



**Gradients spatio-temporels des substances pharmaceutiques et conséquences écologiques en cours d'eau agricole et urbain
(PharmaTOX)**

Rapport final

Action n°75 du Programme 2021 au titre de l'accord cadre Agence de l'Eau ZABR

Stéphane Pesce¹, Cécile Miège¹, Aymeric Dabrin¹, Emilie Lyautey², Christelle Margoum¹, Matthieu Masson¹, Emmanuel Naffrechoux³, Edward Topp^{4,5}, Chloé Bonninea^{1,6}

1. INRAE, UR RiverLy, Villeurbanne (France)
2. CARRTEL, UMR INRAE/USMB, Le-Bourget-du-Lac (France)
3. EDYTEM, UMR CNRS/USMB, Le-Bourget-du-Lac (France)
4. Agriculture and Agri-Food Canada, London Ontario (Canada)
5. Agroécologie, UMR INRAE/Université de Bourgogne/Institut Agro, Dijon (France)
6. INRAE, UR EABX, Cestas (France)

Liste des contributeurs (classés par ordre alphabétique pour chacun des laboratoires):

- **RiverLy**

Laboratoire d'Ecotoxicologie Microbienne Aquatique (EMA)

Chloé Bonnneau, Bernard Motte, Stéphane Pesce, Solène Poulalion, Christophe Rosy, Bernadette Volat

Laboratoire de Chimie des Milieux Aquatique (LAMA)

Pierre Boutet, Corinne Brosse, Aymeric Dabrin, Amandine Daval, Lysiane Dherret, Céline Guillemain, Christelle Margoum, Matthieu Masson, Cécile Miège, Loïc Richard

- **CARRTEL**

Emilie Lyautey

- **Edytem**

Nathalie Cottin, Emmanuel Naffrechoux

- **Agriculture and Agri-Food Canada**

Yuan-Ching Tien, Edward Topp

Remerciements:

Les auteurs remercient **l'ensemble des contributeurs cités ci-dessus**, qui ont participé aux campagnes d'échantillonnage et/ou ont réalisé l'ensemble des analyses chimiques et biologiques présentées.

Nous remercions également Lionel Navarro (**Agence de l'eau RM&C**), pour son accompagnement lors du montage et le suivi de ce projet, **le Comité Intercommunautaire pour l'Assainissement du Lac du Bourget (CISALB)** et en particulier Sebastian Cachera, responsable de la gestion des milieux aquatiques au sein de celui-ci, ainsi que le **Syndicat Mixte des Rivières du Beaujolais (SMRB)** et en particulier Alice Patissier et Grégoire Thévenet, respectivement chargée de mission qualité de l'eau et responsable du SMRB, pour leur participation active aux réunions de pilotage et de restitution et les informations fournies concernant les sites d'études.

Sommaire

1. Contexte général	4
1.1 La contamination des milieux aquatiques par les mélanges de polluants chimiques menace la biodiversité et le fonctionnement de ces écosystèmes	4
1.2 Les substances pharmaceutiques sont considérées comme des contaminants d'intérêt émergent....	4
1.3 Les substances pharmaceutiques peuvent impacter les communautés aquatiques microbiennes dans les écosystèmes contaminés	6
1.4 L'approche PICT (Pollution Induced Community Tolerance) peut être un outil de diagnostic de la pression chimique par les substances pharmaceutiques sur les communautés microbiennes benthiques.....	7
1.5 La contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques est suspectée de contribuer à la dissémination environnementale de la résistance aux antibiotiques.....	8
2 Objectifs du projet PharmaTOX	8
3 Caractéristiques des sites d'étude	9
3.1 L'Ardières.....	9
3.2 Le Tillet	10
4 Stratégie d'échantillonnage et d'analyses	11
4.1 Campagnes d'échantillonnage	11
4.1.1 Calendrier et stations d'échantillonnage	11
4.1.2 Mesures <i>in situ</i> , déploiement des outils et échantillonnage	12
4.2 Analyses physico-chimiques réalisées au laboratoire	12
4.3 Analyses biologiques	13
4.3.1 Tolérance des communautés microbiennes périphytiques et sédimentaires à des substances pharmaceutiques modèles (approche PICT)	13
4.3.2 Abondance de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et autres stress toxiques	13
4.3.3 Structure et diversité des communautés microbiennes bactériennes et archéennes	14
4.3.4 Potentiel fonctionnel des communautés microbiennes périphytiques et sédimentaires	14
5 Résultats	14
5.1 Contamination par les substances pharmaceutiques.....	14
5.1.1 Contamination des eaux de surface	14
5.1.2 Contamination des sédiments	15
5.2 Autres contaminations chimiques.....	17
5.2.1 Pesticides (eaux de surface)	17
5.2.2 PCBs (sédiments)	17
5.2.3 HAPs (sédiments)	18
5.2.4 Eléments traces métalliques (eaux de surface et sédiments)	19
5.3 Tolérance des communautés microbiennes aux substances pharmaceutiques modèles.....	20
5.3.1 Tolérance des communautés périphytiques	20
5.3.2 Tolérance des communautés sédimentaires	22
5.4 Abondance de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et autres stress toxiques	22
5.4.1 Gènes de résistance au sein des communautés périphytiques	22
5.4.2 Gènes de résistance au sein des communautés sédimentaires	24
5.5 Diversité et structure des communautés microbiennes bactériennes et archéennes.....	25
5.5.1 Diversité et structure des communautés périphytiques	25
5.5.2 Diversité et structure des communautés sédimentaires	27
5.6 Potentiel fonctionnel des communautés périphytiques et sédimentaires	27
5.6.1 Activités enzymatiques et efficacité photosynthétique des communautés périphytiques	27
5.6.2 Activités enzymatiques et métaboliques des communautés sédimentaires	28

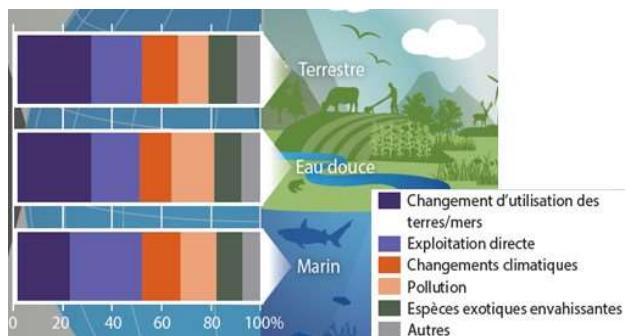
6 Discussion	30
6.1 Influence de la pression chimique par les substances pharmaceutiques sur la tolérance et la résistance des communautés microbiennes benthiques à ces substances	30
6.1.1 Concentration et distribution des substances pharmaceutiques dans les différents compartiments aquatiques	30
6.1.2 Tolérance et résistance des communautés microbiennes benthiques aux substances pharmaceutiques	31
6.1.2.1 Approche PICT	31
6.1.2.2 Quantification de gènes de résistance aux antibiotiques	33
6.2 Influence du contexte de multi-contamination sur les caractéristiques structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes benthiques.....	35
6.2.1 Contexte de multi-contamination dans les deux cours d'eau	35
6.2.2 Conséquences sur les caractéristiques structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes benthiques	36
7 Principales conclusions	38
Références bibliographiques	39
Annexe 1 : Liste des contaminants chimiques analysés dans le projet	48
Annexe 2 : Caractéristiques physico-chimiques des stations	49
Annexe 3 : Concentrations en caféine dans les eaux de surface et les sédiments	50

1. Contexte général

1.1 La contamination des milieux aquatiques par les mélanges de polluants chimiques menace la biodiversité et le fonctionnement de ces écosystèmes

La préservation et la restauration de la biodiversité sont essentielles pour garantir la santé des écosystèmes, des hommes et des animaux et promouvoir le développement durable (Cardinale et al., 2012). Cependant, il est clairement établi que la biodiversité des eaux douces est menacée, en particulier dans les ruisseaux et les rivières, qui sont confrontés à de multiples facteurs de stress environnementaux naturels et anthropiques (Albert et al., 2021). Il est désormais largement reconnu que la pollution chimique, qui contribue au dépassement des frontières planétaires dans lesquelles l'humanité peut continuer à se développer (Persson et al., 2022), est l'un des principaux facteurs responsables de la perte de biodiversité (Groh et al., 2022). Dans leur rapport publié en 2019, les experts scientifiques impliqués dans la plateforme intergouvernementale scientifique et politique sur la biodiversité et les services (IPBES) estiment ainsi que la pollution chimique est le deuxième ou troisième facteur directement responsable du déclin de la nature (derrière le changement d'utilisation des sols et devant les changements climatiques; Fig. 1 ; IPBES, 2019).

Fig. 1 : Estimation de l'influence relative des principaux facteurs directs sur les déclins observés dans la nature au niveau mondial (IPBES, 2019)



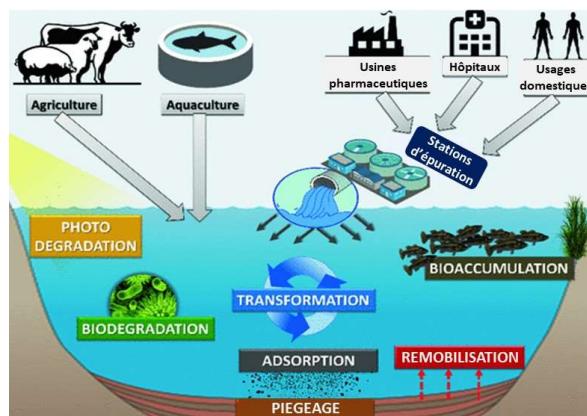
La plupart des cours d'eau pollués sont soumis à des pressions chimiques qui résultent de mélanges de différents types de contaminants (éléments traces métalliques, pesticides, substances pharmaceutiques, etc.), tant en milieu urbain (Robinson et al., 2023) qu'en milieu rural (Fernández-Fernández et al., 2023). Ce contexte de contamination multiple n'épargne pas les cours d'eau situés sur les territoires couverts par la zone atelier du bassin du Rhône (ZABR). Cela avait été par exemple démontré dans le cadre du projet CommuSED (Action n°54 du Programme 2016 au titre de l'accord cadre Agence de l'Eau ZABR) sur les deux sites d'études qui font l'objet du présent rapport : l'Ardières et le Tillet (Pesce et al., 2019).

1.2 Les substances pharmaceutiques sont considérées comme des contaminants d'intérêt émergent

Parmi les contaminants chimiques issus des différentes activités anthropiques, les substances pharmaceutiques sont utilisées en médecine humaine et animale à des fins préventives, thérapeutiques, ou de diagnostic. Les sources de contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques sont multiples (Klimaszek et Rzymski, 2018 ; Fig. 2), les mieux connues transitant vers les stations de traitement des eaux usées (STEU) où ces substances ne sont éliminées que partiellement et sont rejetées en continu dans les milieux récepteurs (rivières ou lacs) via les effluents (Miège et al., 2009). Une étude récente, concernant 1052 sites de prélèvement dans 258 rivières réparties dans 104 pays couvrant l'ensemble des continents, a souligné l'ampleur mondiale de ce problème, en montrant notamment que pour plus de 25% des échantillons, les concentrations en résidus pharmaceutiques excédaient les seuils à risque pour les organismes aquatiques (Wilkinson et al., 2022).

La plupart des milieux aquatiques français sont touchés par ce type de contamination, qui inclut des résidus de médicaments issus de différentes familles. Parmi ceux-ci, certains antibiotiques sont particulièrement bien représentés. C'est le cas notamment du sulfamide sulfaméthoxazole et de la fluoroquinolone ofloxacin. Les données issues du système d'information sur l'eau (SIE) rapportent ainsi que ces deux substances sont quantifiées respectivement dans 60% (n=331) et 39% (n=126) des échantillons d'eau de surface, 12% (n=25) et 46% (n=25) des échantillons de sédiment et 47% (n=32) et 45% (n=20) des échantillons de biofilms périphytiques (ANSES, 2020). En France, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont également très présents dans les milieux aquatiques, et notamment le diclofénac, qui a été détecté dans 29 % des échantillons d'eau de surface analysés entre 2007 et 2018 (ANSES, 2019).

Fig. 2 : Introduction et devenir des substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques (adapté de Klimaszky et Rzymski, 2018)



Face à ce constat d'une contamination généralisée des écosystèmes aquatiques par les substances pharmaceutiques, les Etats membres de l'Union Européenne (UE) ont décidé de mettre en place ces dernières années différentes mesures visant à mieux évaluer et réduire les risques et effets écotoxicologiques de ces substances. Cela s'est traduit par exemple par la promulgation en 2019 d'une stratégie européenne concernant spécifiquement les substances pharmaceutiques (European Commission, 2019) et par l'inclusion de 10 d'entre elles (4 antibiotiques, 3 antimycosiques, 1 antidiépresseur, 1 antidiabétique et 1 antiparasitaire) et 2 de leurs produits de transformation (Tableau 1) dans la dernière version (juillet 2022) de la liste de surveillance de l'UE (i.e. 'watchlist') des composés nécessitant davantage de données pour adapter la réglementation (directive 2013/39/UE ; révisée en 2020 et 2022). La réduction de la pollution et le renforcement de l'évaluation des risques environnementaux liés aux substances pharmaceutiques constituent également un objectif explicite de la stratégie de l'UE en matière de biodiversité à l'horizon 2030 (CE, 2020).

Tableau 1 : Liste des substances pharmaceutiques (et leurs produits de transformation) actuellement répertoriées dans la liste de surveillance de l'Union Européenne (i.e. 'watchlist') des composés nécessitant davantage de données pour adapter la réglementation (directive 2013/39/UE)

Nom de la substance	Année d'inclusion dans la liste	Classe thérapeutique
Clindamycine	2022	Antibiotique
Ofloxacine	2022	Antibiotique
Sulfaméthoxazole	2020	Antibiotique
Triméthoprime	2020	Antibiotique
Venlafaxine	2020	Antidépresseur
O-desméthylvenlafaxine	2020	Produit de transformation (venlafaxine)
Metformine	2022	Antidiabétique
Guanylurea	2022	Produit de transformation (metformine)
Fipronil	2022	Antiparasitaire
Clotrimazole	2020	Antimycosique
Fluconazole	2020	Antimycosique
Miconazole	2020	Antimycosique

1.3 Les substances pharmaceutiques peuvent impacter les communautés aquatiques microbiennes dans les écosystèmes contaminés

Les risques écotoxicologiques associés à la contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques sont étudiés depuis plus de 30 ans, en considérant différents types d'organismes modèles (phytoplancton, zooplancton, poissons, etc ; voir par exemple la revue de [Fent et al., 2006](#)). Les études menées ces dernières années à des niveaux de complexité biologique plus élevés ont notamment permis de montrer que les impacts chroniques de ces substances sur les communautés aquatiques pouvaient avoir des répercussions sur la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes ([Klimaszek et Rzymski, 2018](#) ; [Patel et al., 2019](#)). En particulier, il existe un nombre croissant d'articles scientifiques qui mettent en évidence l'existence d'effets chroniques sur les communautés microbiennes présentes dans ces milieux sous forme d'assemblages benthiques qui se développent à la surface de divers supports immergés (roches, sédiments de surface, litières végétales... ; **Fig. 3**) et qui sont communément appelés biofilms (voir pour revue récente [Lecomte et al., 2023](#)).

Fig. 3 : Illustration de différents types de supports permettant la colonisation et la croissance des communautés microbiennes benthiques (adaptée de [Pesce et al., 2021a](#))



Ces biofilms, qui regroupent différents types de microorganismes (microalgues, bactéries, champignons, virus, microfaune ; [Pesce et al., 2021a](#)), assurent de nombreuses fonctions écologiques dans les écosystèmes aquatiques (fourniture d'une ressource nutritive pour de nombreux macro-organismes ; régulation des cycles du carbone et de nutriments à travers leur activité de décomposition et minéralisation de la matière organique dissoute et particulaire ; épuration naturelle des milieux ; etc.). Les communautés microbiennes sont également des acteurs majeurs du devenir des contaminants chimiques le long du continuum sol-eau-sédiment, y compris concernant le cas particulier des substances pharmaceutiques. En effet, elles peuvent bioaccumuler ces substances ([Bonnineau et al., 2020](#)) et, pour certaines d'entre elles, les biodégrader, comme cela a été mis en évidence dans la thèse de Loren Billet avec l'antibiotique sulfaméthazine, tant dans des sols agricoles que dans des sédiments de rivière ([Billet, 2021](#)).

S'il a été démontré pour certaines substances que les concentrations environnementales détectées dans les cours d'eau les plus contaminés (de l'ordre de quelques centaines de ng/L à quelques µg/L ; [Wilkinson et al., 2022](#)) pouvaient avoir un impact sur la structure ou les activités des communautés microbiennes benthiques (ex. [Bonnineau et al., 2010](#) ; [Lawrence et al., 2007, 2012](#) ; [Paumelle et al., 2021](#) ; [Kergoat et al., 2021](#) ; [Pesce et al., 2021b](#)), les connaissances actuelles se basent quasi exclusivement sur des études réalisées dans des conditions expérimentales de laboratoire, à partir d'une exposition contrôlée (et généralement mono-substance). Quelques suivis menés dans des rivières contaminées par des mélanges de polluants chimiques incluant des substances pharmaceutiques (issues le plus souvent de rejets hospitaliers et/ou urbains) semblent tout de même confirmer l'impact possible de ces contaminants sur la biodiversité et le fonctionnement des biofilms microbiens exposés à ces mélanges (ex. [Proia et al., 2013](#) ; [Chonova et al., 2018](#)).

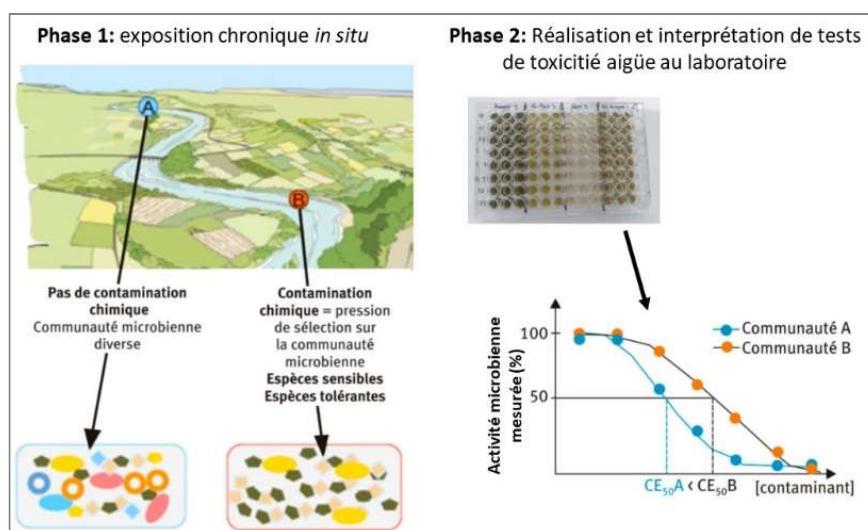
Cependant, il est toujours difficile dans ce type d'études de dissocier l'impact des substances pharmaceutiques de celui exercé par les autres facteurs environnementaux, tels que les autres stress toxiques (du fait de la présence d'autres familles de polluants) ou les stress physiques (ex. variation de température ou de régime hydrologique).

1.4 L'approche PICT (Pollution Induced Community Tolerance) peut être un outil de diagnostic de la pression chimique par les substances pharmaceutiques sur les communautés microbiennes benthiques

Une des méthodes développée en écotoxicologie microbienne pour être en mesure d'établir des liens de causalité entre les niveaux d'exposition aux polluants chimiques et les réponses microbiennes observées est l'approche PICT (Pollution induced community tolerance), proposée initialement par [Blanck et al. \(1988\)](#). Cette méthode repose sur le concept selon lequel des communautés microbiennes exposées chroniquement à un contaminant deviennent plus tolérantes à sa toxicité (ou à la toxicité de substances présentant un mode d'action similaire) du fait de phénomènes d'adaptation inter-spécifiques (ex. sélection des espèces les plus tolérantes ou résistantes au sein des communautés) ou intra-spécifiques (ex. mise en place de mécanismes physiologiques ou génétiques de tolérance ou de résistance). Réalisée *in situ*, elle repose sur un protocole en deux étapes qui consiste d'abord en une phase d'exposition chronique dans le milieu, suivie par la réalisation au laboratoire de tests de toxicité aigüe à partir de la mesure d'une activité microbienne choisie (ex. activité photosynthétique, activité enzymatique, respiration). Les résultats de ces tests sont modélisés sous la forme de courbe dose-réponse qui permettent la détermination de seuils de toxicité (tels que la concentration efficace inhibant 50 % de l'activité mesurée, CE_{50}) qui sont ensuite utilisés pour comparer les niveaux de tolérance entre différentes communautés ([Fig. 4](#) ; [Tlili et al., 2016](#) ; [Pesce et al., 2021a](#)).

Fig. 4 : Illustration du principe de l'approche PICT
(adaptée de [Pesce et al., 2021a](#))

CE_{50} : concentration efficace inhibant 50 % de l'activité mesurée



A ce jour, la méthode PICT a principalement été appliquée *in situ* pour étudier l'impact de pesticides (en particulier des herbicides ; ex. [Pesce et al., 2010](#)) et d'éléments traces métalliques (ex. [Tlili et al., 2011a](#)). Cependant, quelques travaux montrent que cette application *in situ* pourrait être étendue aux substances pharmaceutiques, seules (ex. anti-inflammatoires non stéroïdiens ibuprofène et diclofénac ; [Corcoll et al., 2014](#)) ou en mélange avec d'autres contaminants tels que les pesticides ([Tlili et al., 2020](#)).

1.5 La contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques est suspectée de contribuer à la dissémination environnementale de la résistance aux antibiotiques

Si elles ont largement contribué à l'augmentation de l'espérance de vie humaine et animale, la découverte et l'utilisation massive des antibiotiques ont favorisé l'émergence et la dissémination de la résistance à la plupart de ces substances (Lecomte et al., 2023). Initialement mises en évidence dans les milieux hospitaliers, les résistances aux antibiotiques ont très rapidement été détectées dans les différents compartiments environnementaux composant les écosystèmes terrestres et aquatiques (sol, eau souterraine, eau de surface et sédiment).

Il est désormais admis que les bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) et les gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) sont devenus omniprésents dans les écosystèmes aquatiques en particulier dans les biofilms périphytiques (Guo et al., 2018) et les sédiments (Calero-Cáceres et al., 2017). Les niveaux d'abondance de BRA et GRA mesurés reflètent généralement les niveaux de pressions anthropiques, notamment à l'aval de rejets de stations de traitement des eaux usées - STEU (Proia et al., 2016). Plusieurs auteurs ont également alerté sur la nécessité de prendre en considération le risque de développement des BRA et des GRA au sein des communautés microbiennes naturelles dans les procédures d'évaluation du risque environnemental associé aux antibiotiques (Bengtsson-Palme et Larsson, 2016 ; Tell et al., 2019). Toutefois, bien que questionnée fréquemment, l'influence de l'exposition des communautés microbiennes aux substances pharmaceutiques (et en particulier aux antibiotiques) sur la sélection des BRA et la dispersion de GRA dans les milieux aquatiques reste encore relativement controversée. Ainsi, si certains travaux rapportent des corrélations positives entre les concentrations d'antibiotiques et l'abondance de GRA dans certains environnements, incluant des rivières urbaines, ce type de constat n'est pas toujours vérifié (Aubertheau et al., 2017 ; Li et al., 2020 ; Matviichuk et al., 2022, 203).

Un rapport d'expertise collective publié par l'ANSES en 2020 dresse un bilan des causes possibles de la contamination des milieux en France par les BRA et les GRA (ANSES, 2020). Sur la base de ce rapport, il est maintenant bien établi que la pollution chimique en général, et celle par les substances pharmaceutiques (surtout les substances antibiotiques) en particulier, contribue à exercer dans les différents compartiments environnementaux des conditions co-sélectrices favorables à la constitution d'un réservoir de résistances aux antibiotiques. Si ce rapport suggère que les concentrations en antibiotiques mises en évidence dans le contexte français ne sont vraisemblablement pas suffisantes pour favoriser à elles seules la survie des BRA et la persistance des GRA dans les milieux aquatiques contaminés, certaines études stipulent le contraire. Par exemple, Haenni et al. (2022) estiment que les antibiotiques fluoroquinolones et le triméthoprime présentent en France un risque élevé et moyen de favoriser la sélection de bactéries résistantes dans les eaux usées traitées et dans les rivières les plus contaminées. De nombreuses études réalisées sur des communautés microbiennes benthiques (périphytiques et sédimentaires) dans des milieux aquatiques français contaminés (notamment en aval de rejets de stations d'eau) font état d'une cooccurrence marquée entre différents types d'antibiotiques (et autres substances pharmaceutiques) et d'un large spectre de gènes de résistance aux antibiotiques questionnant sur les possibles relations de cause à effets (Aubertheau et al., 2017 ; ANSES, 2020).

2 Objectifs du projet PharmaTOX

Les suivis réalisés en 2017 et 2018 lors du projet CommuSED (Action Agence de l'Eau-ZABR n°54; Pesce et al., 2019) ont mis en évidence dans les eaux de surface de l'Ardières (située au cœur du Beaujolais) et du Tillet (affluent du lac du Bourget) des concentrations en substances pharmaceutiques jusqu'alors insoupçonnées. Les niveaux de contamination observés dans les zones situées en aval (sur la base de 23 substances pharmaceutiques recherchées) étaient ainsi comparables à ceux fréquemment retrouvés dans des sites à forte pression urbaine et industrielle.

Ces résultats étaient assez inattendus compte tenu du fait que l’Ardières est située dans une zone viticole sans pression d’élevage et avec une pression urbaine limitée (la plus grosse ville, dotée d’un hôpital et d’une STEU, est Beaujeu, ~2000 habitants) et que le Tillet, bien que situé en zone urbaine, ne reçoit pas directement de rejets de STEU.

Ce constat 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 éléments traces métalliques 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, porteur de nombreux enjeux socio-économiques (pêche, tourisme, alimentation en eau potable, etc.) représente un milieu récepteur pour lequel il n’existe que peu de connaissances concernant la contamination par les substances pharmaceutiques.

Dans ce contexte, le projet PharmaTOX ambitionnait donc de mettre en œuvre une approche interdisciplinaire (chimie environnementale, biologie moléculaire, écologie et écotoxicologie microbienne) afin :

- de mieux caractériser le gradient spatio-temporel des substances pharmaceutiques (en élargissant la gamme de molécules considérées et en y intégrant notamment des perturbateurs endocriniens) et leur distribution entre les eaux de surface et le compartiment sédimentaire, en replaçant cette contamination dans un contexte de contamination multiple (pesticides, éléments traces métalliques, PCBs, etc.) ;
- 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 ;
- d’évaluer, à partir d’une approche de metabarcoding, si les changements éventuels de tolérance des communautés microbiennes aux substances pharmaceutiques sont la résultante de changements de structure et de diversité au sein des communautés de bactéries et d’archées ;
- de compléter ces analyses par une étude du potentiel fonctionnel des communautés microbiennes benthiques afin de faire le lien entre l’état physiologique de ces communautés et leur niveau d’exposition aux différents contaminants chimiques présents dans les cours d’eau étudiés.

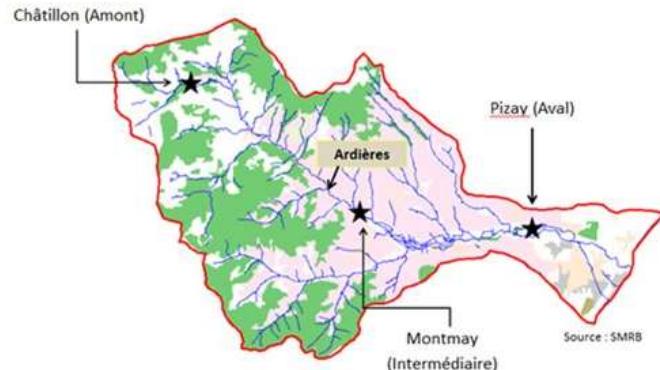
D’un point de vue opérationnel, PharmaTOX visait également à apporter des éléments de connaissance et d’aide à la décision pour une meilleure gestion de la qualité chimique, écotoxicologique et sanitaire des cours d’eau étudiés, en fonction des enjeux territoriaux, *via* notamment la prise en compte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

3 Caractéristiques des sites d’étude

3.1 L’Ardières

L’Ardières est le cours d’eau principal du site atelier Ardières-Morcille (SAAM ; <https://saam.hub.inrae.fr/>), labellisé par la Zone Atelier du Bassin du Rhône (ZABR) en 2007. Située dans le département du Rhône, au nord de la zone viticole du Beaujolais, cette rivière s’écoule sur un linéaire de près de 29 kilomètres avant de se jeter dans la Saône, à proximité de Belleville (Fig. 5).

Fig. 5 : Description du bassin versant de l'Ardières avec localisation des trois stations d'échantillonnage
(adaptée de [Le Dréau et al., 2015](#))

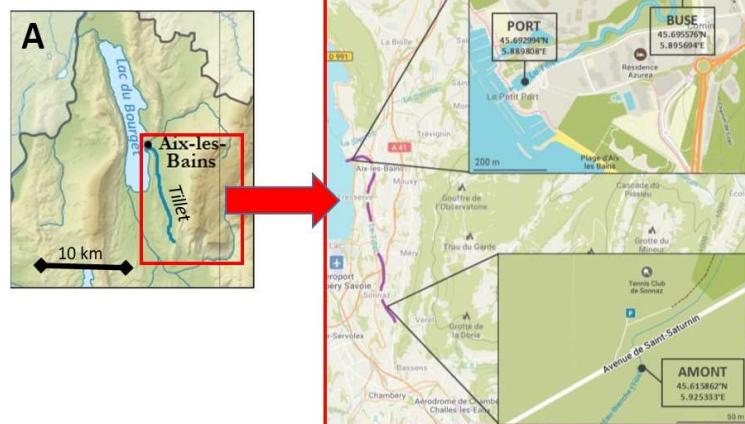


Son bassin versant, d'une superficie de 220 km², est le plus grand du Beaujolais. Sa zone aval est très majoritairement recouverte de vigne, ce type de culture occupant environ 32 % de la superficie totale du bassin versant. Le reste de la superficie, qui se situe principalement en zone amont, est essentiellement occupée par des forêts et des prairies. De ce fait, ce site atelier a surtout fait l'objet d'études visant à caractériser le devenir et les impacts des principaux produits phytopharmaceutiques (pesticides organiques et cuivre) utilisés en viticulture (voir pour revues [Montuelle et al., 2010](#) ; [Gouy et al., 2021](#)). Néanmoins, l'Ardières reçoit également les effluents de la station de traitements des eaux usées (STEU) de Beaujeu (~2000 habitants) et, plus ponctuellement, des eaux usées non traitées via des déversoirs d'orage, qui sont au nombre de 10 et qui sont, pour certains, sous-dimensionnés ([RPQS Beaujeu, 2021](#)).

3.2 Le Tillet

Le Tillet est un cours d'eau situé dans le département de la Savoie, au pied du massif des Bauges. Il présente un linéaire de 13 kilomètres environ jusqu'à son embouchure qui se trouve à Aix-les-Bains (Savoie), sur la rive est du lac du Bourget (**Fig. 6**). Son bassin versant recouvre une superficie de 50 km² incluant des zones urbaines, agricoles et industrielles. Il recueille les eaux pluviales d'une partie de la ville d'Aix-les-Bains dans laquelle se trouvent différentes activités thermales. Sur la commune d'Aix-les-Bains, après un partage initial des eaux au niveau du départ de l'entonnoir traversant la commune de Tresserve, le Tillet présente un linéaire canalisé souterrain d'environ 2800 m, puis un linéaire non canalisé d'environ 700 m où il s'écoule en surface avant de se déverser dans le Lac du Bourget.

Fig. 6 : Description du bassin versant du Tillet avec localisation des trois stations d'échantillonnage



Jusqu'en 2014, le Tillet représentait la principale source de PCB pour le lac du Bourget du fait d'une pollution historique due à l'activité entre 1945 et 1985 d'un site industriel localisé à Aix-les-Bains et spécialisé dans la production de transformateurs électriques ("Société Savoisiennes de Constructions Electriques", puis "Alsthom-Savoisiennes" à partir de 1964).

Les apports de PCB dans le lac depuis le Tillet ont pu être très fortement réduits suite à une dépollution de la majeure partie du site industriel (alors propriété de *Alstom Grid*) entre octobre 2009 et mars 2013 (curage des réseaux hydrauliques internes du site industriel permettant l'élimination hors site de plus de 50 tonnes de sédiments soit 750 kg de PCB) et à une restauration de la partie aval du cours d'eau, entre avril 2013 et mai 2014. Ce cours d'eau a donc fait l'objet de nombreuses études ciblées sur cette problématique particulière des PCB (Naffrechoux et al., 2017 ; Masset, 2019 ; Armani et al., 2021).

4 Stratégie d'échantillonnage et d'analyses

4.1 Campagnes d'échantillonnage

4.1.1 Calendrier et stations d'échantillonnage

Deux campagnes d'échantillonnage ont été réalisées en 2021 sur chacun des sites d'études (Ardières et Tillet) en considérant 3 stations d'échantillonnage sur chacun de ces sites afin de tenir compte du gradient de pression anthropique le long de chaque bassin versant. Les dates des différentes campagnes sont décrites dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Calendrier des 4 campagnes d'échantillonnage (EIP = échantilleurs intégratifs passifs)

Site	Suivi	Date de pose (substrats périphyton + EIP) + mesures physico-chimiques	Date de renouvellement (EIP) + mesures physico-chimiques	Date de collecte/échantillonnage (périphyton, sédiment, EIP) + mesures physico-chimiques
Tillet	Hiver/Printemps 2021	01/03/2021	15/03/2021	29/03/2021
Ardières	Printemps 2021	19/04/2021	03/05/2021	17/05/2021
Ardières	Eté/Automne 2021	30/08/21	13/09/21	27/09/2021
Tillet	Automne 2021	18/10/21	02/11/21	15/11/2021

Les deux suivis sur l'Ardières ont été réalisés en avril/mai et septembre 2021 afin de tenir compte des variations saisonnières liées à différents facteurs tels que la saisonnalité des usages domestiques de médicaments et produits de soin, des usages de pesticides dans le cadre des pratiques viticoles ou encore des conditions hydrologiques. Ainsi, ces deux suivis ont été réalisés respectivement en période de hautes eaux (avril/mai) et d'étiage (septembre).

Trois stations, réparties sur tout le linéaire de l'Ardières ont été sélectionnées, afin d'appréhender le gradient de contamination induit par la pression anthropique issue de la viticulture, de l'urbanisation et, dans une moindre mesure, du trafic routier (Fig. 5):

- Un point '**amont A'** (Chatillon), sans vigne, ni axe routier majeur aux alentours, considéré comme point de référence « peu pollué » (coordonnées N 46° 11' 11.077" E 4° 31' 54.677") ;
- Un point '**intermédiaire**' (Montmay) correspondant à une surface en vigne en amont de moins de 20% de la surface totale du bassin et situé en aval de la ville de Beaujeu (> 2000 habitants) et du rejet de sa STEU (N 46° 07' 57.895" E 4° 37' 29.082") ;
- Un point '**aval'** (Pizay) avec une occupation en vigne en amont supérieure à 30% de la surface totale du bassin (N 46° 07' 39.982" E 4° 42' 45.547").

Les deux suivis sur le Tillet ont été réalisés en mars et octobre/novembre 2021 afin de tenir compte également des possibles variations saisonnières des conditions hydrologiques et des usages domestiques de médicaments et produits de soin. Trois stations ont été considérées (Fig. 6):

- Un point '**amont T'**, situé à une dizaine de kilomètres en amont d'Aix-les-Bains (~30000 habitants), dans une zone relativement préservée de la pollution urbaine et industrielle. ('amont' ; N 45° 36' 57.11" E 5° 55' 31.32") ;
- Un point '**buse**', situé à l'entrée de la zone aval restaurée du Tillet, au niveau de l'exutoire de la buse en béton qui canalise le Tillet sous la ville d'Aix-les-Bains, sur une distance d'environ 3 km. ('buse' ; N 45° 41' 44.10" E 5° 53' 44.76") ;
- Un point '**port**', situé à l'entrée du port à barques aménagé en 2014 lors de la restauration du Tillet, qui représente une zone de dépôt et de stockage des particules et des sédiments qui transitent par le Tillet ('Port' ; N 45° 41' 36.58" E 5° 53' 27.45").

4.1.2 Mesures *in situ*, déploiement des outils et échantillonnage

Lors de chaque campagne (i.e. pour chaque rivière et pour chaque station), nos équipes se sont rendues trois fois sur site, environ toutes les deux semaines, pendant 1 mois (**Tableau 2**).

Lors de chacune des 3 visites sur sites, des mesures ponctuelles ont été réalisées à l'aide de sondes afin de déterminer le pH, la température, la conductivité et la teneur en oxygène dissous.

Des échantillonneurs passifs (**Fig. 7**) de types TSP (Tige Silicone Polaire), POCIS (*Polar Organic Chemical Integrative Sampler*) et DGT (*Diffusive Gradients in Thin films*) ont été utilisés pour obtenir une estimation moyennée sur la durée d'exposition des concentrations dissoutes en pesticides (TSP), substances pharmaceutiques (POCIS) et métaux (DGT, qui permet de piéger la fraction labile, c'est-à-dire sous formes d'ions libres et/ou de petits complexes inorganiques dans l'eau, qui ne représente qu'une fraction du dissous). Ils ont été immergés dans des cagettes lors de la 1^{ère} visite et pour une durée de deux semaines environ (série 1), puis renouvelés selon la même stratégie (immersion pendant les deux semaines suivantes ; série 2).

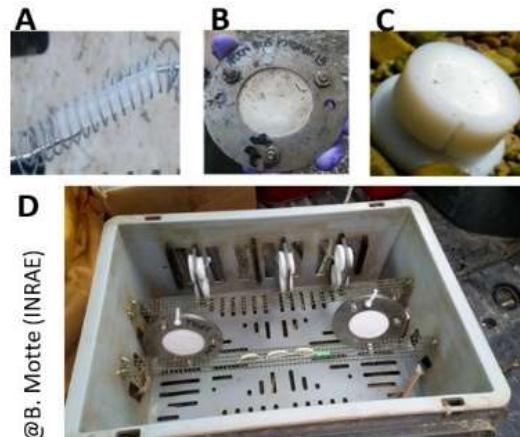


Fig. 7: Illustration des échantillonneurs passifs utilisés pour caractériser la contamination chimique des eaux : TSP (A), POCIS (B), DGT (C) et dispositif utilisé pour leur immersion *in situ* (D)

Lors de la visite initiale, des lames de verre (9x27 cm) ont également été immergées dans des cagettes identiques à celles utilisées pour les échantillonneurs passifs (**Fig. 7D**) afin de permettre la colonisation et la croissance des biofilms pendant toute la durée des différentes campagnes (i.e. environ 1 mois). Lors de la visite finale, les cagettes ont été récupérées afin de collecter l'ensemble des échantillonneurs passifs (série 2) et des lames colonisées par le biofilm périphytique. En complément, des sédiments de surface (profondeur <5 cm) ont été prélevés et tamisés à 2 mm directement sur le terrain, en considérant pour chacune des stations d'échantillonnage trois réplicats indépendants, séparés de quelques mètres dans le cours d'eau.

4.2 Analyses physico-chimiques réalisées au laboratoire

La liste des contaminants chimiques analysés dans les eaux de surface (à partir des extraits issus des différents échantillonneurs passifs) et dans les sédiments, ainsi que les techniques mises en œuvre pour ces analyses sont fournies en **Annexe 1**. Pour les eaux de surface, ces analyses concernent ainsi 35 pesticides et produits de transformation (TSP), 45 substances pharmaceutiques (POCIS) et 11 éléments traces métalliques (DGT).

La caractérisation physico-chimique des sédiments a permis de déterminer pour chaque échantillon la granulométrie (par tamisage en considérant quatre catégories : sable grossier > 500 µm ; sable moyen 200-500 µm ; sable fin 50-200 µm ; argile, limon < 50 µm) ainsi que le pourcentage de matière organique (estimé par perte au feu). En complément, la contamination des sédiments a été caractérisée à travers les analyses des substances pharmaceutiques (n=39), des éléments traces métalliques (n=11), des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP, n=15) et des polychlorobiphényles (PCB) en ciblant les PCB indicateurs (PCBi, n=7) (la liste des substances analysées est fournie en **Annexe 1**).

4.3 Analyses biologiques

L'ensemble des analyses microbiennes concernant les communautés périphytiques et sédimentaires a été réalisé en considérant trois réplicats indépendants. Avant ces analyses, les biofilms périphytiques ont été mis en suspension dans l'eau de leur site d'origine après avoir été décrochés délicatement des lames de verre à l'aide d'une lame de rasoir.

4.3.1 Tolérance des communautés microbiennes périphytiques et sédimentaires à des substances pharmaceutiques modèles (approche PICT)

L'approche PICT s'appuie sur la mesure au laboratoire du niveau de tolérance à un contaminant modèle (choisi a priori) grâce à la réalisation de tests de toxicité aiguë sur les communautés naturelles issues du milieu aquatique. Cela permet ainsi d'observer, sur des durées courtes d'exposition (de quelques heures généralement), l'inhibition d'une fonction biologique à l'échelle de la communauté en réponse à des doses croissantes du toxique testé.

Les couples 'substance modèle – activité microbienne' pris en considération pour les mesures PICT avec les deux types de communautés (périphytiques et sédimentaires), ainsi que les gammes de concentrations testées et les durées d'exposition sont décrits dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : Description des tests de toxicité réalisés pour les approches PICT

Communauté	Substance modèle	Activité mesurée	Concentrations testée	Exposition
Périmyton	Aténolol	Rendement photosynthétique	100 – 6700 mg/L (conc. finale)	4 heures
Périmyton	Diclofénac (sel de sodium)	Rendement photosynthétique	0,5 – 1700 mg/L (conc. finale)	4 heures
Périmyton	Oflaxacine	Activité bêta-glucosidase	6 – 370 mg/L (conc. finale)	4 heures
Sédiment	Oflaxacine	Activité bêta-glucosidase	210 – 150000 mg/L (conc. solution)	4 heures
Sédiment	Sulfaméthazine (sel de sodium)	Activité bêta-glucosidase	2 – 2000 mg/L (conc. solution)	4 heures

Pour chacun de ces couples, une courbe dose-réponse a été ajustée aux données issues des tests de toxicité en sélectionnant le meilleur modèle parmi différents modèles classiquement utilisés (log-logistique, Weibull, Brain-Cousens), à l'aide du logiciel R (packages drc et ggplot2, [R core team 2021](#), [Ritz et al. 2015](#), [Wickham 2016](#)). Les concentrations efficaces médianes (CE_{50}) obtenues à partir du meilleur modèle ont été comparées par la technique du chevauchement des intervalles de confiance à 95% ([O'Brien & Yi, 2016](#)) : si ceux-ci ne se chevauchent pas, on peut conclure que les CE_{50} concernées sont significativement différentes ($P < 0,05$).

4.3.2 Abondance de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et autres stress toxiques

Différents gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et à d'autres stress toxiques ont été quantifiés au sein de communautés périphytiques et sédimentaires à partir d'une approche de PCR quantitative en temps réel (qPCR). Ces gènes ($n=13$) et leur(s) résistance(s) associée(s) sont décrits dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Liste des gènes de résistance quantifiés

Gène	Résistance(s) connue(s) – liste non exhaustive
aadA	aminoglycosides
bla _{ox-A20}	carbapénèmes
CMY2	β -lactamines
ermB	macrolides
ermF	macrolides
intI1	résistance non spécifique
mphE	macrolides
msrE	macrolides
strA	streptomycine
strB	streptomycine
sul1	sulfonamides
sul2	sulfonamides
tetA	tétracyclines

Les protocoles utilisés pour quantifier ces gènes sont décrits par [Lau et al. \(2020\)](#). L'abondance relative de ces différents gènes au sein des communautés microbiennes a été déterminée à partir de la quantification du gène codant l'ARNr 16S, selon la méthode décrite par [Cébron et al. \(2008\)](#).

4.3.3 Structure et diversité des communautés microbiennes bactériennes et archéennes

L'analyse de la structure des communautés microbiennes benthiques a été réalisée par la méthode de metabarcoding qui s'appuie sur une approche de séquençage haut-débit d'un fragment du gène codant l'ARNr 16S. Cette approche permet d'une part d'accéder à une estimation de la biodiversité microbienne et, d'autre part, de comparer les échantillons sur la base de la structure des communautés, mais également, si cela s'avère pertinent, de déterminer l'affiliation phylogénétique des taxons présents et ainsi de travailler à l'échelle de la composition des communautés microbiennes (ce qui n'a pas été fait dans le cadre de ce projet). L'ensemble des protocoles utilisés (depuis l'extraction d'ADN jusqu'aux analyses de bioinformatique et biostatistique) est détaillé dans [Lyautey et al. \(2021\)](#).

4.3.4 Potentiel fonctionnel des communautés microbiennes périphytiques et sédimentaires

Trois types d'approches ont été mobilisées pour caractériser au laboratoire le potentiel fonctionnel des communautés microbiennes phototrophes et hétérotrophes en ciblant différents processus impliqués dans les cycles de l'azote, du carbone et du phosphore. Ces trois approches concernent :

- La mesure de la croissance algale et du rendement photosynthétique, effectuée uniquement sur les communautés microbiennes périphytiques à l'aide d'un fluorimètre PHYTO-PAM, selon le protocole décrit par [Kergoat et al. \(2021\)](#) ;
- L'estimation du potentiel enzymatique pour les activités beta-glucosidase (β -Glu), leucine aminopeptidase (Lap) et phosphatase (Pase), respectivement impliquées dans les cycles du carbone, de l'azote et du phosphore, selon les protocoles décrits par [Pesce et al. \(2021b\)](#) pour les communautés sédimentaires, et [Kergoat et al. \(2021\)](#) pour les communautés périphytiques. Cette estimation repose sur une mesure de fluorimétrie basée sur l'utilisation d'un ensemble non fluorescent qui se compose d'une molécule analogue au substrat de l'enzyme étudiée (substrat analogue) associée à un fluorogène, qui est libéré (et devient fluorescent) sous l'action de l'hydrolyse enzymatique ;
- La mesure de la respiration aérobie, de la dénitrification et de la méthanogénèse dans les sédiments uniquement, *via* le dosage respectif de CO_2 , N_2O et CH_4 par chromatographie en phase gazeuse selon les protocoles décrits par [Pesce et al. \(2021b\)](#)

5 Résultats

5.1 Contamination par les substances pharmaceutiques

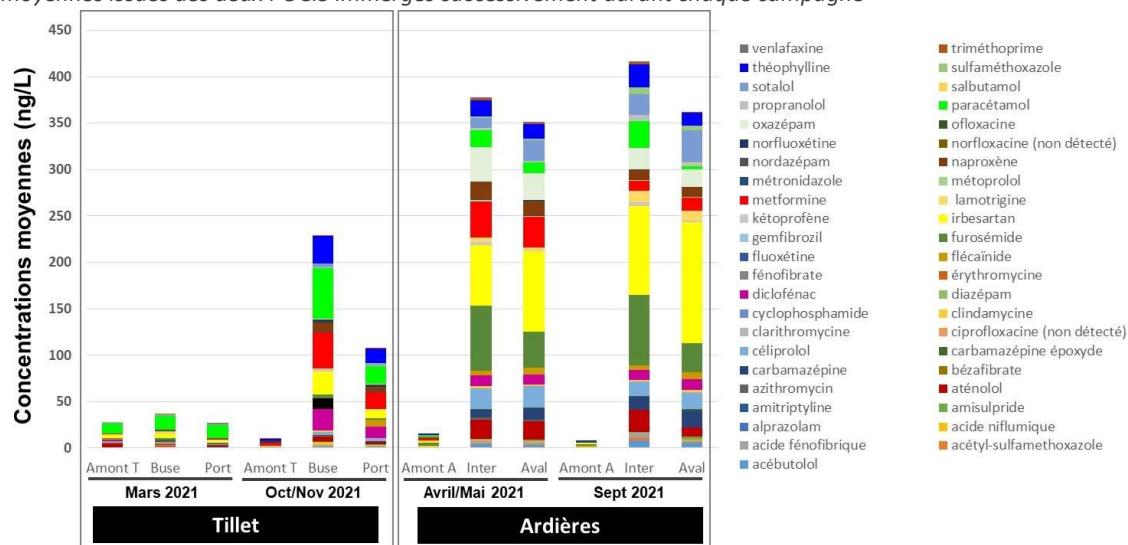
5.1.1 Contamination des eaux de surface

Parmi les 45 substances pharmaceutiques recherchées dans les eaux de surface à partir des extraits issus des POCIS ([Fig. 8](#)), seules 2 n'ont jamais été détectées (i.e. ciprofloxacine et norfloxacine qui sont des antibiotiques de la famille des fluoroquinolones).

Dans le Tillet, les profils de contamination des eaux de surface par les substances pharmaceutiques font apparaître de fortes variations saisonnières. Ainsi, au cours de la campagne réalisée en mars 2021, les concentrations moyennes cumulées, comprises entre 26 et 37 ng/L, et la distribution des substances quantifiées sont relativement similaires entre les stations. La substance la plus représentée est le paracétamol, avec des concentrations moyennes comprises entre 10 et 15 ng/L, représentant ainsi 40 à 54% des concentrations cumulées en pharmaceutiques mesurées sur les 3 stations. A l'automne, durant la campagne menée en octobre et novembre, les variations spatiales sont beaucoup plus marquées. Le niveau moyen de contamination mesuré en amont est très faible (de l'ordre de 10 ng/L) alors que les concentrations moyennes cumulées atteignent respectivement 229 et 108 ng/L au niveau de la sortie de la buse et dans les eaux du port à barques.

Dans ces deux stations contaminées, la diversité des substances quantifiées dans les eaux de surface est quasi similaire (36 substances identiques quantifiées dans la buse et dans le port) et les substances les plus représentées sont le paracétamol (54,5 et 19,4 ng/L en sortie de buse et dans le port respectivement), l'antidiabétique metformine (39,0 et 18,3 ng/L), le bronchodilatateur théophylline (29,5 et 16,0 ng/L), l'anti-inflammatoire non stéroïdien diclofénac (23,8 et 12,4 ng/L) et l'antihypertenseur irbésartan (24,4 et 8,4 ng/L).

Fig. 8 : Concentrations moyennes* cumulées (ng/L) des substances pharmaceutiques dans les eaux de surface à partir des échantillonneurs passifs de type POCIS (polar organic chemical integrative sampler); * valeurs moyennes issues des deux POCIS immergés successivement durant chaque campagne



Contrairement au Tillet, les profils de contamination observés dans les eaux de l'Ardières sont comparables entre les deux saisons d'échantillonnage, tant au niveau des concentrations mesurées que de la diversité et de la distribution (i.e. entre l'eau de surface et les sédiments) des substances quantifiées. En avril/mai et en septembre, les concentrations moyennes cumulées sur le site amont sont très faibles, respectivement de l'ordre de 16 et 8 ng/L. A ces deux périodes, un pic de contamination est observé au niveau de la station intermédiaire (concentrations cumulées supérieures à 377 et 416 ng/L en avril/mai et septembre respectivement) avec des concentrations qui se maintiennent au niveau de la station en aval (351 et 362 ng/L) sans changement majeur au niveau de la diversité et de la distribution des substances. Ainsi, au cours des deux campagnes et au niveau des deux stations contaminées, les substances les plus représentées sont l'antihypertenseur irbésartan (concentrations moyennes comprises entre 65,0 et 130 ng/L), le diurétique furosémide (30,7 – 67,6 ng/L), l'antidiabétique metformine (10,8 – 38,6 ng/L), l'anxiolytique oxazépam (19,2 – 36,8 ng/L), les bêta-bloquants sotalol (11,2 – 34,8 ng/L) et aténolol (10,0 – 23,7 ng/L), le bronchodilatateur théophylline (14,1 – 24,7 ng/L), les anti-inflammatoires non stéroïdiens naproxène (10,3 – 18,7 ng/L) et diclofénac (10,1 – 11,2 ng/L), l'anticonvulsant carbamazépine (8,9 – 17,9 ng/L), ainsi que le paracétamol (2,9 – 29,0 ng/L).

5.1.2 Contamination des sédiments

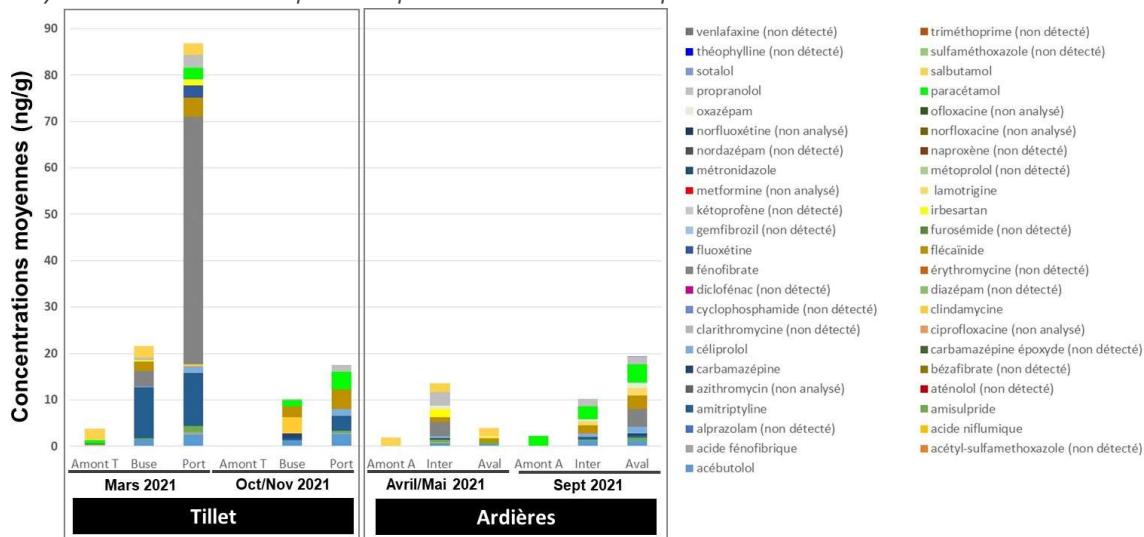
Dans les sédiments (Fig. 9), le nombre de substances pharmaceutiques quantifiées est beaucoup plus faible que dans les eaux (*via* les extraits de POCIS), constat qui s'explique en partie par des limites méthodologiques (moins de substances analysées, limites de quantification généralement plus élevées dans le sédiment, etc.).

Ainsi, sur les 39 substances analysées dans les sédiments (vs 45 dans les extraits de PICS, voir **Annexe 1**), seules 19 ont été quantifiées au moins une fois. Les substances les plus représentées dans les sédiments (ex. amitriptyline, fénofibrate, flécaïnide, etc.) sont dans l'ensemble assez différentes des substances les plus représentées dans les eaux de surface, même si certaines (telles que le paracétamol), semblent bien réparties dans ces deux compartiments.

Dans les sédiments du Tillet, un gradient spatial de contamination, croissant de l'amont vers l'aval, est observé au cours des deux saisons. Il est cependant beaucoup plus marqué en mars 2021 avec des concentrations cumulées inférieures à 4 ng/g en amont, proches de 22 ng/g sur le site de la buse et supérieures à 86 ng/g dans le port. Durant cette campagne de mars, le bronchodilatateur salbutamol est quantifié dans les sédiments des trois stations à des concentrations relativement similaires (environ 2,4 ng/g). La hausse des concentrations observée au niveau de la buse est principalement due à l'antidépresseur amitriptyline (11,0 ng/g), à l'hypolipidémiant fénofibrate (3,4 ng/g) et l'anti-arythmique flécaïnide (2,0 ng/g). Ces trois substances sont également très représentées dans les sédiments du port, avec des concentrations plus élevées, en particulier pour le fénofibrate qui atteint 53,4 ng/g, soit plus de 61% de la concentration cumulée mesurée sur ce site.

En octobre/novembre, les niveaux de contamination sont beaucoup plus faibles ; parmi les 39 substances recherchées, aucune ne présente des concentrations supérieures aux limites de quantification dans les sédiments de l'amont et les concentrations cumulées restent proches de 10 ng/g et 18 ng/g aux stations de la buse et du port, respectivement. Les principales substances quantifiées au niveau de la buse sont l'antibiotique clindamycine (3,5 ng/g) et l'anti-arythmique flécaïnide (2,3 ng/g). La clindamycine n'est pas quantifiée dans les sédiments du port dans lesquels sont retrouvés principalement la flécaïnide (4,2 ng/g), le paracétamol (3,8 ng/g), l'antidépresseur amitriptyline (3,2 ng/g) et le bêta-bloquant acébutolol (2,6 ng/g).

Fig. 9 : Concentrations moyennes cumulées (ng/g) des substances pharmaceutiques dans les sédiments. * valeurs moyennes issues des trois réplicats de prélèvement de sédiment par station



Dans les sédiments de l'Ardières, le gradient de contamination par les substances pharmaceutiques est variable d'une saison à une autre. En avril/mai 2021, les concentrations cumulées les plus fortes (13,5 ng/g) sont mesurées au niveau de la station intermédiaire (contre 1,8 ng/g en amont et 4,0 ng/g en aval). En septembre 2021, le gradient de contamination augmente progressivement de l'amont (2,2 ng/g) à la station intermédiaire (10,2 ng/g) puis à la station aval (19,4 ng/g). En avril/mai, le bronchodilatateur salbutamol est quantifié dans les sédiments de toutes les stations à des concentrations stables, comprises entre 1,7 et 1,8 ng/g.

En septembre, c'est le paracétamol qui est quantifié sur les trois stations avec des concentrations croissantes d'amont (2,1 ng/g) vers l'aval (3,9 ng/g). Les substances principalement responsables de la hausse de contamination des sédiments dans les sites intermédiaires et aval sont l'hypolipidémiant fénofibrate (lors des deux saisons), le bêta-bloquant propanolol et l'anti-arythmique flécaïnide.

5.2 Autres contaminations chimiques

5.2.1 Pesticides (eaux de surface)

Parmi les 35 pesticides et produits de transformation recherchés dans les eaux de surface à partir des extraits issus des TSP (voir liste en **Annexe 1**), seuls 16 ont été quantifiés au moins une fois au cours de l'ensemble des campagnes d'échantillonnage (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Concentrations moyennes* (ng/L) des pesticides et produits de transformation quantifiés au moins une fois dans les eaux de surface à partir des échantilleurs passifs de type TSP (tiges silicones polaires). NA : non analysé ; H : herbicide ; F : fongicide ; I : insecticide ; PT : produit de transformation. La liste entière des substances analysées (n=35) est disponible en **Annexe 1**. * valeurs moyennes issues des deux TSP immergés successivement durant chaque campagne

	Tillet						Ardières					
	Mars 2021			Oct/Nov 2021			Avril/Mai 2021			Sept 2021		
	Amont T	Buse	Port	Amont T	Buse	Port	Amont A	Inter	Aval	Amont A	Inter	Aval
atrazine (H)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,14	0,00	0,00	0,31	0,22	1,14
azoxystrobine (F)	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
boscalid (F)	0,01	0,00	0,00	0,05	0,03	0,00	0,02	1,27	2,18	16,7	1,51	0,05
DCPMU (PT Diuron)	0,00	0,15	0,16	0,00	0,17	0,15	0,00	0,42	0,68	0,79	0,15	0,00
diflufénicanil (H)	0,00	0,00	0,00	0,01	0,15	0,09	0,00	5,36	4,63	1,63	0,43	0,03
dimétomorphe (F)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,21	2,58	101	13,0	0,00
diuron (H)	0,54	1,99	1,64	0,00	1,46	1,05	1,07	1,78	3,51	1,24	0,34	0,00
fludioxonil (F)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,15	0,43	2,50	0,14	0,00
flufénoxuron (I)	0,44	0,61	0,49	NA	NA	NA	0,48	0,35	0,21	NA	NA	NA
isoxabène (H)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,51	1,06	0,46	0,03	0,00
métazachlore (H)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,49	0,00	0,00
métolachlore (H)	0,00	0,33	0,08	0,00	0,36	0,17	0,04	0,35	0,10	0,20	0,16	0,58
norflurazon (H)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,08	2,37	3,36	0,69	0,00
simazine (H)	0,26	0,32	0,31	0,00	0,38	0,66	0,00	0,55	1,69	3,49	0,75	0,38
spiroxamine (F)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	5,80	5,03	6,60	0,73	0,00
Tébuconazole (F)	0,15	0,88	0,50	0,00	0,07	0,04	0,05	0,93	0,67	0,71	0,13	0,02
somme pesticides	1,40	4,28	3,18	0,16	2,79	2,17	1,85	20,77	25,13	139,60	18,29	2,19

Dans les eaux du Tillet, les concentrations moyennes cumulées sont très faibles, comprises entre 0,16 et 4,28 ng/L en fonction de la station et de la période d'échantillonnage. La substance la plus représentée, tant en fréquence de détection qu'en concentration, est le diuron, herbicide dont l'utilisation est interdite depuis plus de 15 ans (décembre 2008).

Dans les eaux de l'Ardières, la contamination par les pesticides est plus variable, au niveau spatial comme au niveau temporel. De manière surprenante, un pic de contamination au fongicide dimétomorphe (101 ng/L) est observé en septembre 2021 au niveau du site amont, avec une dilution au niveau du site intermédiaire (13,0 ng/L) et une absence de quantification au niveau du site aval. A l'exception du dimétomorphe, les pesticides les plus représentés dans les eaux de l'Ardières sont également des fongicides à savoir le boscalid (avec notamment une concentration moyenne atteignant 16,7 ng/L sur le site amont en septembre 2021), la spiroxamine et le fludioxonil. Plusieurs herbicides sont également quantifiés, tels que la simazine, le norflurazon, le diflufénicanil et le diuron, à des concentrations moyennes toujours inférieures à 5 ng/L et qui ne suivent pas forcément le gradient amont-aval attendu.

5.2.2 PCBs (sédiments)

Les concentrations des 7 PCB indicateurs (PCBi) ont été mesurées dans les sédiments du Tillet et de l'Ardières (**Tableau 6**).

Les résultats obtenus dans le Tillet au cours des deux suivis mettent en évidence un gradient de contamination marqué de l'amont vers l'aval. Les concentrations des 7 PCBi sont relativement stables entre mars 2021 (23,9 ng/g) et octobre/novembre 2021 (28,2 ng/g) au niveau de la station amont, alors qu'elles varient légèrement selon la saison considérée au niveau de la buse (693 et 426 ng/g) et du port, où elles atteignent des valeurs très élevées (800 et 1005 ng/g).

Tableau 6 : Concentrations moyennes* (ng/g) des 7 PCB indicateurs (PCBi, classés par ordre croissant de masse) dans les sédiments. * valeurs moyennes issues des trois réplicats de prélèvement de sédiment par station

	Tillet						Ardières					
	Mars 2021			Oct/Nov 2021			Avril/Mai 2021			Sept 2021		
	Amont T	Buse	Port	Amont T	Buse	Port	Amont A	Inter	Aval	Amont A	Inter	Aval
PCB_28	5,30	56,2	15,2	0,62	2,10	16,9	0,10	0,41	0,19	0,43	0,42	0,11
PCB_52	1,94	15,7	37,7	2,10	14,2	45,8	0,40	1,58	0,39	0,54	1,63	0,41
PCB_101	1,57	44,8	97,3	2,23	36,5	112,8	0,33	0,27	0,43	0,71	0,25	0,46
PCB_118	2,12	30,7	38,6	2,36	17,2	46,4	0,45	0,72	0,46	0,81	0,70	0,45
PCB_138	4,54	193,5	202,1	7,19	116,6	244,3	0,25	0,19	0,43	0,52	0,50	0,48
PCB_153	4,32	209,3	228,8	6,46	115,2	279,1	0,33	0,54	0,36	0,69	0,56	0,42
PCB_180	4,12	143,3	180,7	7,26	124,6	259,6	0,26	0,14	0,38	0,43	0,31	0,35
somme 7PCBi	23,9	693,4	800,5	28,2	426,4	1004,9	2,1	3,8	2,6	4,1	4,4	2,7

Les niveaux de contamination dans l'Ardières ne sont pas du tout comparables puisqu'ils sont beaucoup plus faibles, avec peu de variations spatiales et temporelles. Ainsi, les concentrations des 7 PCBi sont comprises entre 2,1 et 4,4 ng/g selon les stations et la période d'échantillonnage.

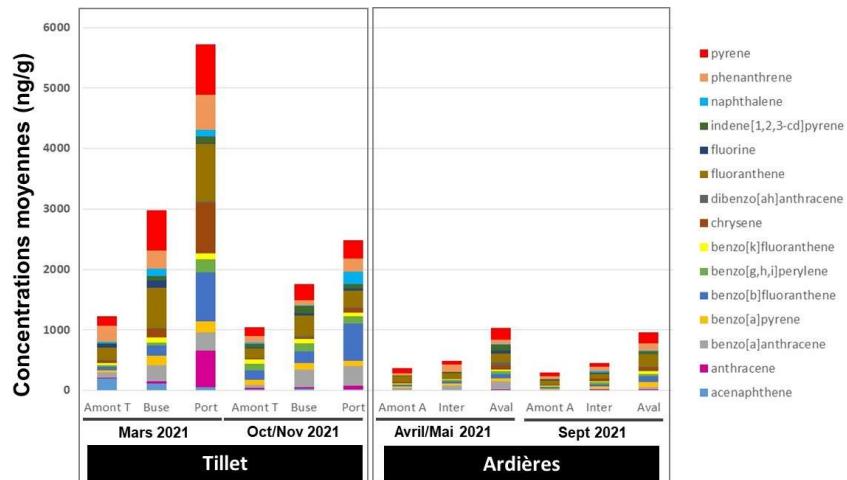
5.2.3 HAPs (sédiments)

Les concentrations des 15 composés HAP mesurées dans les sédiments du Tillet et de l'Ardières mettent en évidence l'existence d'un gradient croissant d'amont en aval dans les deux cours d'eau (**Fig. 10**). Comme pour les PCBs, les concentrations sont beaucoup plus élevées dans le Tillet que dans l'Ardières dans lequel les variations saisonnières sont également moins marquées.

Ainsi, dans le Tillet, les concentrations cumulées en 15 HAP, comprises entre 1042 ng/g et 1228 ng/g à l'amont atteignent respectivement 5720 et 2480 ng/g dans le port en mars 2021 et octobre/novembre 2021 avec des concentrations intermédiaires au niveau de la buse (2983 et 1756 ng/g aux mêmes périodes).

Dans l'Ardières, les concentrations cumulées en amont sont respectivement proches de 374 et 299 ng/g au printemps et en septembre 2021 et elles augmentent d'amont en aval pour atteindre aux mêmes périodes 483 et 452 ng/g à la station intermédiaire puis 1036 et 960 ng/g en aval.

Fig. 10 : Concentrations moyennes* cumulées (ng/g) des 15 HAP dans les sédiments. * valeurs moyennes issues des trois réplicats de prélèvement de sédiment par station

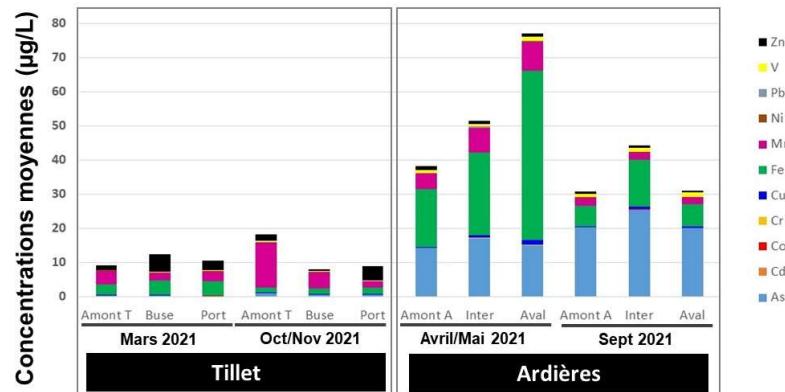


5.2.4 Eléments traces métalliques (eaux de surface et sédiments)

Les concentrations moyennes en éléments traces métalliques (ETMs) et autres métaux dans les eaux de surface, mesurées à partir des extraits de DGT, mettent en évidence des signatures très différentes entre les deux cours d'eau (Fig. 11). Cela reflète notamment des différences en terme de fonds géochimiques.

Les eaux du Tillet sont ainsi moins chargées par ces différents éléments, avec une prédominance du manganèse (Mn ; 1,7 à 13,3 µg/L) selon un gradient décroissant amont-aval et, dans une moindre mesure du fer (Fe ; 1,4 à 4,2 µg/L) et du zinc (Zn ; 0,6 à 5,1 µg/L).

Fig. 11 : Concentrations moyennes cumulées (µg/L) des éléments traces métalliques et autres métaux dans les eaux de surface à partir des échantillonneurs passifs de type DGT (diffusive gradients in thin films) * valeurs moyennes issues des deux DGT immergés successivement durant chaque campagne



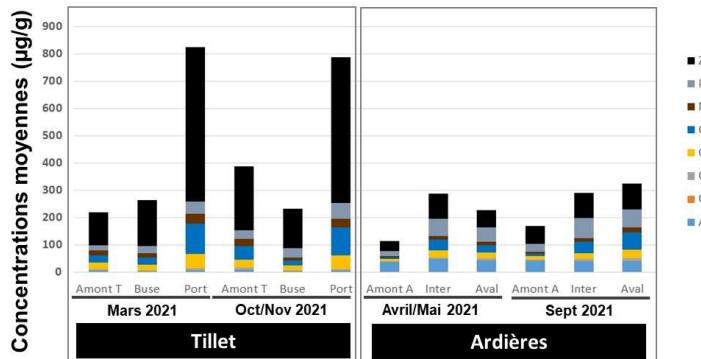
Les eaux de l'Ardières contiennent quant à elles de fortes concentrations en Fe (5,9 à 49,6 µg/L), en arsenic (As ; 14,2 à 25,5 µg/L) et en Mn (2,1 à 8,2 µg/L), éléments très représentés dans les fonds géochimiques du bassin versant. Une augmentation des concentrations en cuivre (Cu), utilisé comme fongicide sur les vignes est observée d'amont en aval, au printemps (0,1 µg/L en amont ; 0,7 µg/L à la station intermédiaire ; 1,4 µg/L en aval) et en septembre (0,3 µg/L, 0,9 µg/L et 0,5 µg/L, respectivement d'amont en aval).

Tableau 7 : Concentrations moyennes* (µg/g) des principaux éléments traces métalliques dans les sédiments.
* valeurs moyennes issues des trois réplicats de prélèvement de sédiment par station

	Tillet						Ardières					
	Mars 2021			Oct/Nov 2021			Avril/Mai 2021			Sept 2021		
	Amont T	Buse	Port	Amont T	Buse	Port	Amont A	Inter	Aval	Amont A	Inter	Aval
Al	9433	4570	11890	11535	3370	11074	6410	11471	8418	9163	10914	13307
As	6,7	3,0	6,0	9,9	2,7	5,7	38,6	47,5	44,4	42,6	40,3	40,6
Cd	0,22	0,16	0,41	0,35	0,14	0,39	0,30	0,41	0,21	0,88	0,40	0,33
Co	4,87	3,51	7,28	6,60	3,47	7,04	1,94	6,90	6,75	3,54	7,26	9,11
Cr	23,3	22,2	53,6	29,2	18,0	47,5	8,7	24,5	21,9	12,7	22,9	31,7
Cu	25,8	25,7	111,4	49,5	18,9	104,1	5,5	39,1	25,8	8,2	40,3	63,8
Fe	10650	7985	14918	15579	8003	15388	5832	12619	11987	8193	12794	15689
Mn	259,2	214,4	206,6	419,5	226,0	212,5	120,0	339,7	287,7	211,5	290,6	362,2
Ni	19,2	14,5	35,8	26,0	11,9	32,3	4,0	13,4	12,6	6,3	13,0	17,6
Pb	17,7	28,0	44,7	33,2	33,6	55,6	19,0	64,8	51,6	29,1	75,0	67,9
Zn	121,8	168,1	564,1	232,9	144,2	535,9	35,3	91,8	63,5	65,5	91,0	94,4

Les éléments Al, Fe et, dans une moindre mesure Mn présentent les contributions relatives les plus importantes des substances métalliques associées aux sédiments superficiels du Tillet et de l'Ardières (Tableau 7). En effet, ces éléments sont des éléments majeurs natifs des particules, et ils ne sont donc pas considérés comme des polluants.

Fig. 12 : Concentrations moyennes* cumulées ($\mu\text{g/g}$) des éléments traces métalliques (hors Al, Fe et Mn) dans les sédiments. * valeurs moyennes issues des trois réplicats de prélèvement de sédiment par station



En ne prenant pas en considération ces trois substances (Fig. 12), on constate dans le Tillet une forte augmentation des concentrations en ETMs dans les sédiments du port, du fait principalement de grandes quantités de Zn ($> 535 \mu\text{g/g}$ alors qu'elles sont comprises entre 121 et 233 $\mu\text{g/g}$ sur les deux autres stations de cette rivière), de Cu ($> 104 \mu\text{g/g}$), de Cr ($> 47 \mu\text{g/g}$), de Pb ($> 44 \mu\text{g/g}$) et de Ni ($> 32 \mu\text{g/g}$). Dans les sédiments de ce cours d'eau, les variations saisonnières des concentrations en ETMs sont peu marquées.

Un constat similaire peut-être fait concernant les concentrations en ETMs (hors Al, Fe et Mn ; Fig. 12) dans les sédiments de l'Ardières. Celles-ci sont deux à trois fois plus faibles dans la station amont que dans les stations intermédiaire et aval, du fait d'une augmentation dans ces deux stations des concentrations de la plupart des ETMs analysés (en particulier le Cu, le Pb, le Zn et le Cr). Comme dans le Tillet, les variations saisonnières sont peu marquées.

5.3 Tolérance des communautés microbiennes aux substances pharmaceutiques modèles

Les niveaux de tolérance estimés à partir des CE_{50} déterminées pour les quatre substances modèles testées avec les communautés périphytiques et/ou sédimentaires sont reportés dans le **tableau 8**.

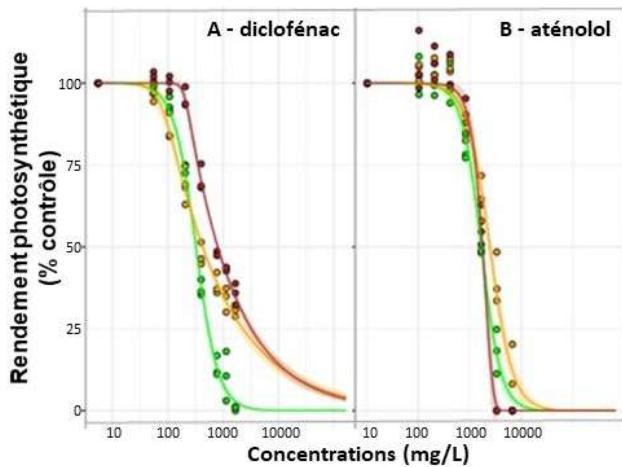
5.3.1 Tolérance des communautés périphytiques

Les résultats obtenus avec les communautés périphytiques mettent tout d'abord en évidence certaines limites des protocoles PICT utilisés pour déterminer la tolérance de l'aténolol et du diclofénac sur la base de la mesure du rendement photosynthétique puisque, dans plusieurs cas, ils n'ont pas permis de déterminer de CE_{50} (valeurs « ND » dans le **tableau 8**). Dans la majorité des cas, cette incapacité à modéliser des courbes dose-réponse était due à des valeurs de rendement photosynthétique trop faibles ($< 0,30$) dans les communautés périphytiques prélevées *in situ*, suggérant que celles-ci étaient déjà fragilisées par les conditions environnementales avant la réalisation du test de toxicité (voir Fig. 19D). La seule campagne ayant permis de mesurer la tolérance à ces deux substances sur l'ensemble des trois stations d'une même rivière est celle qui a été menée sur le Tillet en mars 2021. Les courbes dose-réponse alors obtenues sont illustrées sur la **figure 13**.

Au cours de cette campagne de prélèvement printanière, les communautés périphytiques phototrophes prélevées dans le port présentent une tolérance au diclofénac (CE_{50} médiane = 797 mg/L) significativement plus élevée que celle des communautés issues des deux autres sites (323 et 427 mg/L en amont et à la buse, respectivement). Concernant la tolérance à l'aténolol, ce sont les communautés phototrophes de la buse qui présentent une CE_{50} médiane (2454 mg/L) significativement plus forte que sur les autres sites (environ 1700 mg/L) (**Tableau 8**).

Une tendance similaire, à savoir une augmentation significative de la tolérance du périphyton du site de la buse, est également observée avec l'ofloxacine, en considérant cette fois-ci les communautés hétérotrophes, à travers la mesure de l'activité bêta-glucosidase. Cette tendance est confirmée au cours des deux campagnes d'échantillonnage, durant lesquelles peu de variations temporelles sont observées, les CE_{50} mesurées à chacun des sites du Tillet étant très comparables entre elles (**Tableau 8**).

Fig. 13: Courbes dose-réponse (exprimée en pourcentage par rapport aux échantillons non exposés) obtenues à partir de la mesure du rendement photosynthétique après une exposition de 4h à des concentrations croissantes en diclofénac (A) et en aténolol (B) pour les communautés périphytiques prélevées en mars 2021 dans les trois stations du Tillet (vert: amont T; orange: buse; rouge: port)



Concernant l’Ardières, il n’a pas été possible de comparer la tolérance des communautés périphytiques phototrophes à l’aténolol selon leur site de prélèvement car seules les CE_{50} de la station amont ont pu être mesurées lors des deux campagnes (Tableau 8). Cela a également été le cas pour le diclofénac lors de la campagne de septembre 2021. En avril-mai, le niveau de tolérance à cette substance est comparable entre l’amont (CE_{50} médiane = 91 mg/L) et l’aval (97 mg/L), tandis qu’il est significativement plus faible au niveau de la station intermédiaire (53 mg/L). Cette tendance n’est pas observée pour la tolérance à l’ofloxacine, puisque les niveaux de tolérance mesurés montrent l’absence de variation spatiale significative entre les trois stations ainsi qu’une variation temporelle limitée entre les deux campagnes d’échantillonnage.

Tableau 8 : Concentrations efficaces 50% (CE_{50} , mg/L ou mg/g) déterminées dans les approches PICT avec les communautés microbiennes périphytiques et sédimentaires. La valeur en gras et les valeurs entre crochets représentent respectivement la CE_{50} médiane et l’intervalle de confiance (95%), estimés par modélisation. Les valeurs médianes surlignées en saumon et en vert sont respectivement significativement supérieures ou inférieures à la valeur médiane mesurée sur le site de référence (amont) lors de la même campagne d’échantillonnage. ND : non déterminé

		Pérophyton (CE_{50} en mg/L)			Sédiment (CE_{50} en mg/Kg)			
		Aténolol	Diclofénac	Ofloxacine	Ofloxacine	Sulfaméthazine		
		Rendement photosynthétique	Activité bêta-glucosidase					
Tillet	Mars 2021	Amont T	1676 [1548-1814]	323 [305-341]	104 [97-111]	525 [92-958]	7,6 [6,7-8,4]	
		Buse	2454 [2169-2740]	427 [386-469]	157 [140-175]	537 [298-969]	6,8 [5,9-7,9]	
		Port	1762 [1638-1887]	797 [749-848]	67 [62-71]	2843 [1506-4180]	20,0 [16,9-23,2]	
	Oct/Nov 2021	Amont T	ND	ND	112 [93-131]	>4800	35,6 [30,3-41,2]	
		Buse	2053 [1864-2241]	204 [145-263]	196 [140-276]	656 [558-754]	14,1 [12,7-15,5]	
		Port	2252 [1784-2270]	223 [159-286]	96 [60-132]	>4800	33,5 [30,8-36,2]	
	Ardières	Avril/Mai 2021	Amont A	1780 [1641-1918]	91 [85-98]	115 [99-132]	30 [23-36]	2,8 [2,5-3,2]
			Inter	ND	53 [42-65]	132 [109-155]	56 [40-73]	5,5 [4,8-6,1]
			Aval	ND	98 [37-160]	113 [97-130]	22 [18-25]	4,8 [3,7-5,9]
		Sept 2021	Amont A	797 [714-879]	63 [22-103]	96 [78-113]	1756 [1223-2520]	9,6 [8,0-11,3]
			Inter	ND	ND	86 [79-93]	895 [605-1184]	17,5 [14,4-20,6]
			Aval	ND	ND	87 [72-101]	2281 [1982-2581]	19,9 [17,1-22,6]

5.3.2 Tolérance des communautés sédimentaires

Pour les communautés sédimentaires, les mesures de tolérance à l'ofloxacin et à la sulfaméthazine, réalisées à partir de tests de toxicité sur l'activité bêta-glucosidase, ont permis d'obtenir des courbes dose-réponse pour l'ensemble des campagnes d'échantillonnage, quelle que soit la station de prélèvement (**Tableau 8**). Cependant, les effets de l'ofloxacin sur les communautés prélevées en octobre-novembre 2021 dans les stations amont et port du Tillet sont trop faibles pour permettre de déterminer une CE_{50} , celle-ci étant vraisemblablement très supérieure au niveau d'exposition maximum testé (i.e. 4800 mg/g).

Dans le Tillet, les niveaux de tolérance des communautés sédimentaires sont variables d'une campagne d'échantillonnage à l'autre. Ainsi, en mars 2021, les communautés du port présentent les plus forts niveaux de tolérance à l'ofloxacin (CE_{50} médiane = 2843 mg/g) et à la sulfaméthazine (CE_{50} médiane = 20 mg/L).

Ces valeurs sont en effet très supérieures à celles observées dans les deux autres stations, où elles sont similaires entre elles, de l'ordre de 525 mg/g pour l'ofloxacin et 7 mg/g pour la sulfaméthazine. Cette tendance d'une forte augmentation dans le port n'est pas confirmée lors du suivi réalisé en octobre-novembre durant lequel les niveaux de tolérance mesurés sur ce site sont très proches de ceux mesurés sur le site amont, bien que significativement supérieurs à ceux observés sur le site de la buse. Dans l'Ardières, une forte variabilité temporelle entre les deux campagnes est également observée au niveau de la tolérance des communautés sédimentaires à l'ofloxacin. Bien que relativement similaires entre la station amont et la station aval, les CE_{50} médianes obtenues avec cette substance sont très supérieures en septembre 2021 (1756 mg/g et 2281 mg/g) par rapport à avril-mai (30 mg/g et 22 mg/g). De plus, les communautés sédimentaires de la station intermédiaire sont les plus tolérantes à cette substance en avril-mai (CE_{50} médiane = 56 mg/g) alors qu'elles sont les plus sensibles lors de la campagne de septembre (895 mg/g). Le constat est différent pour la sulfaméthazine puisque quelle que soit la campagne, les communautés sédimentaires des stations intermédiaire et aval, comparables entre elles, sont significativement plus tolérantes à cette substance que celles de la station amont, avec des CE_{50} médianes environ deux fois plus élevées.

5.4 Abondance de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et autres stress toxiques

5.4.1 Gènes de résistance au sein des communautés périphytiques

Au sein des communautés périphytiques, les niveaux d'abondance relative des différents gènes ciblés sont très variables (**Tableau 9**).

Dans les stations amont des deux rivières étudiées, le gène le plus représenté est le gène *int1*. Son abondance relative moyenne est de l'ordre de 14500 CPM (copies par millions de gènes codant l'ARNr 16S) dans le périphyton collecté en amont du Tillet en octobre-novembre 2021 et environ deux fois plus élevée dans le périphyton du site amont de l'Ardières lors des campagnes d'avril-mai (~36000 CPM) et de septembre (~29000 CPM). A l'opposé, certains gènes présentent des abondances relatives inférieures à 10 CPM, comme par exemple les gènes *bla_{OXA-20}* sur le site amont de l'Ardières en septembre), *CMY2*, *ermB* et *ermF* (sur le site amont du Tillet en octobre-novembre, et le site amont de l'Ardières en septembre). Pour la grande majorité des gènes, et dans les deux rivières, leur niveau d'abondance relative est très inférieur dans les stations amont, en comparaison aux deux autres stations (**Fig. 14**).

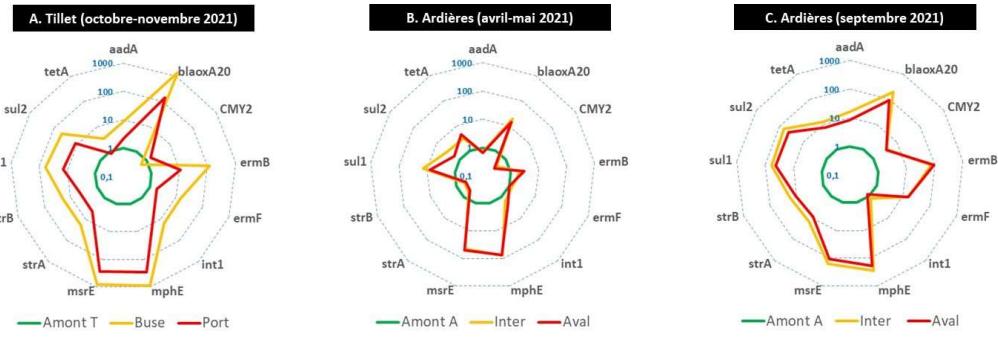
Tableau 9 : Abondances relatives des différents gènes de résistance quantifiés dans les communautés périphytiques, exprimées en nombres de copies par millions de gènes codant l'ARNr 16S (CPM). ND : non déterminé. A noter qu'aucune valeur n'est disponible pour les échantillons de périphyton prélevés en mars 2021 dans la station Amont du Tillet du fait d'un problème subi au moment du transport lors de l'envoi aux collègues canadiens (AAFC) chargés de ces analyses.

			Tillet						Ardières					
			Mars 2021			Oct/Nov 2021			Avril/Mai 2021			Sept 2021		
			Amont T	Buse	Port	Amont T	Buse	Port	Amont A	Inter	Aval	Amont A	Inter	Aval
aadA	ND	354,4 ±126,1	185,0 ±91,4	96,5 ±30,9	851,0 ±259,3	213,5 ±41,3	173,0 ±52,2	122,6 ±66,0	116,8 ±24,4	39,0 ±5,6	634,2 ±110,0	317,5 ±38,1		
bla _{oxA-20}	ND	84036,1 ±37019,6	11295,3 ±4669,2	83,2 ±24,6	114432,9 ±28527,3	11749,3 ±2810,1	53,7 ±17,7	1046,6 ±388,0	768,0 ±144,4	9,3 ±1,5	1724,0 ±311,3	823,8 ±296,4		
CMY2	ND	24,1 ±27,6	49,2 ±47,2	8,3 ±1,4	4,9 ±0,4	12,4 ±3,3	53,7 ±17,7	20,4 ±3,5	16,5 ±6,1	7,8 ±1,7	28,8 ±9,0	27,3 ±20,7		
ermB	ND	920,0 ±231,5	64,8 ±35,0	9,7 ±1,7	1166,0 ±182,8	103,2 ±23,1	84,0 ±33,5	185,8 ±73,7	256,7 ±118,6	8,6 ±1,0	625,2 ±46,1	778,0 ±287,7		
ermF	ND	103,8 ±73,6	49,2 ±47,2	8,3 ±1,4	121,6 ±27,6	15,4 ±1,1	115,2 ±54,2	145,2 ±81,3	118,6 ±24,2	7,8 ±1,7	115,9 ±16,0	121,2 ±41,2		
int1	ND	111369 ±36170	33923 ±9945	14554 ±1931	224770 ±41297	63861 ±14351	36037 ±2350	54918 ±13973	82140 ±38716	29157 ±5245	36793 ±4677	23852 ±3699		
mphE	ND	33572,8 ±33744,3	1383,9 ±746,6	19,2 ±11,4	17811,5 ±4243,2	5549,4 ±4569,7	53,7 ±17,7	4239,2 ±1033,5	4005,9 ±2158,8	42,9 ±45,7	11757,8 ±2408,2	8076,0 ±6144,3		
msrE	ND	16998,0 ±10601,2	1891,8 ±546,6	27,2 ±31,7	21802,4 ±1912,6	7606,5 ±5971,7	121,3 ±115,6	5311,3 ±1146,7	6113,7 ±2339,4	108,3 ±56,0	17069,8 ±3191,2	11334,9 ±7787,9		
strA	ND	27908 ±15908	4076 ±1462	1046 ±189	20202 ±820	4760 ±1313	26321 ±10589	15124 ±156	12683 ±2468	1946 ±611	28908 ±2296	17346 ±3821		
strB	ND	2098,7 ±1410,2	246,7 ±84,6	80,6 ±9,4	1503,4 ±178,7	346,3 ±81,5	2031,0 ±347,6	999,1 ±208,7	881,4 ±206,2	130,7 ±27,0	2272,6 ±205,6	1460,3 ±275,0		
sul1	ND	7898,0 ±1544,5	2756,6 ±906,1	261,9 ±18,7	16128,7 ±2454,6	3613,6 ±673,4	133,2 ±41,5	1768,5 ±515,4	1040,8 ±212,3	60,0 ±4,4	3519,2 ±172,1	2541,6 ±106,5		
sul2	ND	6978,1 ±2937,4	1633,7 ±756,1	166,2 ±22,2	7208,7 ±1529,3	1907,0 ±124,0	360,5 ±30,1	1228,4 ±574,4	590,3 ±145,0	47,8 ±14,6	3232,9 ±399,7	2035,8 ±133,2		
tetA	ND	1737,0 ±1440,5	190,9 ±205,0	264,8 ±131,3	860,6 ±40,1	214,1 ±93,3	91,8 ±15,6	291,3 ±176,3	421,9 ±110,8	47,6 ±20,9	589,1 ±181,0	363,0 ±48,2		

Dans le Tillet, en octobre-novembre 2021, cette surabondance des gènes de résistance en comparaison à la station amont est plus marquée dans les communautés périphytiques de la buse que dans celles du port. Ainsi, dans la station buse, les niveaux d'abondance relative de certains gènes sont parfois 1000 fois plus élevés qu'à la station amont (e.g. gènes *bla_{ox-A20}*, ~84000 CPM ; *mphE*, ~33500 CPM et *msrE*, ~17000 CPM) et seul le gène *CMY2* présente une abondance relative similaire (de l'ordre de 5 à 12 CPM) au niveau des trois stations (**Fig. 14A**). Malgré l'absence de donnée concernant les communautés périphytiques prélevées en amont du Tillet en mars 2021, on peut noter que les abondances relatives des différents gènes mesurées lors de cette campagne au niveau des deux autres sites (buse et Port) sont, dans l'ensemble, du même ordre de grandeur que celles mesurées en octobre-novembre 2021 (**Tableau 9**).

Dans l'Ardières, au cours des deux campagnes, les abondances relatives mesurées sont du même ordre de grandeur entre les stations intermédiaire et aval, avec cependant des valeurs généralement plus élevées au niveau de la station intermédiaire. Dans ces deux stations, l'augmentation d'abondances relatives par rapport à la station amont est beaucoup moins marquée en avril-mai (**Fig. 14B**) qu'en septembre (**Fig. 14C**). Ainsi, lors de la campagne printanière, seuls 4 gènes présentent des abondances relatives au moins dix fois supérieures dans les stations intermédiaire et aval (**Fig. 14B**): *bla_{ox-A20}* (~50 CPM en amont et >750 CPM dans les autres stations), *mphE* (~50 CPM vs ~4000 CPM), *msrE* (~120 CPM vs >5000 CPM), et *sul1* (~130 CPM vs 1768 CPM à la station intermédiaire et 1041 CPM en aval). A l'opposé, les gènes *CMY2*, *strA* et *strB* présentent lors de cette campagne des niveaux d'abondance relative deux à trois fois plus forts en amont que dans les deux autres stations. En septembre, tous les gènes, à l'exception d'*int1*, sont environ 10 à 100 fois plus abondants dans les stations intermédiaire et aval en comparaison à l'amont (**Fig. 14C**). Parmi ces gènes, ceux les plus représentés dans ces deux stations sont *mphE* (~12000 et ~8000 CPM aux stations intermédiaire et aval, respectivement), *msrE* (~17000 et ~11000 CPM) et *strA* (~29000 et ~17000 CPM).

Fig. 14 : Illustration sous forme de radar du niveau de représentation de l'abondance relative moyenne des gènes de résistance dans les communautés périphytiques collectées dans les stations buse et Port du Tillet et dans les stations intermédiaire et aval de l'Ardières, en comparaison à la station amont de chacune de ces rivières.



5.4.2 Gènes de résistance au sein des communautés sédimentaires

Comme pour le périphyton, les niveaux d'abondance relative des différents gènes de résistance dans les communautés sédimentaires sont très variables en fonction du type de gène (Tableau 10).

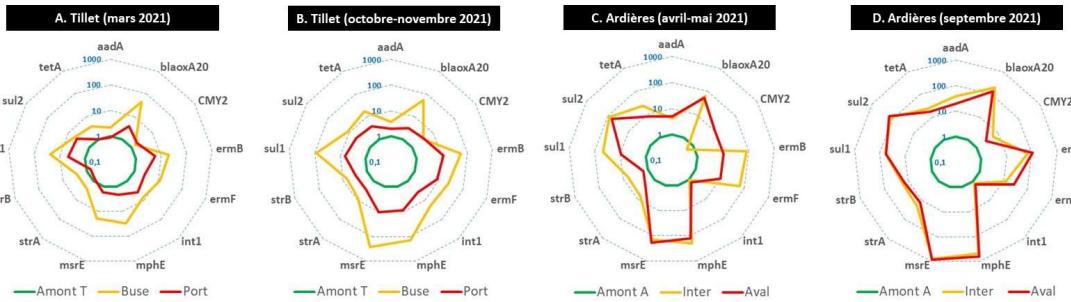
Tableau 10 : Abondances relatives des différents gènes de résistance quantifiés dans les communautés sédimentaires, exprimées en nombres de copies par millions de gènes codant l'ARNr 16S (CPM).

	Tillet						Ardières					
	Mars 2021			Oct/Nov 2021			Avril/Mai 2021			Sept 2021		
	Amont T	Buse	Port	Amont T	Buse	Port	Amont A	Inter	Aval	Amont A	Inter	Aval
aadA	403,5 ±336,4	859,6 ±210,0	355,2 ±194,9	236,8 ±29,9	878,7 ±376,9	476,8 ±160,0	154,3 ±145,1	638,2 ±590,5	755,7 ±435,2	55,4 ±27,3	2171,5 ±888,0	1108,9 ±86,1
bla ox-A20	212,9 ±3,5	8978,7 ±500,2	792,4 ±377,8	189,4 ±108,5	10363,3 ±5025,3	597,0 ±482,0	33,7 ±16,6	2117,5 ±2326,0	1753,7 ±1758,9	17,1 ±13,0	3316,5 ±987,4	2269,5 ±941,0
CMY2	13,2 ±2,7	19,3 ±11,0	24,7 ±5,2	8,1 ±3,7	28,6 ±4,1	31,6 ±18,2	25,7 ±15,9	13,5 ±5,0	267,3 ±146,6	14,6 ±14,4	86,1 ±56,4	41,1 ±19,8
ermB	25,6 ±8,8	508,2 ±128,2	151,2 ±68,4	5,5 ±2,0	307,7 ±186,1	65,3 ±42,5	25,7 ±15,9	2102,9 ±2136,2	273,7 ±146,6	14,6 ±14,4	998,9 ±110,3	1597,4 ±982,6
ermF	13,6 ±2,4	164,9 ±108,2	36,6 ±15,5	5,5 ±2,0	135,5 ±140,5	46,1 ±9,9	25,7 ±15,9	1702,2 ±2136,2	267,3 ±146,6	14,6 ±14,4	187,0 ±54,0	395,5 ±150,3
int1	8033 ±2818	62920 ±56683	32095 ±8666	6973 ±1155	140205 ±67986	27689 ±1792	19987 ±10617	21155 ±11234	27159 ±7838	16272 ±13255	20441 ±4049	23413 ±2066
mphE	97,5 ±39,4	2895,1 ±1174,8	211,9 ±110,0	23,0 ±20,6	3224,9 ±419,4	203,6 ±150,9	28,2 ±14,8	5629,6 ±5459,8	3526,1 ±2208,9	18,9 ±12,2	8929,4 ±1319,7	11709,7 ±3649,0
msrE	211,5 ±78,2	4124,0 ±729,1	354,8 ±245,5	21,6 ±14,2	5761,7 ±886,6	226,1 ±214,9	33,0 ±16,0	4555,1 ±3450,8	6118,7 ±2347,2	18,2 ±12,2	14487,0 ±5430,4	15508,7 ±4116,0
strA	5253 ±4163	13219 ±1763	4420 ±1680	1371 ±607	11347 ±5703	3778 ±1690	4432 ±1013	29946 ±28087	14574 ±6228	1941 ±1000	38542 ±10119	24991 ±4254
strB	391,8 ±226,5	1001,0 ±187,5	273,8 ±115,6	110,1 ±33,2	764,4 ±506,1	322,7 ±96,0	319,8 ±100,1	2024,9 ±1853,3	483,6 ±108,5	152,8 ±49,6	2748,1 ±914,3	2269,2 ±567,8
sul1	316,2 ±76,3	7790,3 ±8364,3	1515,4 ±463,0	256,2 ±62,9	22467,6 ±14483,5	1612,9 ±300,3	65,0 ±18,3	2988,5 ±2985,8	596,9 ±212,7	55,3 ±11,6	3260,4 ±947,2	3088,8 ±528,2
sul2	710,9 ±222,3	3592,5 ±1105,8	2803,8 ±218,6	524,4 ±206,7	6223,6 ±1209,6	2355,0 ±194,8	34,0 ±16,8	2866,7 ±1131,1	2214,8 ±1170,1	39,3 ±11,4	5084,7 ±1058,0	6016,6 ±985,3
tetA	302,5 ±116,3	1144,1 ±191,9	289,2 ±183,8	75,3 ±22,7	1309,1 ±699,4	290,2 ±206,8	59,9 ±75,0	1441,9 ±1453,2	486,7 ±245,6	79,6 ±48,5	1884,0 ±583,2	13409 ±66,8

Là encore, le gène *int1* est le plus représenté dans le sédiment des stations amont, avec des niveaux d'abondance de l'ordre de 7000-8000 CPM dans le Tillet et de 16000-20000 CPM dans l'Ardières.

Dans la station amont du Tillet, l'abondance relative de tous les gènes est plus élevée en mars par rapport à octobre-novembre, en particulier pour *msrE*, 10 fois plus représenté (211,5 CPM vs 21,6 CPM en octobre-novembre), et pour *ermB*, *mphE*, *strA*, *strB* et *tetA*, environ 4 à 5 fois plus représentés, lors de cette première campagne (Tableau 10).

Fig. 15 : Illustration sous forme de radar du niveau de représentation de l'abondance relative moyenne des gènes de résistance dans les communautés sédimentaires collectées dans les stations buse et Port du Tillet et dans les stations intermédiaire et aval de l'Ardières en comparaison à la station amont de chacune de ces rivières.



Lors des deux campagnes, les niveaux d'abondance les plus élevés sont observés au niveau de la station buse. Dans cette station, tous les gènes quantifiés sont environ 2 à 42 fois plus représentés qu'à l'amont en mars (Fig. 15A), et 4 à 266 fois plus qu'à l'amont en octobre-novembre (Fig. 15B).

Les gènes principalement concernés par cette augmentation entre les stations amont et buse sont *bla_{OXA-20}* (x42 en mars et x55 en septembre-octobre), *ermB* (x20 et x56), *mphE* (x30 et x140), *msrE* (x20 et x266) et *sul1* (x20 et x90). En octobre-novembre, les communautés sédimentaires du Port présentent pour l'ensemble des gènes quantifiés des niveaux d'abondance relative compris entre ceux de la station amont et ceux de la station buse. C'est également le cas en mars pour la plupart des gènes, à l'exception de *aaD*, *strA*, *strB* et *tetA*, caractérisés par des abondances relatives comparables ou relativement inférieures à celle de l'amont, ainsi que de *CMY2*, qui présente une abondance relative proche de celle mesurée au niveau de la buse.

Dans l'Ardières, les niveaux d'abondance relative des gènes dans la station amont sont relativement comparables entre les deux campagnes d'échantillonnage, bien que légèrement plus élevés pour la plupart d'entre eux en avril-mai (Tableau 10).

Les prélèvements réalisés en septembre dans cette rivière montrent que les abondances relatives de tous les gènes quantifiés, à l'exception de *sul1*, sont très inférieure dans la station amont que dans les stations intermédiaire et aval, pour lesquelles les valeurs sont relativement similaires (Fig. 15D). L'augmentation la moins marquée entre l'amont et les autres sites concerne le gène *CMY2* (représenté 3 à 6 fois moins en amont), tandis que les augmentations les plus marquées concernent *mphE* (<20 CPM en amont et ~9000-11700 CPM dans les autres stations), *msrE* (<20 CPM vs ~15000 CPM), et, dans une moindre mesure, *bla_{OXA-20}* (<20 CPM vs ~2300-3300 CPM), *ermB* (<20 CPM vs ~1000-1600 CPM), et *sul2* (<40 CPM vs ~5000-600 CPM). Une tendance relativement similaire est observée en avril-mai avec cependant quelques différences entre les stations intermédiaire et aval lors de cette campagne avec certains gènes (*ermB*, *ermF*, *strA*, *strB*, *sul1* et *tetA*) plus représentés dans la station intermédiaire, et *CMY2* en aval.

5.5 Diversité et structure des communautés microbiennes bactériennes et archéennes

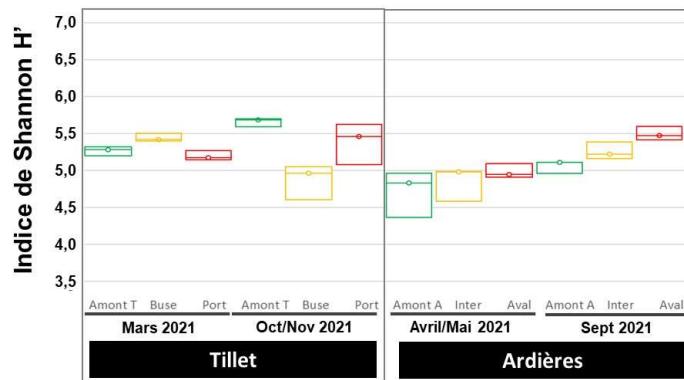
5.5.1 Diversité et structure des communautés périphytiques

L'approche de séquençage haut-débit d'un fragment du gène codant l'ARNr 16S a permis d'appréhender la diversité des communautés de bactéries et d'archées du périphyton. Les résultats sont illustrés dans la figure 16 par l'indice de diversité de Shannon, qui tient compte de l'abondance relative des différents taxons. Les valeurs de cet indice, comprises entre 4,4 et 5,7, font apparaître des tendances très variables suivant la rivière et suivant la saison considérée.

Dans le Tillet, les communautés des stations amont et Port présentent des niveaux de diversité similaires, légèrement plus élevés en octobre-novembre qu'en mars. Pour les communautés de la station buse, la tendance est complètement inversée entre le suivi de mars 2021, durant lequel elles présentent le plus haut niveau de diversité, et le suivi d'octobre-novembre, durant lequel elles présentent au contraire le niveau le plus faible.

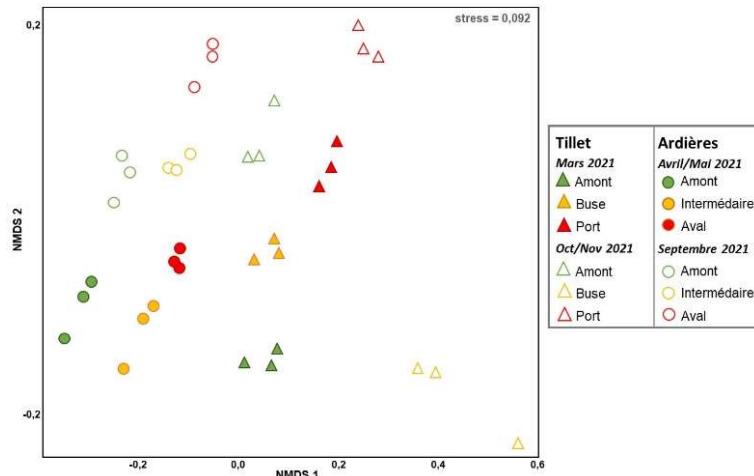
Dans l'Ardières, l'indice de Shannon est comparable entre les trois stations au cours de la campagne d'avril-mai, alors que celui-ci augmente progressivement d'amont en aval au cours de la campagne de septembre.

Fig. 16 : Indice de diversité de Shannon H' (médiane et étendue) des communautés de bactéries et d'archées du périphyton, calculé à partir de l'approche de séquençage haut-débit d'un fragment du gène codant l'ARNr 16S



La comparaison de la structure des communautés a été réalisée sur la base de calculs de distance entre les échantillons, ces distances étant représentées sous forme de graphiques à deux dimensions de type NMDS ('non metric multidimensional scaling' ; **Fig. 17**). Cette représentation permet de distinguer les deux rivières à travers l'axe 1.

Fig. 17 : Analyse par NMDS de la variation spatio-temporelle de la structure des communautés de bactéries et d'archées du périphyton, appréhendée à partir de l'approche de séquençage haut-débit d'un fragment du gène codant l'ARNr 16S



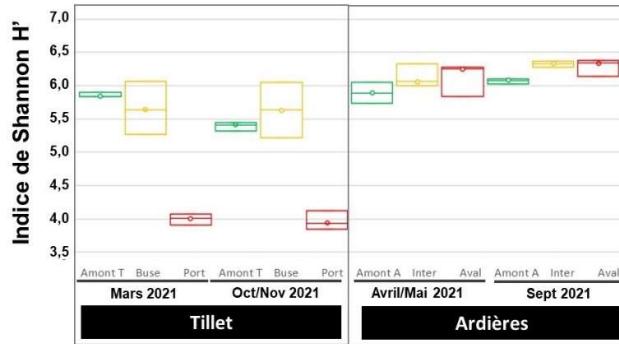
Dans le Tillet, on observe à travers l'axe 2 une séparation des communautés selon la campagne d'échantillonnage, ainsi qu'une évolution spatiale graduelle de leur structure d'amont en aval, à l'exception des échantillons prélevés au niveau de la buse en octobre-novembre 2022, qui se révèlent être très différents des autres.

Dans l'Ardières, l'évolution spatiale, progressive d'amont en aval, est relativement similaire entre les deux campagnes qui sont cependant séparées l'une de l'autre à travers l'axe 2.

5.5.2 Diversité et structure des communautés sédimentaires

Dans les sédiments, l'indice de Shannon permettant de caractériser la diversité des communautés de bactéries et d'archées est relativement stable d'une campagne à l'autre, dans les deux rivières (Fig. 18).

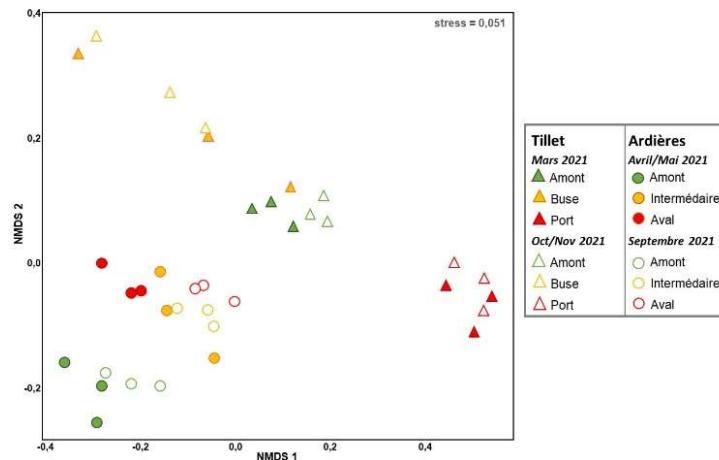
Fig. 18 : Indice de diversité de Shannon H' (médiane et étendue) des communautés de bactéries et d'archées du sédiment, calculé à partir de l'approche de séquençage haut-débit d'un fragment du gène codant l'ARNr 16S



Dans le Tillet, cet indice est comparable entre les stations amont et buse, avec des valeurs moyennes comprises entre 5,4 et 5,9, et il est beaucoup plus faible dans le port, avec une valeur proche de 4, révélant une forte baisse de la diversité au niveau de cette station.

Dans l'Ardières, l'indice est relativement constant d'amont en aval lors de la campagne d'avril-mai, avec des valeurs moyennes comprises entre 5,9 et 6,1. En septembre, il est légèrement inférieur dans la station amont (6,06-6,10), en comparaison aux stations intermédiaire (6,28-6,37) et aval (6,14-6,38). L'analyse NMDS confirme la stabilité temporelle de la structure des communautés de bactéries et d'archées dans le sédiment du Tillet et de l'Ardières d'une campagne à l'autre (Fig. 19). Dans le Tillet, au cours des deux campagnes, cette structure est très différente entre les trois stations, traduisant ainsi une forte évolution spatiale, révélée par NMDS à travers les axes 1 et 2. Dans l'Ardières, l'évolution spatiale est beaucoup plus limitée et seules les communautés de l'amont sont différentes de celles des deux autres sites, suggérant une stabilité structurelle entre la station intermédiaire et la station aval.

Fig. 19 : Analyse par NMDS de la variation spatio-temporelle de la structure des communautés de bactéries et d'archées du sédiment, appréhendée à partir de l'approche de séquençage haut-débit d'un fragment du gène codant l'ARNr 16S

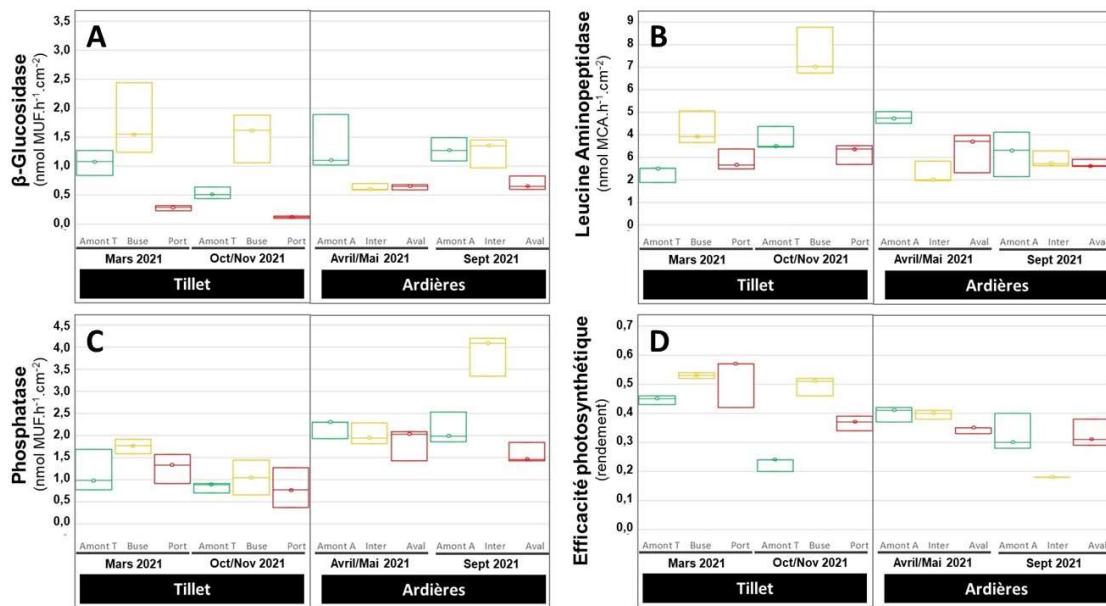


5.6 Potentiel fonctionnel des communautés périphytiques et sédimentaires

5.6.1 Activités enzymatiques et efficacité photosynthétique des communautés périphytiques

Le potentiel fonctionnel des communautés microbiennes périphytiques a été appréhendé à partir de la mesure de trois activités enzymatiques (bêta-glucosidase, leucine aminopeptidase et phosphatase), réalisées par les microorganismes hétérotrophes (notamment les bactéries), et par la mesure de l'efficacité photosynthétique, qui concerne les microorganismes phototrophes, tels que les microalgues et les cyanobactéries (Fig. 20).

Fig. 20 : Potentiel d'activités enzymatiques β -Glucosidase (A), leucine-aminopeptidase (B) et phosphatase (C) et de l'efficacité photosynthétique (D) des communautés microbiennes périphytiques (médiane et étendue)



Dans le Tillet, les variations spatiales du potentiel fonctionnel d'amont en aval sont comparables d'une campagne à l'autre. Concernant l'activité phosphatase, les niveaux d'activités mesurés dans cette rivière sont assez constants d'une station à l'autre et d'une campagne à l'autre (Fig. 20C). Pour les trois autres activités, les variations spatiales observées en mars et en octobre-novembre traduisent une augmentation de l'activité microbienne au niveau de la station buse en comparaison à la station amont (Fig. 20A,B,D). Ces niveaux d'activités diminuent ensuite généralement à nouveau entre la station buse et la station Port, dans laquelle les valeurs sont parfois inférieures à celles observées en amont (bêta-glucosidase, Fig. 20A).

5.6.2 Activités enzymatiques et métaboliques des communautés sédimentaires

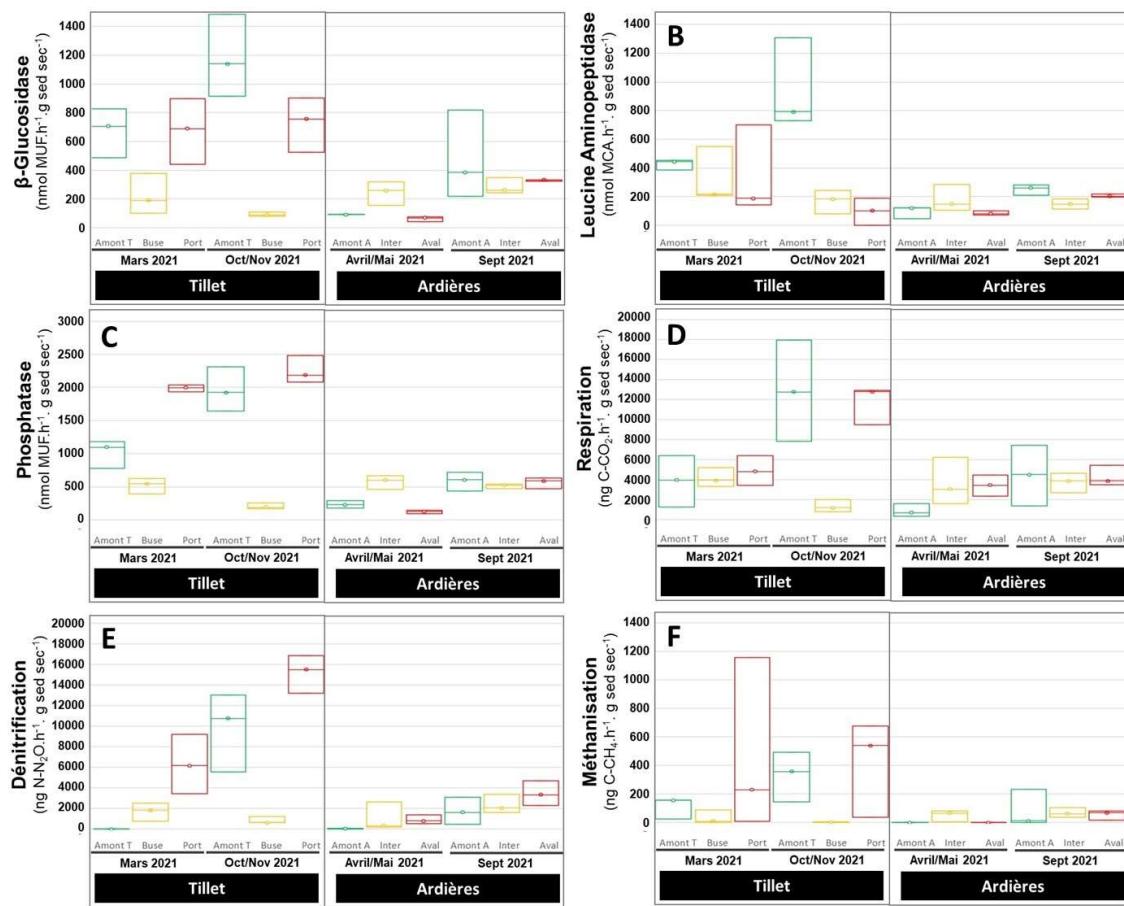
Le potentiel fonctionnel des communautés microbiennes hétérotrophes sédimentaires a été appréhendé à partir de la mesure de trois activités enzymatiques (bêta-glucosidase, leucine aminopeptidase et phosphatase) et de trois activités métaboliques (respiration, dénitrification et méthanisation) (Fig. 21).

Dans le Tillet, les niveaux d'activités mesurés dans la station amont sont plus élevés en octobre-novembre qu'en mars et ce, quelle que soit l'activité considérée. A l'inverse, les niveaux d'activité mesurés au cours de ces deux campagnes au niveau de la station buse sont relativement similaires entre eux et ils sont généralement inférieurs à ceux mesurés en amont.

C'est le cas en particulier pour la bêta-glucosidase (Fig. 21A) et la phosphatase (Fig. 21C) au cours des deux campagnes, et pour la leucine aminopeptidase (Fig. 21B), la respiration (Fig. 21D), la dénitrification (Fig. 21E) et la méthanisation (Fig. 21F), au cours de la campagne d'octobre-novembre. Dans le sédiment de la station Port, les niveaux d'activités sont également relativement stables entre les deux campagnes, sauf pour la respiration (Fig. 21D) et la dénitrification (Fig. 21E), plus stimulées en octobre-novembre. Toutes les activités, à l'exception de la leucine amino-peptidase et de la respiration (en mars), sont supérieures dans les sédiments du port que dans ceux de la station buse et c'est dans le port que certaines d'entre elles (phosphatase, dénitrification et méthanisation) présentent les valeurs maximales pour certaines activités telles que la phosphatase, la dénitrification et la méthanisation.

Dans l'Ardières, les variations temporelles et spatiales sont beaucoup moins marquées pour l'ensemble des activités microbiennes mesurées dans le sédiment. Les seules variations notables entre les différentes stations sont enregistrées en avril-mai. Elles concernent une augmentation dans la station intermédiaire des activités bêta-glucosidase (**Fig. 21A**), leucine aminopeptidase (**Fig. 21B**), et phosphatase (**Fig. 21C**) par rapport aux deux autres stations, ainsi qu'une augmentation de la respiration dans les stations intermédiaire et aval en comparaison à la station amont (**Fig. 21D**).

Fig. 21 : Potentiel d'activités enzymatiques β -Glucosidase (A), leucine-aminopeptidase (B) et phosphatase (C) et du potentiel de respiration (D), dénitritification (E) et méthanisation (F) des communautés microbiennes sédimentaires (médiane et étendue)



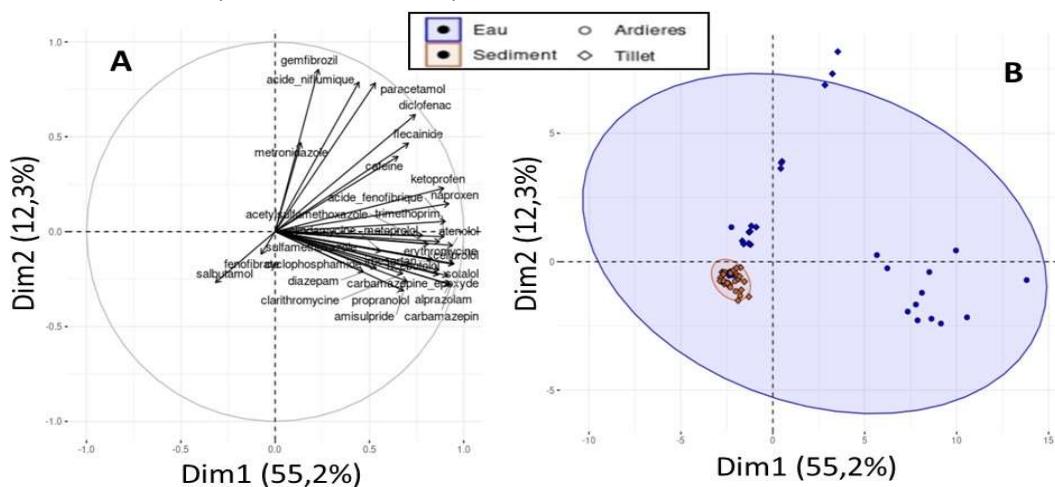
6 Discussion

- 6.1 Influence de la pression chimique par les substances pharmaceutiques sur la tolérance et la résistance des communautés microbiennes benthiques à ces substances
 - 6.1.1 Concentration et distribution des substances pharmaceutiques dans les différents compartiments aquatiques

Les résultats obtenus et présentés dans les **figures 8 et 9** montrent d'une part que pour une même rivière, le gradient de contamination (i.e. entre les stations) par les substances pharmaceutiques mesurées n'est pas le même suivant que l'on considère les eaux de surface (*via* l'utilisation de POCIS) ou les sédiments. Par exemple, sur le site du Tillet, la contamination dans les eaux est la plus élevée au niveau de la station de la buse ; alors que c'est au niveau du port que la contamination est la plus élevée dans les sédiments. Sur l'Ardières, la contamination dans les eaux est légèrement plus élevée dans la zone intermédiaire ; alors que c'est dans la zone aval que la contamination est plus élevée dans les sédiments. Les deux compartiments sont donc importants à considérer quand on veut évaluer une pression chimique globale à l'échelle d'une station ou d'un site.

La **figure 22** suggère que la discrimination entre les deux rivières, selon les niveaux de contamination par les substances pharmaceutiques, s'effectue principalement sur la base des concentrations mesurées dans les POCIS (qui reflètent la contamination chronique des eaux de surface) en comparaison à celles mesurées dans les sédiments. Cependant, cette représentation doit être analysée avec précaution du fait, d'une part, des contraintes méthodologiques qui ont rendu plus difficile la quantification des substances pharmaceutiques dans les sédiments par rapport à celle effectuée dans les extraits de POCIS (moins de substances analysées et limites de quantification plus restrictives) et, d'autre part, de la difficulté à comparer dans une même analyse des concentrations issues de la fraction dissoute à des concentrations issues de la fraction particulaire.

Fig. 22 : Résultats de l'ACP (analyse en composantes principales) réalisée avec l'ensemble des résidus pharmaceutiques mesurés dans l'eau via les POCIS (en bleu) et les sédiments (en marron) des stations du Tillet (losange) et de l'Ardières (rond); les variables ont été centrées réduites préalablement à l'analyse. Le panel A représente les variables (i.e. les concentrations en résidus pharmaceutiques) sur le cercle des corrélations. Le panel B représente la projection des sites sur les 2 premières dimensions de l'ACP, les ellipses colorées sont des ellipses de concentration pour chacun des 2 compartiments étudiés.

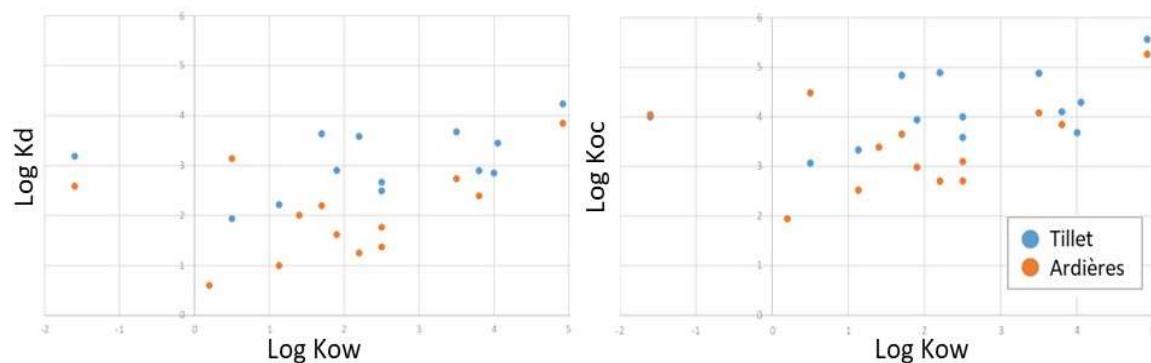


La nature des substances pharmaceutiques mesurées n'est généralement pas la même selon le type de compartiment considéré (eau ou sédiment). Cette distribution des molécules entre les phases dissoutes et particulaires est régie par un équilibre chimique. Elle est différente selon les molécules car celles-ci n'ont pas les mêmes propriétés physico-chimiques, ce qui se traduit par une affinité plus ou moins forte pour la phase dissoute ou particulaire.

L'affinité des molécules pour la phase particulaire peut être quantifiée par le coefficient de distribution (Kd), qui correspond à la concentration de la molécule dans la phase particulaire divisée par la concentration de la molécule dans la phase dissoute. L'affinité d'une même molécule pour la phase particulaire dépend aussi de la nature de cette dernière et en particulier de sa fraction en carbone organique (foc). Pour cette raison, le Kd est souvent normalisé par le foc pour obtenir coefficient de distribution normalisé (Koc, égal à Kd / foc).

Sur les 2 sites, la comparaison des Kd et des Koc entre les molécules permet par exemple de mettre en évidence les propriétés des molécules qui expliquent leur affinité pour le sédiment. La comparaison des Log Kd et Log Koc calculés dans cette étude pour les molécules quantifiées à la fois dans l'eau et dans le sédiment, à une même station et à la même période, au caractère hydrophobe des molécules, évalué par leur coefficient de partage octanol-eau (Log Kow) est illustrée sur la **figure 23**.

Fig. 23 : Coefficient de distribution (Log Kd, A) et coefficient de distribution normalisé (Log Koc, B) exprimés en fonction du coefficient de partage octanol-eau (Log Kow) des substances pharmaceutiques quantifiées à la fois dans l'eau et dans le sédiment du Tillet et de l'Ardières, à une même station et à la même période. Liste des molécules concernées (et log Kow associé) : Amisulpride (-1,6), Sotalol (0,2), Paracétamol (0,5), Lamotrigine (1,4), Acébutolol (1,7), Clindamycine (2,2), Oxazépam (2,2), Flécaïnide (3,8), Fluoxétine (4,05)



Excepté pour l'amisulpride qui présente un log Kow négatif, nous observons une tendance assez classique, caractérisée par une augmentation de l'affinité pour la phase particulaire (qui se traduit par une augmentation du Log Kd (**Fig. 23A**), ou du Log Koc (**Fig. 23B**) avec l'hydrophobie des molécules (qui se traduit par une augmentation du Log Kow). Ceci met en évidence des interactions principalement de type hydrophobes entre ces molécules et les sédiments du Tillet ou de l'Ardières ; sauf pour l'amisulpride, pour laquelle la forte affinité pour le sédiment s'explique par d'autres types d'interactions (i.e. Van der Waals) non caractérisées dans cette étude.

6.1.2 Tolérance et résistance des communautés microbiennes benthiques aux substances pharmaceutiques

Un des objectifs du projet PharmaTOX était d'appréhender plus spécifiquement les conséquences écologiques des substances pharmaceutiques contaminant les eaux de surface et les sédiments à travers l'étude des capacités de tolérance et de résistance microbienne à ces substances. Il s'agissait ainsi d'évaluer si ces descripteurs microbiens pouvaient être considérés comme des bons outils de diagnostic de la pression chimique induite par celles-ci. Pour ce faire, deux types d'approches complémentaires ont été mises en œuvre : l'approche PICT et la quantification de gènes de résistance aux antibiotiques.

6.1.2.1 Approche PICT

Jusqu'à présent, la méthode PICT avait principalement été appliquée pour étudier l'impact d'herbicides (ex. [Pesce et al., 2010](#)) et d'éléments traces métalliques (ex. [Tlili et al., 2011](#)) et la seule étude concernant spécifiquement les substances pharmaceutiques avait été réalisée avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens, l'ibuprofène et le diclofénac ([Corcoll et al., 2014](#)).

Les développements méthodologiques réalisés dans le cadre du présent projet ont permis d'élaborer des protocoles pour mesurer la tolérance des communautés microbiennes photosynthétiques (principalement des microalgues et des cyanobactéries) à l'aténolol et au diclofénac, et des communautés hétérotrophes (principalement des bactéries) à l'ofloxacine et la sulfaméthazine.

La mise en œuvre *in situ* des protocoles développés a permis de tester la pertinence de l'approche PICT pour détecter une éventuelle acquisition de tolérance à ces substances sur les sites les plus contaminés. Les résultats obtenus ont été très variables en fonction du cours d'eau, de la période d'échantillonnage et du type de communauté étudiée (**Tableau 8**).

Dans le Tillet, lors de la première campagne réalisée en mars 2021, une augmentation significative de la tolérance en comparaison à celle mesurée à l'amont a été observée pour toutes les substances, soit au niveau de la Buse (aténolol et ofloxacine pour le périphyton) soit au niveau du port (diclofénac pour le périphyton, ofloxacine et sulfaméthazine pour le compartiment sédimentaire). Ces résultats semblent donc confirmer l'existence d'une pression chimique forte par les substances pharmaceutiques sur ces deux stations d'échantillonnage, comme cela a été révélé par les analyses chimiques au sein du compartiment sédimentaire (mais pas dans l'eau de surface lors de cette première campagne, à partir des extraits de POCIS et sur la base des substances recherchées). Cependant, on peut constater que la réponse PICT n'est pas toujours spécifique d'un type de substance puisque lors de cette campagne, ni l'aténolol, ni le diclofénac, ni l'ofloxacine ne présentaient dans les eaux de la Buse et du Port des concentrations supérieures à celles mesurées en amont. Cette réponse PICT semble donc plutôt refléter une pression plus globale, éventuellement par des substances présentant des modes d'actions relativement spécifiques. Ce constat n'a pas pu être vérifié sur les sédiments puisque ni l'ofloxacine, ni la sulfaméthazine n'ont été quantifiés dans ce compartiment du fait de limitations techniques.

Lors de la deuxième campagne sur le Tillet, réalisée en octobre-novembre 2021, les mesures de tolérance réalisées pour les communautés périphytiques à partir de l'activité photosynthétique (aténolol et diclofénac) n'ont pas pu être comparées à celle de l'amont, du fait d'un niveau d'activité basale trop faible au niveau de cette station. Cela souligne une éventuelle limite méthodologique de l'approche PICT basée sur ce paramètre fonctionnel limitant l'interprétation des résultats obtenus au niveau des stations Buse et Port, qui sont très comparables entre eux. Cependant, l'évaluation de la tolérance réalisée avec ces mêmes communautés en testant la toxicité de l'ofloxacine sur l'activité bêta-glucosidase a permis d'observer des tendances similaires entre les deux campagnes d'échantillonnage. Ainsi, comme en mars, une augmentation significative de la tolérance à l'ofloxacine en comparaison à celle mesurée à l'amont a été mise en évidence en octobre-novembre au niveau de la Buse, où la concentration en ofloxacine, bien que relativement faible (0,61 ng/L) était supérieure à celle mesurée en amont (0,06 ng/L) et dans le port (0,44 ng/L). A l'inverse, dans les sédiments, les communautés issues du site Buse étaient plus sensibles que celles des deux autres sites à la toxicité de l'ofloxacine, mais aussi de la sulfaméthazine, sur l'activité bêta-glucosidase sans que cela ne puisse être expliqué par les mesures chimiques. L'augmentation de la tolérance à ces deux substances, observée en mars pour les sédiments prélevés à la station Port par rapport à la station amont, n'a pas été mise en évidence lors de cette deuxième campagne.

Dans l'Ardières, la tolérance des communautés photosynthétiques du périphyton à l'aténolol n'a pu être mesurée qu'au niveau de la station amont du fait une nouvelle fois de contraintes méthodologiques. Ces limites techniques n'ont donc pas pu permettre de vérifier si l'augmentation forte de la concentration de cette substance dans l'eau entre l'amont et la station intermédiaire en avril-mai (0,26 ng/L à 20,4 ng/L) et en septembre 2021 (0,04 à 23,7 ng/L) a engendré une augmentation de tolérance au sein des communautés.

Concernant la tolérance au diclofénac de ces mêmes communautés, la comparaison entre les trois stations n'a pu être effectuée qu'au cours de la première campagne. Lors de celle-ci, malgré une augmentation notable des concentrations en diclofénac dans l'eau entre le site de l'amont (0,46 ng/L) et ceux intermédiaire (11,0 ng/L) et aval (10,1 ng/L), aucune acquisition de tolérance n'a été détectée sur ces sites et les communautés les plus sensibles à cette substance étaient celles de la station intermédiaire. L'absence de données de tolérance dans les stations intermédiaire et aval en septembre, où les concentrations en diclofénac sur les trois stations étaient assez similaires à celles mesurées lors de la première campagne, n'a pas permis de confirmer ces observations. Les niveaux de tolérance des communautés périphytiques à l'ofloxacine, mesurés à partir de la mesure l'activité bêta-glucosidase, ont été similaires entre les trois stations, durant les deux campagnes, reflétant ainsi le faible niveau de contamination des eaux de l'Ardières par cette substance (concentrations comprises entre <LQ et 0,51 ng/L). Dans le compartiment sédimentaire, la tolérance à cette substance évaluée à partir de cette même activité était également comparable entre les stations amont et aval durant les deux campagnes alors qu'elle était respectivement supérieure et inférieure à celles-ci au niveau de la station intermédiaire en avril-mai et en septembre. A l'inverse, ce même protocole a permis de mettre en évidence une augmentation de la tolérance à la sulfaméthazine pour les communautés sédimentaires prélevées aux stations intermédiaire et aval au cours des deux campagnes. Cela suggère une adaptation à la sulfaméthazine dans ces deux stations qui présentent les plus fortes concentrations en substances pharmaceutiques dans les sédiments (sans information concernant la sulfaméthazine, qui n'a pas été analysée).

De manière globale, bien que les résultats présentent de la variabilité et qu'ils soient parfois incomplets du fait de limites méthodologiques (pour les tests ciblant le rendement photosynthétique), l'approche PICT a permis de mettre en évidence de manière ponctuelle ou plus régulière une augmentation de la tolérance à tout ou partie des substances testées dans les communautés périphytiques et sédimentaires des sites les plus contaminés par les substances pharmaceutiques (en comparaison aux communautés des sites de référence). Dans la plupart des cas, la variation spatiale des niveaux de tolérance observée dans les deux cours d'eau étudiés semble donc refléter en partie la variation du niveau de pression chimique par ces substances. Cependant, la réponse mesurée par l'approche PICT ne semble pas être spécifique d'un seul type de substance mais plutôt d'une pression plus globale qui suggère l'existence de phénomènes de co-tolérance, comme cela a pu être déjà démontré avec d'autres types de contaminants, tels que les éléments traces métalliques ([Tlili et al., 2011b](#)) ou des herbicides présentant le même mode d'action ([Knauer et al., 2010](#)).

Cependant, il est important de préciser que l'exposition des communautés périphytiques aux substances pharmaceutiques a été évaluée à partir d'analyses réalisées sur des extraits de POCIS qui ne sont pas forcément représentatifs de la fraction qui se bioaccumule dans le périphyton ([Lecomte et al., 2023](#)). Il serait donc intéressant de compléter ces analyses chimiques par le dosage des substances ciblées par l'approche PICT dans la matrice périphytique (aténolol, diclofénac et ofloxacine) et dans le sédiment (ofloxacine et sulfaméthazine) pour mieux faire le lien entre les niveaux de tolérance observés et l'exposition spécifique des communautés à chacune d'entre elles.

6.1.2.2 Quantification de gènes de résistance aux antibiotiques

Une sélection de 13 gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et à d'autres stress toxiques a été quantifiée au sein de communautés périphytiques et sédimentaires à partir d'une approche de PCR quantitative en temps réel (qPCR) dont les protocoles sont bien maîtrisés. Pour la très grande majorité de ces gènes et quels que soient le cours d'eau, la période d'échantillonnage ou le compartiment considéré, les niveaux d'abondance étaient beaucoup plus faibles (parfois plus de 1000 fois) dans la station amont de référence que dans les deux autres stations (**Tableaux 9-10 ; Fig. 14-15**). Ces niveaux d'abondance sont donc fortement influencés par le gradient de pression anthropique.

Cependant, de manière générale, aucune corrélation claire et significative n'a été observée entre l'abondance des gènes d'antibiorésistance et les concentrations en contaminants (PCBs, HAPs, ETMs dans les sédiments ou pesticides dans l'eau de surface), incluant la somme des résidus médicamenteux. Il est cependant intéressant de souligner l'existence de corrélations significatives (corrélation de Pearson, p -value <0.05) entre les concentrations en caféine ([Annexe 3](#)), qui est considéré comme un bon marqueur anthropogénique ([Buerge et al., 2003](#)) et l'abondance de *int/1* ($r=0.71$) et de *su/1* ($r=0.68$) dans le sédiment, ainsi qu'entre les niveaux de caféine et l'abondance de *aadA* ($r=0.77$), *ermB* ($r=0.68$), *su/1* ($r=0.48$) et *su/2* ($r=0.50$) dans le biofilm.

Dans le Tillet, les niveaux d'abondance des gènes d'antibiorésistance les plus élevés ont toujours été observés au niveau de la buse, tant dans le périphyton que dans le sédiment, révélant un apport vraisemblable de microorganismes et/ou de matériel génétique porteurs de gènes de résistance au niveau de l'exutoire de la partie busée du Tillet. La diminution des niveaux d'abondance entre les stations buse et port, éloignées l'une de l'autre d'environ 700 m, questionne sur l'importance relative de la proximité de ce rejet par rapport à celle de la pression de sélection possiblement engendrée par la contamination chimique par les substances pharmaceutiques ou autres contaminants pouvant favoriser la résistance aux antibiotiques (tels que les ETMs ou les biocides, [ANSES, 2020](#)). Ce questionnement est amplifié par deux constats. Tout d'abord, dans le périphyton, les niveaux d'abondances relatives de la plupart des gènes de résistance mesurés au niveau de la buse sont comparables au cours des deux campagnes, et ce malgré le fait que, contrairement à la campagne d'octobre-novembre 2021, les mesures chimiques réalisées à partir des extraits de POCIS et sur la base des substances recherchées ne mettent pas en évidence une forte contamination par les substances pharmaceutiques sur ce site en mars 2021. A l'inverse, dans le compartiment sédimentaire, l'augmentation des concentrations en substances pharmaceutiques (mais aussi des autres contaminants mesurés, en particulier les ETMs), entre la station buse et le port ne se traduit pas par une augmentation de l'abondance des gènes de résistance. La diminution progressive de l'abondance de gènes de résistance à mesure de l'éloignement géographique depuis une source de contamination par ce type de matériel génétique (et de leur microorganismes hôtes) a déjà été démontré dans différents cours d'eau receveurs de rejets de stations d'eaux usées ([Karkman et al., 2019](#) ; [Larsson et Flach, 2022](#)).

A l'inverse, dans l'Ardières, les niveaux d'abondance de la grande majorité des gènes ciblés sont similaires entre le site intermédiaire, proche des rejets issus de la ville de Beaujeu, et la station aval, située plus d'une dizaine de kilomètres en aval et ce, tant dans le périphyton que dans le sédiment. Cela semble plutôt en accord avec les niveaux de contamination chimiques mesurées au cours de deux campagnes dans l'eau et les sédiments, qui sont assez comparables entre ces deux stations, tant pour les substances pharmaceutiques que pour les autres types de contaminants.

Cela amène à s'interroger sur les facteurs environnementaux qui pourraient expliquer la diminution de l'abondance des populations microbiennes porteuses de gènes de résistance observée dans le Tillet entre la station buse et la station aval, en particulier dans le sédiment qui est pourtant plus fortement contaminé dans le port. En effet, les stations Buse et Port présentent des différences de contexte environnemental importantes, la Buse étant située dans une zone lotique caractérisée par du sédiment de surface assez grossier et pauvre en matière organique alors que la station du port est dans un milieu lentique dominé par des sédiments fins et très riches en matières organiques ([Annexe 2](#)). Cette question mériterait donc d'être explorée dans le futur.

De manière globale, nos résultats montrent bien une concomitance assez forte entre, d'une part, le niveau d'anthropisation et la contamination chimique associée, notamment concernant les substances pharmaceutiques (mais pas uniquement) et, d'autre part, l'abondance relative des gènes de résistances à différents types d'antibiotiques. Cela a déjà été démontré fréquemment en milieu urbain ([Duarte et al., 2023](#)) mais notre étude démontre que des petits cours d'eau situés dans des territoires

à dominance agricole ne sont pas épargnés, même en absence de grandes villes ou d'une forte activité d'élevage, rejoignant ainsi les conclusions d'autres études réalisées en parallèle à ce travail (ex. projet ANR CHYPSTER¹; projet ZABR/AERM&C IDESOC² ; thèse d'Olivier [Grandjouan, 2024](#) ; etc.). Bien que l'influence de la pression chimique par les substances pharmaceutiques, et sa contribution relative sur l'augmentation de ces gènes de résistance en comparaison aux stations de référence, ne puisse pas être établie avec certitude dans notre étude, nos résultats suggèrent fortement l'existence d'un lien de cause à effet et soulève le besoin d'un effort de recherche pour mieux explorer cette question.

6.2 Influence du contexte de multi-contamination sur les caractéristiques structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes benthiques

6.2.1 Contexte de multi-contamination dans les deux cours d'eau

Comme cela avait déjà été mis en évidence en 2017 et 2018 dans le cadre du projet CommuSED (Action n°54 du Programme 2016 au titre de l'accord cadre Agence de l'Eau ZABR ; [Pesce et al., 2019](#)), le Tillet et l'Ardières sont soumises à un contexte de contamination multiple, du fait de la présence de différents types de contaminants chimiques dans leurs eaux de surface et leurs sédiments. Bien que loin d'être exhaustif, le large panel de substances pris en considération dans cette nouvelle étude a permis de mettre en évidence la grande diversité des substances présentes dans les deux cours d'eau, dans lesquels les 5 grandes classes de contaminants recherchées (PCBs, HAPs, ETMs, substances pharmaceutiques et pesticides) sont détectées, et ce, quelle que soit la station d'échantillonnage considérée (incluant les stations situées les plus en amont). Cela illustre clairement le fait que la plupart des cours d'eau sont soumis à des pressions chimiques de type « multi-contamination », y compris dans des zones géographiques qui semblent *a priori* peu impactées par la pression anthropique, comme par exemple la station amont de l'Ardières.

Cependant, l'analyse en composantes principales (ACP) réalisée avec la somme des concentrations mesurées dans l'eau et les sédiments pour chacune des 5 grandes classes de contaminants citées ci-dessus et pour chacune des stations étudiées montre que les sites amont des deux rivières présentent des profils de contamination très comparables entre eux, et ce quelle que soit la campagne de prélèvement considérée (**Fig.24**). Compte tenu du fait que ces stations ont été caractérisées la plupart du temps par les niveaux de contamination les plus faibles, quelle que soit la famille de substances chimiques ou le compartiment considéré (eau ou sédiment), le résultat de cette analyse multivariée conforte notre choix de considérer ces sites amont comme des stations de référence dans le cadre de notre étude.

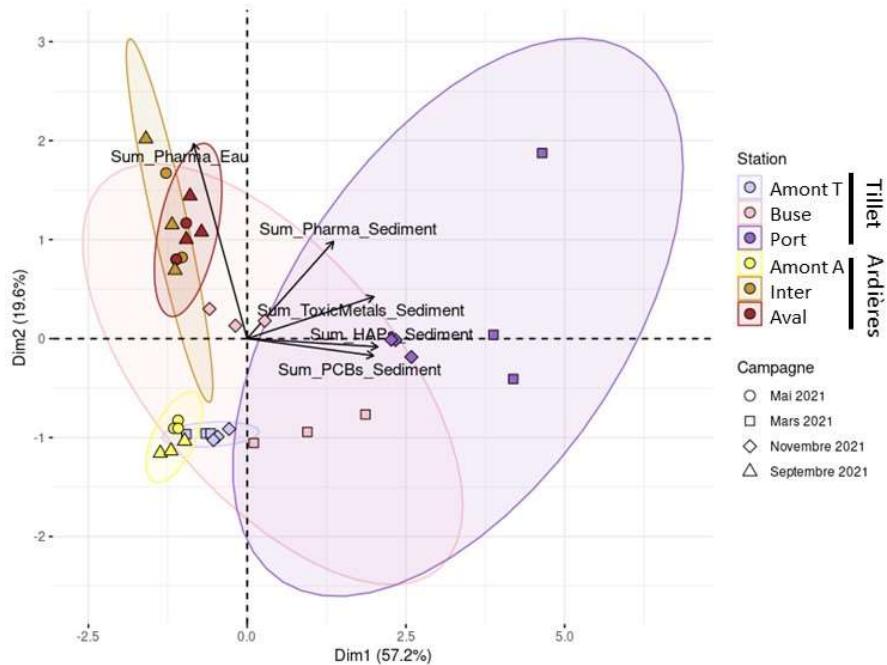
A l'inverse, cette ACP montre bien que ces deux cours d'eau présentent des signatures chimiques très différentes si on prend en considération les stations les plus contaminées, à savoir les stations buse et port pour le Tillet et les stations intermédiaire et aval pour l'Ardières. Cette distinction en terme de signature chimique est principalement due, d'une part, à la contamination des sédiments du Tillet (en particulier au niveau du port) par les PCBs, les HAPs, les ETMs et, dans une moindre mesure les substances pharmaceutiques et, d'autre part, par la contamination des eaux de l'Ardières par les substances pharmaceutiques (sans grande distinction entre les stations intermédiaire et aval).

Ces résultats confirment l'importance de considérer, en plus des eaux de surface, le compartiment sédimentaire afin de mieux caractériser l'état chimique des cours d'eau et d'avoir une meilleure représentation des différentes classes de contaminants qui peuvent dégrader cet état et impacter la qualité écologique de ces écosystèmes.

¹ <https://anr.fr/Projet-ANR-21-CE34-0013>

² <https://www.zabr.assograie.org/action/idesoc-identification-et-caracterisation-des-sources-de-contaminants-dans-des-bassins-versants-dusage-mixte-approche-integree/>

Fig. 24 : Résultats de l'ACP réalisée avec les variables synthétisant la contamination de l'eau et des sédiments des stations du Tillet et de l'Ardières aux différentes campagnes. *Sum_Pharma* : somme des résidus pharmaceutiques dans l'eau (via POCIS) ou dans les sédiments ; *Sum_ToxicMetals_Sediment* : somme des concentrations dans les sédiments de Cd, Cu, Cr, Zn, Ni, As, Co, Pb ; *Sum_PCBs_Sediment* : somme des PCBs dans les sédiments ; *Sum_HAP_Sediment* : somme des HAPs dans les sédiments. Les variables ont été centrées réduites préalablement à l'analyse. Les flèches représentent les variables sur le cercle des corrélations. Les points représentent la projection des sites sur les 2 premières dimensions de l'ACP, les ellipses colorées sont des ellipses de concentration pour chacune des stations.



6.2.2 Conséquences sur les caractéristiques structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes benthiques

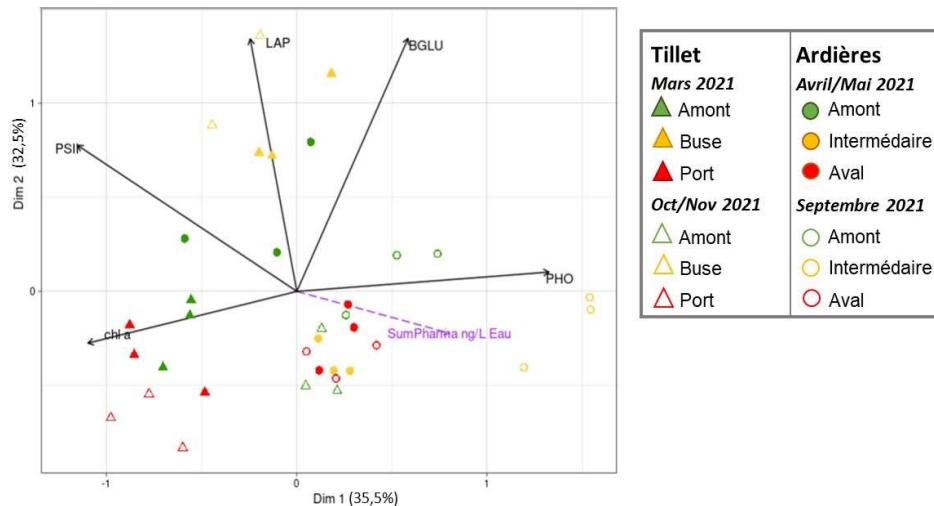
Concernant la structure et la diversité bactériennes dans le périphyton et sédiment, la mise en relation des données générées par l'approche de metabarcoding avec les niveaux de contamination dans l'eau ou les sédiments n'a pas permis d'identifier de relations statistiques significatives. Ainsi, la structure bactérienne semble être influencée par un ensemble de facteurs environnementaux (incluant possiblement la contamination), qui discriminent clairement les communautés en fonction de la rivière dont elles sont issues et de la campagne d'échantillonnage, comme le montrent les analyses multivariées présentées précédemment (Fig. 17 et Fig. 19),

La biodiversité est également peu influencée par les niveaux de contamination : par exemple, l'indice de Shannon est peu variable d'une station à l'autre sauf pour le sédiment de la station port dans le Tillet pour lequel la biodiversité est plus faible que pour tous les autres échantillons. Au-delà de la contamination chimique, cette différence peut également s'expliquer par les fortes différences physico-chimiques entre le sédiment du port (zone lenticule, sédiment fin, riche en matière organique) et celui de la buse ou de l'amont (zone lotique, sédiment plus grossier et moins riche en matière organique). Sur la base de ces résultats, le metabarcoding 16S des communautés microbiennes benthiques semble peu adapté pour diagnostiquer la pression chimique.

Concernant la dimension fonctionnelle, la distribution des fonctions microbiennes montre une variabilité spatio-temporelle importante pour les deux rivières, sans discrimination claire par rivière, campagne ou station, quel que soit le compartiment étudié : périphyton (Fig. 25) ou sédiment (Fig. 26).

Pour le périphyton, l'ACP présenté en **figure 25**, qui visait à appréhender la corrélation entre la distribution des fonctions microbiennes et plusieurs variables environnementales (température, somme des résidus pharmaceutiques, somme des pesticides dans l'eau de surface, etc.) met en évidence que seule l'influence de la somme des résidus médicamenteux dans l'eau de surface était significativement mise en évidence par celle-ci (27%, p-value < 0.05). On peut noter que l'axe 1 de l'ACP permet de discriminer les échantillons collectés en septembre 2021 dans la station intermédiaire de l'Ardières de tous les autres, cette station étant alors caractérisée par une plus forte activité phosphatase, une plus faible activité autotrophe et une plus forte concentration en pharmaceutiques. De plus, l'axe 2 permet également de séparer entre eux les échantillons du Tillet avec d'une part les échantillons de l'amont et du port caractérisés par une faible activité hétérotrophe et d'autre part les échantillons de la Buse, caractérisés par une plus forte activité hétérotrophe. Des analyses de corrélations entre activités microbiennes et niveaux de contamination confirment une légère corrélation entre phosphatase et somme des pharmaceutiques ($r = 0.41$, p-value < 0.05), cependant cette corrélation est principalement due à quelques échantillons et des analyses supplémentaires sont nécessaires pour le confirmer.

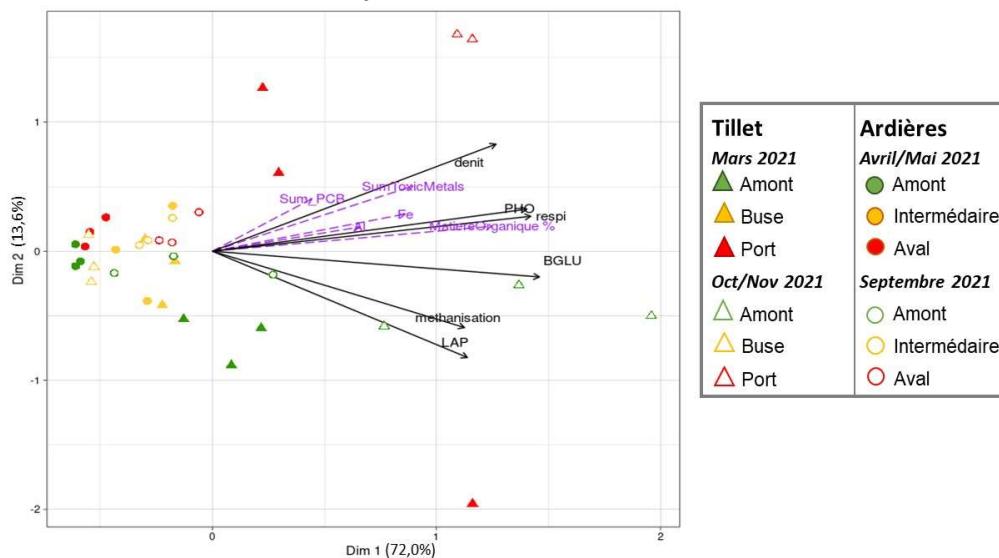
Fig. 25 : Résultats de l'ACP réalisée avec les variables fonctionnelles des communautés microbiennes du périphyton des stations du Tillet et de l'Ardières aux différentes campagnes. Les variables ont été centrées réduites préalablement à l'analyse. Les flèches pleines noires représentent les variables sur le cercle des corrélations : chl a : abondance en chlorophylle-a ; PSII : efficacité photosynthétique ; LAP : activité de la leucine-aminopeptidase ; BGLU : activité de la beta-glucosidase ; PHO : activité de la phosphatase. Les points représentent la projection des sites sur les 2 premières dimensions de l'ACP. La flèche en pointillés violets représente la projection significative ($p\text{-value} < 0.05$) d'une variable explicative, SumPharma : la somme des concentrations en résidus médicamenteux dans l'eau de surface (mesurée via les POCIS hors caféine).



Pour le sédiment, la répartition des stations dans l'ACP est dominée par la discrimination le long de l'axe 1 des stations amont et port du Tillet de toutes les autres (Fig. 26). La recherche de corrélation entre la distribution de ces fonctions microbiennes du sédiment et de plusieurs variables environnementales (% de matière organique, somme des résidus pharmaceutiques, somme des PCBs, somme des HAPs, somme des ETMs – n'incluant pas Al, Fe et Mn, concentration en Al, en Fe, en Mn dans les sédiments, concentrations en caféine) a mis en évidence que les variations de la contamination en PCBs (20%), en métaux (somme des ETMs : 58%; Al : 26% ; Fe : 45%) ainsi que le pourcentage de matière organique (87%) étaient significativement expliquées par cette ACP (p-value < 0.05). Tous ces paramètres sont également positivement corrélés avec les activités microbiennes, notamment la dénitrification, la respiration et la phosphatase.

Il est important de noter que le pourcentage de matière organique est le facteur environnemental le mieux corrélé dans cette ACP aux fonctions microbiennes du sédiment, mettant en avance l'importance de ce paramètre pour les activités microbiennes. Ces résultats sont en accord avec de précédentes observations sur le Tillet (projet ComuSED).

Fig. 26 : Résultats de l'ACP réalisée avec les variables fonctionnelles des communautés microbiennes du sédiment des stations du Tillet et de l'Ardières aux différentes campagnes. Les variables ont été centrées réduites préalablement à l'analyse. Les flèches pleines noires représentent les variables sur le cercle des corrélations : denit : dénitrification *in vitro*; respi : respiration *in vitro*; LAP : activité de la leucine-aminopeptidase ; BGLU : activité de la beta-glucosidase ; PHO : activité de la phosphatase. Les points représentent la projection des sites sur les 2 premières dimensions de l'ACP. Les flèches en pointillés violettes représentent les projections significatives (p -value < 0.05) de variables explicatives, Sum PCBs : la somme des PCBs dans les sédiments ; Sum_ToxicMetals : somme des concentrations dans les sédiments de Cd, Cu, Cr, Zn, Ni, As, Co, Pb ; Al : concentration en aluminium dans les sédiments, Fe : concentration en fer dans les sédiments.



7 Principales conclusions

Le projet PharmaTOX a permis de :

- confirmer que **l'Ardières et le Tillet sont soumis à une contamination chronique par les substances pharmaceutiques**, issues principalement de rejets intervenant respectivement au niveau des villes de Beaujeu et d'Aix-les-Bains, et que celle-ci s'inscrit dans un contexte de multi-contamination qui n'épargne pas certaines zones géographiques qui semblent *a priori* peu impactées par la pression anthropique, comme par exemple la station amont de l'Ardières ;
- montrer dans ces deux cours d'eau que la contamination chimique par les substances pharmaceutiques est associée à une contamination microbiologique qui engendre une **augmentation très significative (pouvant atteindre un facteur 1000) de l'abondance de bactéries porteuses de gènes impliqués dans la résistance à différents antibiotiques** dans les stations les plus contaminées ;
- questionner le **lien entre la contamination chimique (en particulier celle par les substances pharmaceutiques) et la prévalence de la résistance aux antibiotiques** dans ces deux cours d'eau ;

- montrer, à partir d'une **approche PICT**, que la variation spatio-temporelle des niveaux de tolérance des communautés périphytiques et sédimentaires à différentes substances pharmaceutiques reflète en partie la variation du niveau de pression chimique par ces substances, mais qu'elle ne semble pas être spécifique d'un seul type de substances mais plutôt d'une pression plus globale qui suggère l'existence de phénomènes de co-tolérance ;
- démontrer l'importance de **considérer à la fois les masses d'eau et le compartiment sédimentaire**, tant pour caractériser la contamination chimique que pour étudier ses conséquences sur les communautés microbiennes et le développement de l'antibiorésistance.

Pour compléter ce travail, il serait pertinent d'étudier, entre autre, :

- si le développement de l'antibiorésistance s'accompagne dans ces deux cours d'eau d'une augmentation de l'abondance et de la diversité de microorganismes pathogènes, ce qui pourrait soulever la question du risque associé pour la santé humaine et animale ;
- le lien spécifique entre l'exposition chronique aux substances pharmaceutiques et l'acquisition de tolérance (en tenant compte des spécificités du périphyton et du sédiment), pour mieux évaluer le potentiel opérationnel de l'approche PICT.

Références bibliographiques

- Albert JS, Destouni G, Duke-Sylvester SM, Magurran AE, Oberdorff T, Reis RE, Winemiller KO, Ripple WJ, 2021. Scientists' warning to humanity on the freshwater biodiversity crisis. *Ambio*. 50:85-94. doi: 10.1007/s13280-020-01318-8
- Anses, 2019. Avis de l'Anses relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de diclofénac dans les eaux destinées à la consommation humaine. 59 p. <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2016SA0135.pdf>
- Anses, 2020. Antibiorésistance et environnement. État et causes possibles de la contamination des milieux en France par les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques et les supports génétiques de la résistance aux antibiotiques. Avis de l'Anses. Rapport d'expertise collective. 263 p. <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2016SA0252Ra.pdf>
- Armani G, Naffrechoux E, Pesce S, 2021. Efficacité et perception sociale de la restauration du Tillet et de la qualité de l'eau du lac du Bourget : Articulation entre Science et Société (projet PersoResto). Rapport Final. Action n°58 du Programme 2017 au titre de l'accord cadre Agence de l'Eau ZABR. 64 p. <https://www.zabr.assograie.org/wp-content/uploads/2023/01/B55-PersoResto-Rapport.pdf>
- Aubertheau E, Stalder T, Mondamert L, Ploy MC, Dagot C, Labanowski J, 2017. Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance. *Sci Total Environ*. 579:1387-1398. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.11.136
- Bengtsson-Palme J, Larsson DG, 2016. Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environ Int*. 86:140-9. doi: 10.1016/j.envint.2015.10.015
- Billet L, 2021. Potentiel de dispersion de l'antibiotrophie le long du continuum lisier-sol-sédiment dans les agrosystèmes contaminés par la sulfaméthazine. Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard (Lyon). 178 p. <https://theses.hal.science/tel-03714128/file/TH2021BILLETLOREN.pdf>
- Blanck H, Wängberg SA, Molander S, 1988. Pollution-induced community tolerance—a new ecotoxicological tool. In: Cairns J and Pratt JR (Eds.), *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*. 1988; ASTM STP 988, Philadelphia, pp. 219–230.
- Bonnineau C, Artigas J, Chaumet B, Dabrin A, Faburé J, Ferrari BJD, Lebrun JD, Margoum C, Mazzella N, Miège C, Morin S, Uher E, Babut M, Pesce S, 2021. Role of Biofilms in Contaminant Bioaccumulation and Trophic Transfer in Aquatic Ecosystems: Current State of Knowledge and Future Challenges. *Rev Environ Contam Toxicol*. 253: 115-153. doi: 10.1007/398_2019_39
- Bonnineau C, Guasch H, Proia L, Ricart M, Geiszinger A, Romaní AM, Sabater S, 2010. Fluvial biofilms: A pertinent tool to assess beta-blockers toxicity. *Aquat Toxicol*. 96:225-33. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.10.024
- Buerge IJ, Poiger T, Müller MD, Buser HR, 2003. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 37:691-700. Doi: 10.1021/es020125z

- Calero-Cáceres W, Méndez J, Martín-Díaz J, Muniesa M, 2017. The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environ Pollut.* 223: 384-394. doi: 10.1016/j.envpol.2017.01.035
- Cardinale BJ, Duffy JE, Gonzalez A, Hooper DU, Perrings C, Venail P, Narwani A, Mace GM, Tilman D, Wardle DA, Kinzig AP, Daily GC, Loreau M, Grace JB, Larigauderie A, Srivastava DS, Naeem S, 2012. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature.* 486: 59-67. doi: 10.1038/nature11148
- Cébron A, Norini MP, Beguiristain T, Leyval C, 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDA) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J. Microbiol. Methods* 73: 148-159. doi: 10.1016/j.mimet.2008.01.009
- Chonova T, Labanowski J, Cournoyer B, Chardon C, Keck F, Laurent É, Mondamert L, Vasselon V, Wiest L, Bouchez A, 2018. River biofilm community changes related to pharmaceutical loads emitted by a wastewater treatment plant. *Environ Sci Pollut Res Int.* 25:9254-9264. doi: 10.1007/s11356-017-0024-0
- Corcoll N, Acuña V, Barceló D, Casellas M, Guasch H, Huerta B, Petrovic M, Ponsatí L, Rodríguez-Mozaz S, Sabater S, 2014. Pollution-induced community tolerance to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in fluvial biofilm communities affected by WWTP effluents. *Chemosphere.* 112: 185-93. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.128
- Duarte DJ, Zillien C, Kox M, Oldenkamp R, van der Zaan B, Roex E, Ragas AMJ, 2023. Characterization of urban sources of antibiotics and antibiotic-resistance genes in a Dutch sewer catchment. *Sci Total Environ.* 905: 167439. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.167439
- European Commission, 2019. European union strategic approach to pharmaceuticals in the environment: communication from the commission to the European parliament, the Council and the European economic and social committee. COM(2019) 128 final. [https://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/pdf/strategic approach pharmaceuticals env.PDF](https://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/pdf стратегичен приход за фармацевтически обекти)
- Fent K, Weston AA, Caminada D, 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 76: 122-59. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.09.009
- Fernández-Fernández V, Ramil M, Cela R, Rodríguez I, 2023. Occurrence and risk assessment of pesticides and pharmaceuticals in viticulture impacted watersheds from Northwest Spain. *Chemosphere.* 341: 140098. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.140098
- Gouy V, Liger L, Ahrouch S, Bonnneau C, Carluer N, Chaumot A, Coquery M, Dabrin A, Margoum C, Pesce S, 2021. Ardières-Morcille in the Beaujolais, France: A research catchment dedicated to study of the transport and impacts of diffuse agricultural pollution in rivers. *Hydrol. Process.* 35: e14384. doi: 10.1002/hyp.14384
- Grandjouan O, 2024. Apports de la biogéochimie pour l'évaluation d'un modèle hydrologique distribué en milieu péri-urbain. Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard (Lyon). <https://theses.fr/s262769>
- Groh K, Vom Berg C, Schirmer K, Tlili A, 2022. Anthropogenic Chemicals As Underestimated Drivers of Biodiversity Loss: Scientific and Societal Implications. *Environ Sci Technol.* 56: 707-710. doi: 10.1021/acs.est.1c08399
- Guo XP, Yang Y, Lu DP, Niu ZS, Feng JN, Chen YR, Tou FY, Garner E, Xu J, Liu M, Hochella MF Jr, 2018. Biofilms as a sink for antibiotic resistance genes (ARGs) in the Yangtze Estuary. *Water Res.* 129: 277-286. doi: 10.1016/j.watres.2017.11.029
- Haenni M, Dagot C, Chesneau O, Bibbal D, Labanowski J, Vialette M, Bouchard D, Martin-Laurent F, Calsat L, Nazaret S, Petit F, Pourcher AM, Togola A, Bachelot M, Topp E, Hocquet , 2022. Environmental contamination in a high-income country (France) by antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes: Status and possible causes. *Environ Int.* 159: 107047. doi: 10.1016/j.envint.2021.107047
- IPBES (The Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services), 2019. The global assessment report on biodiversity and ecosystem services: Summary for policy makers. IPBES Plenary at its seventh session (IPBES 7, Paris, 2019). Zenodo. 2019. doi: 10.5281/zenodo.3553579
- Karkman A, Pärnänen K, Larsson DGJ, 2019. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nat Commun.* 10:80. doi: 10.1038/s41467-018-07992-3
- Kergoat L, Besse-Hoggan P, Leremboure M, Beguet J, Devers M, Martin-Laurent F, Masson M, Morin S, Roinat A, Pesce S, Bonnneau C, 2021. Environmental Concentrations of Sulfonamides Can Alter Bacterial Structure and Induce Diatom Deformities in Freshwater Biofilm Communities. *Front Microbiol.* 12: 643719. doi: 10.3389/fmicb.2021.643719
- Klimaszyk P, Rzymski P, 2018. Water and Aquatic Fauna on Drugs: What are the Impacts of Pharmaceutical Pollution? In: Zelenakova M (eds) Water Management and the Environment: Case Studies. doi: 10.1007/978-3-319-79014-5_12
- Knauer K, Leimgruber A, Hommenc U, Knauert S, 2010. Co-tolerance of phytoplankton communities to photosynthesis II inhibitors. *Aquat. Toxicol.* 96: 256–263. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.11.001

- Larsson DGJ., Flach CF, 2022. Antibiotic resistance in the environment. *Nat. Rev. Microbiol.* 20: 257–269. doi: 10.1038/s41579-021-00649-x
- Lau CH, Tien YC, Stedtfeld RD, Topp E., 2020. Impacts of multi-year field exposure of agricultural soil to macrolide antibiotics on the abundance of antibiotic resistance genes and selected mobile genetic elements. *Sci. Total Environ.* 727: 138520. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138520
- Lawrence JR, Swerhone GD, Topp E, Korber DR, Neu TR, Wassenaar LI, 2007. Structural and functional responses of river biofilm communities to the nonsteroidal anti-inflammatory diclofenac. *Environ Toxicol Chem.* 26: 573-82. doi: 10.1897/06-340r.1
- Lawrence JR, Zhu B, Swerhone GD, Roy J, Tumber V, Waiser MJ, Topp E, Korber DR, 2012. Molecular and microscopic assessment of the effects of caffeine, acetaminophen, diclofenac, and their mixtures on river biofilm communities. *Environ Toxicol Chem.* 31: 508-517. doi: 10.1002/etc.1723
- Lecomte V, Artigas J, Bonnneau C, Brelot E, Dagot C, Hocquet D, Labanowski J, Miège C, Mondamert L, Martin-Laurent F, Pesce S, 2023. Contamination des milieux aquatiques par les résidus de médicaments : exposition, risques écotoxicologiques, antibiorésistance et leviers d'actions. *Environ Risque Sante* 22: 359-375. doi : 10.1684/ers.2023.1754
- Li LG, Huang Q, Yin X, Zhang T, 2020. Source tracking of antibiotic resistance genes in the environment - Challenges, progress, and prospects. *Water Res.* 185: 116127. doi: 10.1016/j.watres.2020.116127
- Lyautey E, Bonnneau C, Billard P, Loizeau J-L, Naffrechoux E, Tlili A, Topp E, Ferrari BJD, Pesce S, 2021. Diversity, Functions and Antibiotic Resistance of Sediment Microbial Communities From Lake Geneva Are Driven by the Spatial Distribution of Anthropogenic Contamination. *Front. Microbiol.* 12: 738629. doi: 10.3389/fmicb.2021.738629
- Masset T, 2019. Ecodynamique des PCB en milieu lacustre : transferts abiotiques et bioaccumulation par les espèces piscicoles. L'exemple du Lac du Bourget (2016-19). Thèse de la Communauté Université Grenoble Alpes. 213 p. <https://theses.hal.science/tel-03574658/document>
- Matviichuk O, Mondamert L, Geffroy C, Gaschet M, Dagot C, Labanowski J, 2022. River Biofilms Microbiome and Resistome Responses to Wastewater Treatment Plant Effluents Containing Antibiotics. *Front Microbiol.* 13: 795206. doi: 10.3389/fmicb.2022.795206
- Matviichuk O, Mondamert L, Geffroy C, Dagot C, Labanowski J, 2023. Life in an unsuspected antibiotics world: River biofilms. *Water Res.* 231: 119611. doi: 10.1016/j.watres.2023.119611
- Miège C, Choubert JM, Ribeiro L, Eusèbe M, Coquery M, 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants--conception of a database and first results. *Environ Pollut.* 157: 1721-1726. doi: 10.1016/j.envpol.2008.11.045
- Montuelle B, Dorigo U, Bérard A, Volat B, Bouchez A, Tlili A, Gouy V, Pesce S, 2010. The periphyton as a multitemetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières–Morcille experimental watershed. *Hydrobiologia* 657 : 123-141. doi: 10.1007/978-94-007-0608-8_9
- Naffrechoux E, Ferrari B, Lyautey E, Perga M-E, Cottin N, Fanget P, Cachera S, 2017. Quantification des effets de la restauration d'un écosystème lacustre contaminé par des polluants organiques persistants. Application à la pollution aux PCB du Lac du Bourget. Action n°48 du programme 2015 au titre de l'accord-cadre Agence de l'eau RMC – ZABR. Final Report. 59 p. <http://www.graie.org/zabr/zabrdoc/AccordCadre-fiches/2015/2015-48-Restolac-Rapport.pdf>
- O'Brien SF, Yi QL, 2016. How do I interpret a confidence interval? *Transfusion* 56: 1680-1683. doi: 10.1111/trf.13635
- Paumelle M, Donnadieu F, Joly M, Besse-Hoggan P, Artigas J, 2021. Effects of sulfonamide antibiotics on aquatic microbial community composition and functions. *Environ. Int.* 146: 106198. doi: 10.1016/j.envint.2020.106198
- Patel M, Kumar R, Kishor K, Mlsna T, Pittman CU Jr, Mohan D, 2019. Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chem Rev.* 119: 3510-3673. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00299
- Persson L, Carney Almroth BM, Collins CD, Cornell S, de Wit CA, Diamond ML, Fantke P, Hassellöv M, MacLeod M, Ryberg MW, Søgaard Jørgensen P, Villarrubia-Gómez P, Wang Z, Hauschild MZ, 2022. Outside the Safe Operating Space of the Planetary Boundary for Novel Entities. *Environ Sci Technol.* 56: 1510-1521. doi: 10.1021/acs.est.1c04158
- Pesce S, Lyautey E, Naffrechoux E, Ferrari B, Dabrin A, Margoum C, Miège C, Masson M, Vivien R, Bonnneau 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 (Projet CommuSED). Rapport Final. Action n°54 du Programme 2016 au titre de l'accord cadre Agence de l'Eau ZABR. 68 p. http://www.graie.org/zabr/zabrdoc/AccordCadre-fiches/2017/Rapport_A54.pdf

- Pesce S, Bonnineau C, Artigas J, Martin-Laurent F, Morin S, 2021a. Les communautés microbiennes benthiques pour le diagnostic de l'impact écologique des micropolluants dans les cours d'eau. *Sciences Eaux et Territoires*. 37 : 92-99. doi:10.14758/SET-REVUE.2021.4.17
- Pesce S, Kergoat L, Paris L, Billet L, Besse-Hoggan P, Bonnineau C, 2021b. Contrasting effects of environmental concentrations of sulfonamides on microbial heterotrophic activities in freshwater sediment. *Front. Microbiol.* 12:753647. doi : 10.3389/fmicb.2021.753647
- Pesce S, Margoum C, Montuelle B, 2010. In situ relationships between spatio-temporal variations in diuron concentrations and phototrophic biofilm tolerance in a contaminated river. *Water Res.* 44: 1941–1949. doi: 10.1016/j.watres.2009.11.053
- Proia L, Osorio V, Soley S, Köck-Schulmeyer M, Pérez S, Barceló D, Romaní AM, Sabater S, 2013. Effects of pesticides and pharmaceuticals on biofilms in a highly impacted river. *Environ Pollut.* doi: 10.1016/j.envpol.2013.02.022
- Proia L, von Schiller D, Sànchez-Melsió A, Sabater S, Borrego CM, Rodríguez-Mozaz S, Balcázar JL, 2016. Occurrence and persistence of antibiotic resistance genes in river biofilms after wastewater inputs in small rivers. *Environ Pollut.* 210: 121-128. doi: 10.1016/j.envpol.2015.11.035
- R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>
- Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D, 2015. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS One*. 10: e0146021. doi: 10.1371/journal.pone.0146021
- Robinson RFA, Mills GA, Gravell A, Schumacher M, Fones GR, 2023. Occurrence of organic pollutants in the River Itchen and River Test-two chalk streams in Southern England, UK. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 30: 17965-17983. doi: 10.1007/s11356-022-23476-w
- RPQS Beaujeu, 2021. Rapport annuel sur le prix et la qualité du service public de l'assainissement Collectif. Année : 2020. 16 pages. <https://www.services.eaufrance.fr/sispea//referential/download-rpq.action?collectivityId=175717&rpqid=496653>
- Tell J, Caldwell DJ, Häner A, Hellstern J, Hoeger B, Journel R, Mastrocco F, Ryan JJ, Snape J, Straub JO, Vestel J, 2019. Science-based Targets for Antibiotics in Receiving Waters from Pharmaceutical Manufacturing Operations. *Integr Environ Assess Manag.* 15:312-319. doi: 10.1002/ieam
- Tlili A, Bérard A, Blanck H, Bouchez A, Cássio F, Eriksson KM, et al., 2016. Pollution-induced community tolerance (PICT): towards an ecologically relevant risk assessment of chemicals in aquatic systems. *Freshwater Biol* 61: 2141-2151. Doi: 10.1111/fwb.12558
- Tlili A, Corcoll N, Bonet B, Morin S, Montuelle B, Bérard A, Guasch H, 2011a. In situ spatio-temporal changes in pollution-induced community tolerance to zinc in autotrophic and heterotrophic biofilm communities. *Ecotoxicology* 20:1823-1839. doi: 10.1007/s10646-011-0721-2
- Tlili A, Marechal M, Bérard A, Volat B, Montuelle B., 2011b. Enhanced co-tolerance and co-sensitivity from long-term metal exposures of heterotrophic and autotrophic components of fluvial biofilms. *Sci Total Environ.* 409:4335-4343. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.07.026
- Tlili A, Corcoll N, Arrhenius Å, Backhaus T, Hollender J, Creusot N, Wagner B, Behra R, 2020. Tolerance Patterns in Stream Biofilms Link Complex Chemical Pollution to Ecological Impacts. *Environ Sci Technol.* 54:10745-10753. doi: 10.1021/acs.est.0c02975
- Wilkinson JL, Boxall ABA, Kolpin DW, Leung KMY, Lai RWS, Galbán-Malagón C, et al., 2022 Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 119:e2113947119. doi: 10.1073/pnas.2113947119
- Wickham H, 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- .

Annexe 1 : Liste des contaminants chimiques analysés dans le projet

Laboratoire	LCME – USMB		RiverLy - INRAE (LAMA)		
Classe	PCBs n=7	HAPs n=15	Eléments traces métalliques (ETMs) n=12	Pesticides (et métabolites) n=35	Substances pharmaceutiques n=39 (sédiment) ou 45 (POCIS) * substances non analysées dans le sédiment
Technique(s) d'analyse	HPLC	GCMS	ICP-TQ-MS ou ICP-OES	SPE-RPLC-ESI(+) -MSMS	
Echantillonnage	Sédiment de surface (ponctuel)		DGT (2 semaines)	TSP (2 semaines)	Sédiment de surface (ponctuel) et POCIS (2 semaines)
Laboratoire d'analyse	EDYTM (USMB-CNRS)		RiverLy (INRAE)		
Substances	7 PCB indicateurs PCB28 PCB52 PCB101 PCB118 PCB153 PCB138 PCB180	acénaphthène anthracène benzo[a]anthracène benzo[a]pyrène benzo[b]fluoranthène benzo[g,h,i]perylène benzo[k]fluoranthène chrysène dibenzo[ah]anthracène fluoranthène fluorine indeno[1,2,3-cd]pyrène naphthalène phénanthrène pyrène	aluminium (Al) arsenic (As) cadmium (Cd) cobalt (Co) chrome (Cr) cuivre (Cu) cer (Fe) manganèse (Mn) nickel (Ni) plomb (Pb) vanadium (V) zinc (Zn)	acétochlore aclonifène atrazine atrazine déséthyl atrazine desisopropyl azoxystrobine boscalide carbendazime chlorfenvinphos chlorpyriphos_e chlorpyriphos_m chlortoluron dcpmu diflufénicanil dimethoate dimétomorphe diuron fludioxonil flufénoxuron flurtamone imidaclopride isoproturon isoproturon desméthyl isoxabène linuron métamitronate métazachlor métolachlore norflurazon oryzalin pirimicarbe procymidone simazine spiroxamine tébuconazole	acébutolol acétyl sulfaméthoxazole acide fénofibrique acide niflumique alprazolam amisulpride amitriptyline aténolol azithromycin* bézafibrate carbamazépine carbamazépine époxyde céliptrolol ciprofloxacine* clarithromycine clindamycine cyclophosphamide diazépam diclofénac érythromycine fénofibrate flécaïnide fluoxétine furosémide gemfibrozil irbesartan kétoprofène lamotrigine metformine* metoprolol métronidazole naproxen nordiazépam norfluoxacine* norfluoxétine* ofloxacine* oxazépam paracétamol propranolol salbutamol sotalol sulfaméthoxazole théophylline triméthoprime venlafaxine

Annexe 2 : Caractéristiques physico-chimiques des stations

Annexe 2A : Caractéristiques granulométriques du sédiment

	Tillet					
	Mars 2021			Oct/Nov 2021		
	Amont T	Buse	Port	Amont T	Buse	Port
Matière organique (%)	8,2 ±2,2	4,1 ±2,6	14,5 ±0,8	14,0 ±3,8	1,7 ±0,5	15,3 ±1,7
Sable grossier (0,5-2 mm) (%)	5,5 ±4,2	33,7 ±40,3	0,7 ±0,5	4,8 ±4,5	38,3 ±26,6	1,3 ±0,4
Sable moyen (200-500 µm) (%)	14,5 ±6,8	29,5 ±15,6	1,5 ±0,7	10,4 ±7,7	45,1 ±14,6	2,7 ±0,7
Sable fin (50-200 µm) (%)	35,4 ±5,0	26,2 ±23,3	14,8 ±5,3	21,0 ±9,0	13,8 ±10,9	21,3 ±2,6
Argile, Limon (<50 µm) (%)	44,6 ±11,9	10,6 ±8,4	83,0 ±6,5	63,7 ±15,2	2,8 ±1,2	74,7 ±3,7
Ardières						
	Avril/Mai 2021			Sept 2021		
	Amont A	Inter	Aval	Amont A	Inter	Aval
	2,2 ±0,6	4,6 ±1,7	1,9 ±0,6	5,4 ±3,3	3,8 ±0,9	4,6 ±0,1
Sable grossier 0,5-2 mm) (%)	39,9 ±18,7	5,8 ±2,0	35,5 ±21,6	21,2 ±12,6	12,4 ±16,6	1,2 ±0,3
Sable moyen (200-500 µm) (%)	36,7 ±14,7	47,7 ±12,3	42,0 ±6,2	36,2 ±4,5	41,4 ±8,5	28,4 ±11,8
Sable fin (50-200 µm) (%)	15,4 ±6,6	31,9 ±5,0	17,7 ±13,7	25,5 ±10,3	33,8 ±19,9	53,4 ±9,2
Argile, Limon (<50 µm) (%)	8,0 ±3,2	14,6 ±7,2	4,9 ±4,0	17,1 ±9,4	12,4 ±4,7	17,1 ±3,0

Annexe 2A : Conductivité, pH, oxygénation et température de l'eau de surface

	Tillet					
	Mars 2021			Oct/Nov 2021		
	Amont T	Buse	Port	Amont T	Buse	Port
Conductivité (µS/cm)	495 ±128	504 ±134	499 ±135	648 ±46	630 ±96	592 ±54
pH (unité pH)	8,4 ±0,3	8,3 ±0,0	8,3 ±0,0	8,3 ±0,1	8,4 ±0,3	8,5 ±0,2
Oxygène dissous (mg/L)	13,1 ±0,9	12,2 ±0,4	13,5 ±1,0	11,3 ±0,6	10,0 ±0,7	10,3 ±0,8
Saturation en oxygène (%)	110,6 ±8,8	111,7 ±1,5	124,9 ±17,2	100,8 ±2,8	106,3 ±3,6	109,0 ±12,2
Température (°C)	7,6 ±11,9	11,6 ±8,4	12,3 ±6,5	10,2 ±15,2	18,7 ±1,2	18,1 ±3,7
Ardières						
	Avril/Mai 2021			Sept 2021		
	Amont A	Inter	Aval	Amont A	Inter	Aval
	97 ±15	132 ±25	159 ±27	112 ±4	171 ±7	213 ±9
pH (unité pH)	8,2 ±0,4	8,2 ±0,3	8,1 ±0,3	7,8 ±0,3	7,6 ±0,2	7,9 ±0,2
Oxygène dissous (mg/L)	12,8 ±0,8	13,2 ±0,8	12,3 ±1,1	11,5 ±0,3	11,0 ±0,3	10,3 ±0,5
Saturation en oxygène (%)	111,2 ±2,0	113,8 ±3,3	110,5 ±2,4	110,3 ±1,2	109,2 ±0,9	103,9 ±3,0
Température (°C)	9,7 ±1,2	8,9 ±1,5	9,2 ±1,6	13,4 ±0,6	15,0 ±0,8	16,0 ±0,9

Annexe 3 : Concentrations en caféine dans les eaux de surface et les sédiments

		Tillet					
		Mars 2021			Oct/Nov 2021		
		Amont T	Buse	Port	Amont T	Buse	Port
Concentration en caféine dans les eaux de surface* (ng/L) <i>* estimé à partir des extraits de POCIS</i>		168,1 $\pm 5,6$	73,2 $\pm 8,2$	59,4 $\pm 6,2$	24,2 $\pm 2,4$	153,7 $\pm 4,5$	61,5 $\pm 2,3$
Concentration en caféine dans les sédiments (ng/g)		1,30 $\pm 0,28$	4,48 $\pm 1,16$	3,26 $\pm 0,27$	<1,00	5,02 $\pm 3,30$	4,01 $\pm 0,50$
Ardières							
		Avril/Mai 2021			Sept 2021		
		Amont A	Inter	Aval	Amont A	Inter	Aval
Concentration en caféine dans les eaux de surface* (ng/L) <i>* estimé à partir des extraits de POCIS</i>		11,8 $\pm 3,5$	59,9 $\pm 14,2$	44,8 $\pm 8,2$	15,7 $\pm 3,3$	250,8 $\pm 65,6$	77,4 $\pm 5,4$
Concentration en caféine dans les sédiments (ng/g)		<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	3,36 $\pm 1,03$

