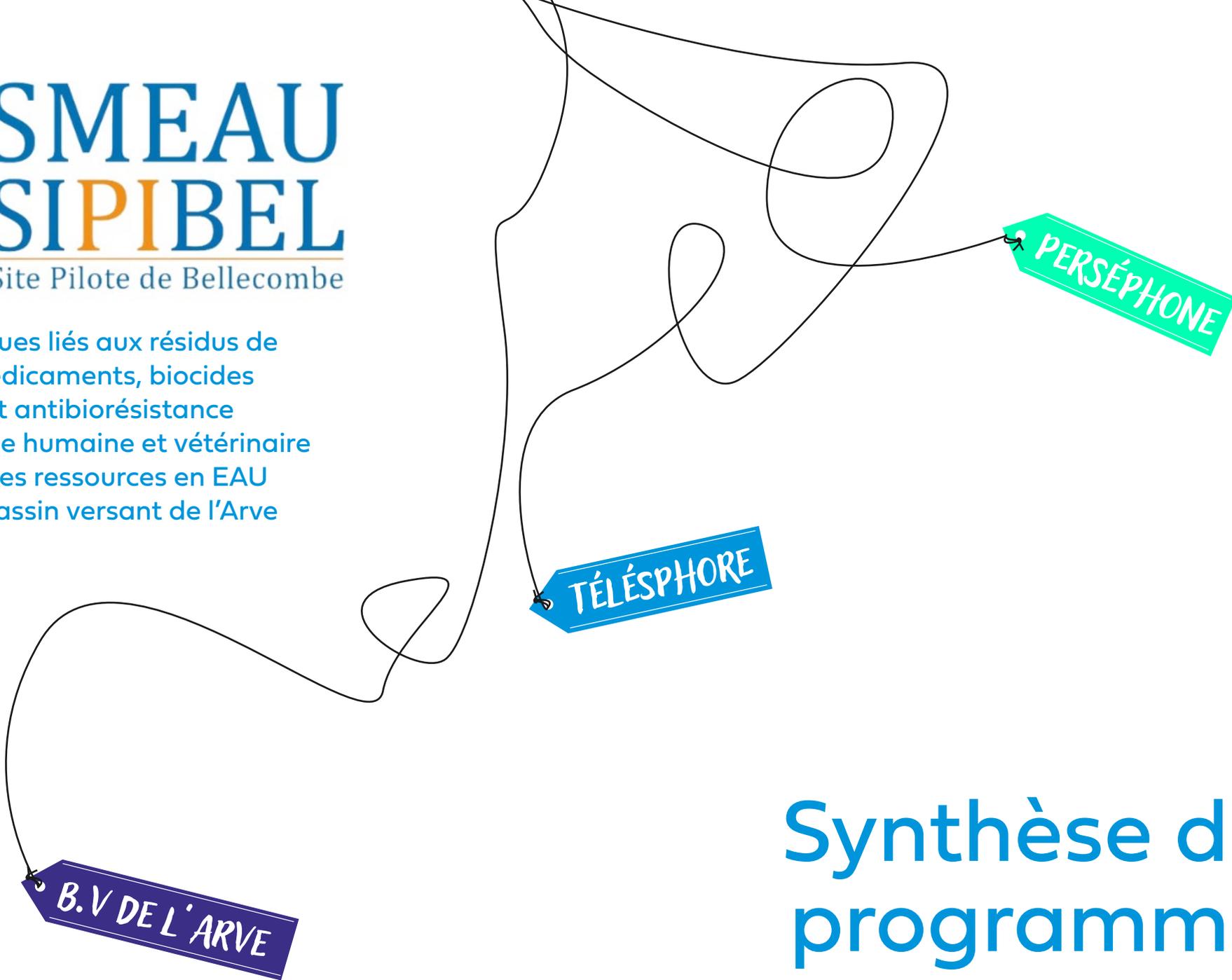


RISques liés aux résidus de
Médicaments, biocides
et antibiorésistance
d'origine humaine et vétérinaire
sur les ressources en EAU
du bassin versant de l'Arve



Synthèse du programme

2019 - 2023

Synthèse du programme RISMEAU – Risques liés aux résidus des médicaments, biocides et antibiorésistance d’origine humaine et vétérinaire sur les ressources en eau du bassin de l’Arve. Développé en appui sur le site pilote de Bellecombe SIPIBEL (2019 – 2023), sept 2024

Auteurs : Noémie Etienne, Jean-Philippe Bedell, Jean-Luc Bertrand-Krajewski, Pierre Benoit, Elodie Brelot, Christophe Dagot, Dominique Patureau, Alexandra Pinscloux, Laure Wiest

Les partenaires

Les équipes de recherches

- INRAE, Univ Montpellier, LBE, 102 avenue des étangs, F-11100 Narbonne
- INSA Lyon, DEEP, UR 7429, 11 rue de la physique, F-69621 Villeurbanne cedex
- INSERM, CHU Limoges, RESINFIT, U1092, Univ. Limoges, F-87000 Limoges
- Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ISA, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne
- Université Claude Bernard Lyon 1, LEHNA UMR 5023, CNRS, ENTPE, F-69518 Vaulx-en-Velin cedex
- Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR ECOSYS, F-91120 Palaiseau

Les partenaires opérationnels

Le programme RISMEAU, développé sur le site pilote de Bellecombe – SIPIBEL – a été possible grâce au SRB - Syndicat des Eaux des Rocailles et de Bellecombe (exploitant de la station d’épuration et terre d’accueil des lysimètres), à la Chambre d’Agriculture Savoie Mont Blanc et aux éleveurs (qui nous ont transmis fumier et lisiers en confiance).

De nombreux partenaires ont participé au financement de tout ou partie de ce programme : l’agence de l’eau Rhône-Méditerranée-Corse, l’OFB – Office Français pour la Biodiversité, le Syndicat Mixte d’Aménagement de l’Arve et ses Affluents (SM3A) et l’école universitaire de recherche H2O’Lyon (ANR-17-EURE-0018).

L’interface science-gestion

L’animation, la coordination et la valorisation du programme ont été assurées par le Graie.

Sommaire

Contexte et objectifs	4
Le programme RISMEAU	5
Préalable : identification des molécules à suivre	7
Suivi <i>in situ</i> de six lysimètres soumis à des épandages	9
Caractérisation des produits résiduels organiques (pro) étudiés	11
Comportements des résidus pharmaceutiques et biocides	12
Impact de l'épandage sur le vivant	16
Impact de l'épandage sur l'antibiorésistance	21
Les messages à retenir	24

Contexte et objectifs

Les pratiques d'hygiène et de soin, humaines et vétérinaires, sont à l'origine d'une pollution diffuse par des micropolluants (résidus de médicaments et biocides) dans l'eau, les sols et le vivant.

La contamination des milieux peut s'accompagner d'un phénomène global de dissémination des résistances bactériennes aux antibiotiques. Ces processus peuvent avoir un impact sur l'environnement et présenter un risque pour la santé humaine.

En 2011, le site pilote de Bellecombe, SIPIBEL, a été mis en place sur le bassin versant de l'Arve, en Haute-Savoie, pour caractériser les effluents hospitaliers et urbains, étudier le fonctionnement de la station d'épuration de Bellecombe vis à vis de ces effluents, et leurs impacts sur les filières eaux et boues et sur le milieu aquatique. Ce projet est né d'un partenariat structurant entre une dizaine d'organisations : collectivités territoriales, professionnels de santé, scientifiques de différentes disciplines, et l'appui d'une structure d'interface.

Cinq programmes de recherche se sont succédés sur SIPIBEL.

- Irmise 2012-2015
- RILACT 2014-2018
- MediATes 2015-2017
- DoMinEau 2016
- Rismeau 2019-2023

Le dernier programme, **RISMEAU** (RISques liés aux résidus de Médicaments, biocides et antibiorésistance d'origine humaine et vétérinaire sur les ressources en EAU du bassin versant de l'Arve), intègre en particulier un suivi des épandages de trois produits résiduels organiques (PRO) : des boues de la station d'épuration de Bellecombe, un fumier et un lisier d'exploitations agricoles du territoire, afin de mesurer les risques associés à ces pratiques pour les sols, les eaux souterraines et le vivant. Deux années d'expérimentations sur des lysimètres *in situ* et des colonnes en laboratoire ont permis de suivre le comportement d'une vingtaine de substances biocides et antibiotiques (sur les 33 recherchées) après épandage de PRO et de fournir des données quantitatives nouvelles [sur les mécanismes de transfert, l'impact écotoxicologique et la dissémination de l'antibiorésistance.](#)

Les illustrations présentes dans ce document ont été réalisées par Fabienne Régnier lors de la 8^e Conférence Eau et Santé les 14 & 15 novembre 2023, à l'occasion de laquelle les résultats ont été présentés.

Le programme RISMEAU

RISMEAU (schématisé dans l'illustration de la page suivante) est organisé en trois projets distincts et complémentaires caractérisés par les axes de recherche suivants.

Diagnostic du bassin versant de l'Arve

Évaluation par un screening non ciblé des résidus pharmaceutiques et biocides présents dans l'Arve et ses affluents.

B.V DE L' ARVE

Télesphore sur le transfert de résidus de médicaments et biocides via :

TÉLÉSPHORE

- Le développement de méthodes analytiques pour les matrices solides (PRO, sol) et liquide (eau infiltrée).
- La quantification des apports de résidus pharmaceutiques et biocides par l'épandage de PRO urbains et agricoles.
- L'évaluation du devenir de molécules cibles (persistance, dissipation, mobilité) grâce à un suivi pluriannuel sur six lysimètres *in situ*.
- La caractérisation des hétérogénéités spatiales des concentrations observées *in situ*.
- La caractérisation de la sorption de quatre résidus pharmaceutiques par des essais en microcosme.
- L'évaluation de la mobilité verticale de quatre résidus pharmaceutiques sur des colonnes de sol en laboratoire.

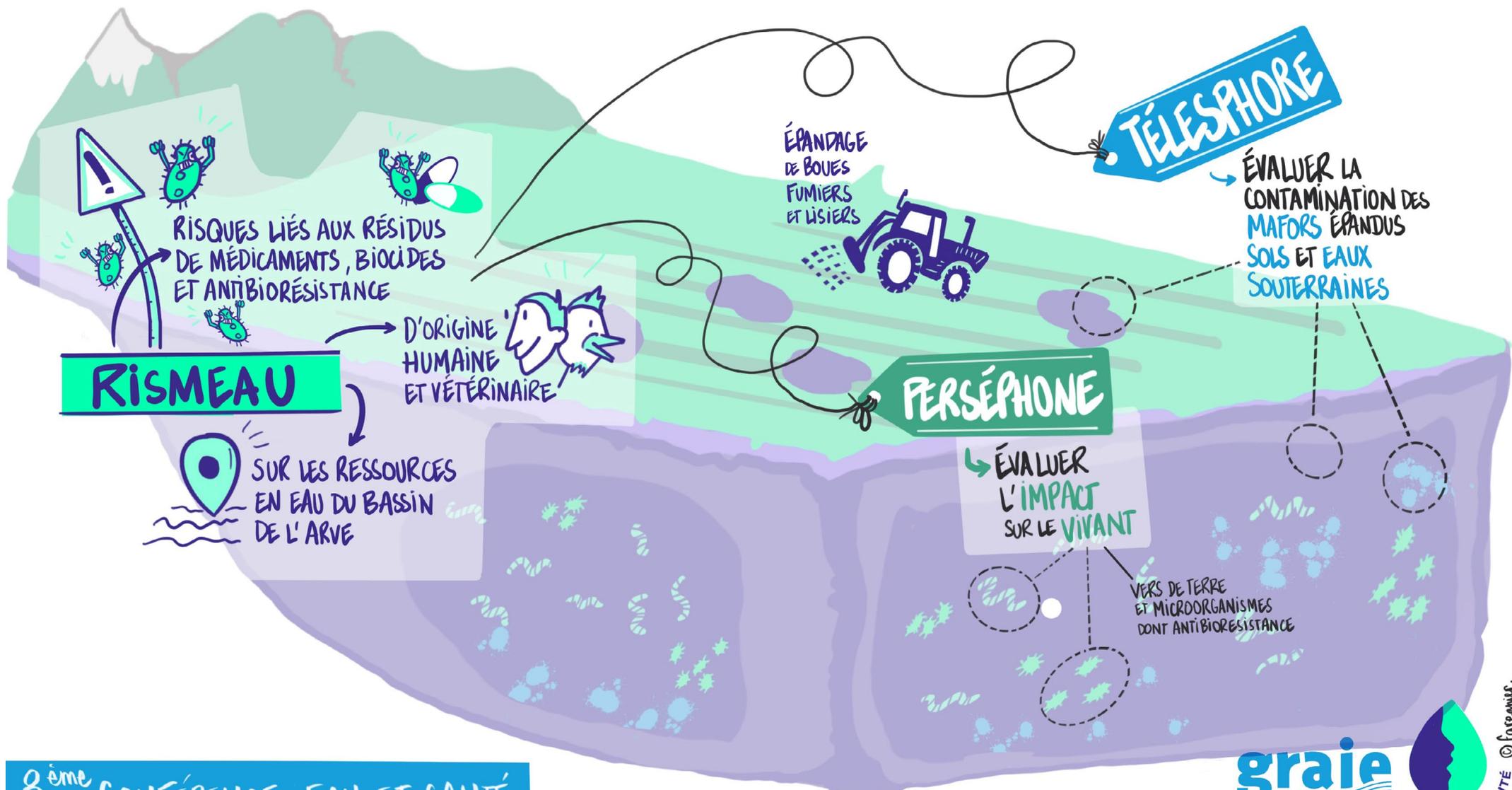
Perséphone sur les impacts écotoxicologiques et l'antibiorésistance, par :

PERSÉPHONE

- La caractérisation physico-chimique des différents types de PRO : boues urbaines, fumiers et lisiers.
- Le développement de méthodes analytiques sur la matrice «vers de terre».
- Le développement de bioessais *in situ* innovants, dans l'objectif de caractériser les effets combinés des résidus de médicaments et biocides sur des organismes du sol (lombriciens).
- La caractérisation des effets de l'apport de PRO sur des populations d'organismes terrestres autochtones en conditions réelles d'exposition (lombriciens *in situ* et en laboratoire).
- La caractérisation écotoxicologique de PRO (aigüe et chronique).
- L'évaluation de la bioaccumulation de résidus de médicaments/biocides et éléments traces métalliques dans un organisme clé de la chaîne trophique (lombriciens).
- L'acquisition de données quantitatives sur le transfert de gènes d'antibiorésistance, en conditions réelles d'épandage, vers les compartiments sol et eau infiltrée.



L'objet de cette synthèse est de présenter les principaux résultats obtenus et d'exposer les grands enseignements du programme RISMEAU.



8^{ème} CONFÉRENCE EAU ET SANTÉ → 14 & 15 NOVEMBRE 2023

Préalable : identification des molécules à suivre

B.V DE L' ARVE

Une méthodologie a été mise au point à l'Institut des Sciences Analytiques (ISA, CNRS) pour établir une liste pertinente de résidus pharmaceutiques et biocides à suivre dans le cadre du programme RISMEAU (illustration ci-dessous).

Un screening non ciblé a été réalisé sur les intrants collectés auprès de cinq exploitations agricoles du territoire (quatre lisiers et un fumier de vaches laitières) et sur différents lots de boues prélevés sous la serre de séchage de la station d'épuration de Bellecombe en mars 2020.

Cette analyse non ciblée a fait émerger une première liste de 155 molécules suspectes.



Les composés répondant aux critères suivants ont été retenus :

- présence dans les boues et au moins un intrant agricole,
- détection dans deux extraits issus de méthodes différentes,
- pics chromatographiques avec une aire significativement élevée.

Cinq molécules font exception et ont été ajoutées *a posteriori* : le triclosan, détecté par Sylvie Néliu (INRAE ECOSYS Versailles-Saclay), le DDAC (chlorure de didécyl diméthyl ammonium), quantifié antérieurement dans les boues de la station d'épuration de Bellecombe, l'érythromycine, dont le suivi est recommandé par l'ANSES, et la doramectine et l'éprinomectine, deux molécules utilisées dans les élevages et signalées par la Chambre d'Agriculture Savoie Mont-Blanc.

Les produits de transformation ont été sélectionnés par une revue bibliographique. Le croisement des résultats obtenus a permis d'établir une **liste finale de 33 molécules dont 9 produits de transformation (PT)**, pertinents à suivre dans la suite du programme (Figure 1).

Les résultats de cette étude ont également permis de choisir l'intrant agricole à épandre sur les casiers lysimétriques, en plus des boues séchées de la station d'épuration de Bellecombe (Scientrier, 74), en prenant en compte la diversité des molécules et les concentrations observées. Il s'agit d'un lisier issu d'une exploitation de vaches laitières.

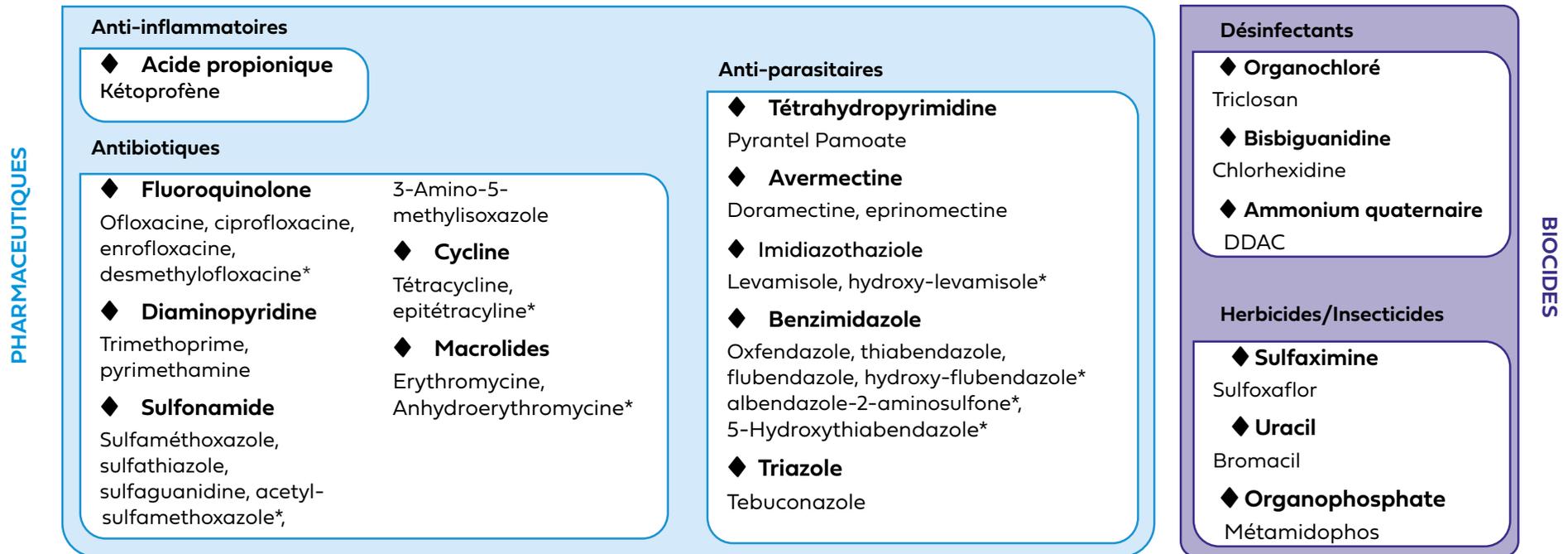


Figure 1 : Molécules pharmaceutiques et biocides sélectionnées pour le programme RISMEAU [Crédit : N. Étienne]

Suivi *in situ* de six lysimètres soumis à des épandages

La collecte de données pour les projets Télésphore et Perséphone a nécessité la mise en place d'un dispositif expérimental *in situ* original pour suivre et quantifier les apports massiques en différents intrants, les apports correspondants en médicaments et biocides, leur rétention dans le sol, leur mobilité, et leur dissipation. Le suivi a été mené sur deux années pleines.

Le dispositif expérimental

Il est composé de six casiers, ou lysimètres, de deux mètres de côté et un mètre de profondeur. Ils sont remplis du sol de la

parcelle expérimentale, reconstitué après construction en respectant l'ordre et la compaction des différentes couches du sol initial.

Trois lysimètres comportent un radier étanche drainé, permettant de collecter l'eau infiltrée en fond de lysimètre dans des bidons placés dans le regard central (Figure 2). Les trois autres lysimètres n'ont pas de radier et ont servi aux prélèvements de sol par carottage.

Sur deux lysimètres, des épandages de boues sont réalisés, sur deux autres, des épandages de lisier. Les deux derniers lysimètres ne reçoivent pas de PRO et servent de référence.

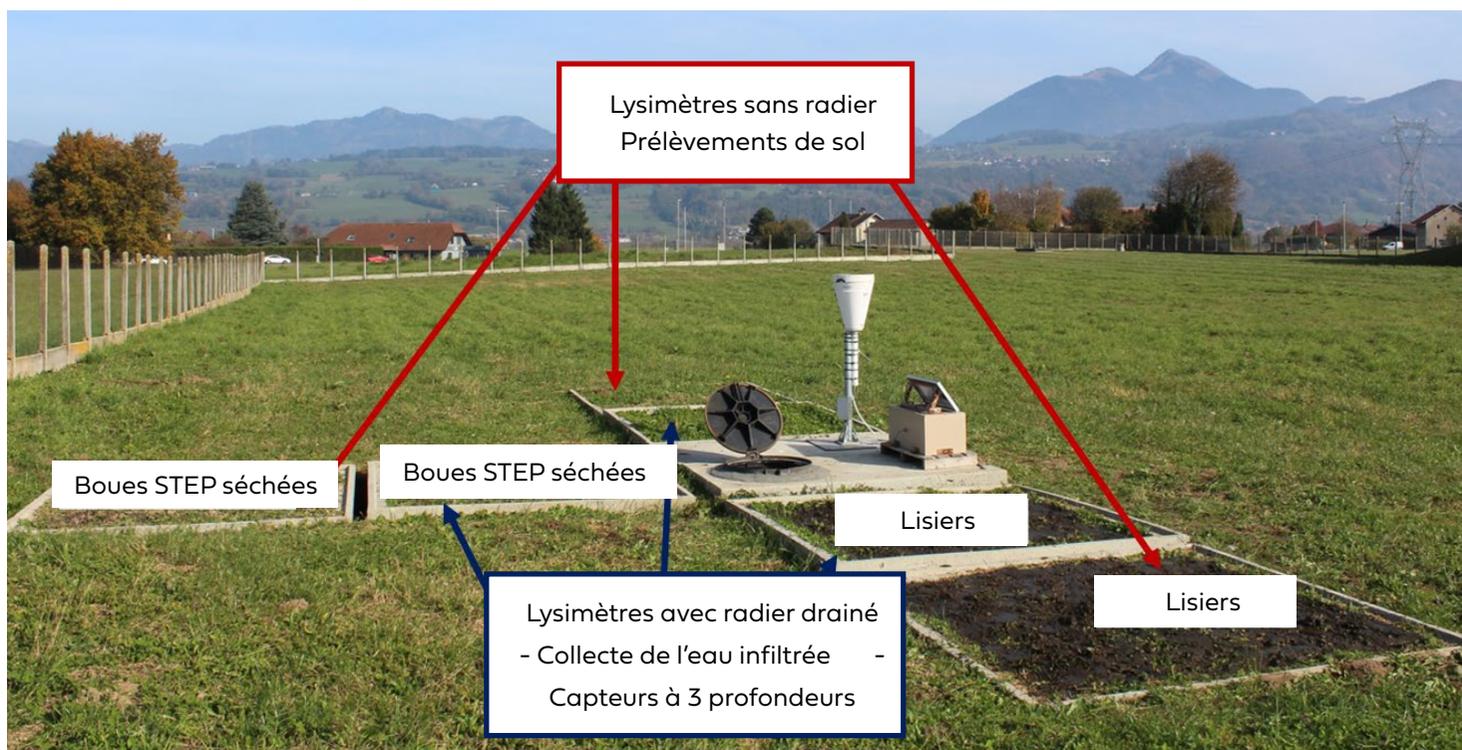


Figure 2: Lysimètre après épandage (octobre 2021) [Crédit : N. Étienne]

Les campagnes d'épandage

Cinq campagnes d'épandage de boues de la station de Bellecombe et de lisier d'un élevage de vaches laitières ont été réalisées entre novembre 2020 et octobre 2022,

dans le respect des calendriers communiqués par la Chambre d'Agriculture Savoie Mont-Blanc (Figure 3).

Les deux premiers apports de PRO ont été effectués à dose agronomique, alors que les apports des campagnes 3 et 4 ont été réalisés à taux agronomique multiplié par cinq.

Pour la dernière campagne, les boues sont épandues à la dose agronomique multipliée par cinq, et un lisier dopé avec quatre composés (ofloxacine, flubendazole, levamisole et pyrantel) est appliqué à sa dose agronomique sur un lysimètre. Les lixiviats collectés en fond de lysimètre

(à un mètre de profondeur) sont échantillonnés régulièrement, dès que le volume disponible le permet. Des carottes de sol ont été prélevées avant chaque nouvel épandage.

Au total, plus de 350 échantillons de PRO, sols et lixiviats ont été prélevés puis analysés, et les 33 substances pré-identifiées ont été systématiquement recherchées par approche ciblée. Sur les échantillons de PRO et de sols, des analyses de marqueurs de l'antibiorésistance ont également été réalisées.

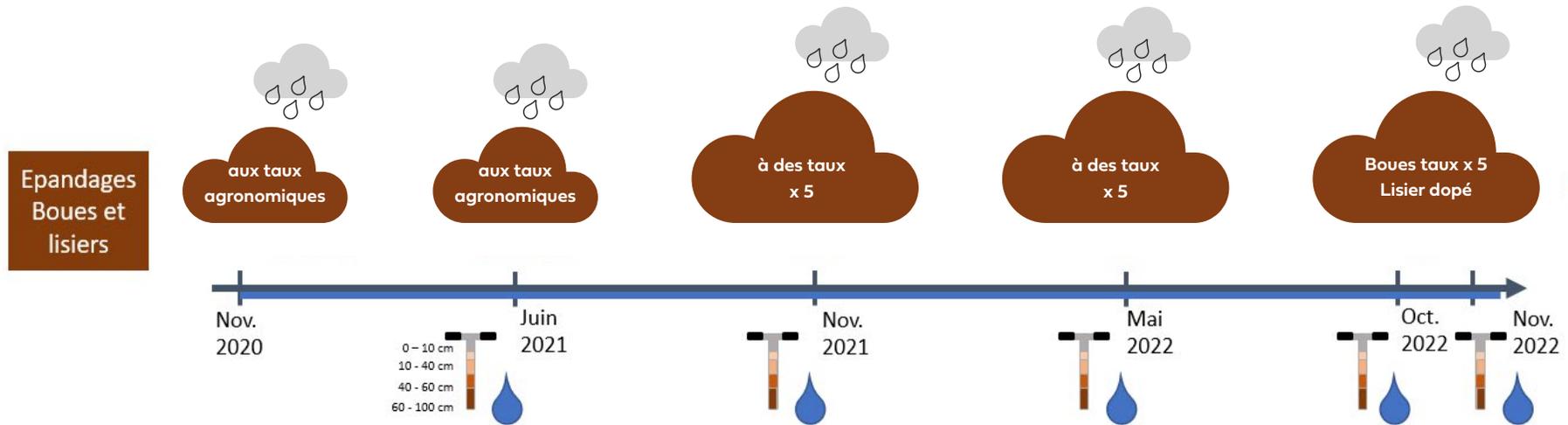


Figure 3 : Chronologie des campagnes d'épandage et de prélèvements menées sur le dispositif in situ [Crédit : N. Étienne]

Caractérisation des produits résiduels organiques (pro) étudiés

Les trois PRO étudiés et le sol ont été caractérisés du point de vue agronomique et de leurs contaminations diverses : éléments traces métalliques (ETM) et polluants organiques : hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et résidus pharmaceutiques et biocides.

Le sol présente un profil relativement homogène sur un mètre de profondeur. Il s'agit d'un limon sableux, très peu argileux et pauvre en ions, développé sur des dépôts fluvioglaciers de la vallée de l'Arve. Son pH est légèrement acide et les teneurs en matière organique mesurées sont caractéristiques des sols de prairie (5,05 % pour la couche entre 0 et 10 cm de profondeur, 4,15 % entre 10 et 30 cm de profondeur puis 2,4% entre 30 et 80 cm de profondeur).

Une grande variabilité

Les PRO étudiés montrent des différences marquées en termes de caractéristiques physiques (texture, siccité) et chimiques (propriétés agronomiques, qualité de la matière

organique). En effet, les boues en sortie de serre ont une siccité élevée (> 45 %) et présentent un rapport C/N entre 5 et 6, contrairement aux lisiers et au fumier (siccité < 10 % et rapport C/N supérieur à 10). Leurs profils de fractionnement chimique de la matière organique sont différents au regard des fractions les plus accessibles : les boues présentent une faible proportion de fractions accessibles, mais peu complexes, ce qui suggère une (bio)dégradabilité plus rapide, alors que le fumier présente une proportion plus importante de fractions accessibles et plus complexes ; le lisier présente des caractéristiques

intermédiaires. Toutefois, les trois PRO se positionnent parmi des PRO assez stables au regard de la part importante de matières organiques peu ou pas accessibles.

Ces trois PRO présentent également une contamination qualitative et quantitative différenciée : les boues présentent davantage de résidus pharmaceutiques et biocides détectés, et les concentrations quantifiées sont supérieures à celles des lisiers et du fumier. Les concentrations les plus élevées sont mesurées pour les antibiotiques fluoroquinolones et des désinfectants (chlorhexidine, diméthyl-didécyl ammonium) avec des concentrations atteignant 105 ng/g MS dans les boues.

Ces grandes variabilités des produits étudiés permettent donc l'étude d'une large gamme de possibilités quant à l'impact de l'épandage de PRO sur les organismes et le devenir des résidus pharmaceutiques et biocides qu'ils véhiculent.

Comportements des résidus pharmaceutiques et biocides

Durant deux années, l'analyse des 350 échantillons de PRO, de lixiviats et de sols des lysimètres soumis à des épandages de boues et de lisier a permis d'observer la mobilité des 33 substances recherchées, leur persistance et leur éventuelle transformation. C'est le volet TéléspHORE du projet, schématisé par l'illustration en page 15.

Concentrations dans les sols

A la suite des apports de lisier et de boues à dose agronomique (campagnes 1 et 2, figure 5) les concentrations mesurées 6 à 7 mois après épandage sont très faibles

et proches des limites analytiques, avec des concentrations maximales de l'ordre du ng/g MS. Seuls 11 composés sont détectés dans les lysimètres avec apport de boues et 4 composés pour ceux avec apport de lisier, en cohérence avec les concentrations et les fréquences de détection des composés plus élevées pour les boues.

A la suite des apports de boues à dose agronomique multipliée par 5 (campagnes 3 et 4, figure 3), les concentrations mesurées dans le sol des lysimètres sont significativement supérieures à celles des premières campagnes. Cette augmentation s'explique par la dose d'apport plus élevée et par des concentrations significativement plus élevées pour 14 des 21 composés présents dans les boues épandues. Au contraire, seul le thiabendazole a été détecté dans le sol des lysimètres avec apport de lisier à la fin de la troisième campagne. Ce résultat est en cohérence avec les caractéristiques du lisier : le lisier épandu à la troisième campagne ne présentait qu'un unique composé détecté (un métabolite de l'albendazole) et aucun composé n'a été détecté dans le lisier épandu à la quatrième campagne.

Les prélèvements complémentaires du sol de surface (0 - 10 cm) réalisés sur la durée de la troisième campagne d'épandage ont permis de détecter 10 composés supplémentaires dans le sol des lysimètres avec apport de boues. Toutefois, il n'a pas été possible de mettre en évidence

des cinétiques de dissipation du fait des concentrations proches des limites analytiques et donc des faibles données quantitatives disponibles.

Les composés les plus fréquemment détectés et présentant les concentrations les plus élevées dans le sol sont le flubendazole et deux antibiotiques fluoroquinolones : l'ofloxacine et la ciprofloxacine. Ces composés, classés comme faiblement mobiles à immobiles lors de la caractérisation de leur capacité de sorption en batch au laboratoire (Chapitre 1 de la thèse de N. Etienne), ont présenté une mobilité relativement importante avec un transfert jusqu'à quarante centimètres de profondeur pour la ciprofloxacine et jusqu'à un mètre de profondeur pour le flubendazole et l'ofloxacine. Leur transport pourrait être lié à la présence d'écoulements préférentiels dans le sol des lysimètres mis en évidence par les essais d'infiltration menés régulièrement sur les lysimètres et par l'étude de l'hétérogénéité des concentrations réalisées lors de la cinquième campagne avec apport d'un lisier dopé au flubendazole, au lévamisole, à l'ofloxacine et au pyrantel. Il est également possible que des phénomènes de co-transport (transport par sorption à une phase particulière mobile dans la solution du sol) aient participé à leur mobilité, mais il n'a pas été possible de mettre en évidence ce processus en raison de la trop faible fraction particulière collectée dans les lixiviats.

Aucune accumulation significative de résidus pharmaceutiques et biocides n'est observée sur les deux ans de suivi.

Concentrations dans les lixiviats

Des résidus pharmaceutiques et biocides dans les lixiviats ont été détectés ponctuellement durant les deux années de suivi. Contrairement

aux concentrations dans le sol qui semblent évoluer avec les concentrations des PRO, ces détections sont sporadiques et sans lien clair avec les variations de dose et de concentrations dans les PRO appliqués en surface. Les résidus pharmaceutiques et biocides sont principalement détectés lors des campagnes d'épandage automne/printemps, ce qui s'explique par la sécheresse ayant marqué les deux périodes estivales, limitant les écoulements de l'eau au sein des lysimètres.

Les concentrations mesurées sont de l'ordre du ng/L pour le thiabendazole, l'anhydroérythromycine, le lévamisole ou la tétracycline et s'élèvent jusqu'à 103 ng/L pour le diméthyl-didécyl ammonium. La fraction de composés mobilisés jusqu'à un mètre de profondeur est faible par rapport aux apports : elle est estimée à 0,31 % du flubendazole apporté par épandage, 0,7 % du thiabendazole, 1,4 % du lévamisole, ou encore 6,9 % de la desméthyl-ofloxacine à la suite des deux premières campagnes d'épandage de boues à dose agronomique.

Aucune corrélation entre les caractéristiques physico-chimiques classiques des lixiviats et les concentrations en résidus pharmaceutiques et biocides n'a été mise en évidence. Cette étude de corrélation a cependant été limitée par le nombre de données quantitatives disponibles restreint pour les paramètres physico-chimiques et les concentrations en contaminants.

Représentativité

Les essais *in situ* n'ont pu être conduits que sur deux années, avec des étés particulièrement secs ne favorisant pas le transfert des substances dans les eaux infiltrées et les sols. Il est donc intéressant de comparer ces résultats avec des analyses de sols soumis à des épandages depuis de nombreuses années.

On peut se référer aux essais longue durée du SOERE-PRO (<https://valor-pro.hub.inrae.fr/presentation-de-l-observatoire-soere-pro>) où des épandages à dose agronomique ont eu lieu depuis 20 ans avec des PRO divers (fumier, fumier composté, compost de boue, lisier, digestat) avec un suivi tant des paramètres agronomiques classiques que de contaminants organiques, métaux trace et antibiorésistance (cf Rapport anses 2020). Les résultats concernant le suivi de résidus de médicaments dans les PRO, les sols et les eaux ayant percolé sont en accord avec ceux observés dans le programme RISMEAU (Deschamps et al., 2017), à savoir : peu de lien entre flux apporté par les PRO et concentration dans le sol, pas d'accumulation significative observée dans le sol *in situ*, faible mobilité vers les eaux.

[Rapport anses, 2020] *Antibiorésistance et environnement État et causes possibles de la contamination des milieux en France, Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective, 2020*

[Deschamps et al., 2017] *Fate and impacts of pharmaceuticals and personal care products after repeated applications of organic waste products in long-term field experiments, Science of the Total Environment 607–608 (2017) 271–280*

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.240>

! Difficultés rencontrées

Les échantillons provenant des lysimètres sans apport (témoins) et de la parcelle environnante ont révélé la présence d'une contamination antérieure et/ou croisée. En

effet, 10 résidus pharmaceutiques et biocides parmi les 33 suivis ont été détectés dans les échantillons de lixiviats et de sols, certains composés différant entre les deux compartiments. En raison des concentrations dans le sol, non significativement différentes entre les lysimètres avec apport de PRO et les échantillons de sol de référence, il n'est pas possible de conclure sur le lien entre épandage et contamination du sol sur une durée de deux ans seulement.

Les concentrations mesurées étant proches des limites analytiques, les données quantitatives de concentration sont peu nombreuses et leur exploitation pour des bilans de masse ou le suivi de leur persistance est de fait très limitée.

La cinquième campagne avec apport d'un lisier dopé à forte concentration et la réalisation d'un nombre élevé de prélèvements de sol (16 carottes sur 4 m²) a mis en évidence les fortes hétérogénéités des concentrations au sein du sol d'un même lysimètre. Ces hétérogénéités peuvent notamment être engendrées par les écoulements préférentiels précédemment évoqués (voir § Concentrations dans les sols) en lien avec les hétérogénéités structurales du sol (i.e. galeries de rongeurs, de vers de terre, racines, etc.) .Il n'est donc pas possible de statuer sur la représentativité des prélèvements menés en triplicat lors des campagnes d'épandage 1 à 4.

ANALYSER
LA CONTAMINATION
APRÈS ÉPANDAGE

RUISSÈLEMENT
ABSORPTION/
VÉGÉTAUX
...



• HÉTÉROGÉNÉITÉ
• CHEMINS PRÉFÉRENCIELS

PAS DE BILAN
DE MASSE

... PERSPECTIVES

MUTUALISATION
DES DONNÉES

IN SITU
ET EN
LABORATOIRE

LY SIMÈTRES

BILAN:
ANALYSES
DE 33 RÉSIDUS
ET BIOCIDES !

CONTAMINATION
DU SOL DE
RÉFÉRENCE

↳ 10/33 COMPOSÉS
DÉTECTÉS DANS LES
SOLS

PROJET TÉLESPHORE

NOÉMIE ETIENNE



8^{ème} CONFÉRENCE EAU ET SANTÉ

14 & 15 NOVEMBRE 2023

graie
PÔLE
EAU & TERRITOIRES



Les bioessais développés

Dans le cadre du projet Perséphone, plusieurs tests en laboratoire ont été menés sur des plantes (*Medicago sativa*, *Sinapis alba*, *Cucurbita pepo*) et sur des vers de terre

(*Eisenia fetida*, *Aporrectodea caliginosa*) (Figure 4) à partir des mêmes échantillons de boues, lisiers et fumiers :

- Test de toxicité aiguë, à doses élevées, afin d'évaluer les effets à court terme (germination, létalité, évitement, activité enzymatique).
- Test de toxicité chronique, afin de caractériser les effets sur le long terme, à des doses d'épandage agronomique.
- Mesure de la bioaccumulation (métaux, résidus pharmaceutiques et biocides) dans les plantes et les vers de terre.

Pour le cas des vers de terre :

- Les tests ont été réalisés sur deux espèces par deux équipes de recherche, afin d'identifier le modèle le mieux adapté à ce type d'expérimentation : *E. fetida* par l'ENTPE et *A. caliginosa* par l'INRAE de Versailles-Saclay.
- La recherche de résidus pharmaceutiques et biocides a nécessité le développement d'une méthode d'analyse spécifique par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-MS/MS) par l'ISA.
- Un système d'encagement *in situ* a de plus été imaginé et mis en place à l'ENTPE durant quelques semaines, avec des résultats encourageants.

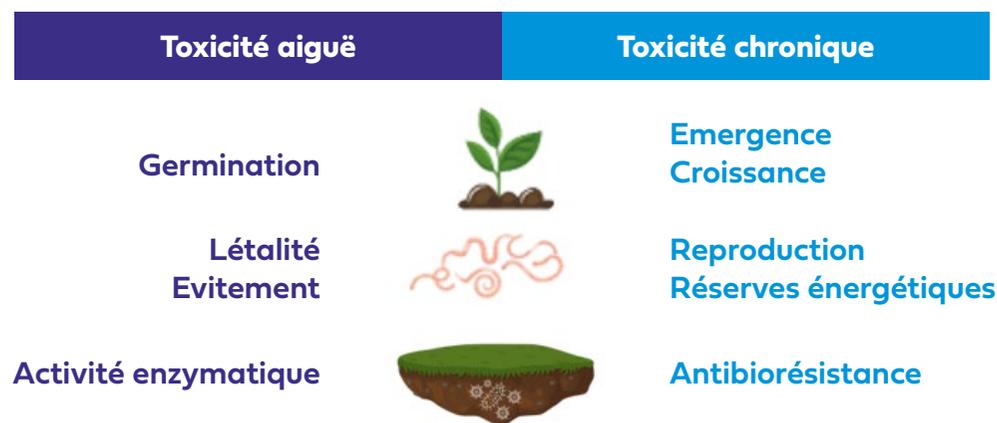


Figure 4 – Deux types de tests de toxicité [crédit : O. Roques]

Toxicité aiguë

Les tests de toxicité aiguë ont mis en évidence des réactions différentes des vers de terre selon le PRO épandu.

Lors de **tests de létalité**, les effets écotoxiques de mortalité apparaissent pour les 3 PRO, mais pour des essais correspondant à des doses d'épandage bien supérieures aux doses agronomiques légales, y compris pour le lisier, pour lequel ces effets apparaissent à des doses d'apport moins élevées que le fumier et les boues. Bien que la boue soit plus riche et plus concentrée en contaminants, c'est le lisier qui reste le plus écotoxique.

Pour les **tests de croissance**, la boue se démarque avec une meilleure croissance des vers de terre. Pour les **tests d'évitement**, les vers semblent attirés par le lisier (pourtant plus écotoxique) alors que la boue et le fumier provoquent plus d'évitement ; on peut alors s'interroger sur l'effet de la texture ou de la structure de l'amendement.

Toxicité chronique

L'évaluation de la bioaccumulation montre un transfert possible des résidus pharmaceutiques et biocides, avec une détection de l'anhydroérythromycine, du diméthyl-didécyl ammonium, de l'érythromycine, de la pyriméthamine, de la tétracycline et du triclosan, molécules différentes de celles détectées dans le sol du milieu d'exposition. Toutefois, en raison de la contamination constatée pour l'essai témoin, les interprétations sont compromises, il n'a donc pas été possible de mettre en évidence et de statuer sur la bioaccumulation des résidus pharmaceutiques et biocides. Lors de ces essais, dans le sol amendé par des boues, une augmentation significative du cuivre

dans les tissus des vers de terre et du zinc dans les tissus des plantes exposées a été observée.

Les tests de reproduction réalisés à des doses d'épandage plus réalistes de boues et de lisier mettent en évidence un effet reprotoxique qui apparaît à une dose d'apport de 20 g/kg MS (au-dessus de la dose légale). L'effet reprotoxique est caractérisé par une inhibition supérieure à 70 % de la reproduction des vers de terre exposés. A cette inhibition s'ajoute une perturbation des réserves énergétiques des organismes exposés. Les résultats des tests de reproduction peuvent être mis en lien avec les activités endocriniennes (oestrogènes et androgènes) mesurées pour les trois PRO étudiés. Ces activités endocriniennes démontrent d'un potentiel risque de l'épandage de ces PRO sur la reproduction des organismes qui y sont exposés.

Au regard des résultats obtenus par ces bioessais, il semble nécessaire de mettre en place des tests d'écotoxicité variés sur plusieurs modèles biologiques terrestres. Cela permettra une analyse croisée des résultats pour évaluer globalement l'impact de l'épandage de PRO sur les organismes vivants. Le bioessai ayant montré les résultats les plus pertinents dans l'évaluation de l'écotoxicité des PRO est le test de reproduction.

Toxicité chronique du sol des lysimètres

En plus des tests précédents, les sols des lysimètres après quatre ou cinq campagnes d'épandage ont été utilisés pour des tests de reproduction et de bioaccumulation sur des vers de terre (*E. fetida*).

Il n'y a pas de différence significative de croissance entre les organismes exposés au sol témoin (lysimètre sans apport de PRO) et ceux exposés aux sols soumis à quatre épandages de boues ou de lisier. Concernant la reproduction, une différence significative apparaît entre les organismes exposés au sol témoin et ceux exposés aux sols soumis aux quatre épandages après 112 jours. Cette différence n'est pas significative à 56 et 84 jours.

Concernant le test de reproduction, après 28 jours, le nombre de juvéniles n'est pas significativement différent entre le test sur sol témoin et le test sur le sol amendé cinq fois par des boues. Par contre, le nombre de juvéniles est significativement inférieur dans le cas d'une exposition au sol amendé quatre fois avec du lisier puis une fois avec du lisier dopé à forte concentration de flubendazole, de lévamisole, d'ofloxacine et de pyrantel.

On observe donc l'impact de l'épandage du lisier dopé qui a engendré des concentrations significativement plus élevées de certains pharmaceutiques dans le sol (desméthyl-ofloxacine, flubendazole, lévamisole, ofloxacine et pyrantel).



Ces essais ont mis en évidence la présence de chlorhexidine dans les vers de terre exposés, avec des concentrations significativement plus élevées avec le lisier par rapport au sol amendé en boues. Aucun autre composé n'a été détecté.



Lors du deuxième test (vers de terre exposés au sol témoin et aux sols soumis à cinq épandages), les vers de terre témoins sont contaminés en chlorhexidine, mais à des concentrations inférieures à celles des vers de terre exposés aux sols amendés (différence non significative mais légèrement plus élevée avec l'amendement au lisier). La même contamination est observée pour l'ofloxacine. Le pyrantel est le seul composé quantifié uniquement pour les vers de terre exposés au sol amendé cinq fois au lisier (dont le lisier dopé).

Des activités endocriniennes ont été détectées : une activité anti-androgénique est détectée pour les extraits ASE des sols soumis à quatre ou cinq épandages de boues et une activité antagoniste aux oestrogènes est détectée pour l'ensemble des sols des lysimètres amendés en boues et lisier. D'après ces résultats et en raison de l'absence d'activité endocrinienne détectée pour le sol de la parcelle, l'épandage répété de PRO présentant des activités endocriniennes (oestrogènes et androgènes) semble engendrer un risque potentiel pour le sol au regard de la reproduction des organismes qui y sont exposés.

Propriétés fertilisantes des sols

L'ensemble des PRO présente un effet positif sur la croissance des plantes et des vers de terre. Lors de la réalisation des tests ainsi que dans les lysimètres, sur les vers (*E. fetida*) comme sur les plantes, l'amélioration des propriétés fertilisantes du sol est systématiquement plus

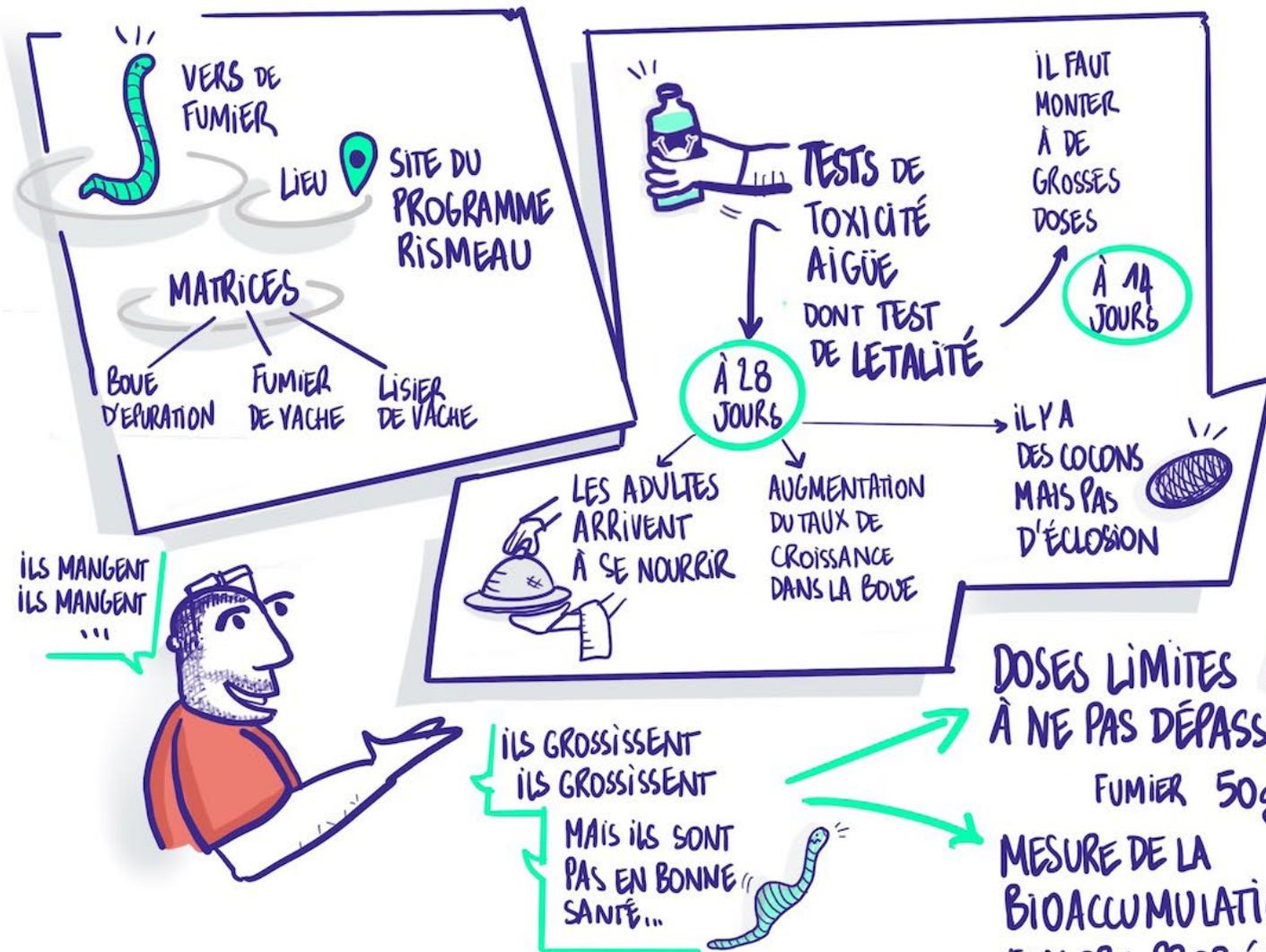
forte dans les sols amendés en boue d'épuration (Tableau 1).

Au regard des tests réalisés, la dose limite d'épandage à ne pas dépasser serait de 50 g/kg pour le fumier et 10 g/kg d'amendement pour la boue et le lisier de vache.

Les tests de toxicité aiguë sont peu appropriés ; les tests de toxicité chronique sont plus prometteurs et mériteraient d'être consolidés.

		Boue	Fumier	Lisier
Plantes	Germination			
	Croissance racinaire	+		
	Germination	++	+	+
	Hauteur tiges	+	+	
	Masse fraîche des parties aériennes	+	+	+
	Masse fraîche des racines	++		
	Masse sèche des parties aériennes	++		+
	Masse sèche des parties racinaires	+		
Vers de terre	Létalité			
	Croissance	+	+	+
	Evitement	+	+	
	Croissance	+		
	Reproduction	-		-

Tableau 1 : Synthèse des effets constatés sur les plantes et les vers de terre d'un amendement par boue, fumier et lisier [crédit : J.P. Bedell]; "+" = effet positif/contrôle; "-" = effet négatif/contrôle



JEAN-PHILIPPE BEDELL

MECANISME DE BIOACCUMULATION

DES RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS ET BIOCIDES LIÉS À L'ÉPANDAGE

DOSES LIMITES À NE PAS DÉPASSER:
 FUMIER 50g.kg⁻¹
 MESURE DE LA BIOACCUMULATION ENCORE PROBLÉMATIQUE

Impact de l'épandage sur l'antibiorésistance

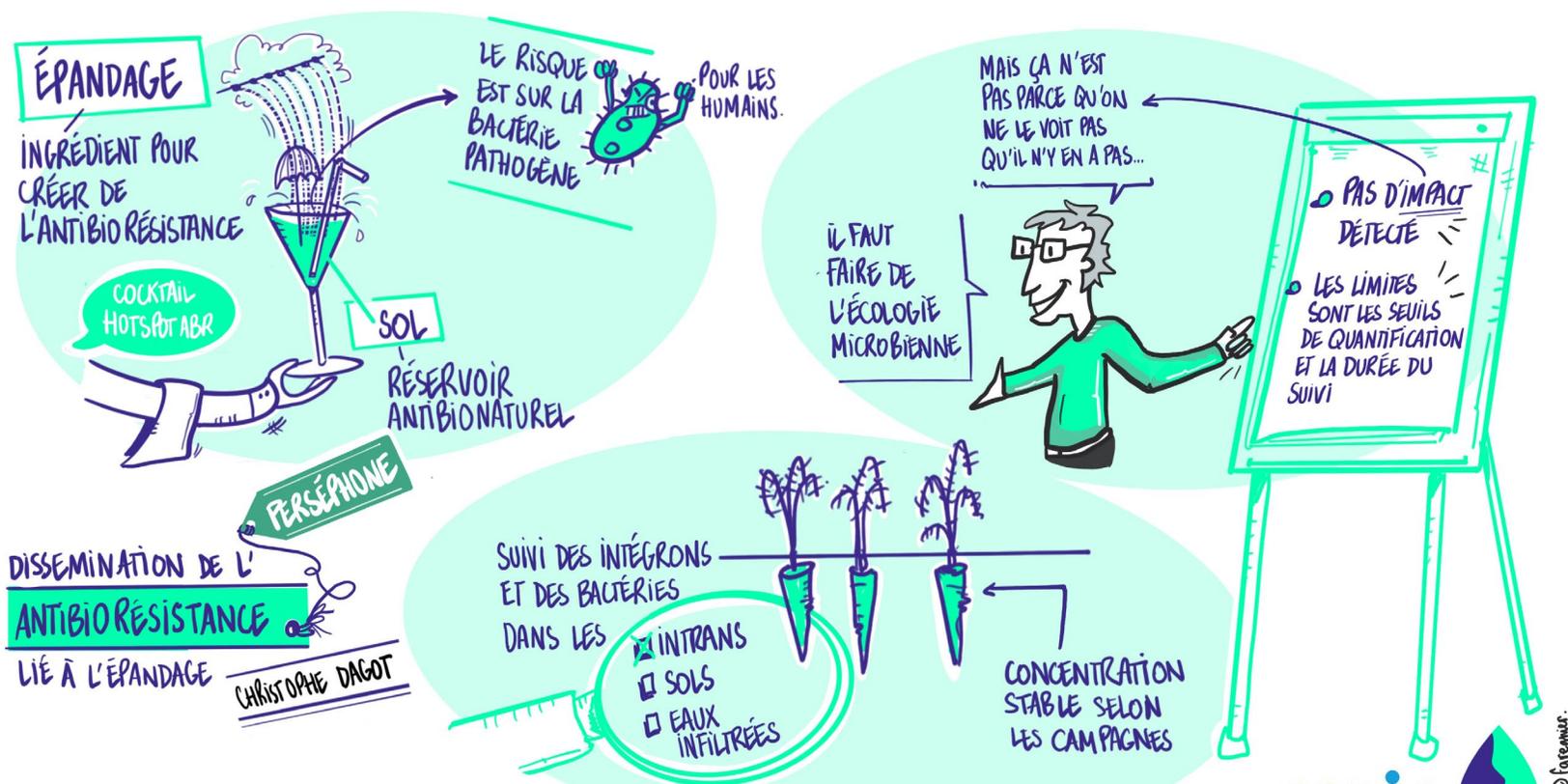
PERSÉPHONE

Des enjeux et objectifs

L'antibiorésistance est aujourd'hui reconnue comme un enjeu majeur de santé publique, avec un risque d'impasse thérapeutique sur les maladies infectieuses d'ici à 2050.

On sait que la dissémination est liée à des micro-organismes présents dans tous les compartiments de l'environnement.

La question posée est donc de savoir si l'activité humaine y contribue via les rejets de stations d'épuration et l'épandage des boues. Dans le cadre du programme RISMEAU, l'objectif était d'obtenir des données quantitatives sur le transfert de gènes d'antibiorésistance en conditions réelles d'épandage et l'évaluation du transfert potentiel vers les compartiments aquatiques (illustration ci-dessous).



8^{ème} CONFÉRENCE EAU ET SANTÉ → 14 & 15 NOVEMBRE 2023

graie
PÔLE
EAU & TERRITOIRES

EAU ET SANTÉ
© fatemguir.

La caractérisation de la dissémination de l'antibiorésistance

Pour la recherche de la dissémination de l'antibiorésistance, trois approches ont été retenues :

- Les intégrons de classes 1, 2 et 3, reconnus comme indicateur global de résistance dans l'environnement, ont été quantifiés par qPCR. Les intégrons constituent une plateforme génétique présente dans l'ADN bactérien qui permet l'acquisition de gènes de résistance.
- l'abondance relative des intégrons, c'est à dire le ratio entre la quantité d'intégrons et la quantité de bactéries estimée par l'ARNr 16S, est calculée.
- les résistomes sont caractérisés par PCR haut débit.

Ces méthodes sont appliquées aux échantillons de PRO, de sol des lysimètres, de lixiviats et de vers de terre préalablement exposés aux PRO lors d'essais de reproduction.

Les principales conclusions

L'analyse des différentes matrices (eau, sol, vers de terre) a montré que seuls les échantillons de sol permettaient un suivi de la dissémination de l'antibiorésistance dans le cadre du programme RISMEAU. En effet, la phase particulaire des échantillons d'eau infiltrée était insuffisante pour l'analyse (matières en suspension < 4 mg/L).

Concernant la concentration bactérienne, celle-ci est globalement stable dans le temps pour un même lysimètre, et elle est plus élevée pour la couche superficielle de sol (0 - 10 cm)

Les intégrons de classe 1 ont été quantifiés dans les PRO (boues, lisiers) avec une variabilité en abondance relative importante pour les boues de la deuxième campagne d'épandage en raison d'une concentration bactérienne plus élevée. Concernant le sol, les quantités d'intégrons sont faibles, et sous la limite de quantification pour de nombreux échantillons (tableau 2).

Les résistomes des PRO montrent des signatures stables avec toutefois un plus grand nombre de gènes codant pour une résistance à la tétracycline pour le lisier épandu lors de la quatrième campagne. L'abondance relative de gènes de résistance et d'éléments mobiles est très faible pour l'ensemble des échantillons de sol analysés, mais une plus grande variabilité du résistome est observée sur les sols amendés ; par exemple des gènes de résistance aux β -lactamases sont détectés après le troisième et le quatrième épandage. L'augmentation des doses épandues et la saisonnalité ne semblent pas impacter les résultats.

CAMPAGNES D'EPANDAGE												
Référence				Lisiers				Boues				
Ep1	Ep2	Ep3	Ep4	Ep1	Ep2	Ep3	Ep4	Ep1	Ep2	Ep3	Ep4	Episodes
				Intrants								
				10 ⁵ à 10 ⁸				10 ⁸ à 10 ⁹				
				Sols								Profondeur
DNQ	10 ⁶	DNQ	DNQ	10 ⁷	10 ⁶	DNQ	10 ⁵	DNQ	DNQ	DNQ	10 ⁴	0-10cm
DNQ	10 ⁶	DNQ	DNQ	10 ⁷	10 ⁵	DNQ	DNQ	DNQ	DNQ	DNQ	DNQ	10-40cm
DNQ	10 ⁶	DNQ	DNQ	10 ⁷	DNQ	DNQ	DNQ	DNQ	DNQ	DNQ	DNQ	40-60cm
DNQ	10 ⁵	DNQ	DNQ	10 ⁶	DNQ	DNQ	DNQ	10 ⁵	DNQ	DNQ	DNQ	60-10cm
				Eaux infiltrées								
				DNQ				DNQ				

Tableau 2 : Quantification des intégrons de classe 1 dans les sols et dans les eaux infiltrées - DNQ : Détecté Non Quantifiable [Crédit : C. Dagot]

Les messages à retenir

Le programme **RISMEAU** (RISques liés aux résidus de Médicaments, biocides et antibiorésistance d'origine humaine et vétérinaire sur les ressources en EAU du bassin versant de l'Arve) a été développé sur le site pilote de Bellecombe Sipibel de 2019 à 2023.

Il visait à appréhender le comportement de **33 substances pharmaceutiques et biocides** suivies après épandage de PRO (boues de station d'épuration et lisiers).



Dans le cadre de ce programme, nous avons comparé les intrant : nous avons constaté que les lisiers présentent des concentrations plus faibles d'un nombre de molécules plus réduit que les boues de station d'épuration.



En procédant à cinq épandages sur des lysimètres *in situ* en deux ans, soit aux doses agronomiques recommandées, soit aux mêmes doses multipliées par cinq, nous n'avons pas constaté d'impacts significatifs :

- pas d'accumulation significative des substances dans les sols,
- pas d'effets létaux ou écotoxiques sur les plantes et vers de terre,
- pas de dissémination d'antibiorésistance.

Il permet de fournir des données quantitatives nouvelles **sur les mécanismes de transfert, l'impact écotoxicologique et la dissémination de l'antibiorésistance**, sur la base de deux années d'expérimentations sur des lysimètres *in situ* et en laboratoire.



Concernant la mobilité des substances et le risque de transfert avec l'eau :

- La mobilité des substances dans le sol semble limitée,
- Des substances sont détectées dans les eaux infiltrées, mais pas systématiquement en rapport direct avec l'épandage,
- La répétition des épandages conduit de fait à des concentrations résiduelles détectables dans les sols.

Malgré le temps court du programme, les résultats viennent conforter des résultats antérieurs acquis sur du temps long, à savoir : peu de lien entre flux apporté par les PRO et concentration dans le sol, pas d'accumulation significative observée dans le sol *in situ* et une faible mobilité vers les eaux.

Le test qui a été le plus sensible aux épandages est le test de reproduction des vers de terre. Nous avons constaté une perturbation de la reproduction à des doses agronomiques ; les essais sont à poursuivre et à enrichir avec d'autres tests complémentaires pour consolider des indicateurs biologiques d'écotoxicité. Au regard de ces éléments, il est possible de recommander des doses maximales d'épandage de 50 g/kg MS pour le fumier bovin et 10 g/kg MS pour les boues et le lisier bovin.

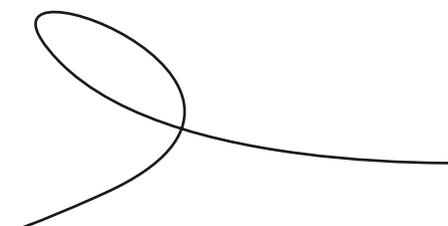
En conclusion sur le protocole expérimental, nous pouvons rappeler les limites du suivi *in situ*. Cela réduit l'interprétation possible des résultats : durée d'exposition courte, non homogénéité des sols, faibles concentrations au regard des limites de détection, contamination des sols de référence, etc.

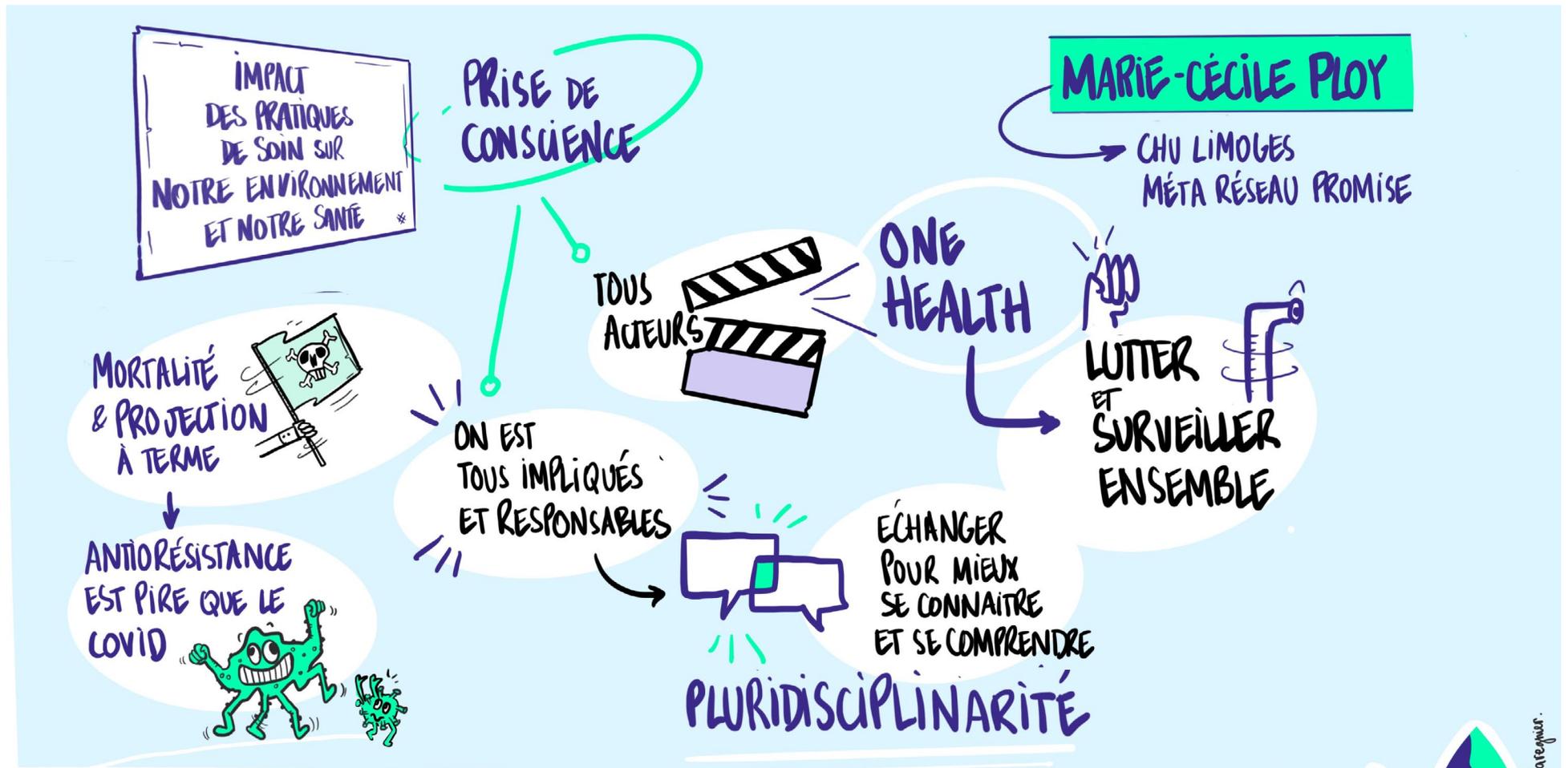


Les premiers résultats sont plutôt rassurants, mais « l'absence de preuve n'est pas la preuve de l'absence ! ». Cette citation de Michael Crichton, auteur de science-fiction américain, est fort à propos dans notre cas.

La nécessaire approche One-Health !

Pour conclure, nous reprendrons l'introduction de la conférence de novembre 2023 faite par Marie-Cécile Ploy (illustration page suivante) : après la prise de conscience des enjeux et de notre responsabilité, il est essentiel de travailler en pluri et transdisciplinarité pour se connaître, se comprendre, faire du suivi et lutter ensemble contre la dissémination de l'antibiorésistance !





8^{ème} CONFÉRENCE EAU ET SANTÉ → 14 & 15 NOVEMBRE 2023



Réunion plénière de lancement de RISMEAU sur le site de Bellecombe en 2020

RISMEAU SIPIBEL Site Pilote de Bellecombe

Partenaires scientifiques



INSTITUT NATIONAL
DES SCIENCES
APPLIQUÉES
LYON



Partenaires opérationnels



Avec le soutien financier de



Animation, coordination & valorisation



www.graie.org