons à des doses allant jusqu'à 32 µg/L de fluoxétine entraîne une baisse significative de la production d'œufs, due à la réduction des niveaux d'œstrogène, concomitant à inhibition de la production des récepteurs des gonadotrope LH et FSH. A ceci s'ajoute des comportements anormaux observés à 32 µg/L (nage verticale à la surface de l'eau). Cet effet de baisse de la fécondité a aussi été constaté avec des invertébrés de l'espèce *C. Dubia*, dans l'étude de Brooks et al. (2003), avec une NOEC⁴ à 56 µg/L.

La fluoxétine a été étudiée en toxicité aiguë sur les poissons par Nakamura et al. (2008), aux pH 7,1, 7,9 et 8,8. La LC50 à 96 heures est atteinte respectivement à 5,5, 1,3 et 0,2 mg/L, montrant qu'une faible variation de pH peut influencer nettement sur la toxicité. A pH = 8,8, une mortalité de 3% a été observée dès la plus faible concentration testée (100 µg/L).

D'autres substances psychotropes trouvées dans l'environnement peuvent présenter des risques. Martin-Diaz et al. (2009) relève des effets sur la moule *Mytilus Galloprovincialis* liés à la présence de carbamazépine dans l'eau, à des concentrations de 0,1 et 10 µg/L. Ces effets sont une réduction importante (respectivement de 60% et 80%) et très rapide (quelques minutes) de la stabilité de la membrane lysosomale dans les hématocytes, une augmentation de la teneur en malondialdéhyde MDA (marqueur de stress oxydant) dans les branchies et le manteau, une augmentation de l'activité Glutathion-S-transférase dans le manteau et une augmentation de l'activité catalase dans les glandes digestives. Une réduction des niveaux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et de l'activité des protéines kinase A a également été constatée dans les glandes digestives, les branchies et le manteau des moules, ainsi qu'une réduction dans les mêmes tissus de l'expression ARNm des gènes encodant trois différents transporteurs liés à la résistance multi-xénobiotiques. Ceci met en évidence l'activation des systèmes de défenses pour les organismes à des concentrations pouvant être retrouvées dans l'environnement. La carbamazépine peut également entraîner une perte de viabilité, une activité benzoyloxyrésorufine dealkylase et une peroxydation lipidique dans les hépatocytes de truites (Gagné et al., 2006).

L'effet du diazépam a été testé par injection par Gagné et al. (2010) sur les moules d'eau douce *Elliptio complanata*. Cette étude a mis en évidence une activité de cette molécule sur les organismes, à savoir une diminution des niveaux de sérotonine à une concentration de 0,35 µg/g de moule, ainsi qu'une hausse de l'activité adénylate-cyclase dépendant de la sérotonine (à 0,35 µg/g) et de la dopamine (à moins de 0,03 µg/g), qui indique un effet potentiel sur les signaux d'endormissement. Le diazépam entraîne également une hausse légère des niveaux de glutamate à 0,07 µg/g, ainsi qu'une peroxydation lipidique des tissus à 0,07 µg/g.

Les études écotoxicologiques sur ces molécules sont encore très incomplètes. Certains médicaments, comme la venlafaxine, qui fait partie des médicaments psychotropes les plus vendus et que l'on retrouve en sortie de STEP (jusqu'à 387 ng/L en Espagne, González Alonso et al, 2009), ne font encore l'objet d'aucune étude en écotoxicologie.

⁴ NOEC : No Observed Effect Concentration

1.3. Quelles sont les principaux axes de recherches actuellement développés ?

Tous les auteurs s'accordent sur le manque de données de toxicité chronique (Fent et al, 2006; Carlson et al, 2007; Budzinski et Togola, 2006; Calisto et Esteves, 2009). Crane et al (2006) souligne que beaucoup de médicaments sont conçus pour agir de façon chronique. Il n'est donc pas pertinent de ce point de vue de se baser sur les données de toxicité aiguë pour calculer le risque, d'autant plus que se pose alors le problème très subjectif des facteurs d'extrapolation entre aigu et chronique, chaque étude pouvant définir le risque à sa manière à partir des mêmes données.

Fent et al (2006) propose également de mener des études sur des cibles plus spécifiques, pouvant se baser sur une hypothèse de similitude des modes d'actions entre les différentes espèces. Les études peuvent facilement être mieux ciblées car les médicaments ont tous déjà été testés sur des mammifères différents avant leur commercialisation, et ces données sont très peu exploitées (Crane et al, 2006). Il faut tout de même garder à l'esprit la difficulté qu'il y a à prédire les effets non-attendus dus aux différences de fonctionnement entre les espèces (Fent et al, 2006). Carlson et al (2006) déplore également le manque d'études sur des cibles spécifiques et propose notamment de mener plus d'études de bioaccumulation.

L'un des autres axes essentiels proposé est l'étude du potentiel effet de synergie des molécules entre elles (Budzinski et Togola, 2006; Calisto et Esteves, 2009). Crane et al (2006) et Carlson et al (2006) soulignent qu'il n'y a *a priori* pas de raison de privilégier les effets des médicaments entre eux, sur les effets synergiques entre les médicaments et d'autres substances présentes dans l'environnement (pesticides, produits chimiques industriels...). Les études à mener ne pourront pas être exhaustives, et personne n'a encore proposé de méthode pour prioriser les expériences à réaliser dans ce cadre. Une étude sur les synergies a été menée en 2003 par Schnell et al, montre que les effets des molécules testées ont principalement tendance à s'additionner (substances ayant des mécanismes d'action similaires), avec parfois un faible effet de synergie (l'effet apparaissant à des concentrations un peu faibles qu'attendu). Ces études sont donc techniquement réalisables et analysables, et devraient être menées à plus large échelle.

1.4. Modèle de bioaccumulation des médicaments dans la *Mytilus Galloprovincialis*

La moule *Mytilus Galloprovincialis* est physiologiquement proche de la *Mytilus Edulis*. Ces deux espèces sont largement utilisées en étude de toxicité et de bioaccumulation (Rosen et Lotufo, 2007).

Selon Peters et al (1998), la moule *Mytilus Galloprovincialis* possède les familles d'enzymes nécessaires à la dégradation des xénobiotiques médicamenteux. Cinq familles de gènes des Cytochromes P450 majoritaires (CYP1A, CYP2B, CYP2E, CYP3A et CYP4A) ont été détectées dans les microsomes de glandes digestives de la *Mytilus Galloprovincialis*. Gagné et al (2006) montre cependant que les bivalves et les poissons sont moins compétents que les mammifères dans l'élimination des médicaments, car il leur manque la famille des CYP2C. Ils ne peuvent en particulier pas prendre en charge les barbituriques, la trimipramine, la fluoxétine, le sulfaphénazole et le sildénafil. Il arrive également que certaines études mettent en évidence une capacité très grande des moules à métaboliser des substances xénobiotiques (comme les composés explosifs dans l'étude de Rosen et Lotufo, 2007).

Théoriquement, les médicaments sont créés pour être biologiquement actifs et être éliminés rapidement par les mammifères. Ils ne sont pas supposés se bioaccumuler dans les tissus, en supposant que les organismes partagent la même compétence pour leur élimination (Gagné et al, 2006).

Cependant, certains auteurs prévoient une bioaccumulation pour des médicaments aux valeurs de pKa élevées (supérieur à 8). La distribution d'un médicament dans l'organisme dépend de ses propriétés de perméabilité, du taux de flux sanguin dans les différents tissus, et de la fixation dans le plasma et les tissus. La distribution est ainsi largement déterminée par la compétition de captage entre le sang et les tissus, aussi bien que par la compétition entre les différents tissus. Les substances lipophiles sont caractérisées par l'accumulation extensive dans les tissus, qui entraîne un haut volume de distribution (Daniel, 2003).

Deux mécanismes interviennent dans la distribution des molécules basiques au pKa supérieur à 8 : il s'agit du piégeage dans les lysosomes (mécanisme principal d'accumulation de la thioridazine et de la péroazine) et des liaisons phospholipidiques (mécanisme majoritaire pour l'accumulation des molécules possédant un azote ionisable et un radical lipophile, comme les antidépresseurs tricycliques, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine, etc.). Les lysosomes sont particulièrement nombreux chez l'homme dans les poumons, les reins, la bile, les globules blancs et les cellules de l'immunité (Daniel, 2003). Les phospholipides liés aux molécules de médicaments s'accumulent chez l'homme dans le sang, le foie, le pancréas, les cellules des tissus endocriniens, le système nerveux, les muscles et les yeux (Ploemen et al, 2004).

Il peut être intéressant de pouvoir prédire les facteurs de bioconcentrations à partir de la formule chimique de la molécule et des propriétés physiques qui en découlent. Le facteur de bioconcentration peut être déterminé en première approche à partir du log Kow (Kow : coefficient de partition octanol/eau), avec des résultats concordants pour de nombreuses substances. La relation est considérée comme linéaire ($\log BCF = a \log Kow + b$). On considère généralement qu'un risque de bioconcentration existe pour une molécule lorsque son log Kow est supérieur à 3 (Franke, 1996).

Meylan et al (1999) propose une méthode d'estimation des facteurs de bioconcentrations à partir du coefficient de partition octanol/eau (log Kow) des molécules. Pour les composés non-ioniques de Kow compris entre 1 et 7, on observe une corrélation linéaire ($\log BCF = 0,86 \log Kow - 0,39$). Les composés ioniques ont pour la plupart des log BCF compris entre 0 et 1 quelque soit leur log Kow. Quant aux composés aromatiques azotés, aucune relation entre log BCF et log Kow n'a pu être établie. On voit donc qu'établir une relation linéaire n'est pas possible dans tous les cas.

Une autre difficulté sur ce calcul a été signalée par l'étude de Paterson et al (2008), concluant des travaux sur la bioaccumulation de la fluoxétine dans les poissons *Médaka japonais* que le log Kow n'est pas le meilleur indicateur pour calculer le BCF (dans le cas de la fluoxétine, le facteur de bioconcentration est sous-estimé). Cette étude rejoint les résultats obtenus par Nakamura et al. (2008). Le BCF est en effet très sensible au pH, il est alors préférable d'utiliser le coefficient $D_{lip-wat}$ (coefficient de partition lipide/eau ; le logD, contrairement au logP, varie avec le pH) qui semble mieux prendre en compte cette sensibilité.

L'étude de Franke (1996) porte sur la comparaison entre le BCF calculé à partir du log Kow, et diverses études de bioconcentration dans des organismes aquatiques. Il met ainsi en relief qu'un composé au log Kow faible (le phénol, Kow = 1,4) peut se bioaccumuler de façon importante (BCF allant jusqu'à 4312), et que le facteur de bioaccumulation obtenu expérimentalement est très variable selon les espèces et les concentrations d'expositions (de 3 ordres de magnitudes dans les cas étudiés). Cette étude met en avant la nécessité d'aller au-delà d'un simple calcul du Kow, et encourage la multiplicité des études expérimentales afin d'affiner l'évaluation du risque environnemental.

Crane et al (2006) insiste également sur le fait que ces prédictions ne sont pas fiables et doivent être confirmées par des données expérimentales. Elles peuvent cependant servir dans un premier temps à orienter sur les expériences à mener en priorité.

1.5. Intérêt de l'étude

Le tétrazépam et le diazépam ont des propriétés physico-chimiques décrites en annexe 1. Ils font partie des composés aromatiques azotés, catégorie pour laquelle une prédiction du BCF à partir du log Kow est impossible (voir paragraphe 2.2). L'étude de leur bioaccumulation permettra donc de combler ce manque d'information.

Leur pKa peu élevé ne suggère pas de tendance particulière à la bioaccumulation. Cependant nous avons vu que la bioaccumulation est un processus complexe dépendant de la capacité de l'organisme à métaboliser et éliminer ces substances, et qu'une bioaccumulation n'est pas forcément prédictible. Seule l'expérience pourra nous dire si ces molécules bioaccumulent ou pas dans les moules.

La moule apparaît être un organisme sentinelle approprié, et est d'ailleurs déjà utilisée comme tel, à cause de sa large distribution en eaux douce et salée, son accessibilité, sa sédentarité, sa tolérance à une large gamme de conditions environnementales (Le Bris et Pouliquen, 2004) et sa capacité d'accumulation de nombreux contaminants (Moy et Walday, 1997).

La bioaccumulation dans la *Mytilus Galloprovincialis* peut-elle être utilisée comme nouvel indicateur de la présence de tétrazépam et de diazépam dans l'environnement? La caractéristique principale d'un biomarqueur est d'avoir une réponse variant de la même façon que l'exposition à laquelle il est soumis (Voets et al, 2006). L'étude d'une phase d'accumulation suivie d'une phase d'épuration permettra de connaître la rapidité et l'intensité de la réponse de la moule à une exposition à ces médicaments.

Notons par ailleurs que les médicaments, très peu étudiés dans l'eau de mer, se révèlent pourtant être potentiellement très persistants dans ce milieu (demi-vie supérieure à 100 jours pour de nombreux composés étudiés par Benotti et Brownawell, 2009).

2. Matériels et méthodes

2.1. Réactifs et solvants

Les médicaments utilisés pour le dopage sont le diazépam, pureté > 98%, fourni par Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Allemagne) et le tétrazépam, fourni par Sanofi Aventis (Paris, France).

Les solvants utilisés sont l'heptane, pureté : 99%, qualité pestipur, fourni par Carlo Erba (Val de Reuil, France), l'acétone, pureté : 99%, qualité pestipur, fourni par Carlo Erba (Val de Reuil, France), l'éthanol, pureté $\geq 99,8\%$, fourni par Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Allemagne) et le méthanol, qualité HPLC, pureté $\geq 99,9\%$, fourni par Carlo Erba (Val de Reuil, France).

Les étalons utilisés sont le Diazépam D5 (étalon interne d'extraction), pureté 99,6%, fourni par Cluzeau (Ste Foy la Grande, France) et le PCB30 (étalon interne d'injection), pureté : 96,5%, fourni par Dr Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Allemagne). Le Diazépam-D5 est utilisé en solution dans l'éthanol (0,25 mg/l) et le PCB30 en solution dans l'heptane (0,1 mg/l), la concentration exacte étant contrôlée par pesée. Les solutions réalisées sont conservées au congélateur à -20°C .

Le sulfate de sodium anhydre utilisé est fourni par Carlo Erba (Val de Reuil, France), pureté > 99,6%.

2.2. Matériels et méthodes

Le matériel de laboratoire utilisé est soit à usage unique (boîtes de pétri, pipettes pasteur, flacons ambrés, tubes en verre, etc.), soit nettoyé 3 fois au dichlorométhane et 3 fois à l'acétone avant utilisation (cuillères, éprouvettes, matériel de filtration, pipettes, etc.). Les béchers, ballons et le matériel de filtration sont également passés au four (à 400°C) avant utilisation.

2.2.1. Exposition

27 lots de 6 moules sont placés dans des béchers individuels. Les moules ont été élevées à l'étang de Thau (Sète, France). Le local ne comporte pas de fenêtres, une alternance jour/nuit est assuré par un éclairage par lampe halogène 12 heures par jour. Chaque bécher est équipé d'un bulleur. L'eau de mer filtrée, provenant de l'étang de Thau (1 litre / bécher) est changée tous les jours, et les béchers nettoyés. 5 ml de phytoplancton (Tetraselmis Suecica lot n°140410, fourni par Greensea, Mèze, France) sont ajoutés dans chaque bécher après changement de l'eau. La température de la pièce est régulée par un climatiseur, pour ne pas dépasser 20°C . Les moules sont placées durant 7 jours en acclimatation avant le début de l'exposition.

Contrôle de l'exposition

L'exposition se fait quotidiennement par ajout d'un ml de solution de diazépam ou de tétrazépam dans l'éthanol à 10 mg/l dans chaque béccher de moules « exposées », et par l'ajout d'un ml d'éthanol dans chaque béccher témoin. Cet ajout s'effectue directement après changement de l'eau et ajout du phytoplancton. Les moules sont exposées pendant une période de 7 jours, puis laissées en épuration les 7 jours suivants.

Trois contrôles de l'exposition sont effectués aux jours 1, 2 et 4. L'exposition est contrôlée par prélèvements sur trois bécchers supplémentaires (deux bécchers exposés et 1 béccher témoin) contenant 1 litre d'eau filtrée, 5 ml de phytoplancton et 1ml de solution de dopage. L'exposition résultante après 24 heures est contrôlée par prélèvement d'eau dans trois bécchers (2 exposés et 1 témoin) choisis aléatoirement parmi les bécchers de l'expérience.

Ces 6 prélèvements de 100 ml sont placés dans des fioles, dans lesquelles sont ajoutés 1 ml de solution de diazépam D5 à 25 ppm. Chaque solution est filtrée sur des cartouches Oasis « LB Extaction Cartridge » commercialisées par Waters Corporation (Irlande). Les cartouches sont séchées et conservées à -20°C.

Retrait des moules

Trois lots de 6 moules sont prélevées au jour 0 (avant la première exposition). Les prélèvements suivants s'effectuent trois fois durant la période d'exposition (jours 1, 3 et 7) et trois fois durant la période d'épuration (jours 8, 10 et 14). Lors de chaque prélèvement sont retirées trois lots de 6 moules exposées et 1 lot de 6 moules témoin, choisis de façon aléatoire pour palier aux différences possibles de conditions de température et d'éclairage dans la pièce. Ces moules sont nettoyées, pesées et mesurées. La chaire de moules est ensuite récupérée par lot et placée à -20°C pour conservation avant lyophilisation. Les coquilles de moules sont séchées au four et pesées.

2.2.2. Extraction

Le lyophilisateur utilisé pour l'extraction est un Héto Power Dry LL3000, fourni par Thermo Fisher Scientific (République Tchèque). Le micro-onde est de type Multiwave 3000, fourni par Anton Paar GmbH (Graz, Autriche). Le rotavapor est un Buchi R-210 (Flawil, Suisse). Les filtres ministart utilisés sont fournis par Sartorius Stedim Biotech GmbH (Goettingen, Allemagne).

Les moules sont lyophilisées et broyées au mixeur. 3 grammes de chaque échantillon (ou 6 moules du même lot) sont pesés et répartis dans une boîte de pétri. 1 ml de la solution d'étalon interne d'extraction (Diazépam-D5 dans l'éthanol, 0,25 mg/l) est réparti goutte à goutte sur l'échantillon. Le volume d'étalon interne ajouté est contrôlé par pesée. Les échantillons sont laissés sous la hotte pour évaporation du solvant pendant environ 10 heures.

Les lyophilisats de moules contenant l'étalon interne sont transférés dans des liners, dans lesquels on rajoute 25 ml de mélange acétone/heptane (v:v ; 1:1). Ces 25 ml de mélange acétone/heptane sont utilisés pour nettoyer 3 fois les boîtes de pétri et le matériel utilisé pour le transfert (cuillère + papier d'aluminium). Les liners sont laissés au repos 15 minutes pour permettre l'absorption du mélange de solvants. Ils sont ensuite placés en opposition dans un micro-onde. Le programme d'extraction consiste à monter à une température de 110°C en 10 minutes (la température est contrôlée par une sonde en position 1). La température est maintenue à 110°C pendant 5 minutes puis le micro-onde laisse refroidir les échantillons pendant 15 minutes.

Les échantillons sortis du micro-onde sont filtrés grâce à un filtre Pall suppor®-200 (47mm, 0,2µm), auquel on ajoute du sulfate de sodium anhydre pour éliminer toute trace d'eau. L'extrait est évaporé à sec par rotavapor (bain-marie réglé à 35°C), puis récupéré par 3 fractions de 600 µl d'éthanol. Les 3 fractions sont successivement filtrées grâce à un filtre ministart à 0,45 µm. Les fractions sont rassemblées et homogénéisées : extrait A.

2.2.3. Purification

La purification de l'extrait A est effectuée par HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance), sur une HPLC (Ultimate 3000– Dionex). La HPLC est composé d'une pompe LPG-3400M, d'un injecteur WPS-3000 TSL équipé d'une boucle 2,5 ml, d'une colonne en phase inverse Spherisorb® (ODS2 ; 5.0µm ; 4,6 x 150 mm ; fournie par Waters (Irlande)), d'un détecteur UV UVD-340U et d'un collecteur de fraction Teledyne Isco.

Un volume de 1 ml d'extrait A est prélevé pour purification en HPLC. Le passage de la phase mobile dans la colonne est réalisé en mode gradient. La phase mobile est initialement composée de 70% de méthanol qualité HPLC et 30% d'eau milliQ. Ce pallier est maintenu durant 4 minutes. La proportion de méthanol augmente ensuite pendant 16 minutes, et reste stable à 100% pendant 20 minutes afin de nettoyer la colonne. Les 5 minutes suivantes permettent un retour à une phase de 70% méthanol / 30% eau milliQ, qui est maintenue pendant 10 minutes.

Le tétrazépam et le diazépam sont des composés polaires qui sont contenus dans la première fraction (de 0 à 10 minutes). Celle-ci est collectée dans des ballons de 100 ml et évaporée juste à sec par rotavapor. Les extraits sont repris par 2 fractions de 0,5 ml de solution d'étalon interne d'injection (PCB30/heptane à 0,1 mg/l) et conservés au congélateur à -20°C avant analyse.

2.2.4. Analyse

L'analyse est faite en chromatographie en phase gazeuse (GC) couplé à un spectromètre de masse (MS). Le GC utilisé est un Trace GC Ultra fourni par Thermo Electron Corporation), équipé d'une colonne capillaire BPX5 (longueur=30m ; diamètre interne=0,2mm ; film=0,25µm) fourni par SGE, dans laquelle on fait circuler de l'hélium. Le spectromètre de masse est de type Thermo Polaris.

Un flux constant d'hélium est maintenu à 50ml/min dans l'injecteur, afin de le nettoyer. Ce flux est interrompu 1 minute durant l'injection (mode splitless). Un volume d'1 µl d'échantillon est injecté et vaporisé à 250°C.

L'échantillon passe ensuite dans la colonne, porté par un flux constant d'hélium de 1,3 ml/min. Le programme du four comprend une température initiale de 80°C, maintenu pendant 30 secondes. Cette température est inférieure à la température d'ébullition de l'hélium (98°C), et permettra donc la condensation et le piégeage des molécules en tête de colonne. La température est ensuite augmentée progressivement (voir détails dans la figure 1), pour permettre la séparation des molécules en présence. La colonne est ensuite portée à 300°C pour nettoyage, et cette température est maintenue pendant 3 minutes.

	Taux d'aug. (°C/min)	Température (°C)	Paliers de temps (min.)
Initial		80	0,5
Phase 1	20	210	
Phase 2	10	250	
Phase 3	0,5	255	
Phase 4	5	265	
Phase 5	20	300	3

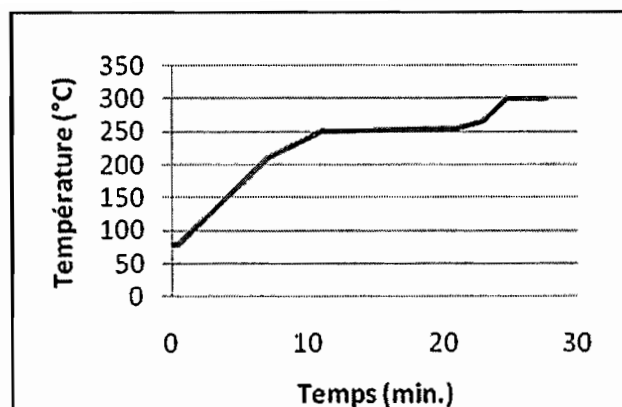


Fig. 1. Programme du four – chromatographie gazeuse

L'échantillon arrive ensuite dans le spectromètre de masse. Pour l'analyse, trois modes sont utilisés :

- Le mode Full Scan : On réalise un balayage sur une large gamme de masses, afin d'avoir un aperçu général des éléments présents. Ce mode ne convient pas à la quantification des molécules.
- Le mode SIM (Single Ion Monitoring) : Ce mode sert à la quantification d'un ion de rapport masse/charge (m/z) précis, lorsqu'il n'y a pas de confusion possible entre deux ions. C'est le mode utilisé pour le dosage du PCB30 (voir tableau 2).
- Le mode MS/MS (Spectrométrie de masse en tandem) : Ce mode permet de sélectionner les ions d'une certaine masse/charge (m/z) et de les casser. L'analyse des ions fils permet la reconnaissance de la molécule recherchée et sa quantification. Ce mode est utilisé pour la quantification du tétrazépam, du diazépam et du diazépam-d5 (voir tableau 2).

Tab. 2. Modes et ions utilisés pour la quantification des molécules

	SIM		MS-MS			
	Ions de quantification	Ions de confirmation	Ion parent	Energie de collision	Qz*	Ions fils de quantification
PCB 30	256	186				
Tétrazépam			253	1,4	0,225	196+225
Diazépam			256	1,2	0,3	221
Diazépam-d5			261	1,3	0,3	226

* Qz : facteur de stabilité, proportionnel à la tension alternative V et inversement proportionnel au rapport masse/charge (m/z).

2.2.5. Calcul du facteur de bioconcentration (BCF)

Le facteur de bioconcentration (BCF) peut s'estimer de différentes façons, selon le niveau de détail souhaité et les paramètres mesurés disponibles. Le BCF s'estime généralement en première approche selon un modèle statique ($BCF = C_a / C_w$, où C_a est la concentration de substance dans l'animal et C_w la concentration de substance dans l'eau). Cet équilibre statique est atteint lorsque l'organisme est soumis à une concentration de polluants constante durant un laps de temps suffisamment long pour atteindre l'équilibre. Le BCF peut également être estimé selon un modèle dynamique. L'accumulation de substances dans l'organisme est en effet due à une différence entre la vitesse d'absorption de la substance et sa vitesse d'excrétion ou de métabolisation. La mesure des cinétiques d'intoxication/épuration permet donc d'affiner le modèle et de l'utiliser pour prédire les niveaux de produits toxiques dans les organismes aquatiques en cas de pollution ponctuelle ou variable dans le temps.

Le modèle dynamique peut par exemple s'écrire selon la formule :

$$C_m(t) = k_1/k_2 \cdot C_w \cdot (1 - e^{-k_2 t})$$

Avec k_1 = vitesse d'assimilation
 k_2 = vitesse d'épuration
 C_w = concentration dans l'eau
 $C_m(t)$ = concentration dans la moule à l'instant t

En considérant le rapport k_1/k_2 constant, ainsi que la concentration dans l'eau C_w , on peut facilement retrouver une valeur de BCF (avec $BCF = k_1/k_2$), même dans le cas où l'expérience est interrompue avant d'atteindre un pallier.

Le facteur d'épuration k_2 peut être déterminé en phase d'épuration par la formule suivante :

$$\ln C_m(t) = \ln C_f(0) - k_2 \cdot t$$

avec : $C_m(t)$ = concentration dans la moule au jour t (en ng/g)

k_2 = facteur d'épuration (jour^{-1})

A partir de cette formule, on peut également estimer le temps de demi-vie (Barron et al., 1998) :

$$t_{1/2} = \ln(2) / k_2$$

Pour calculer le facteur de contamination k_1 on utilise la formule :

$$C_m(t) = k_1/k_2 \cdot C_w \cdot (1 - \exp(-k_2 \cdot t))$$

Avec : $C_m(t)$ = concentration dans la moule au jour t (en ng.g^{-1})

C_w = concentration dans l'eau = 10 ng.ml^{-1}

k_2 = facteur d'épuration (jour^{-1})

k_1 = facteur de contamination ($\text{ml.g}^{-1}.\text{jour}^{-1}$)

2.3. Validation de la méthode

La spécificité a été contrôlée grâce à trois différents lots de moules non contaminées, testés pour analyser les interférences potentielles de substances endogènes avec le tétrazépam et le diazépam.

Les limites de détection et de quantification ont été estimées à partir d'une gamme de concentrations connues. Elles sont calculées selon un rapport entre pic de détection et bruit de fond de 3 pour la limite de détection et de 10 pour la limite de quantification (voir annexe 2).

Le rendement d'extraction a été obtenu par comparaison de deux séries de données (deux fois 3 gammes de 8 points allant 50 à 500 ng/g de médicaments), le dopage étant effectué avant extraction pour la première série et après extraction pour la deuxième. Dans ce dernier cas, l'extrait recueilli après purification en HPLC de moules non contaminées a été concentré par évaporation sous flux d'azote, puis dopé par solutions de médicaments dans l'éthanol, avant d'être évaporé à sec sous azote et repris dans une solution de PCB30 dans l'heptane pour analyse en GC/MS.

La linéarité de la courbe de calibration a été étudiée en analysant 7 points de calibration standards entre 50 et 500 ng/g, en triplicat réalisés indépendamment. Les courbes de calibration ont été construites avec le ratio de hauteur de pics de détection (substance testée / étalon interne), rapportée à la concentration ajoutée.

La précision a été évaluée en analysant des échantillons de moules à des concentrations de 50 (n=3), 100 (n=6) et 500 ng/g (n=3) de mesures conduites le même jour (précision intra-journalière). Ces niveaux ont été choisis pour mesurer la précision de la méthode à des concentrations basses, moyennes et hautes.

3. Résultats

3.1. Validation de la méthode

La spécificité de la méthode a été évaluée en comparant le chromatogramme d'un extrait standard contenant du diazépam et du tétrazépam (500 ng/g) avec le chromatogramme de moules non contaminées de différentes origines (n=3). Aucune interférence n'a été détectée sur les chromatogrammes aux temps de rétention correspondant aux composés étudiés.

Les limites de détection sont de LOD = 20 ng/g pour le tétrazépam et LOD = 9 ng/g pour le diazépam. La limite de quantification est de LOQ = 50 ng/g pour le tétrazépam et de LOQ = 15 ng/g pour le diazépam.

Le rendement d'extraction a été calculé pour chaque point avec extraction, par rapport à la régression linéaire des valeurs obtenues sans extraction. Le rendement d'extraction moyen est de $75 \pm 22\%$ pour le tétrazépam (écart-type : 14%) et de $99 \pm 37\%$ pour le diazépam (écart-type : 15%).

La linéarité est vérifiée entre 50 et 500 ng/g pour le tétrazépam et entre 20 et 500 ng/g pour le diazépam (voir figure 2). La régression linéaire pour le tétrazépam a pour équation : $y = 1,0078 x + 0,2562$, avec un coefficient de détermination $r^2 = 0,9797$. La régression linéaire pour le diazépam a pour équation : $y = 0,9273 x + 0,1004$, avec un coefficient de détermination $r^2 = 0,9677$.

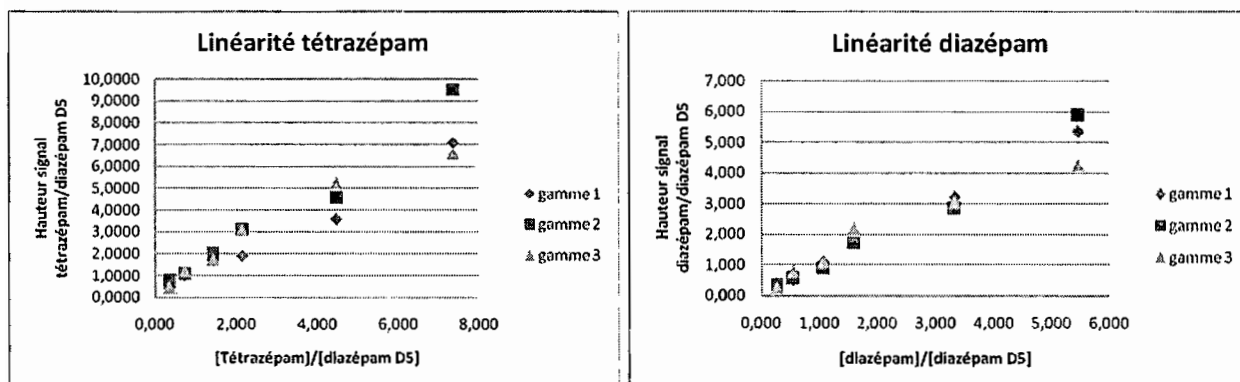


Fig. 2. Linéarité de la réponse en GC/MS pour le tétrazépam et le diazépam

La répétabilité est inférieure à 20 % pour les deux molécules ; elle varie entre 9,4 % et 19,2 % pour le tétrazépam, et entre 10,4 % et 17,6 % pour le diazépam (voir tableau 3).

Tab. 3. Précision intra-journalière pour la mesure du tétrazépam et du diazépam

Concentration (ng/g)	R.S.D. ⁵ tétrazépam (%)	R.S.D. diazépam (%)
50	9,4 %	10,4 %
100	10,3 %	17,6 %
500	19,2 %	16,2 %

Pour le diazépam, la méthode est validée de 20 à 500 ng/g, avec un rendement d'extraction de $75 \pm 22\%$ et une répétabilité inférieure à 20%.

Pour le tétrazépam, la méthode est validée de 50 à 500 ng/g, avec un rendement d'extraction de $99 \pm 37\%$ et une répétabilité inférieure à 20%.

3.2. Contrôle des conditions d'exposition

Lors des études d'exposition en conditions contrôlées, les moules ont été exposées initialement à des concentrations de $14,5 \pm 3,4 \mu\text{g/l}$ pour le tétrazépam et $13,2 \pm 2,8 \mu\text{g/l}$ pour le diazépam.

Après 24 heures, l'exposition résultante est de $6,4 \pm 1,6 \mu\text{g/l}$ pour le tétrazépam et de $10,7 \pm 1,9 \mu\text{g/l}$ pour le diazépam.

L'assimilation de médicaments par les moules a été estimée pour le jour 1. Pour le tétrazépam, l'absorption de médicaments par les moules est de l'ordre de $2,5 \pm 1,3 \mu\text{g}$. Ceci représente entre 13% et 41% des pertes de médicaments constatées dans l'eau. Le reste des pertes (de 59% à 87%) s'explique par une dégradation des molécules (photodégradation ou métabolisation), ou une adsorption sur les parois ou les coquilles de moules. Pour le diazépam, l'absorption par les moules ($0,93 \pm 0,12 \mu\text{g}$) explique la diminution de la concentration dans l'eau à $42 \pm 6\%$.

L'hypothèse d'une métabolisation est la plus probable, puisque la stabilité du diazépam et du tétrazépam a été préalablement testée dans l'eau de mer, sans dégradation constatée. La formation de diazépam a par ailleurs été détectée dans plusieurs lots exposés au tétrazépam (le diazépam est un métabolite possible du tétrazépam ; voir annexe 1).

3.3. Résultats de la bioconcentration du tétrazépam et du diazépam

La figure 3 représente la cinétique d'accumulation et d'épuration du tétrazépam dans les moules. La concentration maximale a été obtenue pour le 7^{ème} jour, avec une concentration moyenne de tétrazépam dans les moules de 1440 ng/g de poids sec, soit 234 ng/g de poids humide. Le tableau 4 résume les données de concentrations obtenues, ainsi que le calcul du facteur de bioconcentration. Les facteurs d'accumulation et d'épuration sont respectivement de $k_1 = 70 \text{ ml.g}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ et $k_2 = 0,48 \text{ jour}^{-1}$, ce qui correspond à un facteur de bioconcentration de 144 par rapport

⁵ R.S.D. : Relative Standard Deviation

au poids sec, soit 24 par rapport au poids humide. Ce rapport est équivalent au rapport $C_{\text{moules}}/C_{\text{eau}}$ au 7^{ème} jour, ce qui signifie que la valeur maximale théorique de concentration de tétrazépam dans la moule a été atteinte au cours de l'expérience.

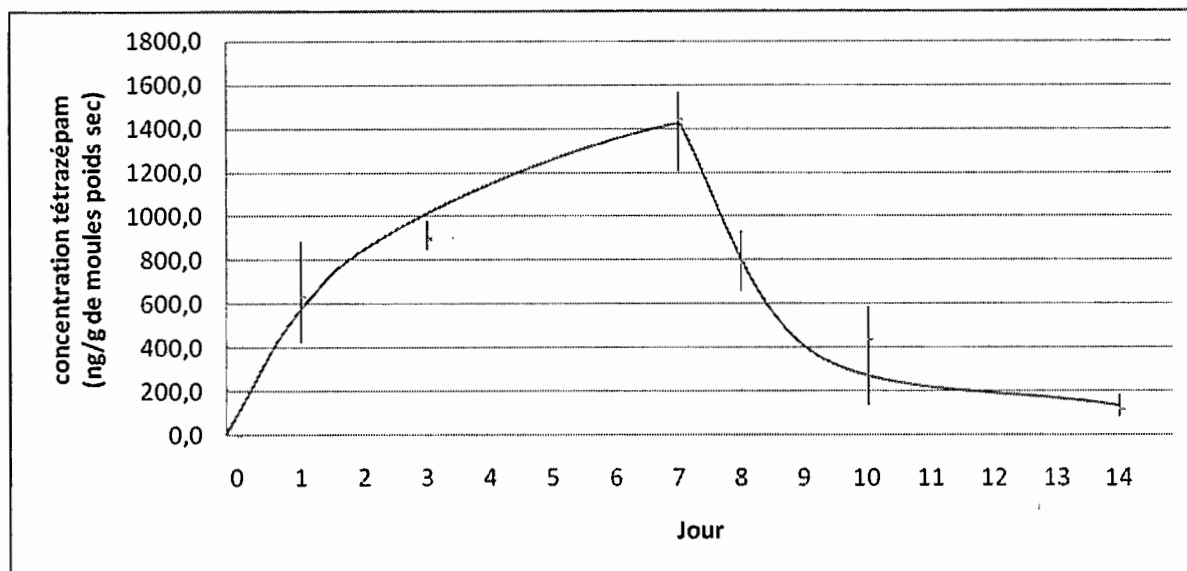


Fig. 3. Cinétique de bioconcentration du tétrazépam à 10 µg/L

Pour le diazépam, l'accumulation et l'épuration se font plus rapidement (figure 4), à des vitesses moyennes respectives de $k_1 = 117 \text{ ml. g}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$ et $k_2 = 1,76 \text{ jour}^{-1}$, ce qui correspond à un facteur de bioconcentration de 67 par rapport au poids sec, soit BCF=11 par rapport au poids humide. Ce rapport est équivalent au rapport $C_{\text{moules}}/C_{\text{eau}}$ au 7^{ème} jour, ce qui signifie que la valeur maximale théorique de concentration de diazépam dans la moule a été atteinte au cours de l'expérience. Au troisième jour, le pallier était déjà quasiment atteint. Cependant les niveaux de concentrations atteints sont environ deux fois moins importants que pour le tétrazépam, avec une concentration moyenne de diazépam pour le 7^{ème} jour de 672 ng/g de poids sec soit 106 ng/g de poids humide.

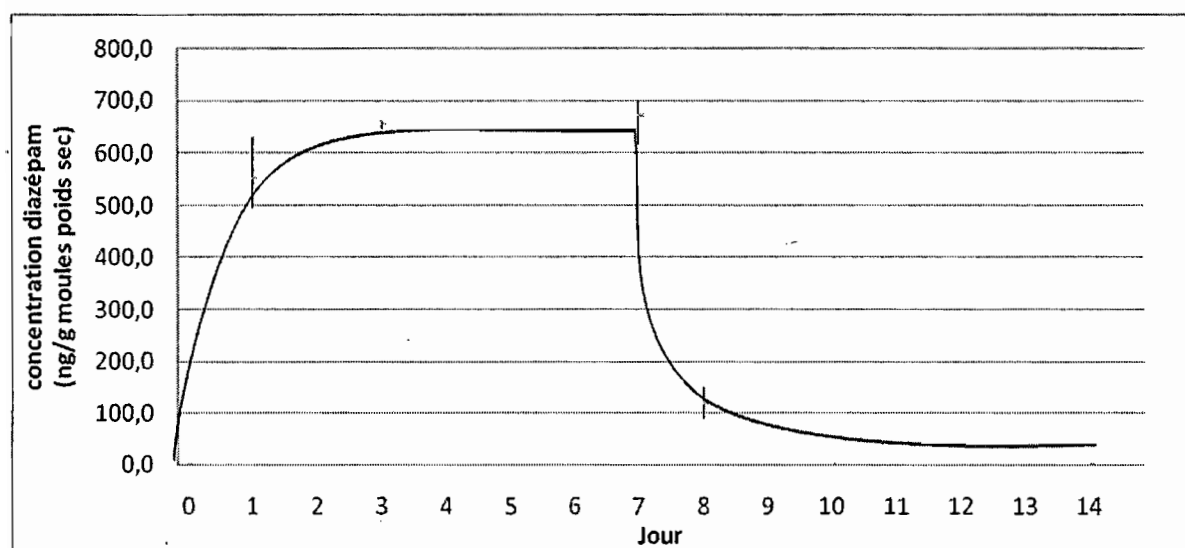


Fig. 4. Cinétique de bioconcentration du diazépam à 10 µg/L

L'expérience montre que les molécules de tétrazépam et de diazépam bioaccumulent dans la moule. L'accumulation et l'épuration se font plus rapidement pour le diazépam que pour le tétrazépam. Le temps de demi-vie des molécules dans la moule sont respectivement de 9,5 heures et 35 heures. Ceci explique qu'au 3^{ème} jour d'épuration, la concentration de diazépam est déjà en dessous du seuil de détection.

Tab. 4. Cinétique de bioconcentration du tétrazépam et du diazépam à 10 µg/L. Les concentrations en tétrazépam et diazépam ont été estimés à partir de la hauteur de signal en spectrométrie de masse, en ng / g de poids sec de moules. Le facteur de bioconcentration (BCF) correspond au rapport entre vitesse d'accumulation moyenne k1 et vitesse de dépuración moyenne k2.

		[TZP] ng/g PS	Moyenne	Ecart- type	k2	k1			[DZP] ng/g PS	Moyenne	Ecart- type	k2	k1		
T0	T01	ND							ND						
	T02	ND	ND	-					ND	ND	-				
	T03	ND							ND						
J1	J1-1	424,7				53,49			535				113,58		
	J1-2	597,6	635,2	231,7		75,27			630	553	69		133,65		
	J1-3	883,4				111,27			495				105,05		
	J1-T	ND	ND						ND	ND					
J3	J3-1	852,6				53,68			660				116,53		
	J3-2	980,0	896,3	72,5		61,70			647	657	8		114,26		
	J3-3	856,2				53,90			663				117,09		
	J3-T	ND	ND						ND	ND					
J7	J7-1	1208,2				60,16			696				122,25		
	J7-2	1548,3	1439,6	200,5		77,10			703	672	48		123,43		
	J7-3	1562,2				77,79			617				108,32		
	J7-T	ND	ND						ND	ND					
J8	J8-1	660,0			0,78				90			2,01			
	J8-2	933,2	788,1	137,4	0,43				149	120	42	1,51			
	J8-3	771,1			0,62				-						
	J8-T	ND	ND						ND	ND					
J10	J10-1	585,9			0,30				ND						
	J10-2	585,6	435,6	260,1	0,30				ND	ND	-				
	J10-3	135,3			0,79				ND						
	J10-T	ND	ND						ND	ND					
J14	J14-1	89,5			0,40				ND						
	J14-2	81,9	118,0	56,1	0,41				ND	ND	-				
	J14-3	182,7			0,29				ND						
	J14-T	ND	ND						ND	ND					
					Moyenne	0,48	69,37						Moyenne	1,76	117,13
					Ecart-type	0,20	18,72						Ecart-type	0,35	8,54
					BCF tétrazépam :		144						BCF diazépam :		67

4. Discussion

Le facteur de bioconcentration calculé n'est à prendre que de façon indicative, comme ordre de grandeur. De nombreuses études montrent en effet que ce facteur varie très fortement selon les conditions de l'expérience. Le tableau 5 récapitule différentes expériences de bioaccumulation pour les poissons, les algues et les moules. On peut y voir différentes manières de calculer les facteurs de bioconcentration, et en particulier voir l'importance des variations de valeur que peut induire :

- ✓ un changement du pH si celui-ci est proche du pKa (Nakamura et al, 2008),
- ✓ une mesure dans différents organes (Nakamura et al, 2008 ; Le Bris et Pouliquen, 2004)

L'étude de Voets et al (2006) étudie l'exposition de moules zébrées (*Dreissena polymorpha*) à des eaux multi-contaminées. Les résultats ont été assez inattendus, puisque les moules exposés aux concentrations les plus fortes présentaient de meilleures conditions de santé que les moules un peu moins exposées. Les auteurs soulignent donc la possibilité d'adaptation des organismes à la pollution, qui produisent plus de protéines dédiées à l'élimination des polluants présents. Aucun effet de ce type n'a été observé dans notre étude, suggérant que le temps d'adaptation de la moule, s'il existe, est plus long que le temps d'exposition choisi.

Une autre donnée inattendue à prendre en compte est que l'on obtient généralement des facteurs de bioconcentration plus élevés pour de faibles concentrations de polluants. L'exposition des poissons « Médaka japonais » à la fluoxétine, réalisée par Nakamura et al. (2008) à des concentrations de 300 µg/L, 30 µg/L et 10 µg/L donne des facteurs de bioconcentrations de 1,1, 5,3 et 9,5 respectivement. Franke (1996) avait déjà identifié le même phénomène pour la bioaccumulation du phénol, en comparant plusieurs études entre elles. Selon lui, tester la bioaccumulation avec des hautes concentrations peut conduire à des bas BCF signalisant un faible risque. Notre étude a été menée à des concentrations de 10 µg/L. Cette concentration est environ 1000 fois supérieure aux concentrations trouvées dans l'environnement, mais cet écart est nécessaire pour dépasser les limites de détection dans les moules.

Le temps d'exposition et d'épuration choisis ont permis la mise en évidence d'un pallier de contamination, et ont permis le calcul de la vitesse d'accumulation et d'épuration. Cependant, le contrôle de l'exposition montre une disparition relativement importante du tétrazépam à l'échelle d'une journée. Cette disparition s'explique en partie par l'absorption des molécules par les moules, peut-être également par une destruction des molécules par biodégradation. La formation de métabolite a d'ailleurs été mise en évidence lors de l'exposition des moules au tétrazépam.

L'estimation du BCF peut également être affinée en prenant en considération différents organes de l'animal, différentes voies d'exposition (nourriture, eau), différents mécanismes participant à l'accumulation (différences de pression interne/externe, données d'assimilation de la nourriture) ou en mesurant l'influence de paramètres environnementaux (pH, température, etc.) (Landrum et al, 1992).

Tab. 5. Expériences de bioaccumulation

Contaminant / Organisme étudié	Conditions de l'expérience	Durée d'exposition et de détoxification	Calcul du BCF ou BAF	Méthodologie	Source
Fluoxetine / Poisson (<i>médaka japonais</i>)	En laboratoire pH = 7,4 c = 0,64 µg/l	Expo : 7 jours Détox : 21 jours	$BCF_a = c_{poisson}/c_{eau} = 74$ $BCF_b = k_{expo}/k_{détox} = 80$	Extraction : PLE (extrac. liq. pressur.) Analyse : LC – MS/MS Lim détec. : 0,08 et 0,12 µg/kg	Paterson et Metcalf, 2008
Fluoxetine / Poisson (<i>médaka japonais</i>)	En laboratoire pH = 7, 8 et 9 c = 10 µg/l	Expo : 30 jours	$BCF = c_{poisson}/c_{eau}$ de 8,8 à 260 selon pH (corps) de 330 à 3100 (foie)	Extraction : centrifug., évap., ultrasons Analyse : GC – MS Lim détec. : 63 et 11 µg/kg	Nakamura et al, 2008
PCBs et métaux / Moule (moule zébrée)	Environnement pH entre 7,8 et 8,6		Non mesuré	Pour PCB : Extraction : heptane/acetone (3:1 , v/v) Analyse : GC - MS	Voets et al, 2006
Composés explosifs (TNT, RDX et HMX ⁶) / Moule (<i>Mytilus</i> <i>Galloprovincialis</i>)	En laboratoire pH ≈ 8 c entre 3,14 mg/l et 17,2 mg/l	Expo : 4 heures Détox : entre 2h et 18h	$BCF = c_{moule}/c_{eau}$ BCF entre 0,44 et 1,61	Extraction : solvant + centrifug. + filtre Analyse : HPLC Lim détec. : 0,4 µg/g	Rosen et Lotufo, 2007
Oxytetracycline et acide oxolinique (antibiotiques) / Moule (<i>M. Edulis</i>)	En laboratoire c entre 1 et 1,5 mg/l	Expo : 8 jours Détox : 2 semaines	$BAF = c_{moule}/c_{eau}$ BAF entre 0.12 et 2.01 (viscères, OTC)	Extraction en phase solide (phase mobile : acétonitrile + acide orthophosphorique) Analyse : HPLC	Le Bris et Pouliquen, 2004
Plomb / Moule (<i>M.</i> <i>Galloprovincialis</i>)	En laboratoire	Expo : 21 jours Détox : 28 jours	BAF = activité ds moule / activité ds eau = 211 ml/g	Méthode de quantification : mesure de radioactivité	Boisson et al, 1998
PCB77 et BaP / Moule (<i>M. Edulis</i>)	En laboratoire c entre 0,1 et 3 µg/l	Expo : 7 à 14 j. Détox : 7 à 44 j.	$BCF_{PCB,algues} = 48$ et 64 Imp. à calc. pr moules car pas d'épuration	Méthode de quantification : mesure de radioactivité de ¹⁴ C-PCB77 et ¹⁴ C-BaP	Moy et Walday, 1997

⁶ TNT : 2,4,6-trinitrotoluene ; RDX : hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine ; HMX : octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine

Le Bris et al. (2004) décrit une expérience de bioaccumulation de deux antibiotiques, l'oxytétracycline et l'acide oxolinique, dans différents tissus de la moule *Mytilus Edulis*, pendant 7 jours d'exposition et 14 jours d'épuration. Les facteurs de bioaccumulation obtenus sont très faibles, le maximum étant pour les vicères (BCF = 2,01). Ces données sont à comparer avec les valeurs de BCF obtenus par rapport au poids humide, à savoir 24 pour le tétrazépam et 11 pour le diazépam. La différence entre les facteurs de bioaccumulation trouvés peut s'expliquer par un faible $\log K_{ow}$ ⁷ pour les antibiotiques étudiés (respectivement 0,30 et 1,67), comparativement au $\log K_{ow}$ du tétrazépam et du diazépam, respectivement de 3,36 et de 2,94. On considère habituellement qu'un composé est bioaccumulable à partir d'un $\log K_{ow} > 3$.

Cependant l'étude de Le Bris et al. a été menée à des concentrations d'exposition très élevées (de 1 à 1,5 mg/L), ce qui peut entraîner une sous-estimation du BCF. L'étude de Nakamura et al. (2008), portant sur l'accumulation de la fluoxétine dans la chair de poissons, a été menée à une concentration d'exposition de 10 µg/L. On peut s'attendre à une bioaccumulation plus importante de la fluoxétine, au $\log K_{ow}$ égal à 4,33. Les valeurs de BCF trouvées sont effectivement plus importantes, variant de 8,8 à 260 dans le corps et de 330 à 3100 dans le foie, selon le pH d'étude. Mais il est difficile de conclure car, outre les différences possibles entre les espèces, la fluoxétine est à ces pH en grande partie ionisée, alors que les composés étudiés sont neutres au pH de la présente étude (le pH de l'eau de mer est environ de 8,2). Il est donc probable que des mécanismes différents entrent en jeu dans l'absorption des molécules.

Les temps d'épuration trouvés dans la présente étude (9,5 heures pour le diazépam et 35 heures pour le tétrazépam) sont très rapides comparés aux études similaires. Le Bris et al. (2004) trouve un temps d'élimination des antibiotiques dans les moules plus rapide dans les vicères (demi-vie de 3,9 jours) que dans la coquille (demi-vie de 8,3 jours). L'étude de Paterson et Metcalfe (2008) portant sur l'accumulation et l'épuration de la fluoxétine dans les poissons constate un temps de demi-vie de 9,4 jours. Le Dictionnaire Vidal (1999) fait état pour l'homme d'un temps de demi-vie plasmatique de 32 à 47 heures pour le diazépam (environ quatre fois plus long que pour la moule) et de 22 ± 4 heures pour le tétrazépam. Ceci montre les capacités très fortes d'élimination du diazépam pour la *Mytilus Galloprovincialis*, par excrétion ou par métabolisation.

Ce résultat est assez inattendu car selon Gagné et al. (2006), les moules sont moins compétentes que les mammifères pour l'élimination des médicaments, du fait de leur absence de la famille 2C des cytochromes P450. Yang et al. (1998) relève deux mécanismes distincts de métabolisation du diazépam : Le cytochrome P450 2B6 catalyse l'action des P450-2C pour la formation de nordiazépam, d'une part. D'autre part, les P450-3A4 et 3A5 entraînent une C3-hydroxylation du diazépam en témazépam. L'étude suggère donc une présence importante de la famille 3A chez la moule, qui compense dans ce cas l'absence de la famille 3C. En termes de dangerosité pour l'environnement, ce temps d'élimination rapide ne doit donc pas faire oublier la potentielle formation de métabolites actifs.

⁷ Kow : Coefficient de partition octanol / eau

Conclusion

La présente étude met en évidence la bioconcentration du diazépam et du tétrazépam dans les moules *Mytilus Galloprovincialis*. Les facteurs de bioconcentration trouvés sont respectivement de 11 et 24. La *Mytilus Galloprovincialis* a montré une capacité plus grande à absorber et à excréter le diazépam que le tétrazépam.

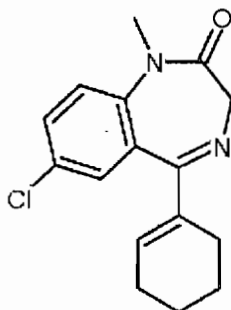
Si ce facteur de bioconcentration est confirmé à des concentrations dans l'eau plus faibles (de l'ordre du ng/L), celui-ci ne permet pas l'utilisation de la moule *Mytilus Galloprovincialis* en biosurveillance du milieu marin, car les niveaux accumulés seraient en-dessous des limites de détection.

L'étude nous permet cependant d'ouvrir des champs de recherches possibles. Il serait en particulier intéressant de considérer les différents organes des moules pour pouvoir faire des hypothèses sur le mode d'accumulation (par les branchies ou par voie digestive), et pouvoir augmenter en biosurveillance les seuils de détection en sélectionnant la partie de la moule dans laquelle la concentration est maximale.

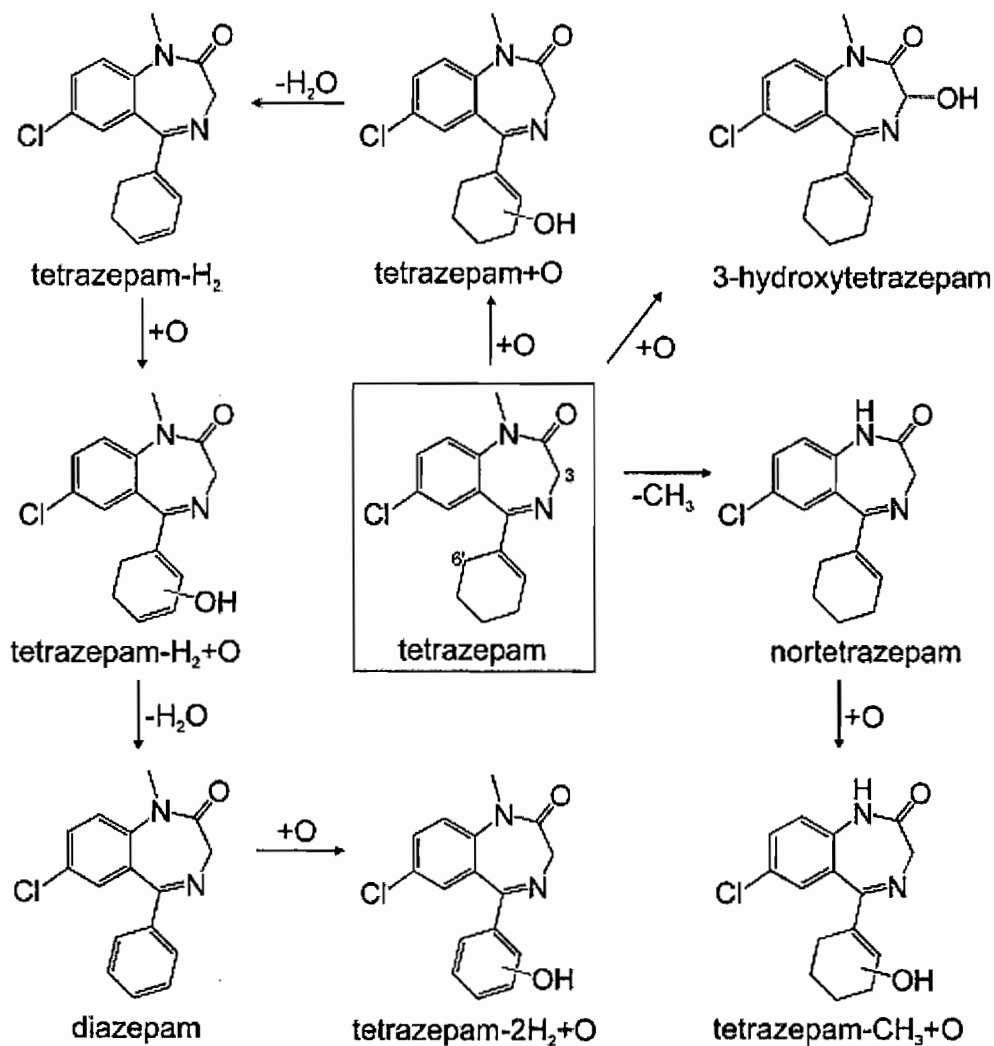
Annexe 1 – Propriétés physico-chimiques du tétrazépam et du diazépam

○ Le tétrazépam

Formule chimique :



Principaux métabolites (source : Baumann et al, 2009) :

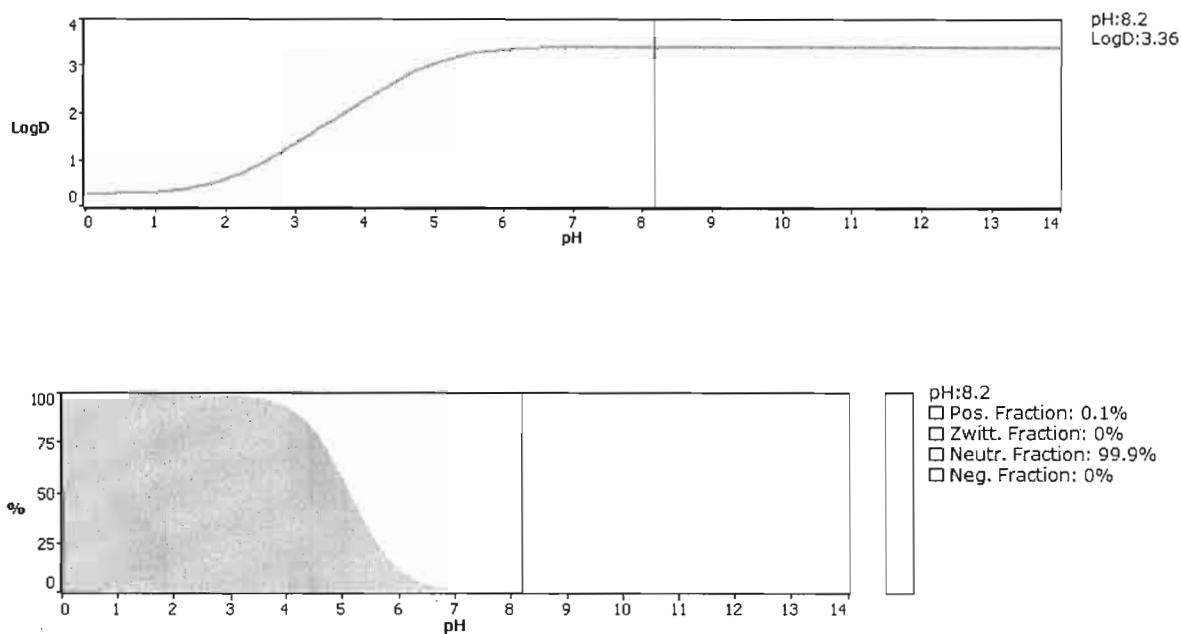


Principales données physico-chimiques (sources : <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) :

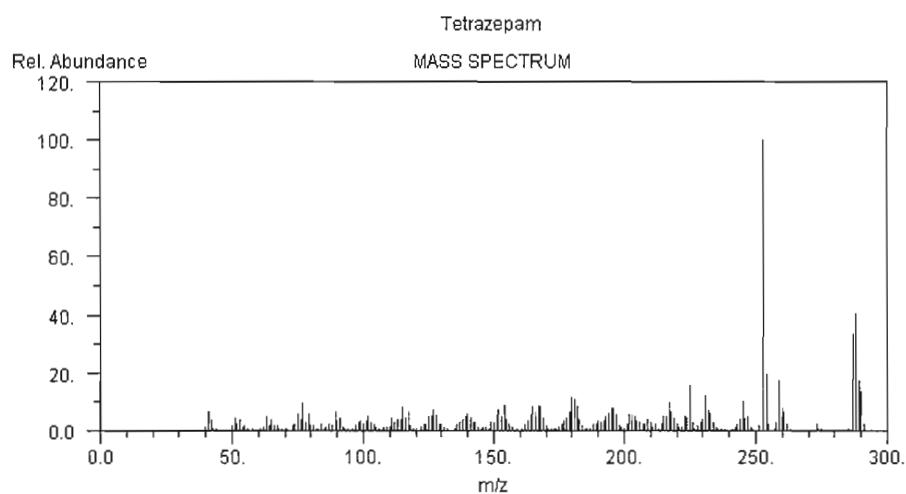
Poids moléculaire 288.77198 [g/mol]

pKa 3.2

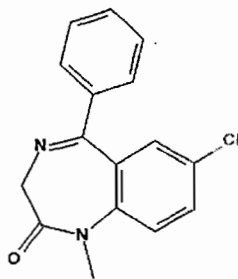
Représentation du log D et de l'ionisation pour un pH d'eau de mer = 8,2 (source : <http://pharma-algorithms.com/webboxes>) :



Spectre de masse du tétrazépam (source : <http://webbook.nist.gov/>) :

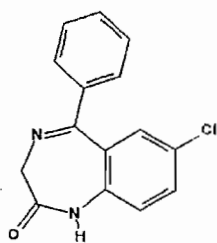


○ Le diazépam

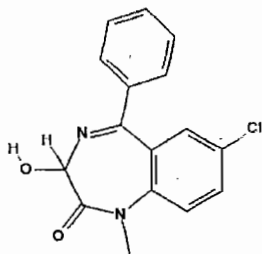


Principaux métabolites :

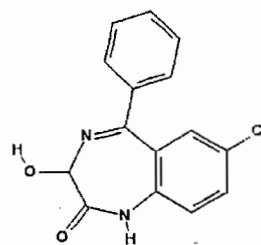
le nordiazépam



le témazépam



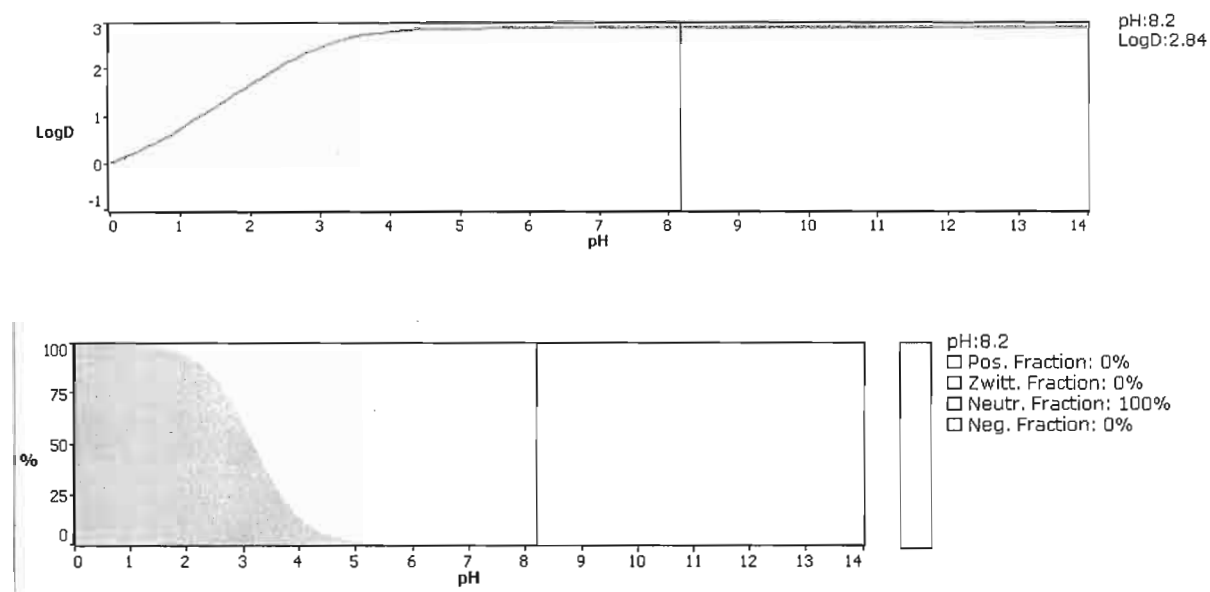
l'oxazépam



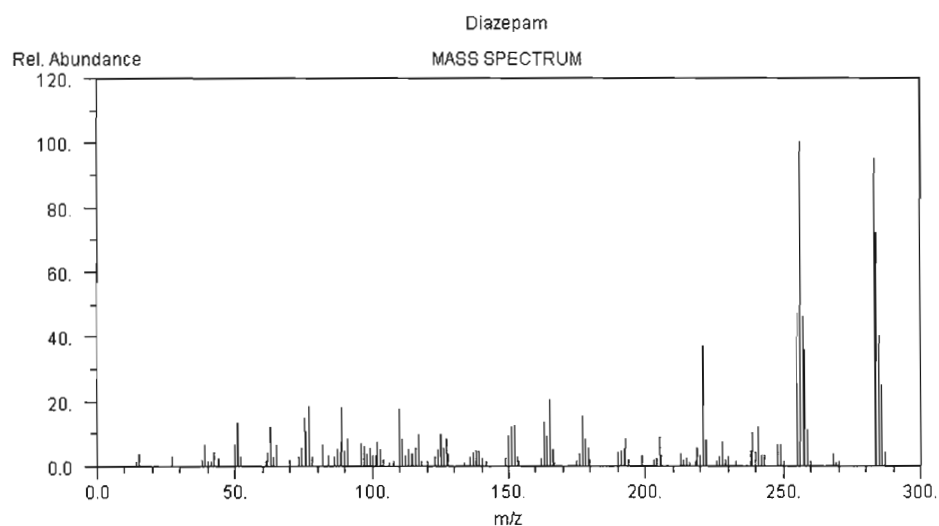
Principales données physico-chimiques (sources : <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> et <http://www.drugbank.ca>) :

Poids moléculaire	284.74022 [g/mol]
pKa	3.4
Log P calculé	2.63
Log P expérimental	2.9
Solubilité prévue dans l'eau	1.22e-02 mg/mL
Solubilité expérimentale dans l'eau	50 mg/L

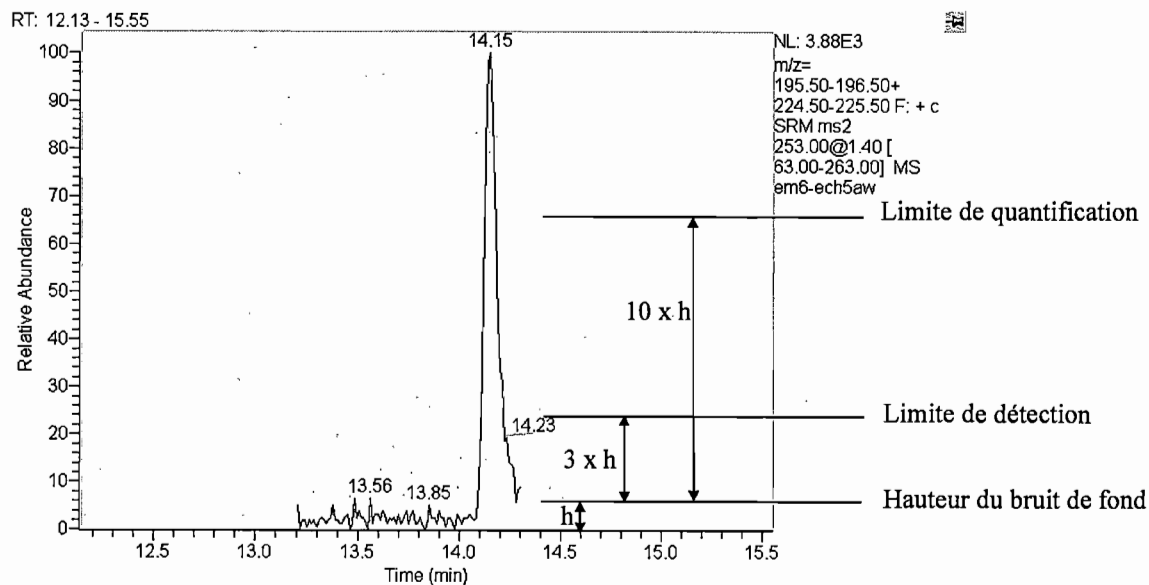
Représentation du log D et de l'ionisation pour un pH d'eau de mer = 8,2 (source : <http://pharma-algorithms.com/webboxes>) :



Spectre de masse du diazépam (source : <http://webbook.nist.gov/>) :



Annexe 2 – Détermination des limites de détection et de quantification



Bibliographie

○ Articles scientifiques

- Barron, G. B., G. R. Stehly et W. L. Hayton (1998) « Pharmacokinetic modeling in aquatic animals I. Models and concepts » *Aquat Toxicol* 18: 61-86.
- Baumann, A., W. Lohmann, B. Schubert, H. Oberacher et U. Karst (2009) « Metabolic studies of tetrazepam based on electrochemical simulation in comparison to in vivo and in vitro methods » *J Chromatogr A* 1216(15): 3192-8.
- Benotti, M. J. et B. J. Brownawell (2009) « Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater » *Environ Pollut* 157: 994-1002.
- Besse, J. P. et J. Garric (2008) « Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation » *Toxicol Lett* 176(2): 104-23.
- Boisson, F., O. Cotret, et S. W. Fowler (1998) « Bioaccumulation and retention of lead in the mussel *Mytilus galloprovincialis* following uptake from seawater » *Sci Total Environ* 222(1-2): 55-61.
- Brooks, B. W., P. K. Turner, J. K. Stanley, J. J. Weston, E. A. Glidewell, C. M. Foran, M. Slattery, T. W. La Point, et D. B. Huggett (2003) « Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms » *Chemosphere* 52(1) : 135-142.
- Brooks, B. W., C. M. Foran, S. M. Richards, J. Weston, P. K. Turner, J. K. Stanley, K. R. Solomon, M. Slattery et T. W. La Point (2003) « Aquatic ecotoxicology of fluoxetine » *Toxicol Lett* 142(3): 169-83.
- Budzinski, H. et A. Togola (2006) « Drug residues in compartments of the aquatic environment » *Environ, Risque et Santé* 5(4): 248-253.
- Calisto, V. et V. I. Esteves (2009) « Psychiatric pharmaceuticals in the environment » *Chemosphere* 77(10): 1257-74.
- Carlsson, C., A. K. Johansson, G. Alvan, K. Bergman, T. Kühler (2006) « Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients » *Sci Total Environ* 364(1-3): 67-87.
- Crane, M., C. Watts, et T. Boucard (2006) « Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals » *Sci Total Environ* 367(1): 23-41.
- Daniel, W. A. (2003) « Mechanisms of cellular distribution of psychotropic drugs. Significance for drug action and interactions » *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(1): 65-73.
- Enick, O. V. et M. M. Moore (2007) « Assessing the assessments : Pharmaceuticals in the environment » *Envir Impact Assess Review* 27: 707-729.
- Fent, K., A. A. Weston, et D. Caminada (2006) « Ecotoxicology of human pharmaceuticals » *Aquat Toxicol* 76(2): 122-59.
- Franke, C. (1996) « How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? » *Chemosphere* 32(10): 1897-1905.
- Gagné, F., C. André et M. Gélinas (2010) « Neurochemical effects of benzodiazepine and morphine on freshwater mussels » *Comp. Biochem. Physiol. part C :toxicology and pharmacology* 152(2): 207-214 .

- Gagne, F., C. Blaise, et C. André (2006) « Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes » *Ecotoxicol Environ Saf* 64(3): 329-36.
- Hammad, M. A. et B. W. Müller (1998) « Solubility and stability of tetrazepam in mixed micelles » *European Journal of Pharmac Sci* 7: 49-55.
- Hempel, G. et G. Blaschke (1996) « Direct determination of zolpidem and its main metabolites in urine using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection » *J Chromatogr B Biomed Appl* 675(1): 131-7.
- Kintz, P., M. Villain, M. Concheiro, et V. Cirimele (2005) « Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS » *Forensic Sci International* 150: 213-220.
- Landrum, P. F., M. J. Lydy et H. Lee (1992) « Toxicokinetics in aquatic systems : model comparisons and use in hazard assessment » *Environ Toxicol* 11: 1709-1725.
- Le Bris, H. et H. Pouliquen (2004) « Experimental study on the bioaccumulation of oxytetracycline and oxolinic acid by the blue mussel (*Mytilus edulis*). An evaluation of its ability to bio-monitor antibiotics in the marine environment » *Mar Pollut Bull* 48(5-6): 434-40.
- Meylan, W. M., P. H. Howard, R. S. Boethling, D. Aronson, H. Printup, et S. Gouchie (1999) « Improved method for estimating bioconcentration/bioaccumulation factor from octanol/water partition coefficient » *Environ Toxicol and Chemistry* 18(4): 664-672.
- Mompelat, S., B. Le Bot, et O. Thomas (2009) « Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water » *Environ International* 35(5): 803-814.
- Moy, F. E. et M. Walday (1997) « Accumulation and Depuration of Organic Micro-pollutants in Marine Hard Bottom Organisms » *Mar Pollut Bull* 33(1-6): 56-63.
- Nakamura, Y., H. Yamamoto, J. Sekizawa, T. Kondo, N. Hirai, et N. Tatarazako (2008) « The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish » *Chemosphere* 70(5): 865-73.
- Paterson, G. and C. D. Metcalfe (2008) « Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) » *Chemosphere* 74(1): 125-30.
- Peters, L. D., C. Nasci, et D. R. Livingstone (1998) « Immunochemical investigations of cytochrome P450 forms/epitopes (CYP1A, 2B, 2E, 3A and 4A) in digestive gland of *Mytilus* sp » *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 121(1-3): 361-9.
- Ploemen, J. P. H. T. M., J. Kelder, T. Hafmans, H. Van de Sandt, J. A. Van Burgsteden, P. J. M. Salemink, et E. Van Esch (2004) « Use of physicochemical calculation of pKa and ClogP to predict phospholipid-inducing potential » *Exp Toxic Pathol* 55: 347-355.
- Rosen, G. et G. R. Lotufo (2007) « Bioaccumulation of explosive compounds in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis* » *Ecotoxicol Environ Saf* 68(2): 237-45.
- Sacher, F., F. T. Lange, H-J. Brauch, et I. Blankenhorn (2001) « Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany » *J Chromatogr A*, 938(1-2): 199-210.
- Santos, L. H.M.L.M., A.N. Araújo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, et M.C.B.S.M. Montenegro (2010) « Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment » *Journal of Hazardous Mat* 175(1-3): 45-95.

- Schnell, S., N. C. Bols, C. Barata, et C. Porte (2009) « Single and combined toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on the rainbow trout liver cell line RTL-W1 » *Aquat Toxicol* 93(4): 244-52.
- Ternes, T. A. (1998) « Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers » *Wat Res* 32(11): 3245-3260.
- Van der Ven, K., Wa. Van Dongen, B. U.W. Maes, E. L. Esmans, R. Blust, et W. M. De Coen (2004) « Determination of diazepam in aquatic samples by capillary liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry » *Chemosphere*, 57(8): 967-973.
- Vasskog, T., U. Berger, P-J. Samuelsen, R. Kallenborn, et E. Jensen. (2006) « Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway » *J Chromatogr A*, 1115: 187-195.
- Voets, J., W. Talloen, T. de Tender, S. van Dongen, A. Covaci, R. Blust, et L. Bervoets (2006) « Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters » *Aquat Toxicol* 79(3): 213-25.
- Yang, T. J., M. Shou, K. R. Korzekwa, F. J. Gonzalez, H. V. Gelboin et S. K. Yang (1998) « Role of cDNA-Expressed Human Cytochromes P450 in metabolism of diazepam » *Biochem Pharmac* 55(6): 889-896.
- Zenker, A., H. Schmutz, et K. Fent (2008) « Simultaneous trace determination of nine organic UV-absorbing compounds (UV filters) in environmental samples. » *J Chromatogr A* 1202(1): 64-74.

○ Livre

Dictionnaire Vidal. 75e éd. Paris : Ed. du Vidal, 1999.

○ Sites internet (consultés le 14 juin 2010)

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
<http://pharma-algorithms.com/webboxes>
<http://www.ameli.fr>
<http://www.vcclab.org/lab/alogps/start.thml>
<http://www.medix.free.fr/sim/anxiolytique.php>

Résumé

L'apport de médicaments par les eaux usées dans l'environnement est une préoccupation récente, dont l'étude est permise par l'amélioration des techniques de détection. L'évaluation des risques est à compléter, les données sont encore largement manquantes. La présente étude concerne l'exposition des moules *Mytilus Galloprovincialis* à une concentration de 10 µg/L de diazépam et de tétrazépam, pendant une durée de 7 jours suivis de 7 jours d'épuration. Des lots de moules sont régulièrement prélevés afin de suivre la cinétique d'accumulation et d'épuration. Le facteur de bioconcentration (BCF) trouvé est de 11 pour le diazépam et 24 pour le tétrazépam. La concentration maximale dans la moule est atteinte plus rapidement pour le diazépam (environ 3 jours) que pour le tétrazépam (environ 7 jours). Les temps de demi-vie des molécules sont de 9,5 heures pour le diazépam et 35 heures pour le tétrazépam.

Mots clés

Bioconcentration, bioaccumulation, moules *Mytilus Galloprovincialis*, médicaments, benzodiazépine, diazépam, tétrazépam, environnement aquatique, milieu marin, demi-vie, élimination, métabolisation, lipophilie, log K_{ow}.