

Accord Cadre ZABR - Agence de l'Eau

Fiche projet

PharmaTOX –UR RiverLy-Gradients spatio-temporels des substances pharmaceutiques et conséquences écologiques en cours d'eau agricole et urbain.

TITRE DU PROJET : Dynamique des substances pharmaceutiques et conséquences écologiques en cours d'eau agricole et urbain

RESPONSABLE SCIENTIFIQUE DU PROJET :

RiverLy, INRAE, EMA, Stéphane Pesce (Directeur de Recherche, stephane.pesce@inrae.fr)

EQUIPES DE RECHERCHES ZABR CONCERNÉES et CONTACT SCIENTIFIQUE DE L'EQUIPE

EDYTEM, USMB, Emmanuel Naffrechoux (Professeur, emmanuel.naffrechoux@univ-smb.fr)

CARRTEL, USMB, Emilie Lyautey (Maitre de Conférence, emilie.lyautey@univ-smb.fr)

RiverLy, INRAE, LAMA, Cécile Miège (Directeur de Recherche, cecile.miege@inrae.fr)

AUTRES PARTENAIRES

(préciser leur degré d'implication et leur accord)

- Recherche : *Quantification complémentaire de gènes de résistance d'intérêt*

Agriculture et Agroalimentaire Canada (London, Ontario, Canada) : Ed Topp (Accord de principe, implication sur fonds propres)

- Institutionnel : *Expertise et relais locaux sur les sites d'études*

Comité Intersyndical pour l'Assainissement du Lac du Bourget - CISALB (accord de principe)

Syndicat Mixte des Rivières du Beaujolais - SMRB (accord de principe) :

THEME DE RATTACHEMENT ZABR

Flux Polluants, Ecotoxicologie, Ecosystèmes (FPEE)

THEME DE RATTACHEMENT AGENCIE DE L'EAU -QUESTIONS AGENCIE DE L'EAU

Quels sont les enjeux santé-environnement ?

- Assurer une veille scientifique sur le risque lié aux contaminations émergentes, en particulier les résidus médicamenteux et les perturbateurs endocriniens
- Organiser des campagnes ponctuelles d'analyses de substances émergentes sur un échantillon représentatif d'effluents urbains et industriels pour préciser les niveaux d'imprégnations du compartiment eau

SITE OU OBSERVATOIRE DE RATTACHEMENT ZABR

SOERE OLA : rivière Tillet (affluent du lac du Bourget)

SAAM : site atelier Ardières-Morcille

RESUME DU PROJET GLOBAL

Fiche projet ZABR – modèle type Le récent projet ZABR-AERM&C CommuSED¹ a mis en évidence **dans les eaux de surface de l'Ardières et du Tillet des concentrations en substances pharmaceutiques jusqu'alors insoupçonnées**. Les niveaux de contamination observés dans les zones situées en aval (sur la base des 23 substances recherchées) étaient ainsi comparables à ceux fréquemment retrouvés dans des sites à forte pression urbaine et industrielle². Ce constat est d'autant plus surprenant que 1/ l'Ardières est située dans une zone agricole sans pression d'élevage et avec une pression urbaine limitée (la plus grosse ville, dotée d'un hôpital et d'une station d'épuration urbaine - STEU, est Beaujeu, ~2000 habitants) et 2/ le Tillet, bien que situé en zone urbaine, ne reçoit pas directement de rejets de STEU. Cela pose donc clairement la **question de l'impact écologique de ce type de contamination par rapport à celui des pollutions historiquement étudiées** sur ces deux sites (i.e. pesticides et métaux sur l'Ardières, PCBs sur le Tillet). Cette question revêt un **fort enjeu territorial tant dans le Beaujolais**, où les viticulteurs sont souvent désignés comme les principaux (voire les uniques) responsables de la dégradation de la qualité chimique et écologique des cours d'eau, qu'au **niveau des affluents du lac du Bourget**, puisque ce dernier représente un milieu récepteur pour lequel il n'existe que peu de connaissances sur le sujet.

Dans ce contexte, il nous apparaît donc important pour ces deux cours d'eau:

1. De mieux caractériser le gradient spatio-temporel de ces substances (en élargissant la gamme de substances considérées et en y intégrant notamment des perturbateurs endocriniens) et leur distribution entre les eaux de surface et le compartiment sédimentaire (dans lequel ces substances n'avaient pas été analysées pour CommuSED)
2. D'appréhender les conséquences écologiques de ces substances en mettant en œuvre des mesures d'effets spécifiques ciblant la résistance (quantification de gènes impliqués dans ce mécanisme) et la tolérance (approche PICT) des communautés microbiennes benthiques exposées dans les eaux de surface (biofilms périphytiques) et les sédiments.

Le projet PharmaTOX vise donc à contribuer à ces objectifs en couplant dans les deux cours d'eau susmentionnés des suivis chimiques (qui prendront en compte différents facteurs potentiellement « confondants » tels que la présence des contaminants « historiques ») à l'étude de la résistance, de la tolérance et de la structure des communautés microbiennes exposées.

D'un point de vue opérationnel, PharmaTOX ambitionne d'apporter des éléments de connaissance et d'aide à la décision pour une meilleure gestion de la qualité chimique, écotoxicologique et sanitaire de ces cours d'eau, en fonction des enjeux territoriaux, *via* notamment la prise en compte des substances pharmaceutiques et des antibiorésistances en complément à celle des contaminants historiques cités ci-dessus et suivis depuis de nombreuses années.

- Livrables :
 - Organisation de 2 ou 3 réunions de pilotage avec l'ensemble des parties prenantes (scientifiques, gestionnaires de sites et agence de l'eau)
 - Création d'une page web décrivant le projet PharmaTOX (voir pour exemple la description de la page consacrée à CommuSED : <https://ema.inrae.fr/commused-2018-2019/>)
 - Rédaction et diffusion d'un rapport décrivant les objectifs, les résultats et les perspectives scientifiques et opérationnelles
 - Rédaction et diffusion d'une fiche synthétique ZABR
 - Référencement des métadonnées générées dans la base MetaZABR

ENCART INRAE_RiverLy (Pesce Stéphane)

Deux équipes de l'UR RiverLy sont impliquées dans le projet : EMA et LAMA.

EMA (S. Pesce) sera en charge de la coordination et l'animation du projet : organisation des réunions, planification et réalisation des campagnes d'échantillonnage, centralisation des données et production des livrables. Elle réalisera également l'ensemble des analyses fonctionnelles microbiennes dans les biofilms périphytiques et les sédiments (approche PICT pour mesurer la tolérance aux pharmaceutiques + activités enzymatiques et métaboliques impliquées dans le cycle du C, N et P).

Le LAMA (C. Miège) réalisera les analyses chimiques pour caractériser dans l'eau et les sédiments les concentrations en pharmaceutiques, pesticides et métaux ainsi que les teneurs en principaux nutriments et en matières organiques (ces paramètres étant nécessaires pour mieux comprendre les liens entre exposition aux contaminants et effets biologiques).

ENCART PharmaTOX-USMB (Lyautey Emilie)

• Deux équipes de l'USMB sont impliquées dans le projet : CARRTEL et EDYTEM.

Le CARRTEL (E. Lyautey) réalisera l'extraction de l'ADN environnemental (ADNe) dans les biofilms et les sédiments et l'ensemble des analyses moléculaires pour caractériser la structure génétique des communautés (génotypage) et le potentiel fonctionnel des communautés microbiennes pour la réalisation du cycle du N. Elle se chargera également de l'envoi des échantillons d'ADNe au partenaire Canadien (AAFC, E. Topp) qui réalisera la quantification d'un large panel de gènes de résistances aux antibiotiques et autres contaminants.

EDYTEM (E. Naffrechoux) réalisera les analyses chimiques pour caractériser dans l'eau et les sédiments les concentrations en HAP et PCBs.

Le rôle et les spécificités des différentes équipes impliquées (4 financées : INRAE-RiverLy-EMA, INRAE-RiverLy-LAMA, USMB-EDYTEM, USMB-CARRTEL + partenaires extérieurs AAF Canada, SMRB & CISALB) sont également décrits ci-dessous dans la partie « objectifs et méthodologie ».

FINALITES ET ATTENDUS OPERATIONNELS (1 p. maxi) :

D'un point de vue scientifique, le projet PharmaTOX vise principalement à acquérir des connaissances nouvelles qui permettront :

- de caractériser le gradient spatial et saisonnier des substances pharmaceutiques dans deux sites d'études qui sont porteurs d'enjeux importants autour de la question de pollutions « historiques » (pesticides et métaux pour l'Ardières ; PCBs pour le Tillet) ;
- d'appréhender la distribution des différentes substances pharmaceutiques entre les eaux de surface et le compartiment sédimentaire ;
- d'évaluer les conséquences sur les communautés microbiennes benthiques exposées dans ces deux compartiments en ciblant des réponses très spécifiques au type de substances auquel elles sont exposées de manière chronique à savoir 1) le développement de gènes de résistance et 2) l'acquisition de capacités de tolérance (PICT).

Le projet a donc pour finalité première de renforcer les connaissances concernant les effets écotoxicologiques induit par la contamination multiple dans les deux sites d'études, en ciblant spécifiquement pour la 1^{ère} fois dans ces cours d'eau la question des substances pharmaceutiques. En effet, si la contamination et les impacts des pesticides et des métaux, en particulier le cuivre, sont étudiés (et démontrés) depuis de nombreuses années dans l'Ardières, et s'il en est de même concernant les PCBs dans le Tillet, il n'existe à notre connaissance aucune étude (à l'exception du précédent projet CommuSED et de quelques campagnes ponctuelles d'échantillonnage réalisées par le LAMA) ayant abordée spécifiquement cet aspect dans ces deux cours d'eau. En complétant les paramètres microbiens structurels et fonctionnels « classiques » par une approches PICT et par la quantification spécifique de certains gènes de résistance (en particulier ceux impliqués dans la résistance à différentes familles d'antibiotiques), nous serons en mesure d'établir un lien direct entre la réponse microbienne et l'exposition aux substances responsables de la mise en œuvre de ces processus d'adaptation ciblée (et qui s'accompagnent généralement d'une modification de la structure génétique des communautés). Cependant, une caractérisation physico-chimique aussi large que possible des deux compartiments étudiés (eau de surface et sédiment), nous permettra d'identifier les éventuels facteurs environnementaux confondants.

De plus, le risque avéré de développement de résistances aux antibiotiques au sein des communautés microbiennes environnementales qui sont chroniquement exposées à ces substances est reconnu comme un risque majeur d'un point de vue sanitaire (OMS, 2016 : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/fr/>). Cette question est notamment fréquemment abordée au sein de la ZABR autour du site de SIPIBEL du fait de la présence dans l'Arve de rejets urbains et hospitaliers importants. Le projet PharmaTOX permettra d'élargir cette question aux sites de l'Ardières et du Tillet, en nous appuyant sur les compétences reconnues

mondialement du Dr Ed Topp (Canada), responsable national (Canada) et expert à l'ANSES autour de cette question.

En complément, et dans la continuité des projets POP-RestoLac, CommuSED et PersoResto, les données acquises permettront de renforcer la compréhension du fonctionnement écologique (sous contrainte chimique) des deux cours d'eau étudiés. Les analyses chimiques réalisées dans les eaux de surface et les sédiments associées aux mesures fonctionnelles effectuées sur les communautés microbiennes benthiques (périmyton et sédiment) permettront ainsi d'alimenter les bases de données actuelles afin de renforcer les connaissances sur les liens entre l'exposition aux contaminants et certaines fonctions écologiques majeures assurées par les communautés microbiennes benthiques.

D'un point de vue opérationnel, PharmaTOX ambitionne d'apporter des éléments de connaissance pour une meilleure gestion de la qualité chimique, écotoxicologique et sanitaire de l'Ardières et du Tillet, en fonction des enjeux territoriaux, *via* notamment la prise en compte des substances pharmaceutiques en complément à celle des contaminants historiques suivis depuis de nombreuses années. En effet, il permettra d'alerter sur le besoin, ou non, d'inclure ce type de substances (et éventuellement les antibiorésistances) dans les suivis mis en œuvre par les gestionnaires de l'environnement sur les territoires étudiés.

Concernant le suivi et la gestion de la qualité chimique des cours d'eau, PharmaTOX fournira des éléments d'aide à la décision pour la définition des stratégies d'échantillonnage et d'analyse des substances pharmaceutiques dans ce type de cours d'eau : Faut-il prendre en compte ces substances et si oui, quelles sont celles à analyser en priorité ? Quel(s) compartiment(s) faut-il cibler préférentiellement : l'eau de surface et/ou le compartiment sédimentaire ? Comment appréhender les variations spatio-temporelles et la saisonnalité pour avoir une bonne représentativité de la contamination ?

Concernant le suivi et la gestion des impacts écotoxicologiques, PharmaTOX permettra de tester la pertinence des approches PICT appliquées aux substances pharmaceutiques pour évaluer spécifiquement les effets chroniques de ces contaminants dans les eaux de surface et le compartiment sédimentaire (comme cela a pu être démontré pour certains contaminants tels que les pesticides et les éléments traces métalliques) et de proposer des protocoles pour leur application en milieu lotique (depuis l'échantillonnage jusqu'à l'interprétation des résultats).

Enfin, d'un point de vue sanitaire, PharmaTOX apportera des connaissances nouvelles sur le rôle des cours d'eau étudiés dans la dissémination des antibiorésistances dans l'environnement et l'influence de la contamination par les substances pharmaceutiques sur celle-ci. Il permettra d'évaluer le besoin de mettre en place des mesures de suivi, voire de prévention, de ce matériel génétique qui représente à ce jour une menace environnementale et sanitaire importante.

En complément, l'alimentation des bases de données combinant des données chimiques et fonctionnelles contribuera à poursuivre les démarches visant à établir des seuils de référence (NOR, « normal operating range »), qui sont nécessaires dans le but de développer à terme des indicateurs d'impacts fonctionnels des contaminants dans les écosystèmes aquatiques.

Enfin, la poursuite du suivi de l'évolution des concentrations en PCBs dans les sédiments du Tillet (données nécessaires dans PharmaTOX pour appréhender les liens entre exposition chimique et effets biologiques dans ce compartiment) permettra de prolonger l'évaluation de l'efficacité de la première restauration de ce cours d'eau (2013) et d'alimenter les réflexions en cours concernant le besoin ou non de mettre en œuvre un nouveau projet pour compléter celle-ci.

OBJECTIFS ET METHODOLOGIE (2 p. maxi) :

Les actions prévues visent à :

- sélectionner sur les deux rivières étudiées des stations de prélèvements caractérisées par des niveaux contrastés de contamination en substances pharmaceutiques (i.e. stations de référence vs stations contaminées) sur la base de la connaissance des sources potentielles de ce type de contamination (ex. amont vs aval zone urbaine) et d'analyses réalisées dans le cadre de précédents projets,
- caractériser sur les différentes stations sélectionnées les niveaux de contamination et la distribution (i.e. fraction dissoute *vs* compartiment sédimentaire) d'un large panel de substances pharmaceutiques et compléter ce suivi par la mesure des différents paramètres physico-chimiques (dont les contaminants « historiques ») qui peuvent influencer la réponse des communautés microbiennes à ces substances,
- évaluer spécifiquement l'impact des pharmaceutiques sur les communautés microbiennes benthiques (périmyton et sédiments) en caractérisant leur niveau de tolérance (approche PICT) et de résistance (quantification des antibiorésistances et autres gènes d'intérêt) à ces substances,
- établir le lien entre les niveaux d'exposition mesurés et les caractéristiques microbiennes structurelles et fonctionnelles pour appréhender l'impact des substances pharmaceutiques au regard de la contamination « historique » et des différents paramètres environnementaux.

Deux suivis seront programmés en année 1 (2021) sur chacune des deux rivières étudiées (Ardières et Tillet) afin d'appréhender les variations spatiales (par comparaison des différentes stations sélectionnées sur chaque site) et saisonnières (en considérant si possible une période d'étiage et une période de hautes eaux) des niveaux de contamination et des impacts associés.

L'année 2 sera consacrée à la réalisation des différentes analyses tout en gardant la possibilité de reproduire un ou deux suivis en cas de nécessité scientifique (pour tester certaines hypothèses) ou logistique (en cas par exemple de difficultés liées à des aléas climatiques lors de l'année 1).

Ces suivis feront appel à des compétences pluridisciplinaires en s'appuyant sur la complémentarité des différentes équipes de recherche en chimie, écologie microbienne et écotoxicologie.

Ainsi, **la caractérisation des niveaux de contamination dans les eaux de surface, les sédiments et les MES** sera réalisée par le LAMA (INRAE) concernant les substances pharmaceutiques, les pesticides et les métaux, et par EDYTEM (USMB) concernant les PCBs et les HAPs. Le LAMA réalisera également l'**analyse des nutriments ainsi que la caractérisation de la matière organique dissoute et particulaire**, qui pourrait aider à mieux interpréter l'évolution spatio-temporelle des concentrations en substances pharmaceutiques ainsi que les réponses microbiennes à ces substances (facteurs confondants).

Les experts locaux (CISALB et SMRB) apporteront également des éléments de connaissance précieux concernant l'origine potentielle de cette contamination, notamment en zone urbaine (rejets directs, surverse potentielle du réseau unitaire...).

La quantification, au sein des communautés microbiennes benthiques (périphtyon et sédiment), des gènes impliqués dans différents mécanismes de résistance (incluant l'antibiorésistance) sera réalisée par le CARRTEL (USMB) en collaboration avec Agriculture and AgriFood Canada (AAFC) qui complétera le panel des gènes étudiés (une collaboration de longue date est établie entre ces deux partenaires). En complément, l'équipe EMA (INRAE) mettra en œuvre l'**approche PICT** qui permettra d'évaluer la tolérance de ces communautés microbiennes benthiques à partir de différentes substances pharmaceutiques modèles retrouvées dans les deux sites d'études. **L'étude des gènes de résistance et la mesure des niveaux de tolérance sont des approches novatrices de bioindication** qui permettront d'évaluer si les niveaux d'exposition chronique aux pharmaceutiques auxquels sont soumises les communautés microbiennes sont suffisants pour induire la mise en œuvre de mécanismes d'adaptation spécifiques.

Ces paramètres, qui permettront de mettre en évidence des impacts spécifiques, seront complétés par l'**étude structurelle et fonctionnelle** des communautés benthiques, en combinant une méthode de génotypage (ARISA, USMB-CARRTEL) à la mesure du potentiel génétique fonctionnel (cycle du N, USMB-CARRTEL) et de certaines activités enzymatiques (cycles du N, C et P, INRAE-EMA).

L'ensemble des données chimiques et microbiennes acquises seront bancarisées (et elles serviront également à compléter la base de données initiée dans le cadre du précédent projet CommuSED). Différentes méthodes statistiques multivariées seront mises en œuvre pour établir les liens de causalité entre exposition aux contaminants et réponses microbiennes.

Concernant spécifiquement la question des substances pharmaceutiques, l'étude des réponses spécifiques (gènes de résistance et PICT) ainsi que les conclusions des analyses statistiques multivariées permettront de tester si les niveaux de contamination des eaux de surface et des sédiments sont supérieurs aux seuils (non définis à ce jour) d'exposition suffisants pour induire des effets sur les communautés microbiennes benthiques. Cela permettra également d'identifier quels sont les facteurs environnementaux qui peuvent éventuellement moduler ces effets.

DUREE DU PROJET: 2 ans

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] PESCE S., LYAUTHEY E., NAFFRECHOUX E., FEFFARI B.J.D., DABRIN A., MARGOUM C., MIEGE C., MASSON M., VIVIEN R., BONNINEAU C., 2019. Pression chimique et impacts écologiques : Distribution des contaminants et réponse des communautés de microorganismes et d'invertébrés dans les sédiments de l'Ardières et du Tillet. Action n°54 du Programme 2016 au titre de l'accord cadre Agence de l'Eau ZABR. Rapport Final, 68 p.
- [2] MATHON B., A. TOGOLA, N. MAZZELLA, [...], C. MIEGE, 2019 – Réseau de Surveillance Prospective (RSP) – évaluation de la pertinence des échantilleurs intégratifs passifs (EIP) pour la surveillance des milieux aquatiques - Rapport de synthèse 2019.