



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

باجي مختار جامعة عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité: Biologie Animale

Intitulée :

Mise en évidence et impact d'une pollution par les résidus pharmaceutiques sur un micro-organisme (*Paramecium sp*).
Essai de bioremédiation.

Présentée par : Mme KERMICHE ACHAICHIA Fella

Membres de Jury:

Dr DJEBAR Med Réda	Prof.	Président	Université de B. Mokhtar
Dr BERREBBAH Houria	Prof.	Directrice de thèse	Université de B. Mokhtar
Dr DJAHOUDI Abdelghani	Prof.	Examineur	Université de B. Mokhtar
Dr KHALDI Fadila	M.C.A.	Examinatrice	Université de M.C Messaadia
Dr SOUIKI Linda	Prof.	Examinatrice	Université du 8 Mai 1945
Dr KACHI Slimane	Prof.	Examineur	Université du 8 Mai 1945

Année universitaire: 2016/2017

Remerciements :

Me voilà arrivée à une étape clé de mon parcours universitaire avec la présentation d'une thèse de Doctorat, effectuée au sein du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université BADJI MOKHTAR de Annaba, sous l'encadrement des professeurs Houria et Med Reda DJEBAR.

C'est donc vers eux qu'iront, en premier lieu, mes remerciements. Ils m'ont accueillie et entourée de toute leur confiance, dirigé ma thèse en me prodiguant orientations et conseils. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance.

Le professeur DJAHOUDI Abdelghani n'a pas, quant à lui, lésiné sur aide et soutien. C'est un honneur pour moi, qu'il examine et juge mon travail.

Ma gratitude va également au professeur SOUIKI Linda pour ses précieux avis et orientations. Je vous remercie d'accepter de juger ce travail aujourd'hui.

Je remercie également Dr KHALDI Fadila et Pr KACHI Slimane pour avoir bien accepté, malgré leurs obligations, de faire partie de ce jury.

Un grand merci à SAKRI Sabrina, ZOUAGHI Sana et NAMANE Imen. Elles m'ont accompagnée au cours de mes travaux, lors de leurs soutenances de Master II. Leur motivation ainsi que leur sérieux ont été un réel support pour moi. Bonne continuation les filles.

Je n'oublierai pas toute l'équipe du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire pour sa contribution au bon déroulement des expérimentations : DJEKOUN Meriem, BENBOUZID Houneida, KHEBBEB Nabil, SAIB Amina, CHIHEB Lynda, et tous ceux que j'oublie.

Dédicace :

A la mémoire de mon **Papa** Kamel, parti trop tôt pour un monde meilleur.

A tous ceux que j'aime et qui m'ont soutenue

dans la voie que j'ai choisie.

Résumé :

L'utilisation intensive des médicaments en médecine humaine et vétérinaire au cours de ces dernières décennies, est à l'origine de quantités non négligeables de substances actives accumulées dans les milieux naturels, engendrant ainsi, fortement la dégradation de la qualité des milieux, ce qui présente inévitablement un risque éco-toxicologique non négligeable.

Notre travail a concerné tout d'abord, la consommation des médicaments par l'homme et l'animal dans la ville de Annaba, Les deux groupes thérapeutiques les plus prescrits et donc les plus consommés sont les anti-infectieux et les analgésiques (Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdiens AINS). D'autres composés sont également consommés mais à de plus faibles quantités tels que les hormones. On constate également, que l'automédication est une pratique qui concerne plus de 87% des personnes interrogées, et que plus de 65% des médicaments non utilisés ou périmés se retrouvent dans nos poubelles. Tous ces moyens d'élimination des médicaments représentent des voies importantes de contamination de l'environnement par les produits pharmaceutiques.

Nous avons choisi pour les tests toxicologiques, quatre médicaments différents (Diclofénac, Aténolol, Erythromycine et Lévonorgestrel), que nous avons testés sur un organisme non visé : les Paramécies. Les résultats obtenus avec l'ensemble des molécules montrent un ralentissement du rythme de croissance, une accélération de la respiration et la mise en place d'un stress oxydatif chez *paramecium sp*, des valeurs positivement proportionnelles aux concentrations qui augmentent. Des lésions membranaires cellulaires sont même constatées avec l'Aténolol et l'Erythromycine.

Enfin, un essai de Phyto-épuration est entrepris avec *Phragmites australis* et *Typha latifolia*, vis-à-vis d'un ATB à large spectre : La Ciprofloxacine (Fluoroquinolone). Les deux plantes montrent une bonne épuration de l'Antibiotique, néanmoins, une meilleure performance a été enregistrée pour la *T. latifolia*.

Mot clés : Médicaments, Toxicité, *Paramecium sp*, Phytoépuration.

ملخص

إن الاستخدام المفرط للأدوية في الطب البشري و البيطري خلال العقود الماضية ، أدى إلى تراكم كميات كبيرة من المواد الفعالة في الطبيعة التي لديها بالضرورة ، خطر سمي إيكولوجي كبير على البيئة، حيث نشأ عن ذلك تدهور رهيب في نوعية المحيط .

ركزت هذه الدراسة في بداية الأمر على استهلاك الأدوية من قبل الإنسان والحيوان في مدينة عنابة، مجموعة الأدوية الأكثر وصفاً، وبالتالي الأكثر استهلاكاً : هي أدوية مكافحة الجراثيم و مكافحة الألم (المضادة للالتهاب غير الستيرويدية). توجد مركبات أخرى تستهلك أيضاً ولكن بكميات أقل مثل الهرمونات.

وجدنا أيضاً أن التطبيب الذاتي هو ظاهرة منتشرة بكثرة حيث شكلت هذه الفئة أكثر من 87 ٪ من مجموع أفراد العينة التي اجريت عليها الدراسة، كما أثبتت الدراسة أن أكثر من 65٪ من الأدوية غير المستعملة أو المنتهية الصلاحية ترمى في سلة المهملات.

تعتبر كل هذه الطرق المتبعة للقضاء على الأدوية، وسائل مهمة لتسرب الأدوية في الطبيعة وبالتالي تلوث هذه الأخيرة بالأدوية الصيدلانية.

أجريت اختبارات سمية مع 4 أدوية مختلفة (الديكلوفيناك، الأتينولول، الاريثروميسين والليفونورجيستريل) على كائن غير مستهدف: الباراميسيوم.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن كل المركبات المستعملة تؤدي إلى تباطؤ في حركية النمو، تسرع في التنفس و اندلاع توتر أكسدي في خلايا الباراميسيوم، مقادير تتناسب إيجابياً مع تركيزات الأدوية المتزايدة. هناك حتى ضرر في غشاء الخلايا مع الأتينولول والاريثروميسين..

وأخيراً قمنا بتجربة محاولة تطهير نباتي مع فراغميتيس اوسترناليس و تيفا لاتيفوليا بالنسبة لمضاد حيوي واسع الطيف : سيبروفلوكساسين (من عائلة الفلوروكوينولون). بينت النباتات قوة تنقية جيدة مع ملاحظة تأثير أحسن لدى تيفا لاتيفوليا .

الكلمات الرئيسية: الأدوية، سمية، باراميسيوم، تطهير نباتي

Abstract :

As a result of the intensive use of drugs by humans and inveterinary medicine during the last decades, significant quantities of active substances have accumulated in the natural environments, thus causing a noticeable degradation of the environmental quality, which inevitably induced a significant eco-toxicological risk.

This work was focused on the analysis of drug consumption by humans and animals in the city of Annaba. The two most prescribed and thus the most consumed therapeutic groups are: Anti-infectives and Analgesics (Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs NSAIDs). Other compounds are also consumed in lower amounts such as Hormones. The study shows that self-medication is a practice that concerns more than 87% of respondents, and more than 65% of unused or expired drugs are found in our garbage. All these means for medicines elimination are serious ways of environmental contamination by pharmaceuticals.

Toxicological tests were performed with four different drugs (Diclofenac, Atenolol, Erythromycin and Levonorgestrel) on a non-target organism: *paramecium sp.*

The results show a decrease in the growth rate, an increase of the respiratory metabolism and an oxidative stress reaction in *paramecium sp.* These different changes were proportional to the increasing concentrations. We also observe lesions on the cellular membrane with Atenolol and Erythromycin.

Finally, a Phyto-purification test was carried out on *Phragmites australis* and *Typha latifolia*, against a broad spectrum ATB Ciprofloxacin (Fluoroquinolone). The two plants show a good purification of Antibiotic, however, a better performance was recorded with the *T. latifolia*.

Key words: Drugs, toxicity, *paramecium*, phytopurification.

Sommaire :

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations.

1. Introduction générale.	1
2. Synthèse bibliographique.	
2.1. Les substances pharmaceutiques.	6
2.2. Métabolisation des médicaments.	8
2.3. Sources de contamination de l'environnement par les médicaments.	8
2.4. Devenir des résidus médicamenteux.	10
2.5. Evaluation des risques.	13
2.6. La phytoremédiation.	17

Chapitre 1 : Enquête épidémiologique : Consommation des médicaments dans la ville de Annaba.

1. Description de l'enquête.	
1.1. Méthode d'échantillonnage.	18
1.2. Groupes concernés.	18
1.3. Taille des échantillons.	19
1.4. Lieu de l'enquête.	20
1.5. Support de l'enquête.	20
1.6. Traitement des données.	20
2. Résultats.	
2.1. Enquête chez les médecins/ dentistes (Médecine humaine).	
2.1.1. Les fréquences des consultations selon l'âge et le sexe.	21
2.1.2. Les différentes voies d'administration.	22
2.1.3. Les groupes thérapeutiques les plus prescrits.	23
2.1.4. Les médicaments les plus prescrits.	24
2.2. Enquête chez les vétérinaires (Médecine animale).	
2.2.1. Les fréquences de consultations selon les catégories d'animaux.	24
2.2.2. Les différentes voies d'administration.	25
2.2.3. Les groupes thérapeutiques et les médicaments les plus prescrits.	25
2.3. Les classes thérapeutiques les plus utilisées en médecine	26

humaine et animale.	
2.4. Enquête chez les citoyens.	
2.4.1. Pratique de l'automédication.	27
2.4.2. Automédication selon l'âge	28
2.4.3. Automédication selon le sexe.	29
2.4.4. Devenir des médicaments non utilisés.	30
2.4.5. Les pathologies les plus concernées par l'automédication.	31
2.5. Enquête chez les pharmaciens.	
2.5.1. Les groupes thérapeutiques concernés par l'automédication.	32
2.5.2. Les médicaments de l'automédication.	32
3. Discussion	33

Chapitre 2 : Tests de toxicité des médicaments vis-à-vis des Paramécies.

1. Matériel et Méthodes.	
1.1. Matériel biologique.	
1.1.1. Présentation des Paramécies.	36
1.1.2. Culture des Paramécies.	37
1.2. Matériel chimique.	
1.2.1. Diclofénac.	38
1.2.2. Aténolol.	38
1.2.3. Erythromycine.	39
1.2.4. Lévonorgestrel.	40
1.3. Tests toxicologiques.	
1.3.1. Cinétique de croissance.	41
1.3.2. Pourcentage de réponse.	41
1.3.3. Métabolisme respiratoire.	42
1.3.4. Dosage des biomarqueurs.	42
1.4. Analyses statistiques.	45
2. Résultats.	
2.1. Effets des produits pharmaceutiques sur la cinétique de croissance et le pourcentage de réponse des Paramécies.	
2.1.1. Cas du Diclofénac.	46
2.1.2. Cas de l'Aténolol.	48
2.1.3. Cas de l'Erythromycine.	49
2.1.4. Cas du Lévonorgestrel.	51
2.2. Effet des produits pharmaceutiques sur le métabolisme respiratoire des Paramécies.	53
2.3. Effets des produits pharmaceutiques sur les mécanismes de	

défense cellulaire des Paramécies : Evaluation de l'activité de la GST et du taux de GSH.	
2.3.1. Cas du Diclofénac.	54
2.3.2. Cas de l'Aténolol.	56
2.3.3. Cas de l'Erythromycine.	57
2.3.4. Cas du Lévonorgestrel.	58
2.4. Toxicité des médicaments et peroxydation lipidique : Evolution du taux de Malondialdéhyde (MDA) chez les Paramécies.	60
3. Discussion	61
4. Hypothèse	69

Chapitre 3 : Phytoremédiation d'un Antibiotique (Ciprofloxacin) par *Phragmites australis* et *Typha latifolia*.

1. Matériel et Méthodes.	
1.1. Matériel végétal.	
1.1.1. <i>Phragmites australis</i> .	70
1.1.2. <i>Typha latifolia</i> .	71
1.2. Matériel chimique.	72
1.3. Zone d'étude.	72
1.4. Prélèvement de l'eau.	73
1.5. Récolte des plantes.	73
1.6. Traitement des plantes	73
1.7. Paramètres physico-chimiques.	74
1.8. Activité antibactérienne.	76
1.9. Régression linéaire.	77
1.10. Pourcentage d'élimination de l'Antibiotique.	78
1.11. Temps de Demi-vie.	78
1.12. Tests statistiques.	78
2. Résultats	
2.1. Paramètres physico-chimiques	
2.1.1. Paramètres physico-chimiques pré-expérimentaux de l'eau.	79
2.1.2. Paramètres physico-chimiques post-expérimentaux de l'eau.	79
2.2. Détermination du pouvoir épurateur.	
2.2.1. Tests antibactériens.	81
2.2.2. Détermination des quantités d'Antibiotique.	82
2.2.3. Détermination du temps de Demi-vie.	83
3. Discussion	84
3. Conclusion générale et perspectives.	87

4. Références bibliographiques.	90
5. Annexes.	
1. Annexe 1	116
2. Annexe 2	119
3. Annexe 3	121
4. Annexe 4	123
5. Publication internationale (Kermiche <i>et al.</i> , 2016).	125

Liste des figures :

Figure 1. Métabolisation des médicaments.	8
Figure 2. Principales sources de contamination des médicaments dans l'environnement.	9
Figure 3. Le prétraitement primaire des eaux usées (STEP Guelma).	10
Figure 4. Le traitement secondaire des eaux usées (STEP Guelma).	11
Figure 5. Groupes de l'enquête épidémiologique.	19
Figure 6. Fréquence des consultations médicales selon l'âge et le sexe.	21
Figure 7. Fréquence des consultations médicales selon les spécialités.	22
Figure 8. Les voies d'administration les plus utilisées.	22
Figure 9. Répartition des groupes thérapeutiques les plus prescrits en médecine humaine.	23
Figure 10. Répartition des consultations vétérinaires selon les catégories animales.	25
Figure 11. Les voies d'administration les plus utilisées chez les vétérinaires.	25
Figure 12. Les classes thérapeutiques utilisées en médecine humaine et animale.	27
Figure 13. Pratique générale de l'automédication.	28
Figure 14. Répartition de l'automédication selon l'âge.	28
Figure 15. Fréquence de l'automédication selon l'âge.	29
Figure 16. Répartition de l'automédication selon le sexe.	29
Figure 17. Fréquence de l'automédication selon le sexe.	30
Figure 18. Devenir des médicaments non utilisés dans les foyers.	30
Figure 19. Les pathologies concernées par l'automédication.	31
Figure 20. <i>Paramecium sp.</i>	37
Figure 21. Structure chimique du Diclofénac sodique (Pharmacopée Européenne, 2004).	38
Figure 22. Structure chimique de l'Aténolol (Pharmacopée Européenne, 2004).	39
Figure 23. Structure chimique de l'Erythromycine (Pharmacopée Européenne, 2004).	40
Figure 24. Structure chimique du Lévonorgestrel (Pharmacopée Européenne, 2004).	40
Figure 25. Effet du Diclofénac sur la croissance de <i>Paramecium sp</i> (Début de croissance DC).	46
Figure 26. Effet du Diclofénac sur la croissance de <i>Paramecium sp</i> (Phase exponentielle PE).	46
Figure 27. Pourcentage de réponse à 96h de <i>Paramecium sp</i> traités au Diclofénac (Début de croissance DC).	47

Figure 28. Pourcentage de réponse à 96h de <i>Paramecium sp</i> traités au Diclofénac (Phase exponentielle PE).	47
Figure 29. Effet de l'Aténolol sur la croissance de <i>Paramecium sp</i> (Début de croissance DC).	48
Figure 30. Effet de l'Aténolol sur la croissance de <i>Paramecium sp</i> (Phase exponentielle PE).	48
Figure 31. Pourcentage de réponse à 96h de <i>Paramecium sp</i> traités à l'Aténolol (Début de croissance DC).	49
Figure 32. Pourcentage de réponse à 96h de <i>Paramecium sp</i> traités à l'Aténolol (Phase exponentielle PE).	49
Figure 33. Effet de l'Erythromycine sur la croissance de <i>Paramecium sp</i> (Début de croissance DC).	50
Figure 34. Effet de l'Erythromycine sur la croissance de <i>Paramecium sp</i> (Phase exponentielle PE).	50
Figure 35. Pourcentage de réponse à 96h de <i>Paramecium sp</i> traités à l'Erythromycine (Début de croissance DC).	51
Figure 36. Pourcentage de réponse à 96h de <i>Paramecium sp</i> traités à l'Erythromycine (Phase exponentielle PE).	51
Figure 37. Effet du Lévonorgestrel sur la croissance de <i>Paramecium sp</i> (Début de croissance DC).	51
Figure 38. Effet du Lévonorgestrel sur la croissance de <i>Paramecium sp</i> (Phase exponentielle PE).	51
Figure 39. Pourcentage de réponse à 96h de <i>Paramecium sp</i> traités au Lévonorgestrel (Début de croissance DC).	52
Figure 40. Pourcentage de réponse à 96h de <i>Paramecium sp</i> traités au Lévonorgestrel (Phase exponentielle PE).	52
Figure 41. Différences de quantité d'O ₂ consommé par les Paramécies exposées au Diclofénac.	53
Figure 42. Différences de quantité d'O ₂ consommé par les Paramécies exposées à l'Aténolol.	53
Figure 43. Différences de quantité d'O ₂ consommé par les Paramécies exposées au l'Erythromycine.	53

Figure 44. Différences de quantité d'O ₂ consommé par les Paramécies exposées au Lévonorgestrel.	53
Figure 45. Effet des concentrations croissantes de Diclofénac sur l'activité de la GST chez les Paramécies.	55
Figure 46. Effet des concentrations croissantes de Diclofénac sur le taux de GSH chez les Paramécies.	55
Figure 47. Effet des concentrations croissantes de l'Aténolol sur l'activité de la GST chez les Paramécies.	56
Figure 48. Effet des concentrations croissantes de l'Aténolol sur le taux de GSH chez les Paramécies.	56
Figure 49. Effet des concentrations croissantes de l'Erythromycine sur l'activité de la GST chez les Paramécies.	57
Figure 50. Effet des concentrations croissantes de l'Erythromycine sur le taux de GSH chez les Paramécies.	58
Figure 51. Effet des concentrations croissantes du Lévonorgestrel sur l'activité de la GST chez les Paramécies.	59
Figure 52. Effet des concentrations croissantes du Lévonorgestrel sur le taux de GSH chez les Paramécies.	59
Figure 53. Schéma illustrant l'action des xénobiotiques (médicaments) sur le déclenchement d'un stress oxydatif chez <i>Paramecium sp.</i>	69
Figure 54. <i>Phragmites australis</i> .	71
Figure 55. <i>Typha latifolia</i> .	71
Figure 56. Chlorhydrate de Ciprofloxacine (Pharmacopée Européenne, 2004).	72
Figure 57. Situation géographique de la zone d'étude (Logiciel QGIS).	72
Figure 58. Schéma de la mise en place du processus expérimental.	74
Figure 59. Exemple de zones d'inhibition (Laboratoire de microbiologie, faculté de Médecine, Université Badji Mokhtar).	77
Figure 60. Régression linéaire exprimant les diamètres d'inhibition (mm) en fonction de concentrations de Ciprofloxacine testées (mg/L).	77
Figure 61. Concentrations de Ciprofloxacine (mg/L) en fonction du temps (jours).	82
Figure 62. Le temps de Demi-vie de la Ciprofloxacine en présence des plantes épuratrices.	83

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Taille des échantillons.	19
Tableau 2 : Répartition des médicaments les plus utilisés chez les médecins.	24
Tableau 3 : Répartition des médicaments les plus prescrits.	26
Tableau 4 : Fréquence de vente des médicaments selon leur classe pharmaceutique.	32
Tableau 5 : Répartition des médicaments sans prescription les plus concernés par l'automédication.	32
Tableau 6 : Evaluation du taux de MDA chez les Paramécies après exposition aux quatre médicaments, valeurs exprimées en moyennes \pm écarts types ($m \pm e$).	60
Tableau 7 : Paramètres physico-chimiques pré-expérimentaux de l'eau.	79
Tableau 8 : Paramètres physico-chimiques post-expérimentaux de l'eau.	80
Tableau 9 : Taux d'abattement des paramètres physico-chimiques.	80
Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des tests antimicrobiens, valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($m \pm e$).	81
Tableau 11 : Le pourcentage d'élimination (%) de la Ciprofloxacine tout au long de l'expérience.	82

Liste des abréviations :

AC : Acide Clofibrilic.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens.

ANOVA : Analyse de la Variance.

ASS : Acide Sulfosalicylique.

ATB : Antibiotique.

BAPs : Potentiel Antioxydant Biologique.

BBC : Bleu Brillant de Coomassie.

BSA : Albumine de Sérum de Bœuf.

CDNB : Chlorodinitrobenzène.

CE : Conductivité Electrique.

DBO₅ : Demande Biologique en Oxygène.

DC : Début de Cycle.

DCO : Demande Chimique en Oxygène.

DTNB : Acide 5-5'-Dithio-Bis-2 Nitrobenzoïque.

E.Coli : *Escherichia Coli*.

EDTA : Ethylène Diamine Tetra-Acétique.

GPx : Glutathion Peroxydase.

GSH : Glutathion.

GST : Glutathion S Transférase.

H.A.B : Hydrolytique et Acido-Basiques.

HSP : Heat Shock Protein.

MA : Marais Artificiels.

MDA : Malondialdéhyde.

MES : Matières En Suspension.

MNU : Médicaments Non Utilisés.

O₂ : Oxygène.

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie.

PE : Phase Exponentielle.

SH : Groupement Thiol.

SOD : Super Oxyde Dismutase.

STEP : Station d'Épuration.

T_{1/2} : Temps de Demi-vie.

TBA : Acide Thiobarbiturique.

TBARS : Thiobarbituric Acid Reactive Substances.

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane, (2-Amino-2-Hydroxyméthyl-1,3- Propanediol).

Introduction générale

1. Introduction générale :

Respectée et bien gérée, la planète nous offre tout ce dont nous avons besoin pour vivre, mais le poids de l'activité humaine et la surexploitation de ses ressources, pèsent lourdement sur notre environnement. Un rapport de force avec la nature s'est donc installé, perturbant complètement l'équilibre naturel, mettant en péril la relation de l'homme avec son environnement et ainsi la survie des espèces.

Une des conséquences majeures des activités intensives de l'homme : la pollution. Divers polluants sont rejetés chaque jour dans l'environnement, contaminant alors les différents milieux. Aujourd'hui, des études démontrent bien que la chaîne alimentaire est menacée, et à tous les niveaux par la plupart des produits chimiques que l'homme introduit dans son environnement (Tyler *et al.*, 1998 ; Guillette, 2000).

Tout comme l'air ou le sol, l'eau est un réservoir final d'innombrables polluants persistants dans l'environnement. Et c'est à la fin des années 60, quand des observations de troubles sur la faune sauvage et les populations humaines ont été constatées, que les premières interrogations sur l'impact possible des polluants environnementaux sur la santé animale et humaine sont apparues (cas des pesticides organochlorés). Les effets se sont traduits par des perturbations chez des populations de plusieurs espèces, des atteintes physiologiques chez les oiseaux et les poissons, des baisses de fertilité chez des oiseaux, des poissons, des mollusques et des mammifères, démasculinisation et féminisation des poissons, des oiseaux et des mammifères mâles, etc. (Colborn *et al.*, 1993). Et c'est là que, l'éventualité d'une relation entre ces composés et le développement de troubles de la santé de l'homme a alors été suspectée. Des études ont par la suite mis en exergue une augmentation des atteintes des fonctions de reproduction chez l'homme, notamment une augmentation du nombre de cancers des testicules et du sein, ainsi qu'une baisse de la fertilité et notamment une diminution de la production spermatique (Kolpin *et al.*, 2002 ; Sharpe & Skakkebaek, 1993). Toutes ces constatations sont dues à la présence de substances

Introduction générale

chimiques perturbatrices du système endocrinien dans l'environnement (Colborn & Clément, 1992).

Par conséquent, l'une des préoccupations majeures de ces dernières décennies, concernait les contaminants émergents organiques (CEO) (Ying, 2007 ; Benotti *et al.*, 2009 ; Kumar & Xagorarakis, 2010). Ce terme comprend non seulement les composés nouvellement découverts, mais également ceux nouvellement développés dans l'environnement, par exemple, les produits pharmaceutiques et les produits de soins personnels, les pesticides, les produits vétérinaires, etc. (Richardson & Ternes, 2011).

Avec l'augmentation de la population, l'augmentation du nombre de personnes âgées et l'amélioration des standards de vie, l'accès aux médicaments se généralise et augmente à l'échelle mondiale, en particulier dans les pays émergents (Kümmerer, 2010). Ceci nous a aidés à orienter notre axe de recherche vers une nouvelle catégorie de polluants, longtemps insoupçonnés, les médicaments. Même s'ils sont plutôt plébiscités, en faveur du rôle majeur qu'ils jouent dans l'amélioration des conditions de vie, beaucoup de choses encore restent ignorées concernant leur impact écologique, ainsi que leurs modes d'action sur des organismes non visés (Ankley *et al.*, 2007 ; Fent *et al.*, 2006).

En effet, la présence de médicaments dans l'environnement est une préoccupation relativement récente. Initialement, le problème a été pointé du doigt aux États-Unis dans les années 1970 (Garrison *et al.*, 1976 ; Hignite & Azarnoff, 1977), et presque une décennie plus tard en Angleterre (Richardson & Bowron, 1985). Pourtant, ce n'est seulement qu'au milieu des années 90, que la pollution médicamenteuse a été réellement caractérisée, grâce au développement des moyens analytiques (Taylor & Senac, 2014). Ainsi, ces nouvelles prouesses techniques, chromatographiques notamment, ont permis d'identifier et de quantifier des résidus pharmaceutiques dans plusieurs échantillons environnementaux, afin de révéler les différentes classes thérapeutiques qui envahissent notre environnement (Santos *et al.*, 2010), et obliger ainsi, la communauté scientifique à prendre au sérieux ce nouveau genre de contaminants (Kümmerer, 2001). Et c'est d'ailleurs, à partir du moment où ces composés pharmaceutiques ont été retrouvés dans les cours d'eau, en particulier les sources d'eau potable, que la question des potentiels effets sur la santé humaine et les différents écosystèmes a été posée (Yuan *et al.*, 2009 ; Sirés & Brillas, 2012). Par la suite, des travaux ont bien démontré que l'exposition à des perturbateurs endocriniens, y compris les

Introduction générale

produits pharmaceutiques et leurs métabolites entraîne une baisse de la fertilité masculine, des malformations congénitales, des cancers du sein et des testicules (Nikolaou *et al.*, 2007 ; Campion *et al.*, 2012), ainsi que le développement de phénomènes de résistances des bactéries pathogènes aux antibiotiques (Kolpin *et al.*, 2002).

L'apparition de produits pharmaceutiques est d'autant plus inquiétante, quand on sait qu'ils ne se retrouvent jamais dans l'environnement seuls, mais plutôt, sous forme de mélanges ou de mixtures avec divers autres polluants, des interactions toxicologiques sont donc très susceptibles de se produire (Cleuvers, 2003 ; Keil *et al.*, 2008). En effet, des études ont montré que, des combinaisons de médicaments exercent un effet toxique plus important que celui attendu par l'exposition de chaque composé individuellement (Cleuvers, 2003 ; Carlsson *et al.*, 2006 ; Katz & Griffin, 2008).

Ces substances sont introduites dans l'environnement via différentes sources, elles sont par ailleurs fréquemment détectées à des concentrations allant du Nano-gramme (ng) au Micro-gramme (μg) par litre (Kolpin *et al.*, 2002 ; Kümmerer, 2009). Elles sont retrouvées dans les affluents (Vieno *et al.*, 2006) et effluents (Koutsouba *et al.*, 2003 ; Bendz *et al.*, 2005) d'eaux usées (Kümmerer & Schuster, 2008), les eaux de surface (Stumpf *et al.*, 1999 ; Sacher *et al.*, 2001), les eaux souterraines (Barnes *et al.*, 2008 ; Loos *et al.*, 2007), les eaux marines (Batt *et al.*, 2006) et également l'eau potable (Focazio *et al.*, 2008 ; Kidd *et al.*, 2007).

Les produits pharmaceutiques sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, ils sont spécifiquement conçus pour résister à la dégradation métabolique, dans le but de maximiser l'absorption, et déclencher ainsi, les voies métaboliques escomptées chez l'homme ou l'animal visé (Arnott & Planey, 2012 ; Dave & Herger, 2012). Et c'est justement ces mêmes propriétés de résistance à la dégradation qui sont paradoxalement responsables de leur bioaccumulation, de leur persistance dans l'environnement, et ainsi, de leurs effets toxiques dans les écosystèmes aquatiques et terrestres (Halling-Sorensen *et al.*, 1998). Surtout que même à de faibles concentrations, et en fonction du temps d'exposition d'organismes non visés (Heberer, 2002), ils peuvent agir sur des voies métaboliques similaires à celles de l'homme (Fent *et al.*, 2006).

Introduction générale

Les Antibiotiques, les Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS), les β -bloquants, les Hormones, et les Anticancéreux représentent les classes de médicaments les plus communément retrouvés dans l'environnement (Miège *et al.*, 2009).

Les industries pharmaceutiques ne semblent pas tellement se soucier de l'impact écologique de leurs produits, de leur éventuelle bioaccumulation, de leur persistance ou des effets synergiques de leurs mixtures, encore moins l'élaboration de médicaments dits « verts », soit plus respectueux de l'environnement. Leur souci majeur, est de trouver le meilleur rapport entre la plus grande efficacité et le moins d'effets secondaires possibles (Monteiro & Boxall, 2010).

But du travail :

Dans le but d'apporter des réponses supplémentaires à cette nouvelle problématique environnementale, notre travail s'est étalé en trois parties distinctes :

Dans un premier lieu, et dans le but d'évaluer l'étendue de la consommation médicamenteuse dans la ville de Annaba, nous avons réalisé une enquête épidémiologique de nature descriptive, elle nous renseigne sur les différentes classes de médicaments les plus consommés dans la société, qu'ils soient prescrits par les médecins et les vétérinaires, ou bien obtenus en libre service chez le pharmacien. Ainsi, avoir une idée préliminaire sur les médicaments les plus susceptibles d'envahir notre environnement.

Dans un second lieu, afin d'évaluer un potentiel effet toxique de ces résidus pharmaceutiques sur des organismes non visés, nous avons effectué des tests toxicologiques avec quatre médicaments différents, représentatifs de groupes thérapeutiques particulièrement présents dans l'environnement, à savoir : le Diclofénac (AINS), L'Aténolol (β -bloquant), L'Erythromycine (Antibiotique) et le Lévonorgestrel (Progestatif). L'effet de ces composants a été testé sur un protozoaire cilié bien connu de la sphère des biologistes (Simon & Plattner, 2014), il s'agit des Paramécies. Leur croissance cellulaire, leur métabolisme respiratoire ainsi que certains biomarqueurs du stress oxydatif et de la lipoperoxydation, ont été suivis suite à leur exposition à ces xénobiotiques.

Introduction générale

En dernier lieu, et dans le but de remédier à cette présence de xénobiotiques dans l'eau, nous avons procédé à un essai de phytoremédiation. En effet, la phytoépuration fait partie des solutions écologiques, économiques et facilement réalisables, susceptibles d'être utilisées dans les stations d'épuration (Derradji, 2015 ; Kleche, 2013), afin de compléter leurs traitements des eaux usées, connaissant leur efficacité modérée vis-à-vis des résidus pharmaceutiques (Jelic *et al.*, 2011 ; Gao *et al.*, 2012a). Deux plantes ont été choisies : *Phragmites australis* et *Typha latifolia*, l'Antibiotique quant à lui, est à large spectre, appartenant à la famille des Fluoroquinolones : La Ciprofloxacine.

Dans la première partie de ce tapuscrit, nous présentons une synthèse bibliographique sur les médicaments, leurs voies de contamination, les risques écologiques redoutés et les premières conséquences liées à cette pollution.

Les moyens utilisés pour notre étude, les résultats obtenus et leurs discussions sont regroupés dans trois chapitres distincts relatifs aux trois sections étudiées.

Enfin, la dernière partie sera consacrée aux conclusions générales et aux perspectives de ce travail.

Synthèse bibliographique

2. Synthèse bibliographique :

2.1. Les substances pharmaceutiques :

Les composés pharmaceutiques sont des molécules complexes avec différentes fonctionnalités, ainsi que des propriétés physicochimiques et biologiques plus ou moins spécifiques (Giri & Pal, 2014). Ce sont des composés donc bioactifs, généralement résistants à la biodégradation, rendant ainsi leur présence dans l'environnement un réel problème à divers enjeux écologiques (Dave, 2012).

Les pays industrialisés sont les plus gros consommateurs de composés pharmaceutiques, puisque l'Europe, l'Amérique du Nord et le Japon représentent à eux seuls près de 84% du marché mondial pour moins de 16 % de la population mondiale. En Afrique, les médicaments essentiels ne représentent que 16 % de la part des médicaments vendus par les 20 plus grands laboratoires mondiaux (IMS Health, 2008).

Les produits pharmaceutiques les plus courants selon Li, (2014) sont présentés comme suit:

Les Analgésiques :

Ils comprennent les Analgésiques Narcotiques (comme la Codéine ou la Morphine), les Analgésiques Non Narcotiques (tels que le Paracétamol ou l'Aspirine) et les Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdiens (AINS) (comme le Diclofénac, l'Ibuprofène, le Kétoprofène, l'Acide Méfénamique ou le Naproxène) (Nicholas-Bateman, 2012). Ils agissent de différentes façons sur le système nerveux périphérique et central. Ils sont largement utilisés pour soulager la douleur présente dans presque toutes les maladies (Bueno *et al.*, 2012).

Les Antibiotiques :

C'est à la fin des années 1930, que les Antibiotiques naturels et synthétiques ont été introduits. Largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, leur utilisation n'a cessé d'augmenter. Ils sont considérés comme "pseudo-persistants", ce qui signifie que leur entrée

Synthèse bibliographique

perpétuelle et continue dans l'environnement rend leur présence permanente dans les différents milieux. On répertorie plus de 10 classes différentes d'Antibiotiques, les plus communes sont : les β -Lactamines, les Macrolides, les Fluoroquinolones, les Aminoglycosides, les Sulfamides et les Tétracyclines. Les β -Lactamines (Amoxicilline et la Pénicilline) par exemple sont les Antibiotiques les plus utilisés en thérapie humaine (Huang *et al.*, 2001). Pour la médecine vétérinaire, les Antibiotiques sont non seulement utilisés pour traiter la maladie, mais également pour augmenter l'efficacité alimentaire et améliorer les taux de croissance (Sarmah *et al.*, 2006).

Les médicaments cardiovasculaires :

Principalement représentés par les Anti-hypertensifs. Il en existe plusieurs types : β -bloquants, les Inhibiteurs Calciques, les Diurétiques...etc.

Les Composés Hormonaux :

Les Composés Hormonaux sont l'une des plus importantes classes de produits pharmaceutiques, en raison de leur usage commun, ainsi que leurs impacts graves sur l'homme et les animaux (Santos *et al.*, 2010). Représentés par les Hormones Œstrogènes, Progestatives et Androgènes. Les principaux Œstrogènes naturels excrétés par l'homme comprennent : l'Œstriol, l'Œstradiol et l'Œstrone. Un autre Œstrogène synthétique important : le 17α -Ethinylestradiol, est largement utilisé pour la contraception féminine, il induit des effets critiques sur l'environnement (Kolpin *et al.*, 2002).

Les Antiépileptiques :

La Carbamazépine est l'un des Antiépileptiques les plus fréquemment détectés dans les effluents d'eaux usées (Zhang *et al.*, 2008). Une recherche a montré des effets tératogènes de la Carbamazépine dus à ses métabolites (Amore *et al.*, 1997).

2.2. Métabolisation des médicaments :

Après leur absorption dans le corps, les médicaments sont plus ou moins métabolisés. Plus une substance est métabolisée, plus son taux d'excrétion est faible. Le métabolisme des médicaments a lieu en deux phases consécutives (I et II) (Figure. 1).

La phase I : Elle consiste habituellement en une oxydation ou une hydrolyse, avec l'ajout systématique d'un groupe fonctionnel.

La phase II : Elle consiste généralement en une conjugaison avec une molécule polaire, comme l'Acide Glucuronique, le GSH, un Sulfate, un Acétate ou un Acide Aminé. Les métabolites conjugués de la phase II sont plus polaires, donc plus hydrosolubles (Menager *et al.*, 2009).

Théoriquement, les métabolites sont moins bioactifs que leur molécule-mère, mais dans certains cas, on observe le contraire (Kummerer, 2008).

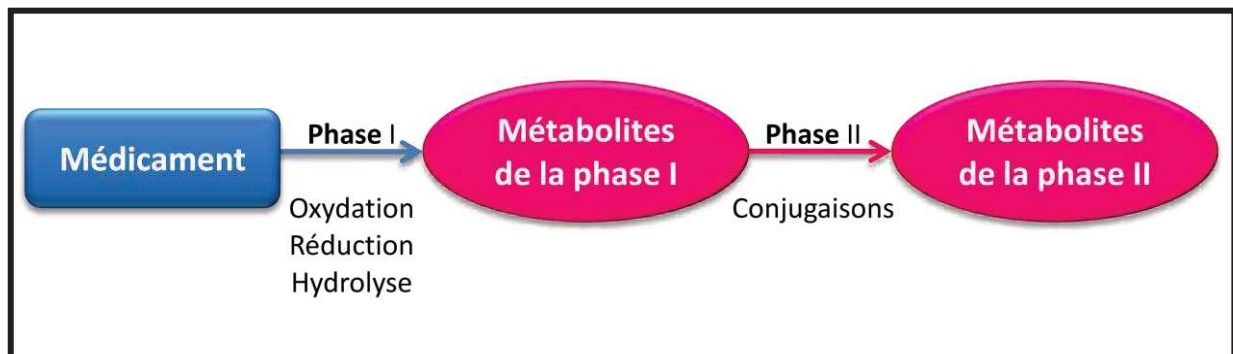


Figure 1. Métabolisation des médicaments.

2.3. Sources de contamination de l'environnement par les médicaments :

Les résidus pharmaceutiques sont introduits dans les différents milieux de diverses manières (Figure. 2). Pour l'évaluation et la gestion des risques, il est nécessaire de connaître ces différentes voies de contamination :

Sources diffuses :

Ce sont les rejets via les urines et les selles des populations, ainsi que des animaux de compagnie et d'élevage (Lixiviation et lessivage après épandage des lisiers et purins). Ce sont aussi tous les médicaments non utilisés (MNU) qui sont jetés dans les éviers, à la poubelle ou dans les toilettes... etc. (Lapworth *et al.*, 2012).

Sources ponctuelles :

Il s'agit des rejets de l'industrie chimique fine, l'industrie pharmaceutique, la lixiviation des décharges, les établissements de soins, les élevages industriels d'animaux et piscicoles et enfin, la valorisation des boues des stations d'épuration par leur épandage sur les terres agricoles (Fertilisants) (Lapworth *et al.*, 2012).

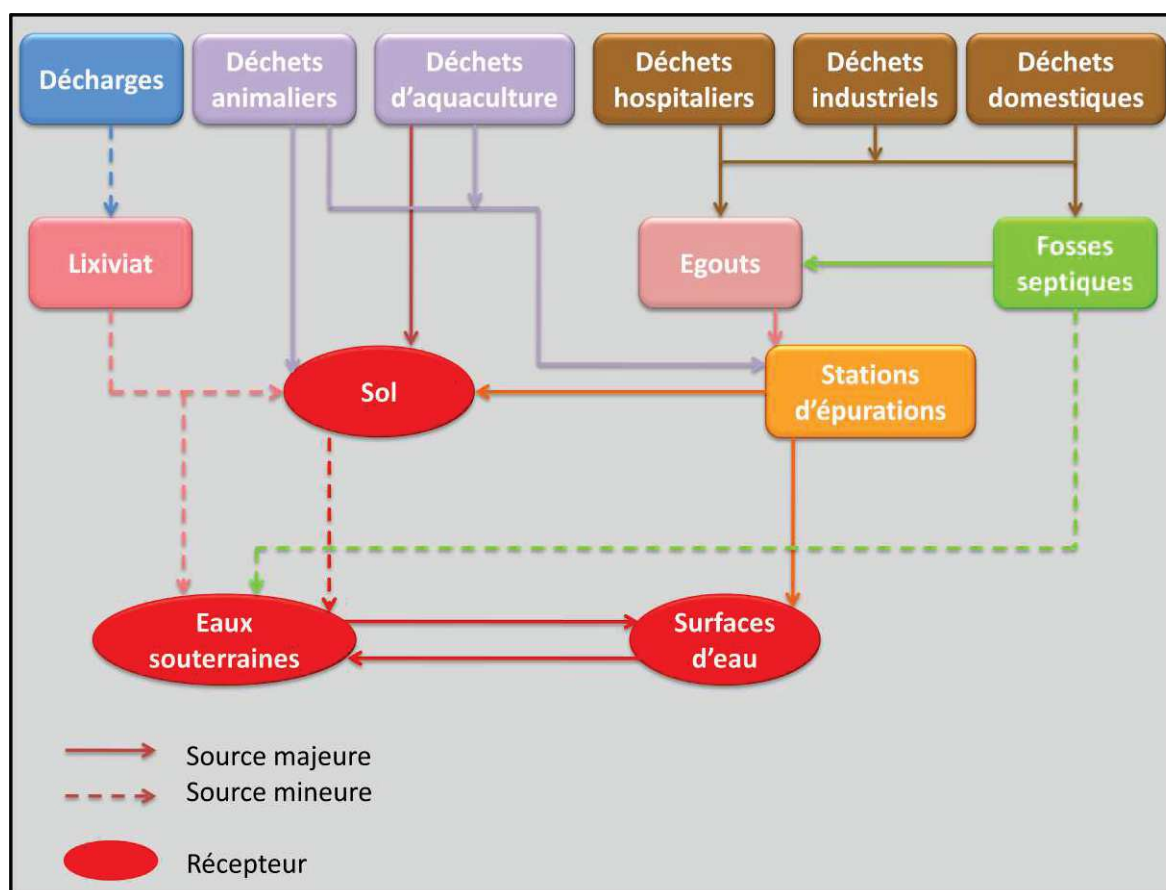


Figure 2. Principales sources de contamination des médicaments dans l'environnement (Lapworth *et al.*, 2012).

2.4. Devenir des résidus médicamenteux :

La dégradation d'un médicament est caractérisée par son temps de Demi-vie ($T_{1/2}$), c'est à dire, le temps nécessaire pour que se produise la transformation de 50% du produit. Quand la dégradation est incomplète, les résidus de médicaments peuvent se transformer en métabolites intermédiaires (Heidler & Halden, 2008).

De plus, le temps de Demi-vie d'un composé pharmaceutique dans l'environnement est relié à différents processus de dégradation provoqués selon Radjenović *et al.*, (2009) par:

- Les microorganismes (biodégradation).
- La température.
- Les rayonnements solaires (Photodégradation).
- Les réactifs oxydants (Radicaux, peroxyde d'hydrogène, métaux de transitions...).
- Les agents d'hydrolyse : OH^- , H^+ , ou l'eau.

Devenir dans les STEP :

Les stations d'épurations sont élaborées pour éliminer les sables, les graisses, les métaux et les matières organiques générées par les activités humaines quotidiennes, mais pas du tout faites pour éliminer les produits pharmaceutiques (Gros *et al.*, 2011). Généralement, les STEP contiennent deux phases de traitement principales :

1. Le prétraitement qui élimine les matières solides, les déchets et aussi les graisses (Figure. 3).



Figure 3. Le prétraitement primaire des eaux usées (STEP Guelma).

Synthèse bibliographique

2. Le traitement secondaire qui se caractérise le plus souvent par un traitement biologique à boues activées (Figure. 4).



Figure 4. Le traitement secondaire des eaux usées (STEP Guelma).

Les eaux traitées contenant les résidus de médicaments et leurs métabolites restants, sont directement rejetés dans les eaux de surface, ils peuvent continuer à se dégrader par des processus naturels comme l'hydrolyse, la photolyse ou la biodégradation. De plus, ils peuvent aussi migrer dans les eaux souterraines grâce à des échanges irréversibles entre ces deux eaux (Bui, 2014).

Devenir dans l'environnement :

Après leur passage dans les STEP ou bien dans le cas de rejets directs et/ou pour les médicaments à usage vétérinaire, les résidus de médicaments et leurs métabolites non éliminés vont être transférés dans les eaux superficielles (Bui, 2014).

Les concentrations auxquelles les résidus de médicaments se trouvent dans l'environnement dépendent de plusieurs paramètres :

Synthèse bibliographique

- Les quantités consommées.
- La métabolisation dans l'organisme.
- Les propriétés physico-chimiques des médicaments et leurs résidus.
- L'efficacité du traitement de la station d'épuration sur ces composés.
- La dimension du milieu récepteur (facteur de dilution).

En Fonction de ces paramètres, les résidus peuvent subir différents processus de dégradation tels que l'adsorption sur les matières solides (sol, sédiments, matières organiques), ou la dégradation physico- chimique.

Une large gamme de produits pharmaceutiques y compris les Analgésiques et les Antibiotiques sont détectés dans l'eau et le sol. En comparant les concentrations de médicaments dans les différents milieux et les effluents de STEP, Nous constatons que leur concentration dans l'environnement naturel est plutôt inférieure à celle des effluents de STEP, grâce quand même à certains processus d'élimination partiels tels que : La biotransformation, la photolyse et la sorption (Li, 2014).

Dans l'atmosphère :

Le milieu aérien est peu concerné par ce problème. Quant à l'incinération des MNU, quand elle est réalisée, elle peut se faire en toute sécurité sans avoir peur de retrouver des composés médicamenteux et/ou intermédiaires susceptibles de modifier la composition des fumées dégagées (Haguenoer, 2010).

Dans le sol :

La contamination des sols peut se faire par le biais des décharges, des déjections d'animaux traités par des médicaments vétérinaires, l'épandage des fumiers, purins ou biosolides de STEP sur les champs, ce qui peut conduire à des concentrations locales parfois très fortes. Les pluies peuvent ensuite entraîner les substances les plus hydrophiles vers les eaux souterraines et les eaux de surface. Les animaux se nourrissant de fumier comme les vers, les oiseaux ou les mouches, peuvent à leur tour être contaminés. Une autre conséquence de l'utilisation des purins dans l'amendement des sols agricoles : est le

Synthèse bibliographique

transfert de résistances provenant de la microflore des animaux d'élevage (Haguenoer, 2010).

Les six produits pharmaceutiques les plus couramment retrouvés dans le sol sont les Antibiotiques (Triméthoprim, Sulfadiazine et Triclosan), les Analgésiques (Ibuprofène et Diclofénac) et les Antiépileptiques (Carbamazépine). En général, les concentrations de produits pharmaceutiques détectés dans les sols sont assez faibles en comparaison avec ceux des ressources en eau (Ho *et al.*, 2012).

Dans l'eau :

La persistance des résidus médicamenteux dans l'eau dépend en particulier, de la Demi-vie des molécules, liée à leur stabilité et à leurs propriétés physico-chimiques. Elle peut varier de plusieurs mois à quelques jours ou quelques heures (Haguenoer, 2010). Mais le rejet en continu de médicaments et de leurs métabolites dans les milieux aquatiques, confère à ces molécules un caractère de « pseudo-persistance ».

Le sol peut agir comme une source importante de contamination de l'eau (Alder *et al.*, 2001), étant donné que la plupart de ces composés et leur métabolites sont hydrosolubles (Halling-Sørensen, 2001).

Dans les milieux aquatiques, six catégories de résidus médicamenteux sont principalement retrouvées selon Nikolaou *et al.*, (2007) :

- Analgésiques et Anti-inflammatoires.
- Antibiotiques.
- Régulateurs de lipides.
- Antiépileptiques, Anticancéreux, Antidépresseurs.
- β -bloquants.
- Stéroïdes et dérivés hormonaux.

2.5. Evaluation des risques :

Les produits pharmaceutiques qui ne peuvent être dégradés et atténués naturellement, vont s'accumuler dans l'environnement et conduire à des effets potentiels

Synthèse bibliographique

sur des organismes non visés ou même l'homme. Certains organismes tels que les poissons, les algues et les moules sont particulièrement affectés par les quantités élevées de produits pharmaceutiques, et ainsi causer des perturbations écologiques (Li, 2014).

En effet, certaines espèces sont susceptibles de concentrer les polluants dans leurs tissus, particulièrement, les molécules lipophiles (Casellas *et al.*, 2010). Certains médicaments tels que l'Erythromycine, l'Acide Clofibrigue, le Cyclophosphamide, le Naproxène, ou le Sulfaméthoxazole peuvent persister dans l'environnement pendant plus d'une année, augmentant ainsi leur bioaccumulation et leur action biologique (Rivera-Utrilla *et al.*, 2013), c'est également le cas du Diclofénac qui possède un fort potentiel de bioaccumulation (Carlsson *et al.*, 2006).

Les risques pour l'homme liés à l'absorption éventuelle de petites doses de résidus de médicaments sont totalement inconnus. La présence de mélanges de ces résidus dans l'eau du robinet, certes à des concentrations extrêmement faibles, montre qu'il y a des voies directes d'absorption, et de possibles effets synergiques qu'il faudrait surveiller, notamment pour les populations les plus sensibles comme les enfants ou les femmes enceintes. Il existe très peu de cas identifiés de contamination d'eau du robinet, mais il ne faut pas oublier que dans beaucoup de régions du monde, les eaux sont mal voire peu traitées. En l'état actuel des connaissances, il semble que, même en absorbant deux litres d'eau du robinet par jour pendant toute une vie, la dose cumulée, suite à une contamination, ne dépasse pas la quantité d'une prise thérapeutique unique (Joyeux, 2006). Mais nous ignorons les apports liés aux éventuels transferts alimentaires, ce qui empêche d'évaluer les risques réels pour la population. Dorne *et al.*, (2007) estiment que l'évaluation des risques d'absorption de médicaments par l'homme aux faibles doses environnementales, devrait faire l'objet d'une priorité scientifique et de recherches pluridisciplinaires.

Les AINS :

Les AINS sont largement retrouvés dans les effluents de STEP en Europe, aux États-Unis et au Canada. A l'exception de l'Acide Acétylsalicylique (Aspirine), c'est l'Ibuprofène, le Diclofénac, le Paracétamol et le Naproxène qui sont les plus détectés car les plus vendus. (Khetan & Collins, 2007). Le Diclofénac est le plus toxique avec des effets observés à des

Synthèse bibliographique

concentrations inférieures à 100 mg/L (Cleuvers, 2003), avec l'Ibuprofène, ils font partie des AINS les plus explorés quant à leur potentielle toxicité vis-à-vis d'organismes non visés (Flippin *et al.*, 2007 ; Heckamann *et al.*, 2007). Globalement, les AINS comme le Diclofénac, l'Ibuprofène, le Naproxène ou le Kétoprofène sont considérés comme très toxiques pour les bactéries et toxiques pour les invertébrés et les algues (Hernando *et al.*, 2006).

Les ATB :

Les Antibiotiques sont essentiels à la préservation de la santé humaine d'un côté, et l'augmentation de la croissance des animaux de l'autre. Cependant, ces dernières années, ils deviennent menaçants quant à leur implication dans les perturbations de l'environnement. La préoccupation majeure est associée au développement de mécanismes de résistance par les bactéries, pouvant ensuite compromettre la santé publique en diminuant l'efficacité du traitement (Costanzo, 2005 ; Baquero *et al.*, 2008).

Même en tenant compte de leur utilisation à des concentrations sub-thérapeutiques, de nombreuses études suggèrent le développement de résistances bactériennes, voire même de résistances croisées entre différentes classes d'Antibiotiques (Bottoni *et al.*, 2010). La présence d'Antibiotiques dans l'environnement, peut donc, influencer les biomasses bactériennes des différents milieux que ce soit dans les eaux, les sols, les stations de traitement des eaux, ou les réseaux de distribution d'eau potable (Haguenoer, 2010). De là, des effets toxiques peuvent être observés dans les écosystèmes aquatiques et / ou terrestres (Halling-Sørensen *et al.*, 1998), tels que les effets néfastes sur les bactéries nitrifiantes (Gomez *et al.*, 2007 ; Halling-Sørensen *et al.*, 1998). Selon Liu *et al.*, (2012), la présence d'Antibiotiques dans les milieux aquatiques serait à l'origine d'hépatotoxicité et de génotoxicité sur diverses espèces : poissons, micro-algues, crustacés, la cible variant avec l'Antibiotique.

Les Hormones :

Considérés comme perturbateurs endocriniens, les Hormones Stéroïdes peuvent agir à des concentrations très faibles, de l'ordre du ng/L, et induire des troubles de la reproduction chez diverses espèces de poissons et autres organismes aquatiques (Desbrow *et al.*, 1998). A travers les effluents de STEP et les épandages des déchets agricoles, les

Synthèse bibliographique

Hormones se dispersent ainsi dans l'environnement, pouvant donc contaminer à la fois notre environnement aquatique et édaphique. Selon Combalbert & Hernandez-Raquet, (2010), les Hormones présentes dans les eaux de surface proches des rejets de stations d'épuration urbaines sont responsables de la féminisation de certaines espèces de poissons.

Les Hormones Œstrogènes (Œstradiol, Œstrone, Œstriol...) ont des effets toxiques à de très faibles concentrations sur le développement, la différenciation sexuelle, la production de vitellogénine et la reproduction de diverses espèces de poissons (Andersen *et al.*, 2003 ; Nash *et al.*, 2004).

Les Androgènes (Testostérone) sont encore assez peu étudiés bien que les travaux à leur sujet se développent depuis quelques années (Liu *et al.*, 2009c ; Sumpter, 2005). Des études rapportent néanmoins leur présence dans les effluents de STEP (Liu *et al.*, 2009c ; Chang *et al.*, 2008), Van Der Linden *et al.*, (2008) révèlent la présence d'une activité androgénique de divers échantillons environnementaux à l'aide de tests *in vitro*.

S'il existe un nombre de données sur la toxicité des Œstrogènes, les données relatives aux Progestatifs sont beaucoup plus rares, déséquilibre non justifié en vue de leur grande utilisation (Contraception féminine).

Les mixtures :

Dans la pratique, il y'a peu d'études qui évaluent les effets des mélanges des médicaments (Kümmerer, 2009 ; Láng & Köhidai., 2012). Beaucoup de mélanges produisent des effets plus toxiques et plus importants que ceux correspondant à leur action individuelle, car des effets interactifs et synergiques peuvent se produire (Khetan & Collins, 2007). Certains composés considérés comme inoffensifs, peuvent même augmenter et amplifier la toxicité d'autres composés. Comme de manière alternative, certaines combinaisons de substances peuvent être antagonistes, avec un effet mineur par rapport à celui attendu.

Afin de remédier à cette pollution médicamenteuse, divers procédés d'élimination de ces composés sont étudiés, parmi eux : la Phytoremédiation.

2.6. La phytoremédiation :

En raison du danger de l'entrée des produits chimiques dans les eaux usées, beaucoup de méthodes biologiques dites vertes ont été développées pour le traitement de ces eaux. Ainsi, parmi les procédés biologiques les plus intéressants pour le traitement des eaux usées : la phytoremédiation (Roongtakit et al., 2007). Un procédé d'élimination qui utilise à la fois, les espèces supérieures de plantes et les micro-organismes pour extraire, séquestrer, et / ou détoxifier les divers polluants (Tsao, 2003 ; Lu, 2009). En plus de leur grande efficacité vis-à-vis des eaux usées, les marais artificiels (MA) contribuent également à l'amélioration de la qualité de l'air, et donc à la prévention des changements climatiques (Azaizeh et al., 2003). Ils sont donc plus respectueux de l'environnement, écologiques, simples, économiques et efficaces (Roongtakit et al., 2007). En outre, la phytoremédiation peut être réalisée *in situ*, et ainsi limiter l'exposition humaine et environnementale aux polluants.

La phytoremédiation des polluants organiques peut avoir lieu de différentes manières : Absorption par les plantes, sécrétion d'exsudats ou d'enzymes et/ou avec la participation des micro-organismes de la rhizosphère, à la fois dans des conditions aérobiques et anaérobiques (Wu et al., 2012 ; Cui et al., 2013). Les procédés d'élimination dépendent donc des propriétés de chaque polluant, et de son interaction avec la plante (Pilon-Smits, 2005 ; Zhang et al., 2010). Ces procédés, peuvent être classés comme suit : photo-dégradation, phyto-stabilisation, phyto-volatilisation, rhizo-dégradation et rhizo-filtration (Pilon-Smits, 2005 ; Zhang et al., 2010).

L'application et la recherche sur le traitement des eaux usées par la phytoépuration incluent également le traitement des substances pharmaceutiques. En effet, Les plantes se sont révélées jouer un rôle essentiel dans l'élimination des médicaments (Verlicchi & Zambello, 2014 ; Matamoros et al., 2012b), des études ont même prouvé l'absorption directe de produits pharmaceutiques par plusieurs espèces de plantes cultivées (Carvalho et al., 2014 ; Shenker et al., 2011).

Chapitre 1 :

Enquête épidémiologique :

**Consommation des médicaments dans la ville
de Annaba.**

Chapitre 1 : Enquête épidémiologique : Consommation des médicaments dans la ville de Annaba.

1. Description de l'enquête :

Il s'agit d'une enquête exploratrice transversale qui vise à évaluer la consommation des médicaments humains et vétérinaires dans la wilaya de Annaba.

L'étude s'effectue sur le terrain, à l'aide de questionnaires adaptés aux différents objectifs de l'étude.

1.1. Méthode d'échantillonnage :

La méthode d'échantillonnage est dite non probabiliste ou non aléatoire soit par quotas, cela signifie que nos échantillons sont sélectionnés selon plusieurs critères qui sont :

- Métiers et spécialités pour le corps médical.
- Age, sexe et niveau d'instruction pour les autres.

1.2. Groupes concernés :

Nous nous sommes intéressés en premier lieu au corps médical (Médecins et vétérinaires).

En second lieu, nous nous sommes penchés sur les citoyens et les pharmaciens, pour prendre en considération le phénomène d'automédication. Soit l'auto-administration d'un traitement médicamenteux par le patient, sur sa propre initiative et sans prescription (Figure. 5).

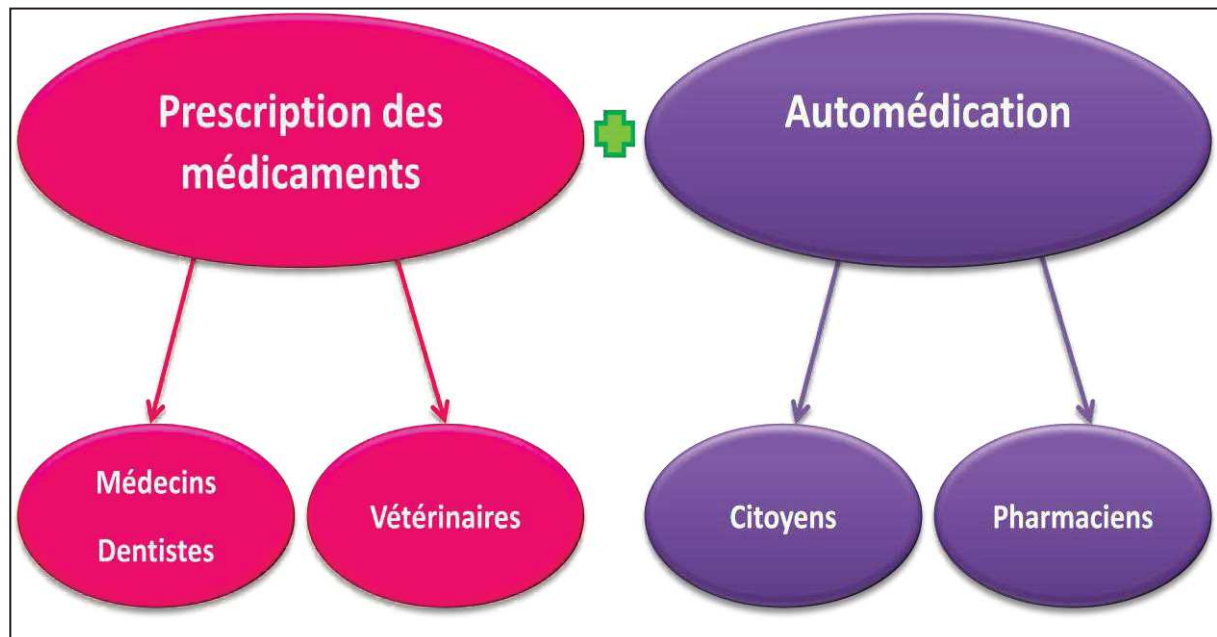


Figure 5. Groupes de l'enquête épidémiologique.

1.3. Taille des échantillons :

Les tailles des échantillons sont variables selon les groupes visés, elles se répartissent dans le tableau (1) comme suit :

Tableau 1 : Taille des échantillons.

Groupes		Taille des échantillons
Médecins/ Dentistes	Généralistes	120
	Spécialistes	
	Dentistes	
Vétérinaires		40
Pharmaciens		40
Citoyens		40
Total		240

Chapitre 1 : Description de l'enquête

1.4. Lieu de l'enquête :

L'enquête est réalisée dans la ville de Annaba et ses communes (Berrahal, El Hadjar...) Pour le corps médical, nous avons tenu à toucher le secteur public comme le privé (Hôpitaux et cabinets privés). Les citoyens quant à eux sont interrogés dans la rue et les axes publics.

1.5. Support de l'enquête :

Nos questionnaires se composent de séries de questions de 2 types :

- Des questions fermées (Oui/Non).
- Des questions à échelles de notation (de 1 à 5).

Nous avons préparé quatre types de questionnaires selon chaque catégorie interrogée.

- Administration des médicaments par les professionnels de la santé :
 - Médecins/Dentistes (Annexe 1).
 - Vétérinaires (Annexe 2).
- Auto-administration ou Automédication des citoyens.
 - Citoyens (Annexe 3).
 - Pharmaciens (Annexe 4).

Les listes des médicaments utilisées sont référencées comme suit :

- Pour l'homme : la liste modèle des médicaments essentiels. tirée de l'Organisme Mondial de la Santé (OMS, 2011).
- Pour l'animal : D'après l'article L. 5143-6 du code de la santé publique (2011).

1.6. Traitement des données:

Le traitement des données s'effectue sur le Logiciel Office Excel 2013. Le traitement statistique des données est réalisé avec le Logiciel Minitab (Version 16) en utilisant le test du Khi Deux (X^2).

2. Résultats :

Les résultats regroupent les réponses aux questionnaires effectués sur les 4 groupes suivants :

1. Les médecins /dentistes.
2. Les vétérinaires.
3. Les citoyens.
4. Les pharmaciens.

2.1. Enquête chez les médecins/dentistes (Médecine humaine) :

2.1.1. Les fréquences des consultations selon l'âge et le sexe :

Les fréquences de consultations médicales en fonction de l'âge et du sexe sont représentées dans les figures (6) et (7).

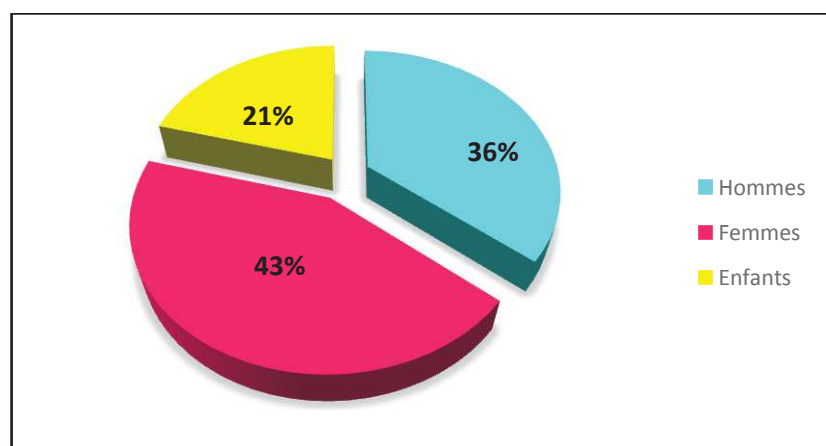


Figure 6. Fréquence des consultations médicales selon l'âge et le sexe.

Il en ressort que, sur les 120 Médecins/Dentistes spécialistes et généralistes confondus, la fréquence des consultations médicales est en faveur des adultes femmes avec un pourcentage de 43% des consultations. Les enfants quant à eux ne représentent que le 5^{ème} des consultations.

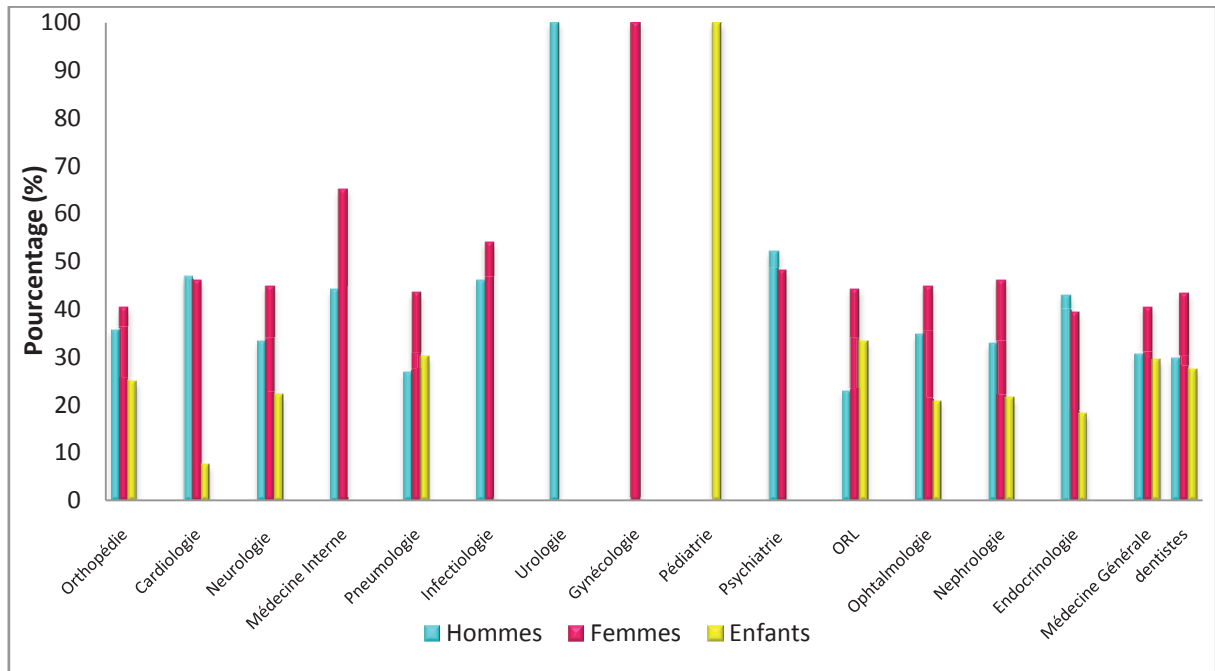


Figure 7. Fréquence des consultations médicales selon les spécialités.

2.1.2. Les différentes voies d'administration :

La figure (8) illustre les différentes voies d'administration utilisées par les médecins.

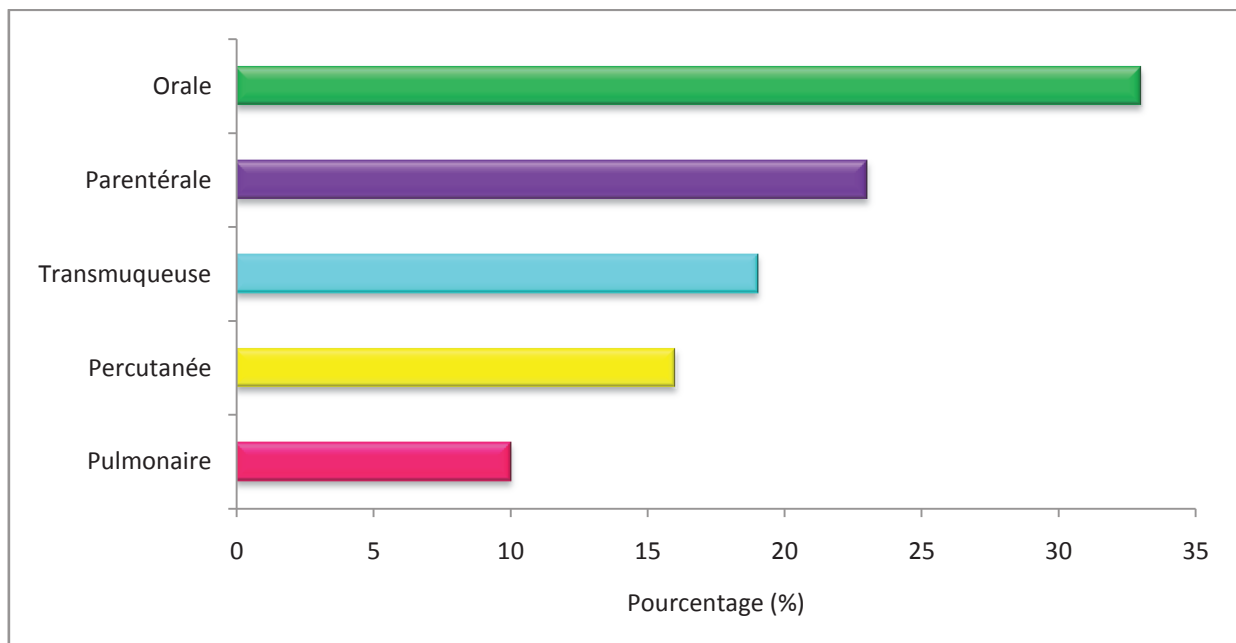


Figure 8. Les voies d'administration les plus utilisées.

Chapitre 1 : Résultats

Les résultats révèlent que les médecins ont tendance à exploiter les voies orale et parentérale à 33 et 23% respectivement.

2.1.3. Les groupes thérapeutiques les plus prescrits:

La figure (9) met en évidence la répartition des groupes thérapeutiques les plus prescrits en médecine humaine.

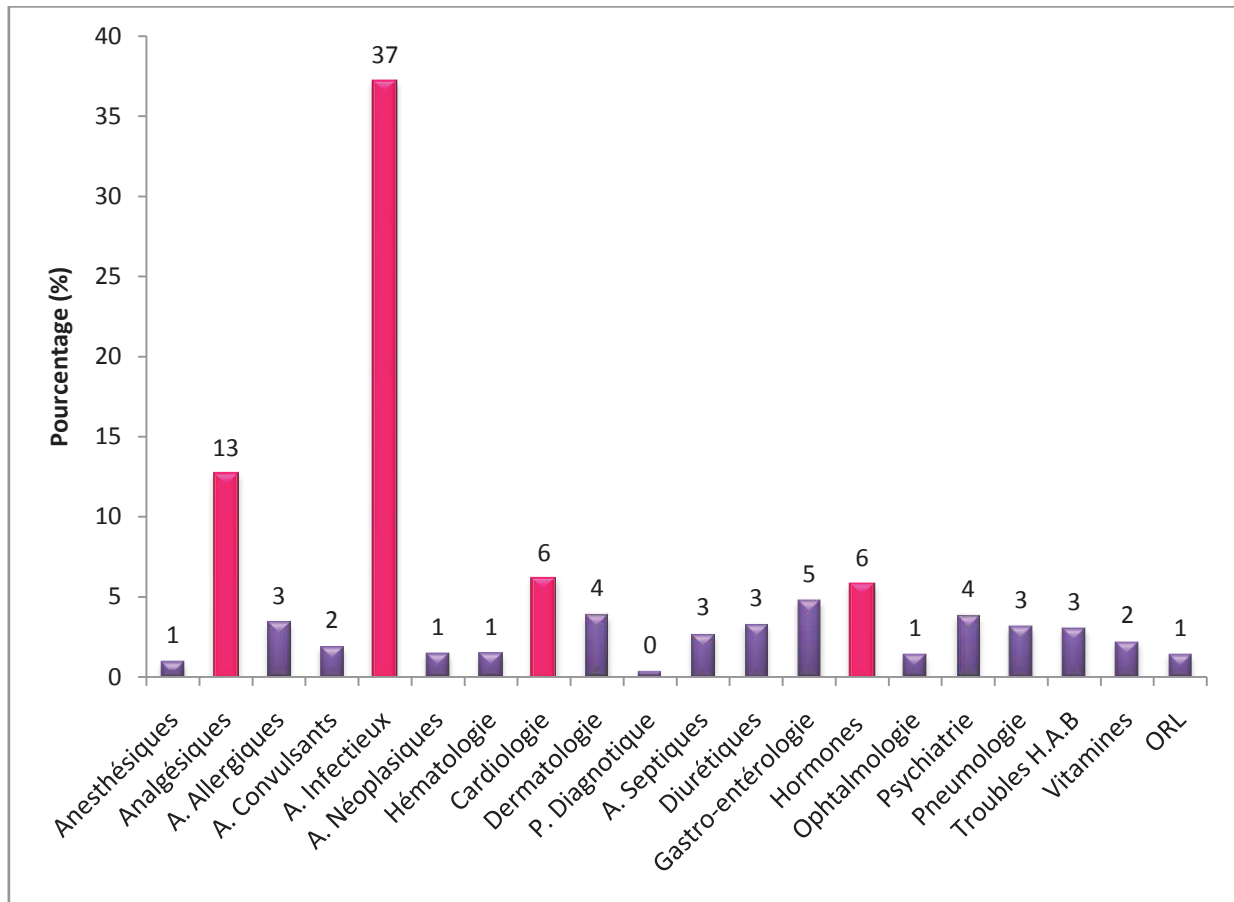


Figure 9. Répartition des groupes thérapeutiques les plus prescrits en médecine humaine.

On remarque que deux groupes s'imposent fortement et ressortent, il s'agit des Anti-infectieux à 37% (Antibactériens, Antiparasitaires, Antiviraux et Antifongiques) ainsi que les Analgésiques à 13%. Néanmoins, d'autres groupes apparaissent également mais avec de plus faibles proportions, comme les Hormones et les médicaments utilisés en Cardiologie tels que les β -bloquants.

2.1.4. Les médicaments les plus prescrits :

D'après les groupes les plus prescrits, nous avons enquêté sur les molécules les plus utilisées relatives à chaque groupe, les résultats sont inscrits dans le tableau (2) :

Tableau 2 : Répartition des médicaments les plus utilisés chez les médecins.

Anti-infectieux	37%	Analgésiques 13%	
Antibiotiques	78%	Paracétamol	38%
Amoxicilline	23%	Ibuprofène	25%
Ciprofloxacine	8%	Acide acétylsalicylique	24%
Céfalexine	7%	Autres	13%
Gentamicine	6%	Hormones 6%	
Métronidazole	6%	Insuline	22%
Erythromycine	5%	Metformine	16%
Autres	45%	Hydrocortisone	12%
Antiviraux	10%	Autres	50%
Aciclovir	19%	Médicaments de la Cardiologie 6%	
Emtricitabine + Ténofovir	8%	Bisoprolol	15%
Autres	81%	Digoxine	13%
Antifongiques	6%	Amlodipine	10%
Anti-Lépreux	4%	Simvastatine	8%
Antihelminthiques	2%	Autres	62%

2.2. Enquête chez les vétérinaires (Médecine Animale) :

2.2.1. Les fréquences de consultations selon les catégories d'animaux :

Les animaux de compagnie étant minoritaires dans notre société, le choix des vétérinaires s'est volontairement orienté vers ceux des animaux de ferme.

La figure (10) spécifie la répartition des différents groupes d'animaux auxquels ils ont affaire, Les bovins sont dominants avec plus de 34% des consultations, suivis des ovins et des volailles.

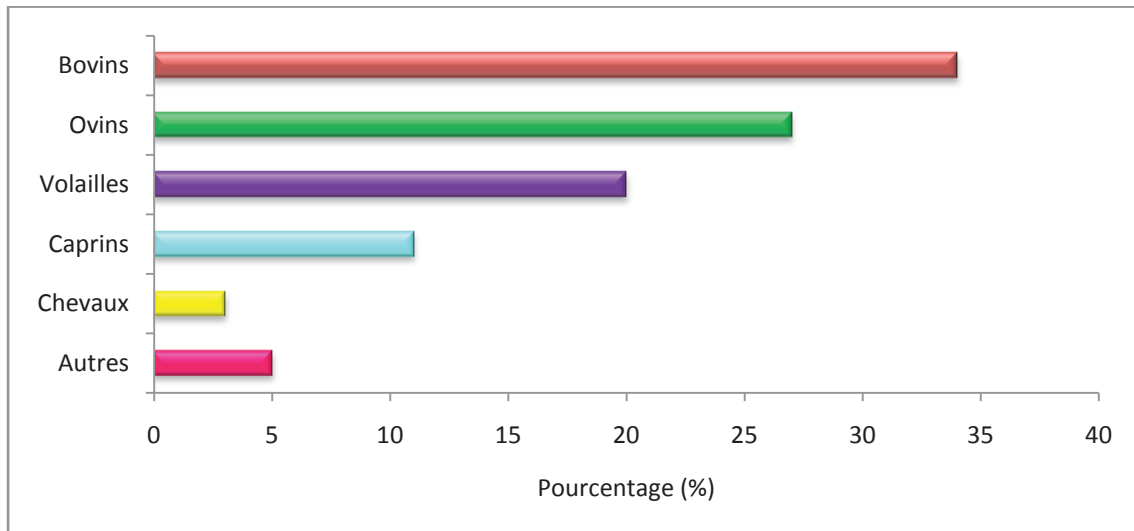


Figure 10. Répartition des consultations vétérinaires selon les catégories animales.

2.2.2. Les différentes voies d'administration :

La figure (11) montre la répartition des voies d'administration les plus utilisées chez les vétérinaires. Tout comme chez l'homme, la voie orale et la voie parentérale sont les voies les plus pratiquées avec un taux moyen de 30% par rapport aux autres voies.

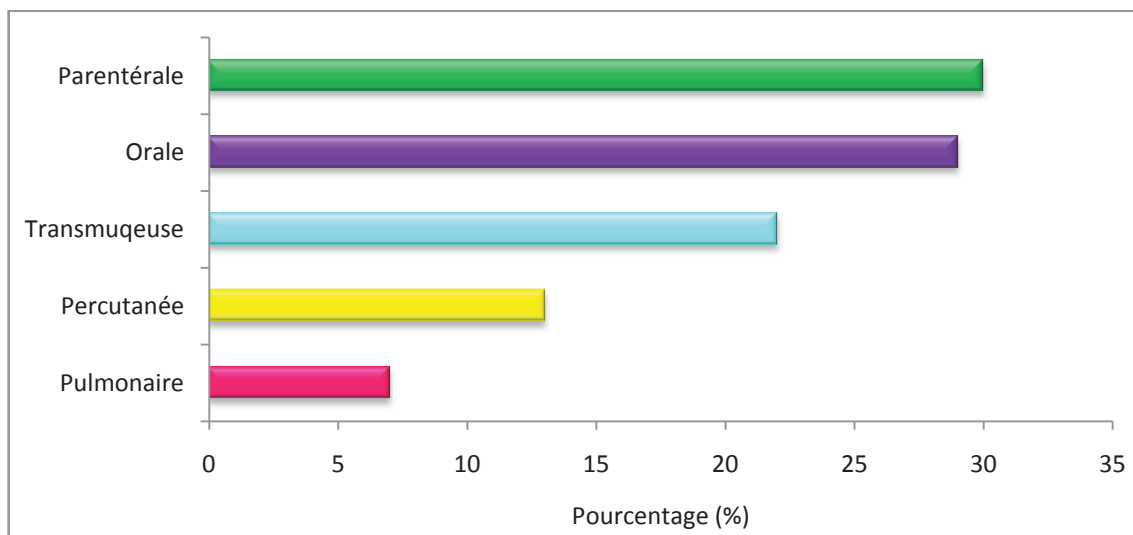


Figure 11. Les voies d'administration les plus utilisées chez les vétérinaires.

2.2.3. Les groupes thérapeutiques et les médicaments les plus prescrits :

Le tableau (3) illustre les groupes thérapeutiques et les médicaments les plus prescrits par les vétérinaires.

Tableau 3 : Répartition des médicaments les plus prescrits par les vétérinaires.

A. Infectieux	97%
A. Parasitaires	59%
Ivermectine	16%
Fenbendazole	11%
Albendazole	11%
Sulfadimérazine (Sulfadimidine)	10%
Sulfadiméthoxine	9%
Nitroxinil	8%
Autres	35%
Antibiotiques	38%
Chlortétracycline	23%
Colistine	23%
Oxytétracycline	19%
Spiramycine	11%
Autres	24%
Hormones	3%
Prostaglandine	96%
Progestérone	3%

Les résultats montrent bien que seulement deux grands groupes sont fréquemment utilisés en médecine animale, il s'agit des Anti-infectieux et des Hormones. On constate d'ailleurs que les Anti-infectieux sont utilisés à une fréquence de 97% par rapport aux Hormones avec seulement 3%.

2.3. Les classes thérapeutiques les plus utilisées en médecine humaine et animale :

La Figure (12) montre les 4 groupes les plus utilisés à la fois par la médecine humaine et vétérinaire.

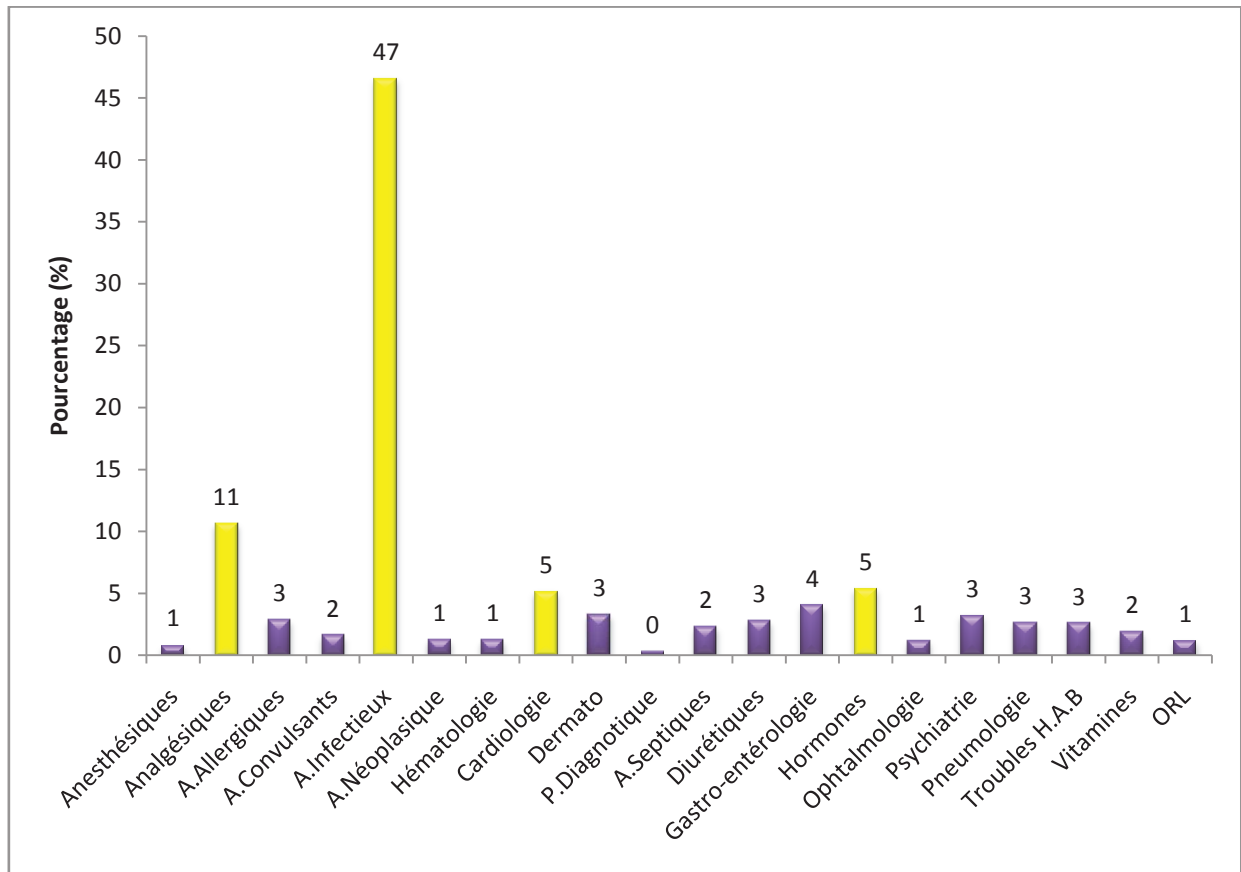


Figure 12. Les classes thérapeutiques utilisées en médecine humaine et animale.

Les Anti-infectieux sont carrément prescrits dans 1 cas / 2 par rapport à tous les autres médicaments disponibles. Les Analgésiques restent en deuxième position précédant les Hormones entre autres.

2.4. Enquête chez les citoyens :

2.4.1. Pratique de l'automédication :

Les personnes interrogées sont choisies de manière homogène selon l'âge et le sexe afin d'évaluer le phénomène d'automédication. L'étude révèle que plus des 87% des personnes interrogées ont recours à cette pratique (Figure. 13).

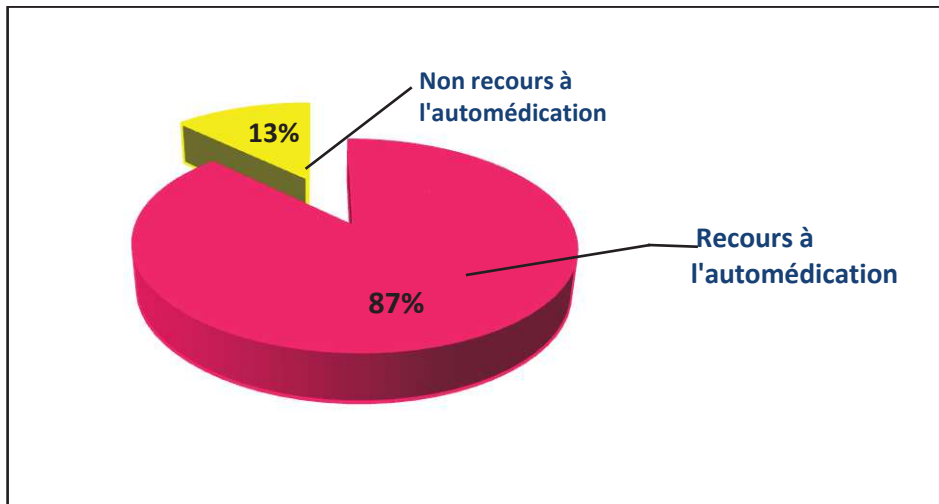


Figure 13. Pratique générale de l'automédication.

2.4.2. Automédication selon l'âge :

Les figures (14) et (15) répartissent l'automédication en fonction des âges.

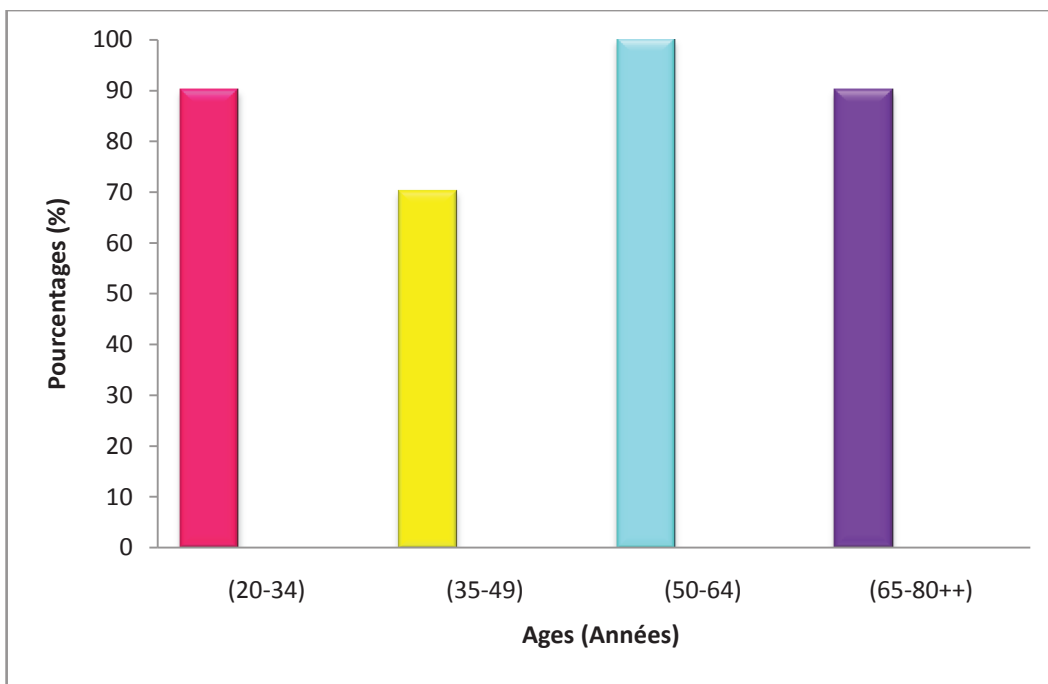


Figure 14. Répartition de l'automédication selon l'âge.

Les données obtenues montrent que la pratique est assez généralisée quelque soit l'âge des personnes interrogées. On remarque également, que la pratique d'auto-administration des médicaments semble s'affirmer et augmenter avec l'âge. Le test du χ^2 le prouve et manifeste une relation significative entre l'âge et la fréquence de l'automédication ($\chi^2 = 47,75$, $P=0,000$).

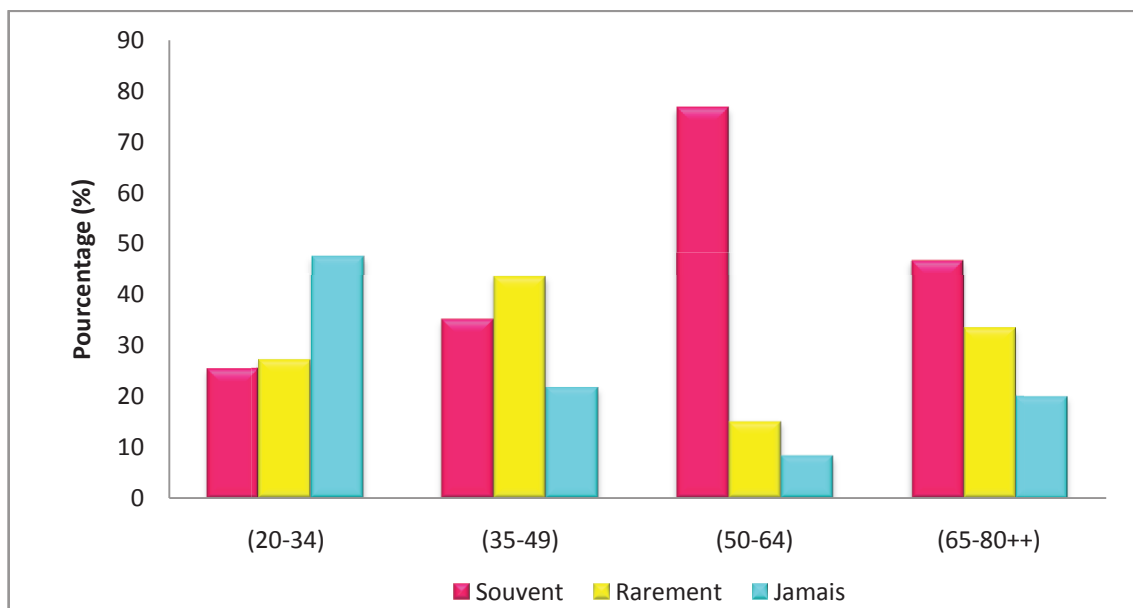


Figure 15. Fréquence de l'automédication selon l'âge.

2.4.3. Automédication selon le sexe :

Les figures (16) et (17) représentent la fréquence de pratique de l'automédication selon le sexe.

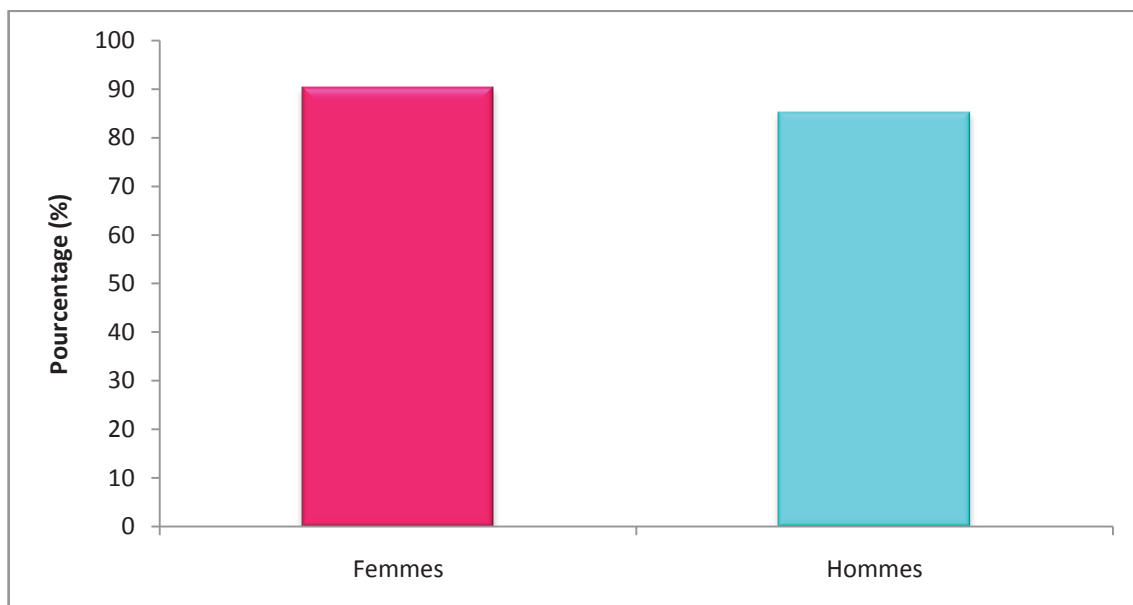


Figure 16. Répartition de l'automédication selon le sexe.

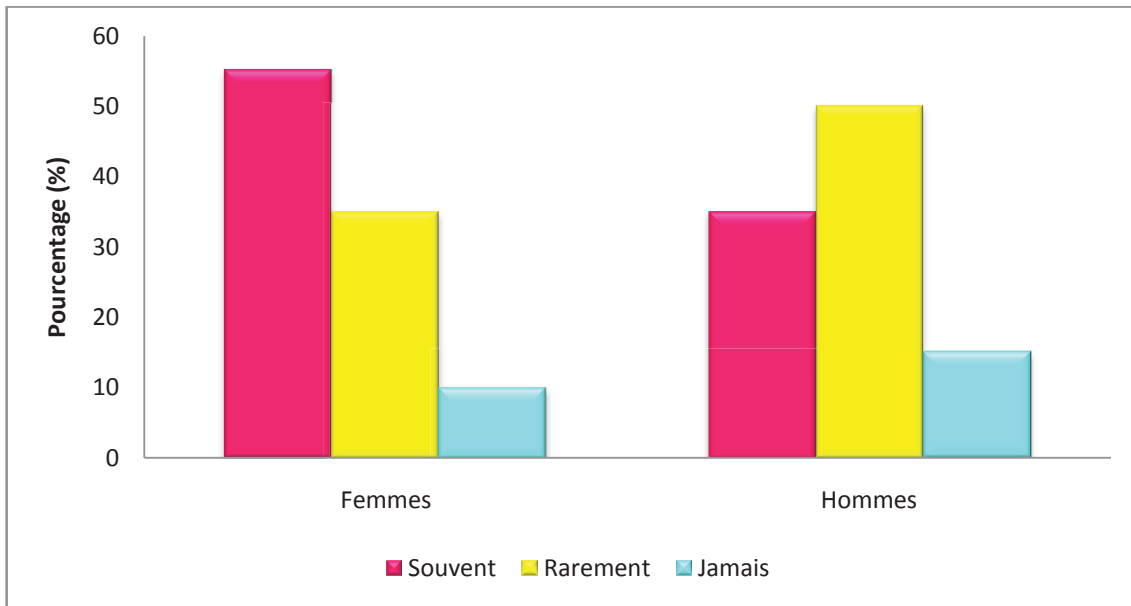


Figure 17. Fréquence de l'automédication selon le sexe.

Les résultats obtenus montrent que les femmes ont sensiblement plus tendance à se laisser aller à l'automédication, même si statistiquement, le test du χ^2 ne révèle aucune relation significative entre le sexe et l'automédication ($\chi^2 = 2,61, P > 0,05$).

2.4.4. Devenir des médicaments non utilisés :

La figure (18) nous décrit le devenir des médicaments non utilisés (MNU) dans les foyers.

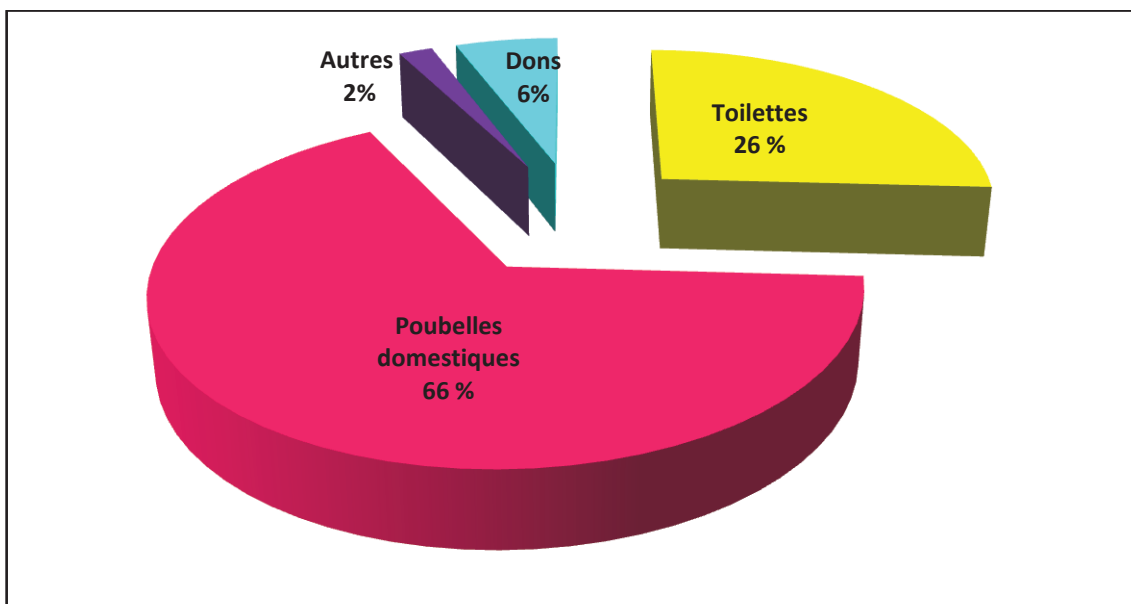


Figure 18. Devenir des médicaments non utilisés dans les foyers.

Chapitre 1 : Résultats

Plus de 2/3 des MNU finissent dans les poubelles domestiques contre près de 1/4 dans les toilettes. Le don du médicament au pharmacien reste malheureusement peu pratiqué dans notre société (6%).

2.4.5. Les pathologies les plus concernées par l'automédication :

La figure (19) décrit les maux les plus concernés par l'auto-administration des médicaments. Les maux de tête, d'estomac ou de sphère ORL (Oto-Rhino-Laryngologique) sont les maux les plus cités dans notre enquête, les médicaments associés à ces maux sont en libre accès en pharmacie.

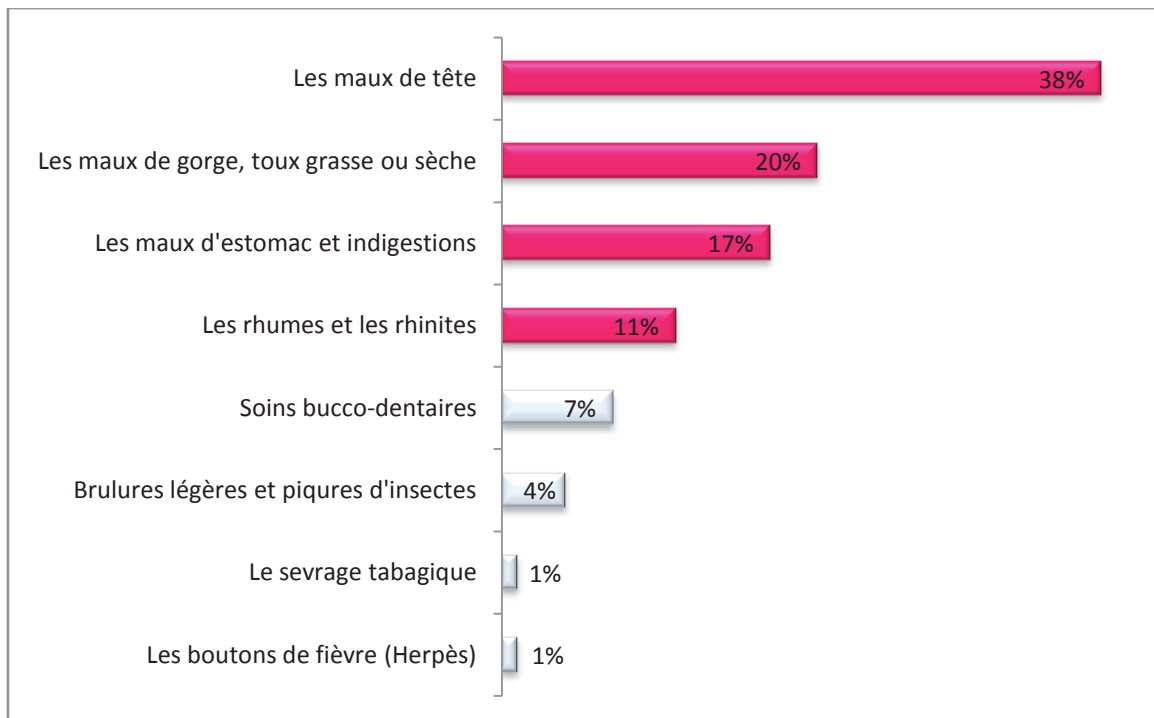


Figure 19. Les pathologies concernées par l'automédication.

2.5. Enquête chez les pharmaciens :

L'enquête sur les pharmaciens servira comme outil complémentaire aux informations récoltées chez les citoyens, en effet, elle permettra de mettre un nom sur le ou les composés pharmaceutiques achetés par le citoyen lors de son automédication.

2.5.1. Les groupes thérapeutiques concernés par l'automédication :

Le tableau (4) représente la répartition des groupes de médicaments les plus vendus en pharmacie pour l'automédication.

Tableau 4: Fréquence de vente des médicaments selon leur classe pharmaceutique.

Classes pharmaceutiques	Fréquences (%)
Anti-inflammatoires	45,44
Anti-infectieux	13,24
Antitussifs	10,2
Vitamines	6,87
Pansements gastriques	5,56
Corticoïdes	4,06
Antispasmodiques	3,02
Antiseptiques	2,31
Laxatifs	1,68

Les Anti-inflammatoires ainsi que les Anti-infectieux arrivent en tête du classement à plus de 45% et 13%.

2.5.2. Les médicaments de l'Automédication :

L'enquête révèle les médicaments inscrits dans le tableau (5) :

Tableau 5 : Répartition des médicaments sans prescription les plus concernés par l'automédication.

Les maux de tête 38%	Les maux de gorge, la toux grasse ou sèche 20%
Paracétamol Acide Acétylsalicylique Ibuprofène	Carbocisteine Alpha amylase Oxomemazine
Les maux d'estomac et problèmes de digestion 17%	les rhumes et les rhinites 11%
Omeprazol Ranitidine Trimubutine	Pseudoephedrine Phenylpronolamine+chlorphenamine Pseudoephedrine+ phenylpronolamine + Chlorphenamine

3. Discussion :

La nature active des produits pharmaceutiques présents dans l'environnement, soulève des préoccupations concernant leur potentiel impact sur les espèces non visées dans l'écosystème (Fent *et al.*, 2006 ; Ankley *et al.*, 2007).

Selon des travaux menés en Autriche, Brésil, Canada, Croatie, Angleterre, Allemagne, Grèce, Italie, Espagne, Suisse, Pays-Bas et aux Etats-Unis, plus de 80 composés pharmaceutiques et des métabolites ont été détectés dans les milieux aquatiques, en particulier dans les eaux usées, les eaux de surface, les sols agricoles ...etc. (Hereber, 2002).

L'enquête qui a été réalisée nous a apporté des informations essentielles quant aux groupes de médicaments les plus prescrits par les différents médecins et vétérinaires. En effet, les classes thérapeutiques les plus utilisées en médecine, qu'elle soit humaine ou animale, sont essentiellement les Anti-infectieux et les Antalgiques. D'ailleurs, Krifa *et al.*, (2013) observent que les Antibiotiques font partie des produits pharmaceutiques qui contaminent le plus l'environnement, en raison de leur taux élevé de consommation. Selon Blasco & Delvalls, (2008), les AINS représentent la classe de médicaments la plus vendue par rapport aux autres groupes thérapeutiques. Nos résultats sont également appuyés par le rapport de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé en France (ANSM, 2013).

Ces médicaments, après leur consommation, se retrouvent dans l'environnement via différentes voies. Beaucoup d'études à travers le monde confirment la présence de ces composants pharmaceutiques dans l'environnement. Essentiellement, le rapport de Miège *et al.*, (2009), qui apporte des conclusions quantitatives à partir de plus d'une centaine de travaux internationaux, il en ressort justement que les groupes pharmaceutiques les plus retrouvés dans l'environnement sont principalement les Hormones, les Anti-inflammatoires et les Antibiotiques. Il en est de même des travaux de Nikolaou *et al.*, (2007) qui retrouvent les ATB, les Hormones, les Stéroïdes, les AINS, les β -bloquants, et les Anti-cancers parmi les classes communes de médicaments les plus retrouvées dans les effluents de STEP.

Chapitre 1 : Discussion

L'automédication, reste une source non négligeable de présence de composants pharmaceutiques dans l'environnement. Effectivement, l'enquête nous a révélé des résultats surprenants, 87 % de la population déclare avoir recours à l'automédication, Ceci n'est pas propre qu'aux citoyens de la ville de Annaba, d'autres villes et pays présentent des chiffres similaires : 75% des citoyens en France pratiquent l'automédication (TNS Sofres, 2013), 99 % d'étudiants au Lumbubashi et 66% à Kinshassa (République démocratique du Congo) (Mbutiwi *et al.*, 2012 ; Chiribagula *et al.*, 2015), 81,8% au Soudan (Awad *et al.*,2006), 81,1% en Egypte (Sallam *et al.*,2009), 88,4% en Tanzanie (Mwambete & Andrew, 2010), 63% à Sikasso (Mali) (Konate, 2005), et même 82% à Tlemcen en Algérie (Fardeheb, 2015).

Les femmes semblent plus adeptes de cette pratique, c'est le cas à Tlemcen avec un pourcentage de 61% de femmes contre 39% d'hommes (Fardeheb, 2015), 60% de femmes au Camérout (Sekou, 2011), 79% en France (TNS Sofres, 2013), et 71% en Ile de Réunion Pignorel, (2014), Pouillard, (2001) dans son rapport d'ailleurs, observe que l'automédication est proportionnellement plus importante chez la clientèle féminine.

En ce qui concerne la tranche d'âge, notre étude montre que les personnes âgées entre 50 et 64 ans constituent la classe d'âge qui a le plus recours à l'automédication (100%), devant celle âgée de 35-49 ans (70%). Pouillard, (2001) de son coté, affirme que l'automédication augmente chez les adultes de 40-79 ans et diminue à partir de 80 ans, contrairement à TNS Sofres, (2013) qui trouve que cette pratique est plutôt généralisée chez les 25-34 ans, Pignorel, (2014) constate également que 46% des adeptes de l'automédication ont entre 20 et 39 ans, et 38% entre 40 et 59 ans, des conclusions similaires sont retrouvées dans les travaux de Fardeheb, (2015).

Notre enquête montre également que les médicaments les plus concernés par l'automédication sont associés aux maux de tête, ils appartiennent aux classes thérapeutiques des Antalgiques. En concordance avec des études effectuées en Ethiopie (Abay & Amelo, 2010) et au Brésil (López *et al.*, 2009). Les travaux de Fardeheb, (2015) le confirment également. L'AFIPA, (2015) à son tour classe les médicaments de l'automédication ainsi : les médicaments des voies respiratoires, les Antalgiques et les voies

Chapitre 1 : Discussion

digestives. En pays d'Afrique, les mêmes groupes thérapeutiques sont retrouvés, néanmoins, un autre groupe rentre dans le classement, il s'agit des Antipaludiques en raison de la présence de la Malaria (Paludisme) dans ces pays (Chiribagula *et al.*, 2015 ; Mbutiwi *et al.*, 2012 ; Sekou, 1999).

Nous nous sommes également intéressés au sort des MNU, leur accumulation est principalement liée à une amélioration de l'état de santé du patient avant même la consommation complète des médicaments achetés, aux conditions de vente (quantités excessives), au dépassement de la date de péremption du médicament, aux changements de traitements ou bien, à la mort du patient (Ekedahl, 2006 ; Braund *et al.*, 2009).

Une pratique relativement intéressante s'est révélée dans notre enquête, elle consiste en la manière dont les citoyens se débarrassent de leurs médicaments non consommés ou périmés, 2/3 de ces médicaments se retrouvent jetés dans les poubelles domestiques, contre 1/4 dans les toilettes.

Selon une étude réalisée au Royaume Uni, environ 50% des médicaments achetés seulement sont consommés, le reste deviendra des MNU. Selon cette même étude, l'élimination des MNU est effectuée dans 63% des cas via les ordures ménagères, et 11,5% dans les toilettes, tandis qu'environ 22% sont remis à la pharmacie (Bound & Voulvoulis, 2005). En Allemagne, 60 à 80% de MNU sont jetés soit dans les toilettes soit avec les ordures ménagères (Scheytt *et al.*, 2006). Le passage donc de ces composés pharmaceutiques dans les sols et vers les milieux aquatiques par leur lessivage, représente une voie non négligeable de contamination de l'environnement.

Chapitre 2 :

**Tests de toxicité des médicaments vis-à-vis
des Paramécies.**

Chapitre 2 : Tests de toxicité des médicaments vis-à-vis des Paramécies.

1. Matériel et Méthodes :

1.1. Matériel biologique :

1.1.1. Présentation des Paramécies :

Le zooplancton d'eau douce est principalement composé de ciliés, rotifères et autres. Ils sont largement utilisés comme indicateurs de stress dans les milieux aquatiques (Sarma & Nandini, 2006). Et comme ils sont numériquement plus abondants (Snell & Joaquim-Justo, 2007), ils constituent donc un groupe planctonique très important (Fenchel, 2008). Leur morphologie est extrêmement diversifiée englobant une multitude de formes et de tailles. Parmi eux, les Paramécies (Buchsbaum *et al.*, 1987), elles représentent un maillon essentiel du réseau trophique (Lynn, 2008). Elles font également partie des modèles unicellulaires de protozoaires les plus fréquemment utilisés dans la biologie cellulaire et moléculaire (Simon & Plattner, 2014). Elles ont longtemps été utilisées comme un organisme modèle pour la recherche phylogénétique biochimique, génétique et moléculaire (Greczek-Stachura *et al.*, 2012).

Elles sont de forme sphérique ou ovoïdale, de longueur de 250 μm (Figure. 20). Le corps entier est couvert de cils, avec lesquels ils peuvent nager d'avant en arrière et se tourner. Ces cils forment un appareil sensoriel capable de détecter la température, la lumière, et une variété d'attraction et de répulsion des substances chimiques. Les membranes excitables et les réponses comportementales prévisibles font des Paramécies un modèle très approprié en toxicologie (Hinrichsen & Schultz, 1988).

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

La position systématique des Paramécies selon Corliss *et al.*, (1961) est la suivante :

Super règne : Eukaryotae.

Phylum : Protista.

Classe : Ciliophora.

Sous Classe : Oligohymenophorea.

Ordre : Peniculia.

Sous Ordre : Urocentrida.

Famille : Paramecina.

Genre : *Paramecium*.

Espèce : *sp.*

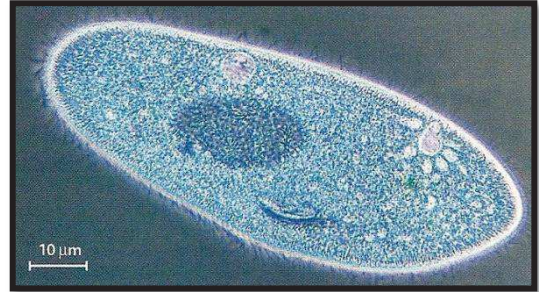


Figure 20. *Paramecium sp.*

1.1.2. Culture des Paramécies :

Lors d'une culture de Paramécies, le nombre de cellules augmente de manière exponentielle pendant quelques jours, cette poussée est suivie par une courte phase en plateau dite stationnaire, où la densité d'individus semble constante (Mikami & Koizumi, 1977 ; Fok & Paeste, 1982). Durant cette croissance, l'activité et la production cellulaires sont influencées par l'environnement de la cellule et la concentration des nutriments (Prescot, 1957).

Les Paramécies sont cultivées dans un milieu constitué d'une macération et d'une infusion de fibres végétales (Foin et/ou laitue déshydratée), le milieu est enrichi de *Saccharomyces cerevisiae* afin d'encourager la croissance cellulaire, elles sont incubées à 27 ± 3 °C à l'abri de la lumière.

Dans le but de maintenir et de multiplier les cultures cellulaires, il est nécessaire de procéder à des repiquages périodiques à partir de la culture mère en période de phase exponentielle, leur donnant ainsi un maximum de chances de survie et de multiplication.

1.2. Matériels chimiques :

1.2.1. Diclofénac :

Le Diclofénac appartient à la grande classe des Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS). Ils ont pour rôle essentiel l'inhibition des enzymes Cyclo-Oxygénases, responsables de la biosynthèse des Prostaglandines à partir des Acides Gras (Fent *et al.*, 2006). Ces dernières ont des rôles importants dans différents processus physiologiques tels que l'inflammation, la douleur, la coagulation, la protection de la muqueuse gastrique et la régulation de la circulation sanguine dans les reins (Roberts & Morrow, 2001). Donc, Un grand nombre d'effets secondaires à long terme des AINS sont donc liés aux fonctions physiologiques des prostaglandines (Fent *et al.*, 2006).

Pour des raisons d'hydro-solubilité, nous avons travaillé avec le Diclofénac Sodique, il est sous forme de poudre blanche faiblement jaunâtre, en plus de l'eau, il est assez soluble dans le méthanol et l'alcool, il est peu soluble dans l'acétone (Pharmacopée Européenne, 2004) (Figure. 21).

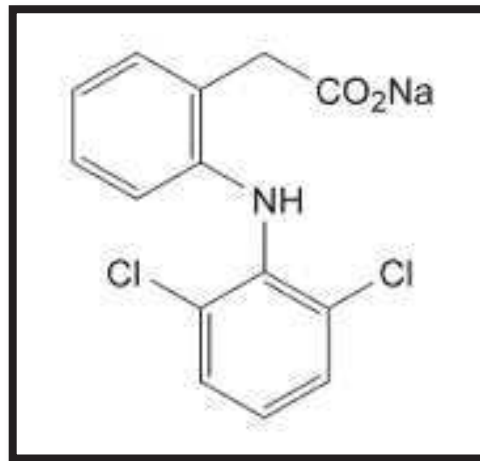


Figure 21. Structure chimique du Diclofénac sodique (Pharmacopée Européenne, 2004).

1.2.2. Aténolol :

Il fait partie des médicaments cardiovasculaires, plus précisément la catégorie des β -bloquants. Ce sont des médicaments qui agissent sur les vaisseaux sanguins, ce qui empêche la vasodilatation et la réduction de la vitesse et de la force des contractions cardiaques. Ces substances bloquent la stimulation des récepteurs β -adrénergiques de la

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Noradrénaline dans le système nerveux sympathique, d'où l'abaissement de la pression artérielle et la fréquence cardiaque (Giri & Pal, 2014 ; Morley, 2009).

L'Aténolol se présente sous la forme de poudre blanche assez soluble dans l'eau et l'éthanol et peu soluble dans le chlorure de méthylène (Pharmacopée Européenne, 2004) (Figure. 22).

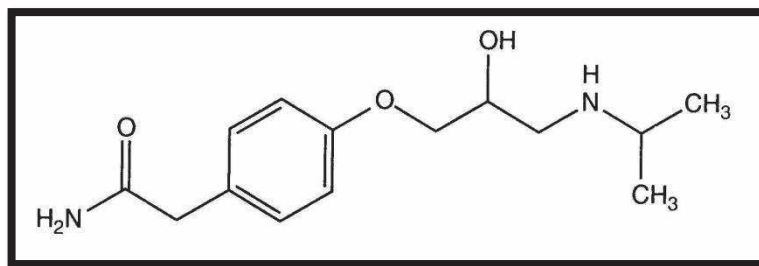


Figure 22. Structure chimique de l'Aténolol (Pharmacopée Européenne, 2004).

1.2.3. Erythromycine :

Ce sont des substances chimiques qui tuent ou inhibent la croissance de micro-organismes, à savoir les bactéries, les virus, les champignons et les parasites (Flynn, 2014). Les ATB peuvent être des produits naturels, fongiques, des métabolites bactériens originels ou secondaires, des dérivés semi-synthétiques de produits naturels ou entièrement synthétiques. Il y'a actuellement environ 250 Antibiotiques différents enregistrés pour une utilisation en médecine humaine et vétérinaire (Kümmerer, 2009). Ils peuvent être regroupés selon leur structure chimique ou leur mode d'action. Ils peuvent être divisés en différents sous-groupes tels que les β -Lactamines, les Macrolides, les Sulfamides et autres (Aronson, 2001).

L'Erythromycine fait partie des Macrolides, sous forme de poudre ou cristaux blancs faiblement jaunâtres, peu soluble dans l'eau mais facilement soluble dans l'alcool ou dans le méthanol (Pharmacopée Européenne, 2004) (Figure. 23).

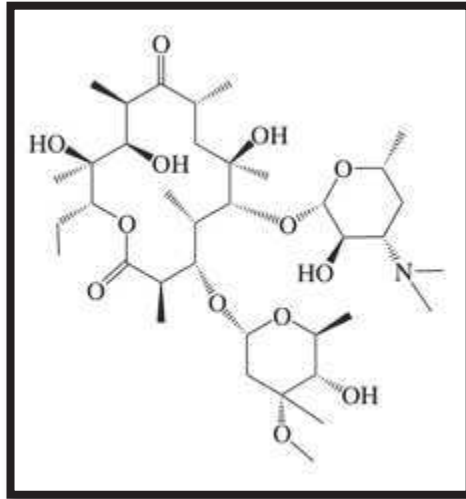


Figure 23. Structure chimique de l'Erythromycine (Pharmacopée Européenne, 2004).

1.2.4. Lévonorgestrel :

Les Hormones sexuelles sont une classe de médicaments utilisés à la fois en médecine humaine et vétérinaire. Utilisées pour contrôler et traiter les troubles et les fonctions sexuels (Morley, 2009). Elles se répartissent en trois groupes distincts : Œstrogènes, Progestatifs et Androgènes.

Le Lévonorgestrel est un Progestatif de synthèse, souvent utilisé comme contraceptif féminin, il est sous forme de poudre cristalline sensiblement blanche. Insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool mais assez soluble dans le chlorure de méthylène (Pharmacopée Européenne, 2004) (Figure. 24).

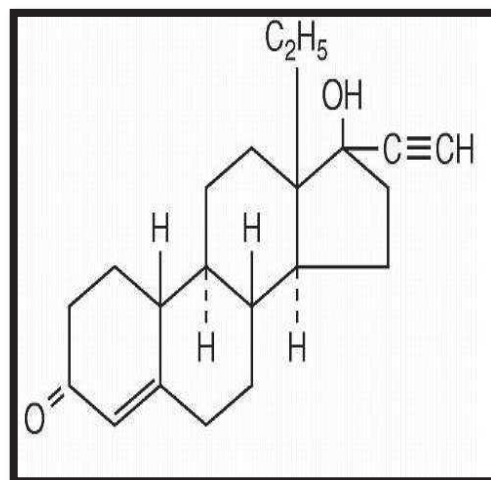


Figure 24. Structure chimique du Lévonorgestrel (Pharmacopée Européenne, 2004).

1.3. Tests toxicologiques :

1.3.1. Cinétique de croissance :

De nombreuses études se concentrent sur les perturbations du taux de croissance des populations de zooplancton, un excellent moyen d'interprétation des réponses du zooplancton face au stress environnemental (Forbes & Calow, 1999 ; Roex *et al.*, 2000 ; Sarma & Nandini, 2006).

Les Paramécies sont alors exposées à des concentrations croissantes de chaque xénobiotique (1, 10, 10², 10³, 10⁴ et 10⁵ µg/L). L'exposition se fait de deux manières :

- En début de phase de croissance ou de cycle cellulaire.
- En pleine phase exponentielle.

La cinétique de croissance est mesurée par comptage sous microscope optique (Leïca DL) au grossissement (x10) à l'aide d'un compteur manuel toutes les 24h après fixation au Lugol, la lecture est effectuée au minimum à 3 reprises (Prescott, 1957).

1.3.2. Pourcentage de réponse :

Le traitement terminé, nous procédons au calcul du pourcentage de réponse des Paramécies face aux différents xénobiotiques testés. Il est obtenu par la formule de Wong *et al.*, (1999):

$$\text{Pourcentage de réponse} = [(N_C - N_E) / N_C] \times 100$$

N_C : Nombre de cellules témoins.

N_E : Nombre final de cellules traitées.

Les valeurs positives du pourcentage de réponse indiquent une inhibition de la croissance tandis que les valeurs négatives indiquent une stimulation de la croissance (Wong *et al.*, 1999).

1.3.3. Métabolisme respiratoire :

Après traitement des Paramécies à différentes concentrations des différents xénobiotiques (1, 10, 100 et 500 µg/L), la mesure de l'oxygène consommé dans le milieu se fait au début du cycle cellulaire jusqu'en phase exponentielle (0, 2, 4, 24 et 48h). La mesure est réalisée grâce à une électrode à Oxygène Hansatech à l'échelle du Nmole d'oxygène/ml de milieu pendant plusieurs minutes (Djebar & Djebar, 2000). Nous avons mesuré par la suite, la différence de quantité d'oxygène consommée durant ces quelques minutes de lecture:

$$\text{Différence de quantité d'O}_2 \text{ consommée (Nmole/ml)} = \text{Quantité d'O}_2 t_0 - \text{Quantité d'O}_2 t$$

t_0 : Quantité d'O₂ en début de lecture.

t : Quantité d'O₂ en fin de lecture.

1.3.4. Dosage des biomarqueurs :

Evaluation de l'activité de la Glutathion S-transférase (GST) :

La mesure de l'activité de la GST se fait selon la méthode de Habig *et al.*, (1974), elle consiste en la réaction de l'enzyme GST avec un substrat : le Chlorodinitrobenzène (CDNB), avec l'aide d'un cofacteur le GSH. Pour cela, on effectue un broyage dans 1ml de tampon phosphate (0,1 M, pH= 6), suivi d'une centrifugation à 14000 trs/min pendant 30 minutes. Pour la lecture au spectrophotomètre (JENWAY 6300): 200 µl de surnageant + 1,2 ml du mélange de CDNB (1 mM) et GSH (5 mM). La lecture s'effectue toutes les minutes pendant 5 minutes.

$$\text{GST } (\mu\text{Mol/min/mg de protéines}) = \frac{\Delta \text{DO} \times V_t}{9,6 \times d \times V_s \times \text{mg de protéines}}$$

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

ΔDO : Densité optique.

V_t : Volume total de la cuve.

9,6 : Coefficient d'extinction moléculaire du CDNB= (m/M.cm).

d : Epaisseur de la cuve = 1cm.

V_s : Volume du surnageant en ml.

mg de protéines : Quantité des protéines exprimée en mg.

Evaluation du taux de Glutathion (GSH) :

Le taux de glutathion réduit est estimé selon la méthode de Weckbercker & Cory, (1988), il est basé sur l'absorbance de l'acide 2-nitro-5 mercapturique résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2 nitrobenzoïque (DTNB) par le groupement thiol (-SH) du glutathion. Les échantillons sont homogénéisés pendant quelques secondes dans une solution d'EDTA (0,02 M, pH 9,6). L'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'Acide Sulfosalicylique (ASS à 0,25%) (0,2 ml d'ASS sont ajoutés à 0,8 ml d'homogénat). Après un séjour de 15 min au bain de glace, une centrifugation à 1000 trs/min est effectuée pendant 5 minutes. Le surnageant est utilisé comme source d'enzyme (500 μ l de surnageant + 1ml de tampon Tris/EDTA (0,02 M; pH 9,6) + 0,02ml de DTNB). La lecture des absorbances est réalisée après un temps de repos de 5 minutes à 412 nm avec un spectrophotomètre (JENWAY 6300).

Le taux de GSH s'obtient par la formule suivante :

$$\text{GSH } (\mu\text{Mol/mg de protéines}) = \frac{\Delta DO \times V_d \times V_t}{13,1 \times V_h \times V_s \times \text{mg de protéines}}$$

ΔDO : Densité optique.

V_d : Volume entier des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0,8 ml homogénat + 0,2 ml ASS).

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Vt : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH (0,5 ml surnageant + 1 ml Tris-EDTA + 0,025 ml DTNB).

13,1 : Coefficient d'extinction molaire (concernant le groupement –SH du GSH à 412 nm).

Vh : Volume de l'homogénat utilisé en ml.

Vs : Volume du surnageant utilisé en ml.

mg de protéines : Quantité des protéines exprimée en mg.

Evaluation du taux de Malondialdéhyde (MDA) :

Le dosage du MDA est réalisé en suivant la méthode de Draper & Hadley, (1990), il repose sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'Acide Thiobarbiturique (TBA) et le Malondialdéhyde (MDA), la densité d'absorption du produit de la réaction (couleur rouge brune) est mesurée grâce au spectrophotomètre (JENWAY 6300) à une longueur d'onde de 532 nm.

$$\text{MDA } (\mu\text{Mol/mg de protéines}) = \frac{\text{DO} \times \text{Vt}}{156 \times \text{Vs} \times \text{mg de protéines}}$$

DO : Densité optique.

156 : Coefficient d'extinction molaire du TBA.

Vt : Volume total dans la cuve.

Vs : Volume du surnageant utilisé dans le dosage : 0,5 ml.

Dosage des protéines totales :

La quantification des protéines a été faite selon Bradford, (1976), sur la base d'une réaction colorimétrique entre une fraction aliquote de 0,1 ml de l'homogénat et le réactif au BBC (Bleu Brillant de Coomassie + Acide Orthophosphorique (85%) + Eau distillée). Après une centrifugation de 10000 trs/min pendant 20 minutes, les absorbances ont été lues à une longueur d'onde de 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY 6300).

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

L'albumine de sérum de bœuf (BSA) a été utilisée comme standard pour la gamme d'étalonnage.

1.4. Analyses statistiques :

Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du Logiciel du Minitab (version 16). Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-types. Des équations de régression linéaire ont été déterminées pour les différents dosages dans les différents échantillons.

Les résultats obtenus sont comparés avec des tests paramétriques (ANOVA) et non-paramétriques (Kruskal Wallis), adaptés en fonction de la Normalité des valeurs.

2. Résultats :

Dans cette partie, nous présentons les résultats obtenus concernant l'impact de certains médicaments chez les Paramécies. D'abord, nous commençons par examiner leurs effets sur la cinétique de croissance, ensuite, nous nous intéressons aux effets sur le métabolisme respiratoire, et le suivi de certains biomarqueurs (enzymatiques ou non) susceptibles de nous indiquer un éventuel stress radicalaire/ oxydatif.

2.1. Effets des produits pharmaceutiques sur la cinétique de croissance et le pourcentage de réponse des Paramécies:

Nos essais sont effectués en début de cycle de croissance (DC), puis en pleine phase exponentielle (PE).

2.1.1. Cas du Diclofénac :

Les figures 25 et 26 illustrent l'effet du Diclofénac sur la cinétique de croissance des Paramécies.

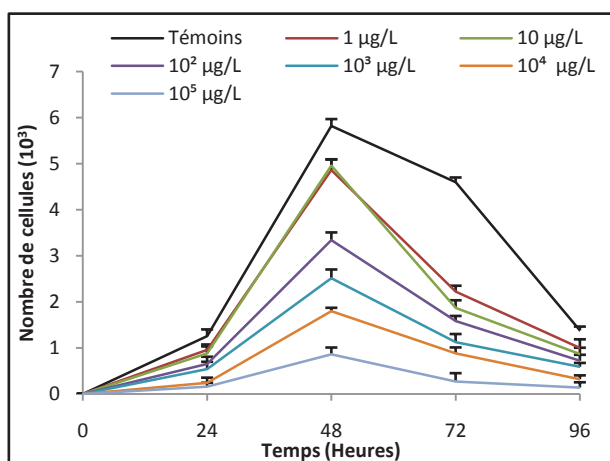


Figure 25. Effet du Diclofénac sur la croissance de *Paramecium sp* (Début de croissance DC).

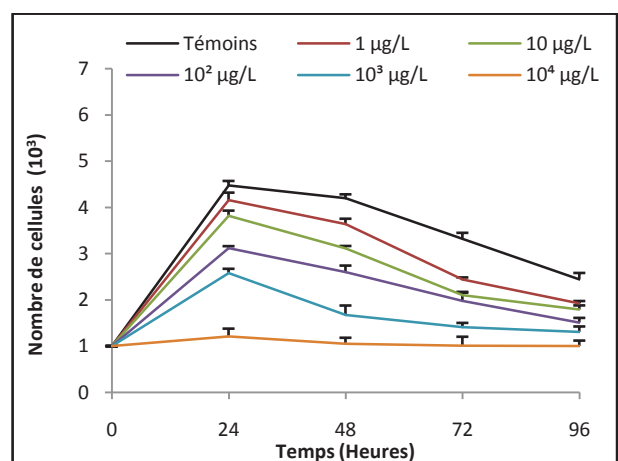


Figure 26. Effet du Diclofénac sur la croissance de *Paramecium sp* (Phase exponentielle PE).

Chapitre 2 : Résultats

Nous constatons que le traitement avec des concentrations croissantes du xénobiotique présente un effet marquant sur la croissance des *Paramécies*. Ainsi, l'analyse de la variance nous indique un effet hautement significatif ($P \leq 0,01$) du Diclofénac à toutes les concentrations testées, avec un effet temps très hautement significatif ($P \leq 0,001$).

Lors de la phase (DC), le traitement au Diclofénac à 1 $\mu\text{g/L}$, provoque une faible inhibition du nombre de cellules d'environ 16% à 48h, l'augmentation de la concentration du Diclofénac a tendance à inhiber la croissance cellulaire de manière dose dépendante, ainsi, on note à 48h et à 10^3 et 10^4 $\mu\text{g/L}$ une très forte inhibition de la croissance cellulaire et ce, proportionnellement à la concentration utilisée.

En phase dite exponentielle, le traitement par le Diclofénac provoque ainsi une forte inhibition dose dépendante de la croissance cellulaire. Nous observons par contre que le traitement par le Diclofénac en phase (DC) provoque un pic pour toutes les concentrations utilisées à 48h, ce qui n'est pas toujours le cas pour le traitement en (PE) où le pic est enregistré avant, c'est-à-dire à 24h.

En conclusion, quelque soit la phase de traitement, le Diclofénac a un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire des *Paramécies*, et ce, de manière dose dépendante.

Les figures 27 et 28 représentent les effets du traitement par le Diclofénac sur le Pourcentage de réponse de *Paramecium sp* à 96h durant les deux phases d'expérimentation.

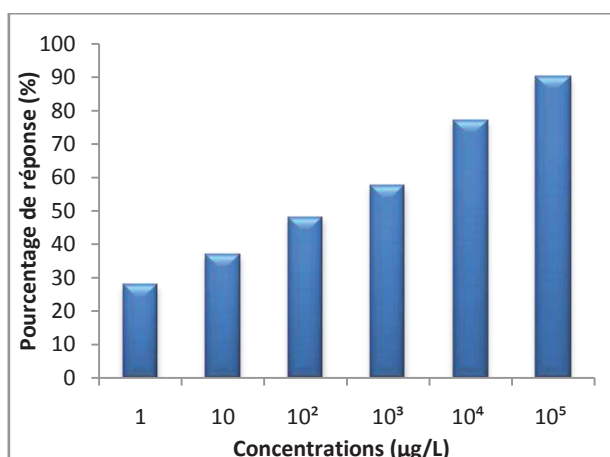


Figure 27. Pourcentage de réponse à 96h de *Paramecium sp* traités au Diclofénac (Début de croissance DC).

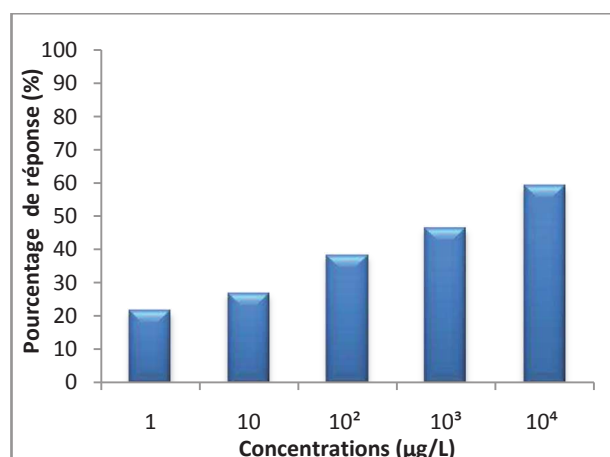


Figure 28. Pourcentage de réponse à 96h de *Paramecium sp* traités au Diclofénac (Phase exponentielle PE).

Chapitre 2 : Résultats

Les résultats confirment le ralentissement progressif de la croissance avec toutes les concentrations testées. Par ailleurs, nous remarquons que le seuil de tolérance des Paramécies n'est pas le même en fonction du mode de traitement appliqué. En effet, chez les cellules traitées à la plus haute concentration ($10^5 \mu\text{g/L}$) de Diclofénac en (DC), on observe une croissance cellulaire, malgré un ralentissement de 90%, alors qu'une mortalité immédiate est constatée à la même concentration lors du traitement en (PE).

2.1.2. Cas de l'Aténolol :

Les figures 29 et 30 indiquent l'effet des concentrations croissantes d'Aténolol sur la croissance des Paramécies.

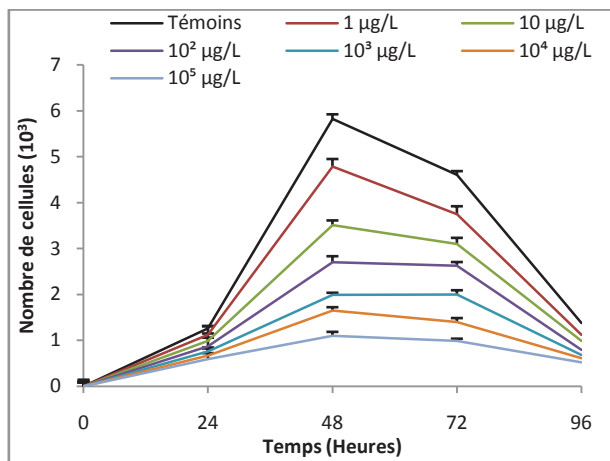


Figure 29. Effet de l'Aténolol sur la croissance de *Paramecium sp* (Début de croissance DC).

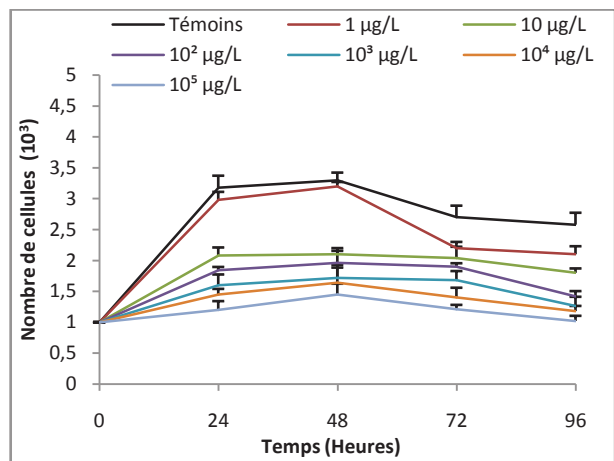


Figure 30. Effet de l'Aténolol sur la croissance de *Paramecium sp* (Phase exponentielle PE).

Les résultats indiquent un impact du traitement à l'Aténolol hautement significatif sur la multiplication cellulaire. Nous constatons également un effet temps très hautement significatif ($P=0,000$).

Lors de la phase (DC), le traitement à l'Aténolol à $1 \mu\text{g/L}$, provoque une inhibition du nombre de cellules d'environ 18% à 48h, cette inhibition augmente en fonction des concentrations croissantes, pour atteindre 80% à 48h avec la plus forte concentration ($10^5 \mu\text{g/L}$).

En phase exponentielle (PE), le traitement par l'Aténolol provoque aussi une forte inhibition, particulièrement à partir de la concentration $10 \mu\text{g/L}$. la plus faible concentration quant à elle ($1 \mu\text{g/L}$), n'a de réelles conséquences qu'à partir de 72h de traitement.

Chapitre 2 : Résultats

De manière générale, l'Aténolol possède un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire des Paramécies.

Les figures 31 et 32, traitent de l'évolution du pourcentage de réponse des Paramécies à 96h suite au traitement à l'Aténolol.

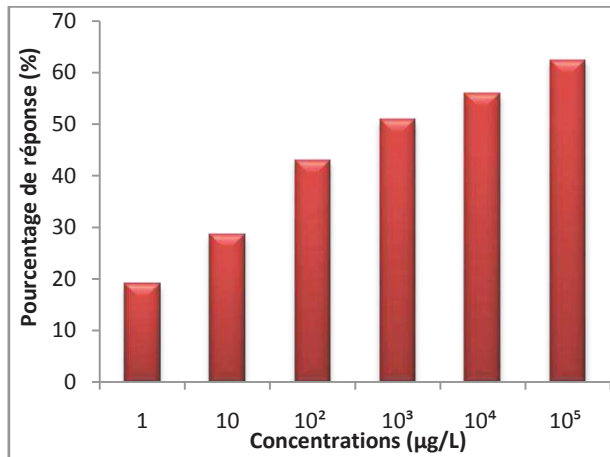


Figure 31. Pourcentage de réponse à 96h de *Paramecium sp* traités à l'Aténolol (Début de croissance DC).

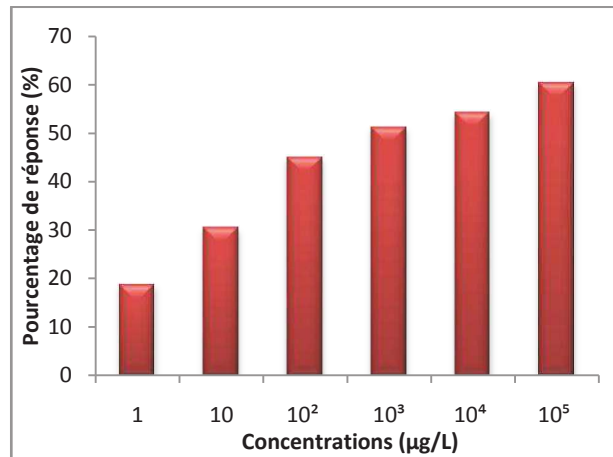


Figure 32. Pourcentage de réponse à 96h de *Paramecium sp* à traités à l'Aténolol (Phase exponentielle PE).

Ainsi, nos résultats démontrent le ralentissement de la croissance positivement corrélé aux concentrations croissantes. On note par ailleurs, que les taux d'abattement à 96h pour les deux modes de traitement sont quasiment similaires.

2.1.3. Cas de l'Erythromycine :

La cinétique de croissance des Paramécies traitées à l'Erythromycine est représentée par les figures 33 et 34.

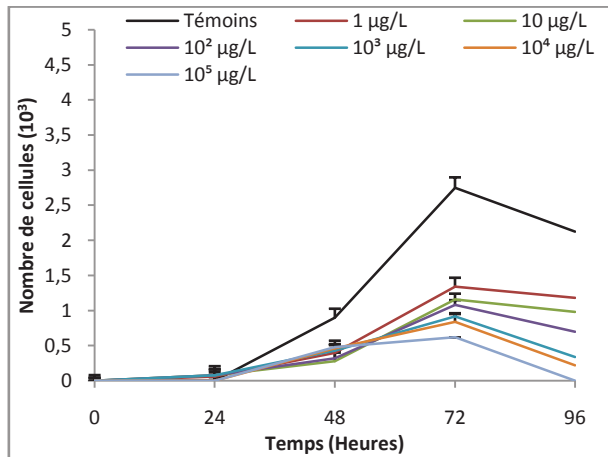


Figure 33. Effet de l'Erythromycine sur la croissance de *Paramecium sp* (Début de croissance DC).

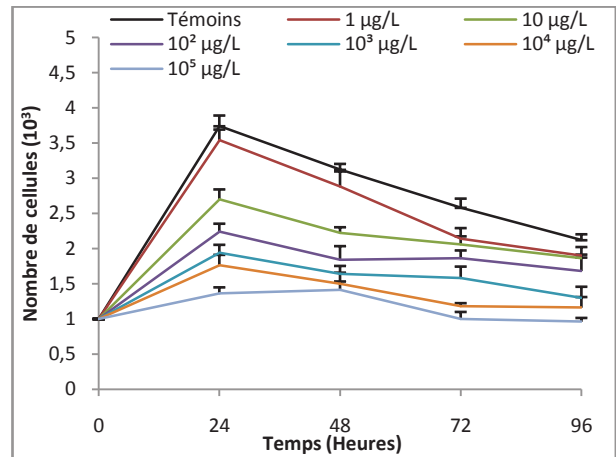


Figure 34. Effet de l'Erythromycine sur la croissance de *Paramecium sp* (Phase exponentielle PE).

Nous constatons une diminution hautement significative de la croissance lors du traitement à l'Erythromycine en (DC) ($P \leq 0,01$), et significative en (PE) ($P \leq 0,05$).

Le traitement en (DC) à l'Erythromycine entraîne une forte diminution de la multiplication cellulaire. En effet, le traitement à la plus faible concentration (1 µg/L) induit jusqu'à plus de 50% d'inhibition après 72h de traitement par rapport aux témoins. On note par ailleurs, une mort cellulaire à 100% avec la plus forte concentration (10⁵ µg/L) à 96h, une mortalité non constatée lors du traitement en (PE) quelque soit la concentration testée.

On remarque également en phase exponentielle, que le traitement à l'Erythromycine provoque une inhibition dose dépendante de la croissance cellulaire. Nous observons également que ce mode de traitement provoque un pic pour toutes les concentrations utilisées à 24h, contrairement au traitement en (DC) où ce pic est observé à 72h.

Pour conclure, on peut dire que l'Erythromycine possède un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire des Paramécies, particulièrement lors du traitement en (DC).

Les figures 35 et 36, illustrent les pourcentages de réponses de 96h des Paramécies suite au traitement à l'Erythromycine.

Chapitre 2 : Résultats

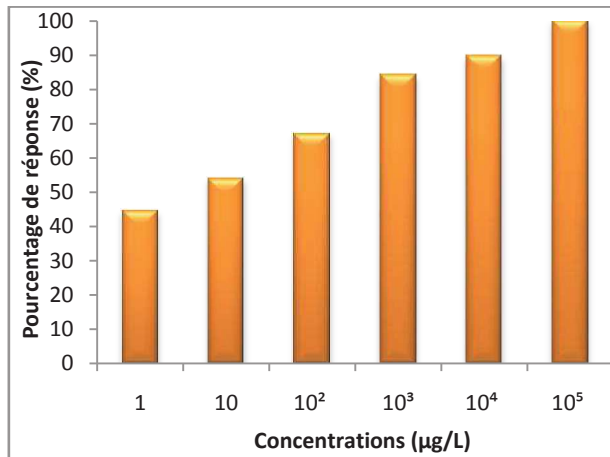


Figure 35. Pourcentage de réponse à 96h de *Paramecium sp* traités à l'Erythromycine (Début de croissance DC).

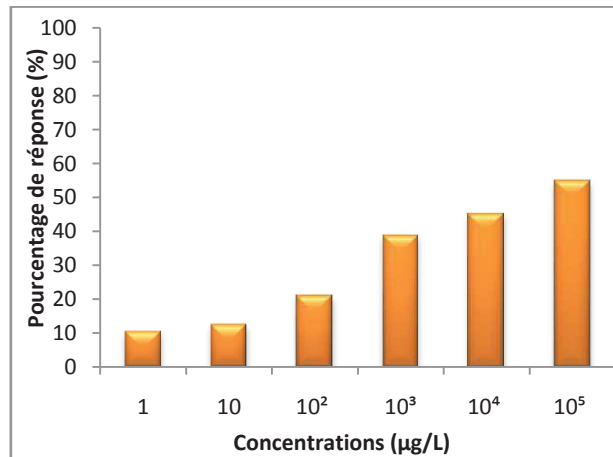


Figure 36. Pourcentage de réponse à 96h de *Paramecium sp* traités à l'Erythromycine (Phase exponentielle PE).

Les résultats obtenues, confirment le ralentissement de la croissance cellulaire en fonction des concentrations testées quelque soit le mode de traitement.

Une mortalité à 96h de 100% à la plus forte concentration (10⁵ µg/L) lors du traitement en (DC) témoigne de la vulnérabilité des Paramécies par rapport au traitement en (PE).

2.1.4. Cas Lévonorgestrel :

La cinétique de croissance des Paramécies traitées au Lévonorgestrel est représentée dans les figures 37 et 38.

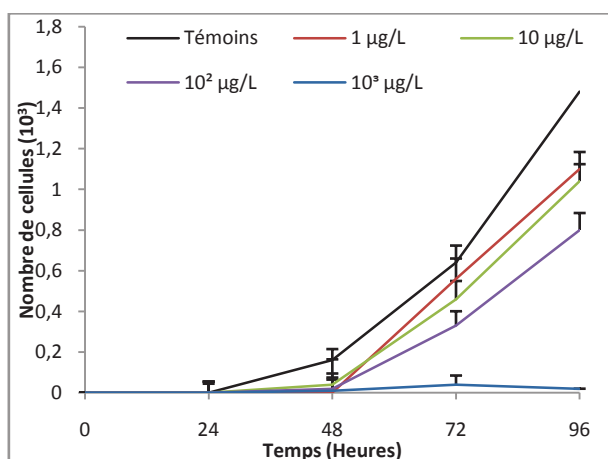


Figure 37. Effet du Lévonorgestrel sur la croissance de *Paramecium sp* (Début de croissance DC).

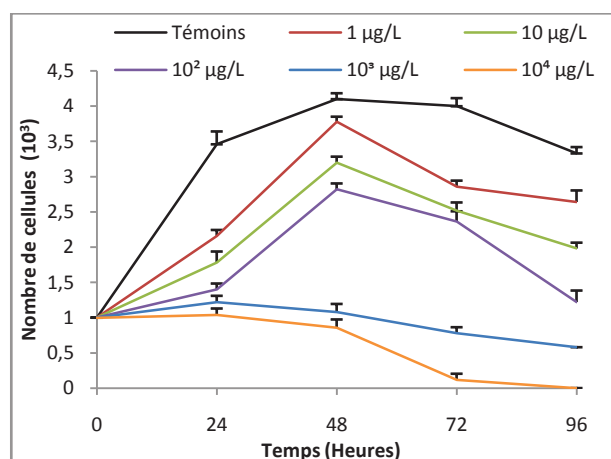


Figure 38. Effet du Lévonorgestrel sur la croissance de *Paramecium sp* (Phase exponentielle PE).

Chapitre 2 : Résultats

Les résultats montrent que le traitement au Lévonorgestrel sur la croissance cellulaire a un effet inhibiteur hautement significatif sur les Paramécies quelque soit le mode de traitement appliqué ($P \leq 0,01$). Dans les deux cas, nous observons également un effet temps dépendant très hautement significatif ($P= 0,001$).

Lors de la phase (DC), le traitement au Lévonorgestrel induit une inhibition de la croissance cellulaire positivement proportionnelle aux concentrations qui augmentent, on note d'ailleurs, que la concentration de $10^3 \mu\text{g/L}$, provoque une très forte inhibition voire la mortalité cellulaire à 96h. Le traitement au Lévonorgestrel en (PE) provoque également une forte inhibition dose dépendante de la croissance cellulaire, les concentrations 10^3 et $10^4 \mu\text{g/L}$ ralentissent particulièrement cette croissance jusqu'à atteindre la mortalité totale à la plus forte concentration. Par comparaison, on est ainsi forcé de constater la vulnérabilité des Paramécies vis-à-vis du Lévonorgestrel en (DC) par rapport à (PE). Pour finir, le Lévonorgestrel ralentit sérieusement la croissance cellulaire des Paramécies de manière dose dépendante.

Les Figures 39 et 40, illustrent l'évolution des pourcentages de réponse des Paramécies traitées au Lévonorgestrel à 96h.

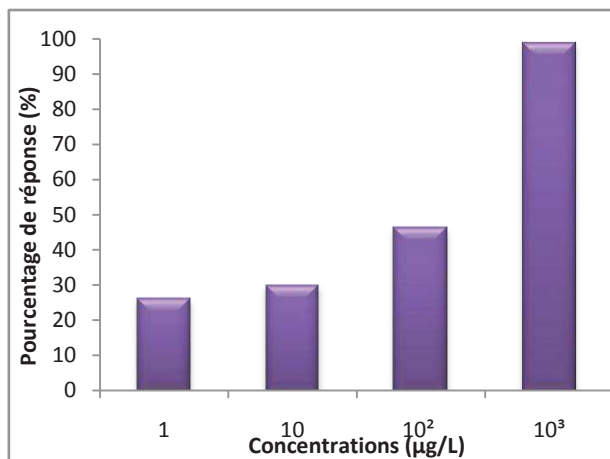


Figure 39. Pourcentage de réponse à 96h de *Paramecium sp* traités au Lévonorgestrel (Début de croissance DC).

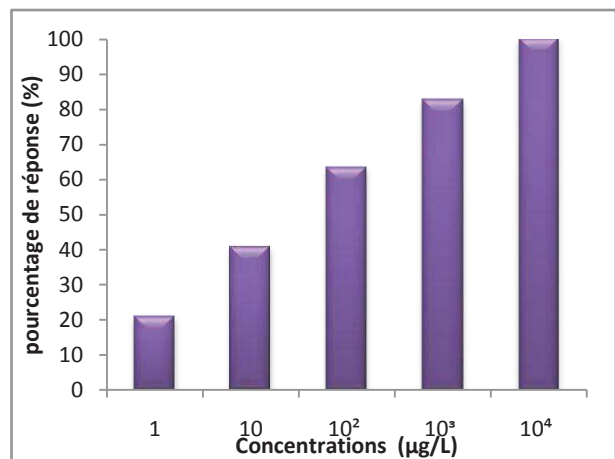


Figure 40. Pourcentage de réponse à 96h de *Paramecium sp* traités au Lévonorgestrel (Phase exponentielle PE).

Ainsi, les résultats confirment le ralentissement de la croissance des Paramécies traitées au Lévonorgestrel, on observe également le seuil de tolérance supérieur des Paramécies

Chapitre 2 : Résultats

lorsqu'elles sont traitées en (PE). En effet, la mortalité à 100% est atteinte à 10^4 $\mu\text{g/L}$ contre 10^3 $\mu\text{g/L}$ pour le traitement en (DC).

2.2. Effets des produits pharmaceutiques sur le métabolisme respiratoire des Paramécies:

Les Paramécies ont été exposées à différentes concentrations de médicaments au début du cycle de croissance. Les figures 41, 42, 43 et 44 expriment donc, les différences de quantités d'oxygène consommé après exposition aux médicaments testés, elles ont été mesurées après 0, 2, 4, 24 et 48h de traitement.

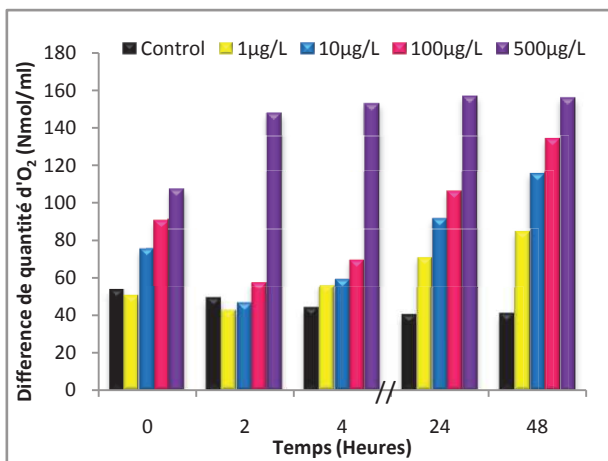


Figure 41. Différences de quantité d'O₂ consommé par les Paramécies exposées au Diclofénac.

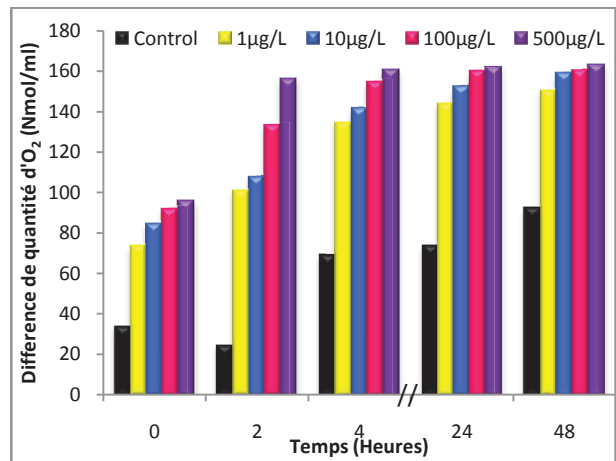


Figure 42. Différences de quantité d'O₂ consommé par les Paramécies exposées à l'Aténolol.

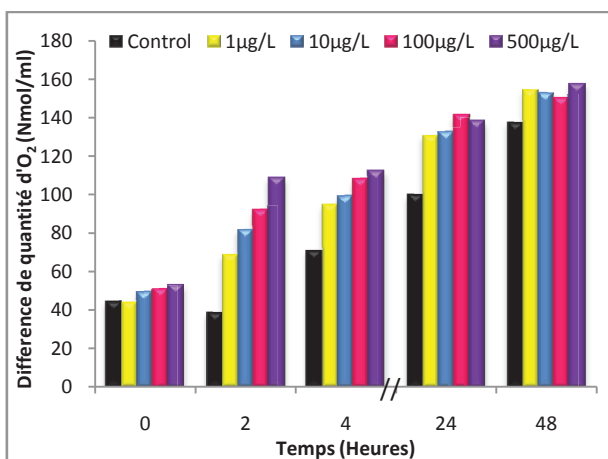


Figure 43. Différences de quantité d'O₂ consommé par les Paramécies exposées à l'Erythromycine.

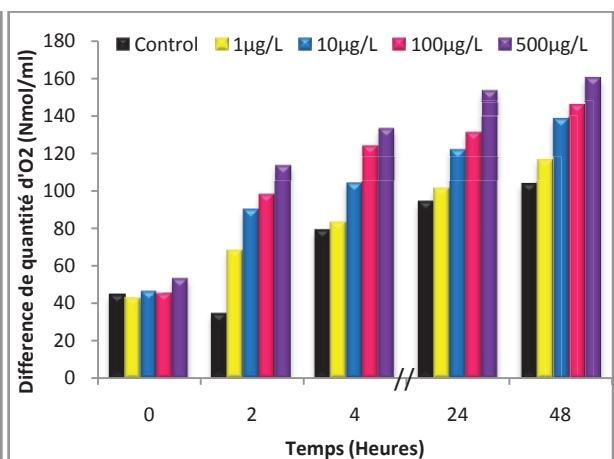


Figure 44. Différences de quantité d'O₂ consommé par les Paramécies exposées au Lévonorgestrel.

Chapitre 2 : Résultats

Les résultats obtenus montrent bien que la consommation d'oxygène augmente progressivement de manière significative en fonction des concentrations utilisées ($P = 0,02$), et ce, pour les 4 molécules testées.

Lors du traitement des Paramécies au Diclofénac, la concentration de 500 $\mu\text{g/L}$ entraîne une quantité d'oxygène consommé supérieure de plus de 200% par rapport aux témoins, et ce, à partir des deux premières heures de traitement. Idem pour la concentration de 100 $\mu\text{g/L}$ mais au delà de 48h de traitement au Diclofénac.

Le traitement des Paramécies à l'Aténolol provoque une surconsommation d'oxygène dès l'exposition des Paramécies au xénobiotique c'est-à-dire à 0h, d'ailleurs, à la plus faible concentration (1 $\mu\text{g/L}$), on constate une consommation redoublée d'oxygène, cette augmentation se poursuit en fonction du temps et des concentrations croissantes jusqu'à 48h.

L'exposition des Paramécies à l'Erythromycine de son coté, manifeste aussi une hyper-oxygénation des cellules proportionnelle aux concentrations croissantes dès 2h de traitement. La consommation maximale d'oxygène est atteinte à 48h par la plus forte concentration utilisée (500 $\mu\text{g/L}$).

Pour finir, le traitement des Paramécies au Lévonorgestrel, induit une augmentation également de la quantité d'oxygène consommée. Les Paramécies semblent réagir 2 heures seulement après exposition. D'ailleurs, c'est à partir de la concentration de 10 $\mu\text{g/L}$ de Lévonorgestrel, que la consommation d'oxygène est la plus marquée comparativement aux témoins.

2.3. Effets des produits pharmaceutiques sur les mécanismes de défense cellulaire des Paramécies: Evaluation de l'activité de la GST et du taux de GSH :

2.3.1. Cas du Diclofénac :

Les figures 45 et 46 illustrent l'évolution de l'activité de la GST ainsi que le taux de GSH chez les Paramécies en fonction du temps après traitement au Diclofénac.

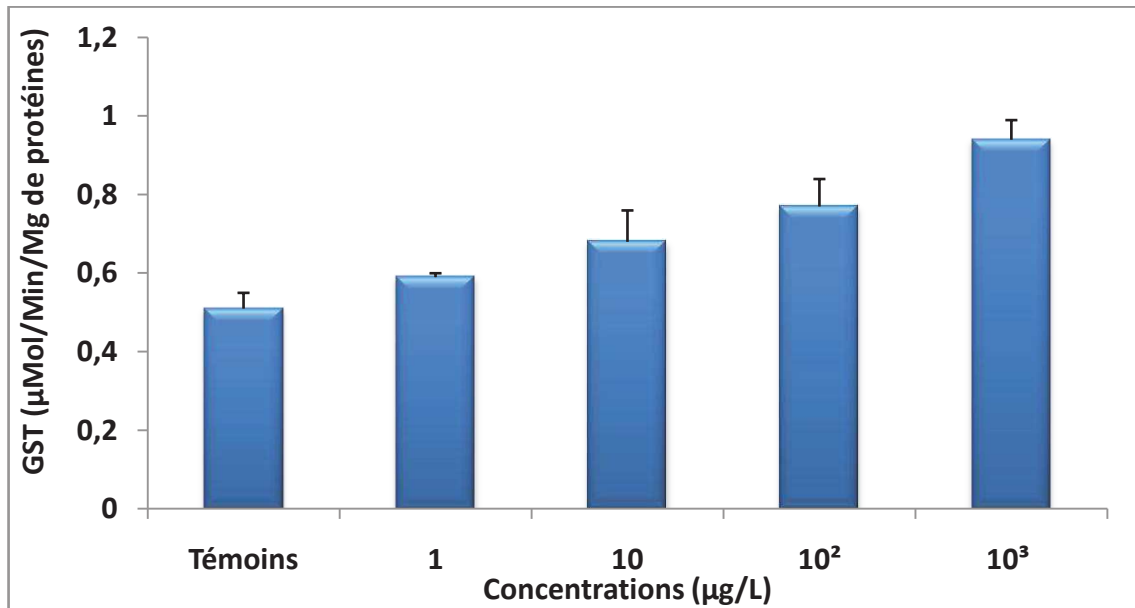


Figure 45. Effet des concentrations croissantes de Diclofénac sur l'activité de la GST chez les Paramécies.

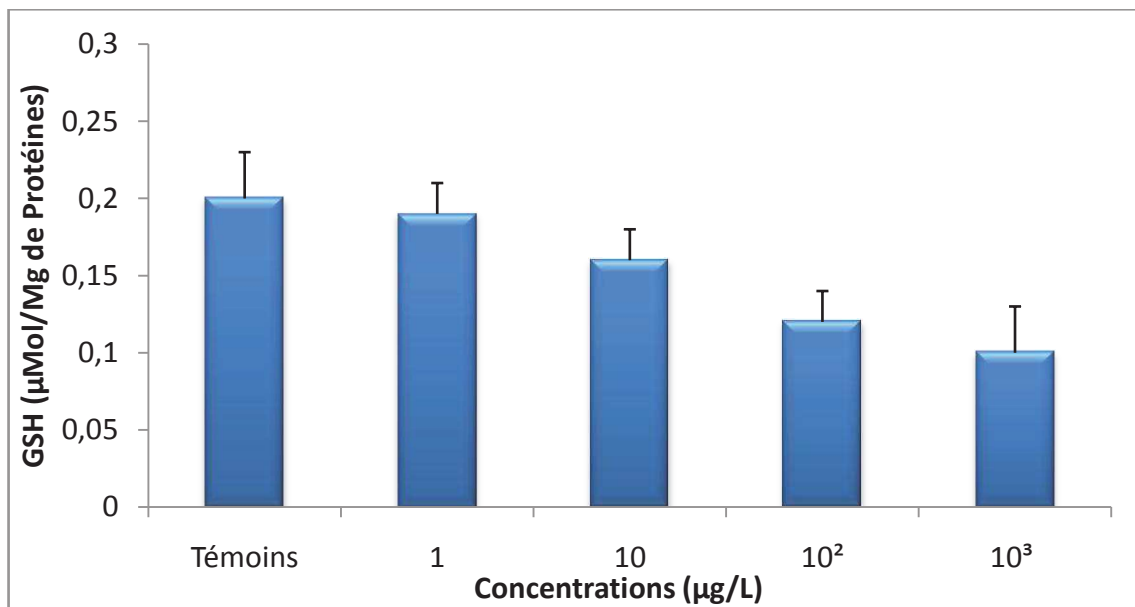


Figure 46. Effet des concentrations croissantes de Diclofénac sur le taux de GSH chez les Paramécies.

Les résultats manifestent une augmentation significative de l'activité de la GST accompagnée d'une diminution du taux de GSH. Le traitement à la plus forte concentration ($10^3 \mu\text{g/L}$) donne la plus forte activité de GST, elle est égale à $0,94 \mu\text{mol/ mg}$ de protéines avec le plus faible taux de GSH soit $0,1 \mu\text{mol/ mg}$ de protéines.

2.3.2. Cas de l'Aténolol :

Les figures 47 et 48 mettent en évidence l'évolution de l'activité de la GST ainsi que le taux de GSH suite à l'exposition des Paramécies à des concentrations croissantes d'Aténolol.

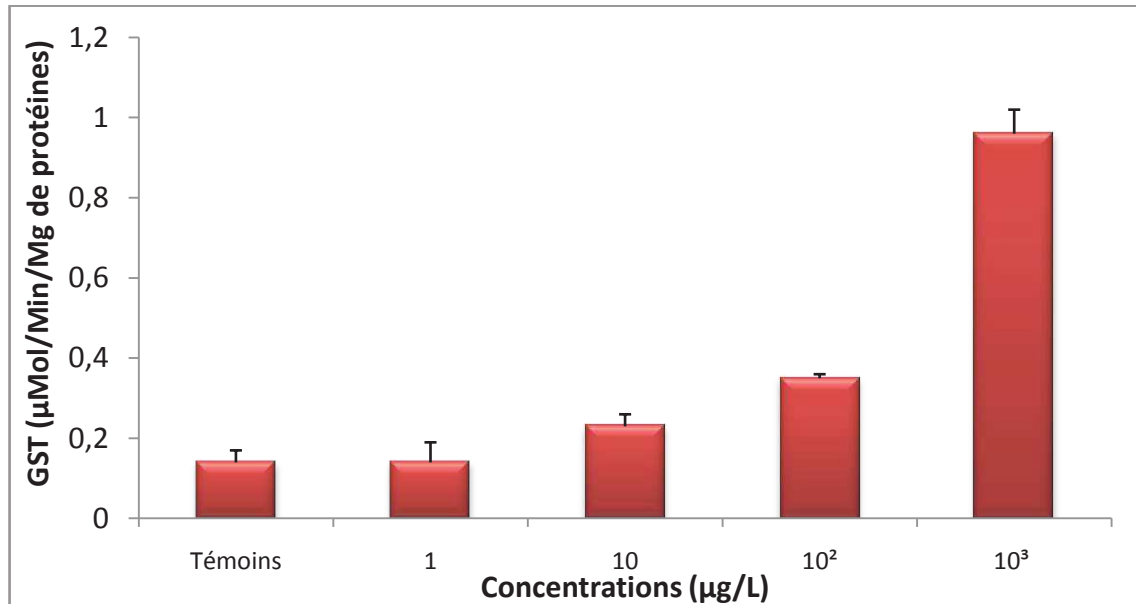


Figure 47. Effet des concentrations croissantes de l'Aténolol sur l'activité de la GST chez les Paramécies.

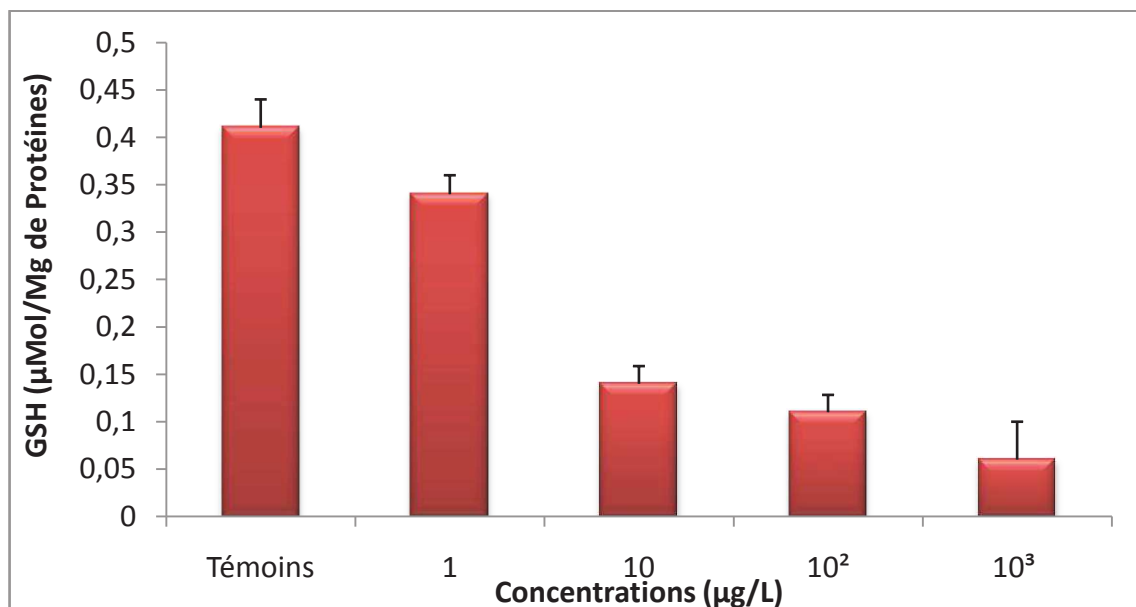


Figure 48. Effet des concentrations croissantes de l'Aténolol sur le taux de GSH chez les Paramécies.

Chapitre 2 : Résultats

Nous remarquons un effet très hautement significatif sur l'activité de la GST ainsi que sur le taux de GSH. C'est à partir de la concentration de 10 $\mu\text{g/L}$ qu'on observe une forte augmentation de l'activité de la GST chez les Paramécies (65%). Parallèlement, cette même concentration entraîne un même pourcentage de diminution du taux de GSH par rapport aux témoins. L'activité de la GST atteint sa valeur maximale de 0,96 $\mu\text{Mol/Min/mg}$ de protéines contre 0,14 $\mu\text{Mol/Min/mg}$ de protéines pour les témoins à la concentration de $10^3 \mu\text{g/L}$. Parallèlement à cette augmentation, une plus forte diminution du taux de GSH est observée à cette même concentration, 0,06 $\mu\text{Mol/Mg}$ de protéines contre 0,41 $\mu\text{Mol/mg}$ de protéines chez les témoins.

2.3.3. Cas de l'Erythromycine :

Les figures 49 et 50, expriment l'activité de la GST ainsi que les taux de GSH observés après traitement à l'Erythromycine chez les Paramécies.

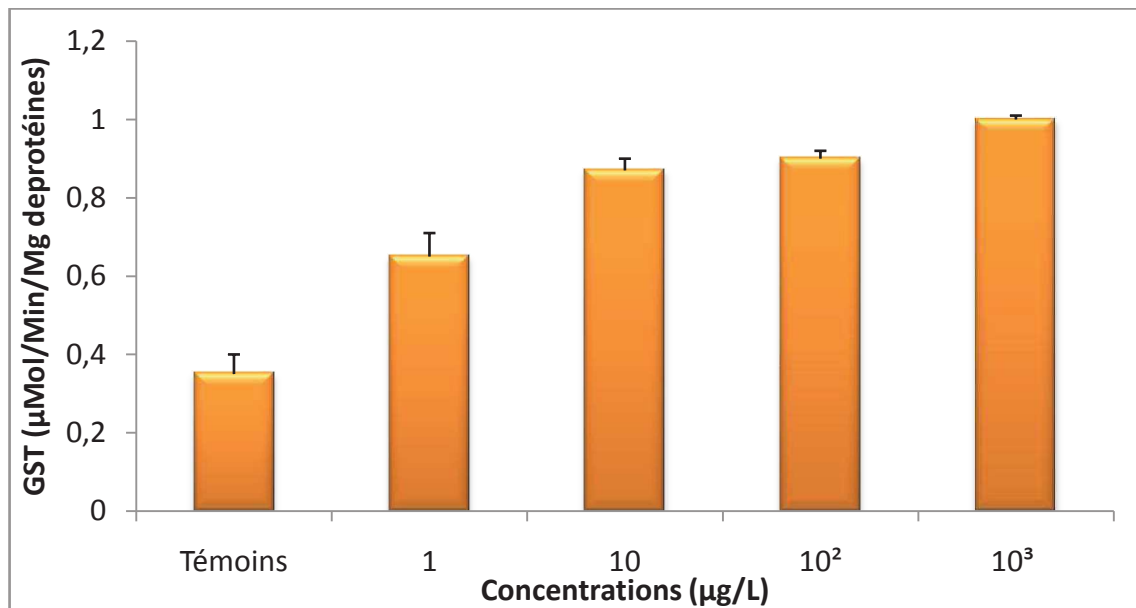


Figure 49. Effet des concentrations croissantes de l'Erythromycine sur l'activité de la GST chez les Paramécies.

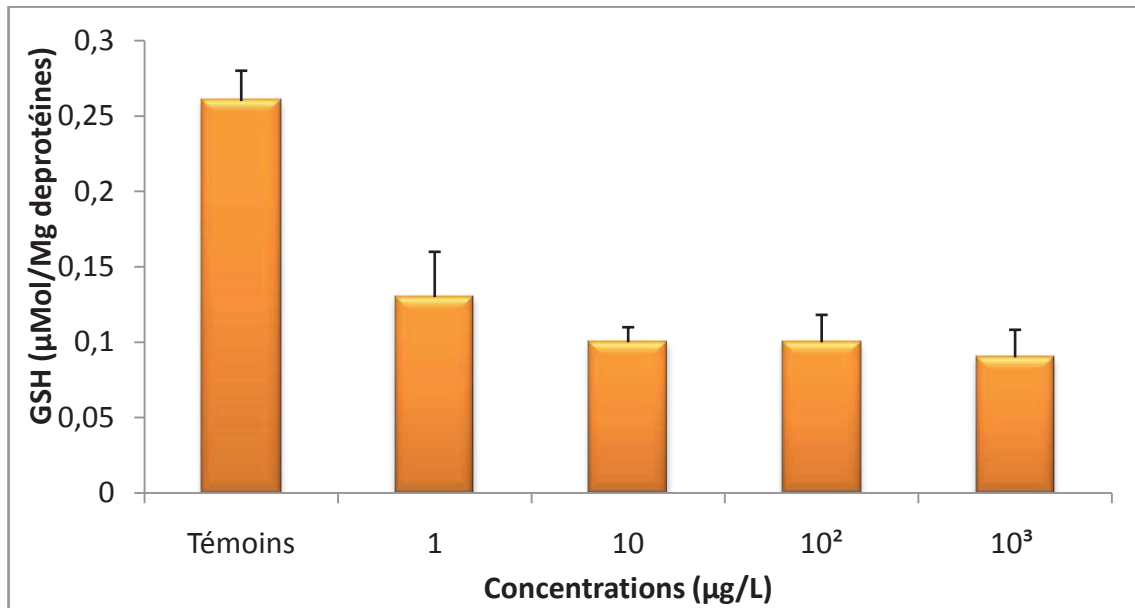


Figure 50. Effet des concentrations croissantes de l'Erythromycine sur le taux de GSH chez les Paramécies.

On constate une augmentation de l'activité de la GST accompagnée d'une diminution de son substrat, soit le GSH. Ces variations sont confirmées statistiquement avec un effet significatif ($P < 0,05$).

On observe lors des expérimentations que l'activité de la GST ainsi que le taux de GSH des Paramécies sont perturbés dès la plus faible concentration (1 $\mu\text{g/L}$), ces variations tendent à se stabiliser à la hausse pour la GST et à la baisse pour le GSH à partir de 10 $\mu\text{g/L}$.

L'activité de la GST varie de 0,65 $\mu\text{Mol/Min/mg}$ de protéines à la plus faible concentration jusqu'à 1 $\mu\text{Mol/Min/mg}$ de protéines pour la plus forte concentration contre seulement 0,35 $\mu\text{Mol/Min/mg}$ de protéines pour les témoins. Le taux de GSH quant à lui diminue de 0,13 $\mu\text{Mol/Mg}$ de protéines à la faible concentration à 0,09 $\mu\text{Mol/mg}$ de protéines pour la plus forte concentration, alors que le témoin enregistre une valeur de 0,26 $\mu\text{Mol/mg}$ de protéines.

2.3.4. Cas du Lévonorgestrel :

L'activité de la GST ainsi que le taux de GSH chez les Paramécies exposées au Lévonorgestrel sont illustrés dans les figures 51 et 52.

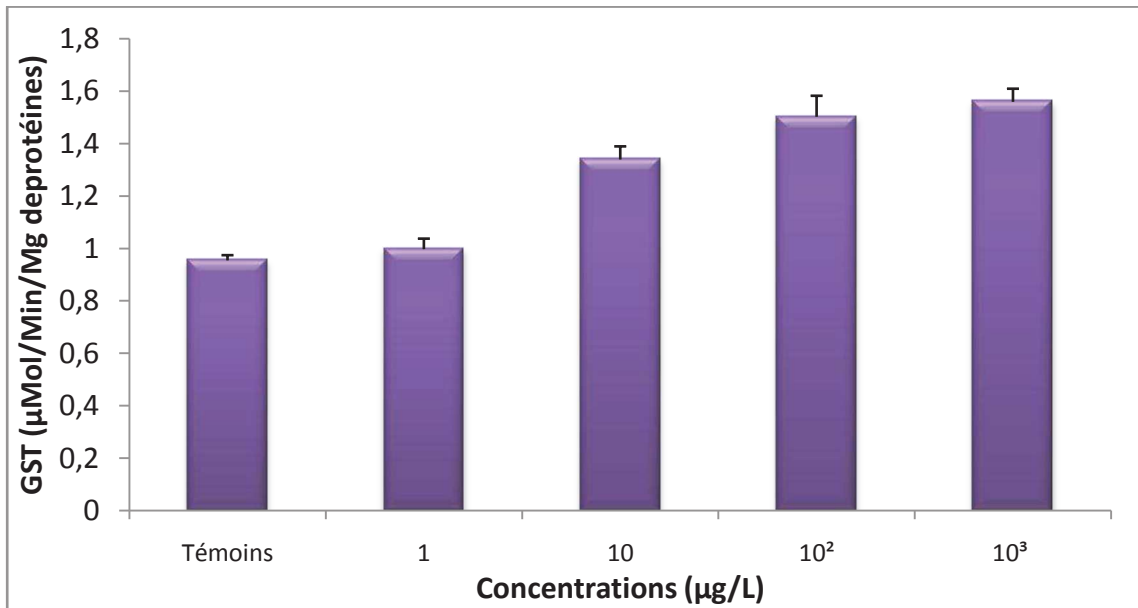


Figure 51. Effet des concentrations croissantes du Lévonorgestrel sur l'activité de la GST chez les Paramécies.

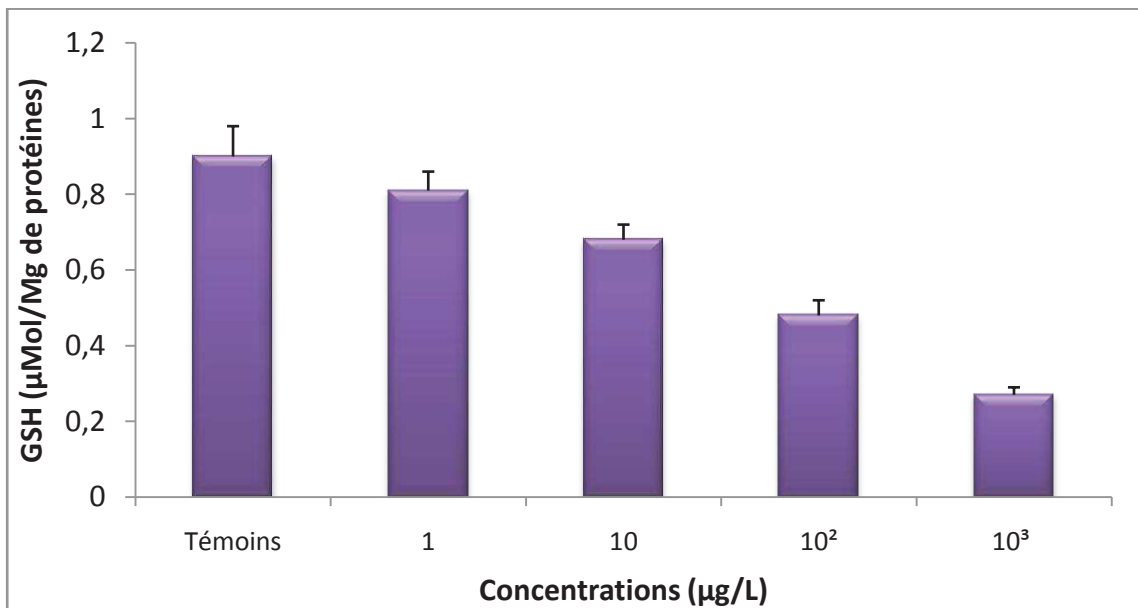


Figure 52. Effet des concentrations croissantes du Lévonorgestrel sur le taux de GSH chez les Paramécies.

Les résultats obtenus manifestent une augmentation significative ($P \leq 0,05$) de l'activité de la GST proportionnelle aux concentrations croissantes de Lévonorgestrel, ces résultats sont accompagnés d'une diminution hautement significative du taux de GSH inversement

proportionnelle aux concentrations croissantes du xénobiotique. Le taux de GSH à la plus forte concentration de Lévonorgestrel est de 0,27 $\mu\text{Mol/g}$ de protéines contre 0,9 $\mu\text{Mol/mg}$ de protéines chez les témoins.

2.4. Toxicité des médicaments et peroxydation lipidique : Evolution du taux de Malondialdéhyde (MDA) chez les Paramécies:

Le tableau 6 illustre les variations du taux de MDA chez les Paramécies après leur exposition aux différentes concentrations des quatre médicaments testés.

Tableau 6 : Evaluation du taux de MDA chez les Paramécies après exposition aux quatre médicaments, valeurs exprimées en moyennes \pm écarts types ($m \pm e$).

	Taux de MDA ($\mu\text{Mol/mg}$ de protéines)			
	Diclofénac	Aténolol	Erythromycine	Lévonorgestrel
Témoins	0,164 \pm 0,01	0,62 \pm 0,08	0,31 \pm 0,03	0,56 \pm 0,05
1 $\mu\text{g/L}$	0,174 \pm 0,01	0,68 \pm 0,07	0,46 \pm 0,05	0,58 \pm 0,04
10 $\mu\text{g/L}$	0,179 \pm 0,02	0,78 \pm 0,05	0,47 \pm 0,04	0,66 \pm 0,02
10 ² $\mu\text{g/L}$	0,181 \pm 0,01	0,87 \pm 0,04	0,50 \pm 0,02	0,68 \pm 0,01
10 ³ $\mu\text{g/L}$	0,185 \pm 0,01	0,97 \pm 0,05	0,59 \pm 0,01	0,67 \pm 0,01

Les résultats obtenus n'expriment pas d'effets significatifs sur le taux de MDA concernant le Diclofénac et le Lévonorgestrel. Par contre, une augmentation significative ($P \leq 0,05$) du taux de MDA est enregistrée lors du traitement avec l'Aténolol et l'Erythromycine. D'ailleurs, le traitement à l'Erythromycine enregistre une augmentation doublée du taux de MDA à la plus forte concentration (10³ $\mu\text{g/L}$), soit 0,59 $\mu\text{Mol/mg}$ de protéines contre seulement 0,31 $\mu\text{Mol/mg}$ de protéines chez les témoins. Le traitement à l'Aténolol quant à lui enregistre un taux de MDA à la concentration de 10³ $\mu\text{g/L}$ de 0,97 $\mu\text{Mol/mg}$ de protéines contre seulement 0,62 $\mu\text{Mol/mg}$ de protéines chez les témoins, soit une augmentation de plus de 50%.

3. Discussion :

La communauté scientifique s'accorde à l'idée que des effets négatifs peuvent résulter de la présence de produits pharmaceutiques dans les milieux, non seulement pour la santé humaine mais aussi pour les organismes aquatiques. On a montré que plusieurs effets, peuvent se produire lors d'une exposition continue, pendant plusieurs cycles de vie de vertébrés et d'invertébrés aquatiques, à des concentrations de médicaments sous-thérapeutiques (Daughton & Ternes, 1999 ; Timbrell, 2002). Ces effets s'accumulent et tardent à se manifester, le plus couramment, de manière finale et irréversible, souvent remarqués plusieurs générations plus tard (Braund *et al.*, 2009).

L'apparition de produits pharmaceutiques dans l'environnement est d'autant plus inquiétante, lorsque l'on considère le fait qu'ils agissent souvent sous forme de mixtures. Sharif *et al.*, (2015) soulèvent le fait qu'un mélange de déchets pharmaceutiques, de métaux lourds et d'autres contaminants organiques, peuvent avoir un puissant effet mutagène et génotoxique sur des organismes vivants exposés. Cleuvers, (2005) a conclu lors de ses travaux, que l'effet total d'une mixture d'AINS était supérieur à la somme des effets individuels chez les organismes étudiés. Donc, différents effets synergiques peuvent subvenir, ce qui peut constituer une menace beaucoup plus grave pour l'environnement. (Stankiewicz *et al.*, 2015).

Les Paramécies ont fait l'objet de plusieurs essais avec les quatre médicaments testés, évaluant leur dynamique de croissance, leur métabolisme respiratoire ainsi que l'éventuelle mise en place d'un mécanisme de défense antioxydant. En effet, le stress oxydatif correspond à une agression des cellules par des radicaux libres très toxiques : les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou Reactive Oxygen Species (ROS), leur accumulation incite l'organisme à déployer un ensemble complexe de défenses anti-oxydantes telles que : la Super Oxyde Dismutase (SOD), la Catalase, la Peroxydase, la Glutathion S-transférase (GST) et le Glutathion (GSH). Une cascade de réactions est ainsi déclenchée, elle vise à limiter au mieux les dommages voire la mortalité cellulaire. Certains métabolites secondaires

Chapitre 2 : Discussion

sont parfois produits, c'est le cas du MDA, il témoigne des dommages membranaires irrémédiables qui résultent de ces agressions cellulaires.

Les résultats obtenus dans nos expériences concernant le Diclofénac, suggèrent que l'Anti-inflammatoire est particulièrement toxique vis-à-vis des Paramécies, il ralentit leur croissance cellulaire en fonction des concentrations qui augmentent, entraînant même une forte mortalité cellulaire à la plus forte concentration. Néanmoins, on remarque une meilleure résistance des Paramécies face au Diclofénac lors de leur traitement en début de cycle, avec un seuil de tolérance plus important comparativement au traitement en phase exponentielle. Le métabolisme respiratoire de son côté, semble également perturbé, en effet, la quantité d'oxygène consommé augmente avec l'augmentation des concentrations, indiquant une hyperactivité cellulaire probablement causé par un stress de la cellule. Le dosage des biomarqueurs du stress oxydant confirme cette hypothèse, en effet, l'augmentation de l'activité de la GST accompagnée par la diminution du taux de son substrat, le GSH, témoignent de la mise en place d'agents antioxydants, visant à défendre la Paramécie de cette agression médicamenteuse. Beaucoup de travaux appuient nos résultats, notamment ceux de Boulassel, (2014), des essais de toxicité du Paracétamol et de l'Ibuprofène ont été réalisés chez les Paramécies, les résultats montrent que ces dernières sont sensibles aux deux xénobiotiques, à travers une inhibition de leur croissance, des changements morphologiques et une augmentation de la GST, la Catalase, la GPx et le MDA. Doi *et al.*, (2002) ; Doi & Horie, (2010) révèlent également de leur côté, l'induction de stress oxydatif chez les mammifères par un autre groupe d'AINS : Les Salicylates (comme l'aspirine), ils augmenteraient les enzymes anti-oxydantes tels que, la GST, la SOD, la Catalase ou les TBARS, avec des conséquences délétères comme la lipo-péroxydation et l'hépatotoxicité. Contrairement à la non variabilité significative du taux de MDA chez nos Paramécies, l'étude menée par Schmidt *et al.*, (2011) a montré que la moule *Mytilus sp* a souffert de peroxydation significative causée par l'exposition au Diclofénac. L'exposition du poisson *Cyprinus carpio* aux AINS induit l'augmentation de la GPx (San Juan-Reyes *et al.*, 2013). Pamplona & Costantini, (2011) ont observé l'altération de la GST après exposition du poisson chat *Rhamdia quelen* à un AINS (Dipyron). Des résultats similaires ont été également obtenus avec le Diclofénac, mais sur les espèces d'eau douce *Dreissena*

Chapitre 2 : Discussion

polymorpha, mettant en évidence le potentiel de cet AINS à provoquer un stress oxydatif chez les organismes aquatiques (Quinn *et al.*, 2011). Cette même espèce était également sensible au stress oxydatif provoqué par l'Ibuprofène (Contardo-Jara *et al.*, 2011). El-Bassat *et al.*, (2012) observent ce même stress chez différentes espèces planctoniques (*Chlorella vulgaris*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Paramecium caudatum*, *Brachionus calyciflorus* et *Daphnia longispina*) après une exposition au Naproxène.

Beaucoup d'autres travaux reflètent les effets néfastes des AINS, ils indiquent, qu'à des concentrations importantes, ils ont des effets sur les poissons (Saravanan & Ramesh, 2013), avec des modifications histo-pathologiques indésirables, causées dans divers tissus chez de nombreuses espèces (Mehinto *et al.*, 2010 ; Memmert *et al.*, 2013). Haap *et al.*, (2008) ont même observé que le Diclofénac a un effet négatif à la fois sur les vertébrés et les invertébrés. Après une exposition chronique, plusieurs auteurs ont observé des effets histo-pathologiques chez les espèces de truites, à des concentrations relativement faibles de Diclofénac autour de 1 à 5 µg/L (Schwaiger *et al.*, 2004 ; Schmitt-Jansen *et al.*, 2007 ; Mehinto *et al.*, 2010). Saravanan *et al.*, (2011) détectent une forte influence dans les profils hématologiques, biochimiques, iono-régulateurs et enzymatiques chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*), avec des expositions au Diclofénac à 1, 10 et 100 µg/L. Eades & Waring, (2010) démontrent la diminution de la capacité d'osmo-régulation des crabes verts (*Carcinus maenas*) lors de l'exposition au Diclofénac, Nassef *et al.*, (2010) ont admis qu'il existe des risques écologiques par toxicité aiguë avec le Diclofénac chez les poissons médaka japonais (*Oryzias latipes*), en âge adulte et sur les embryons. Les organismes aquatiques ne semblent pas être les seuls concernés, car des études ont également révélé le déclin dramatique des vautours à col blanc depuis 1992 au Pakistan, il s'agit du vautour chaugon (*Gyps bengalensis*), le vautour indien (*G. indicus*) et le vautour à long bec (*G. tenuirostris*). Conséquence d'une défaillance rénale, due à la consommation de carcasses d'animaux inconsidérément traitées et contenant des résidus de Diclofénac (Green *et al.*, 2004 ; Oaks *et al.*, 2004 ; Shultz *et al.*, 2004). Ceci est un excellent exemple des problèmes posés par des résidus de médicaments dans une chaîne alimentaire terrestre.

Concernant d'autres AINS connus, Saravanan *et al.*, (2012) montrent que chez la carpe mrigal (*Cirrhinus mrigala*), l'Ibuprofène possède une grande influence sur les profils hématologiques, biochimiques et enzymologiques. Han *et al.*, (2010) ; Ji *et al.*, (2013) soupçonnent également l'Ibuprofène d'influencer les Hormones Stéroïdes sexuelles, en

Chapitre 2 : Discussion

ayant des effets cytogénétiques chez les bivalves, et considèrent l'Ibuprofène ainsi, comme un perturbateur endocrinien. D'ailleurs, Heckmann *et al.*, 2007 ont exposé *Daphnia magna* à l'Ibuprofène, le taux de croissance de la population était significativement réduit à toutes les concentrations. La toxicité chronique de l'Ibuprofène chez le poisson médaka japonais (*O. latipes*) a été étudiée par Flippin *et al.*, (2006), après six semaines d'exposition, ils observent une diminution de la fréquence de production des œufs, ainsi qu'une augmentation du nombre d'œufs produits par ponte. Une stimulation de la croissance des cyanobactéries *Synechocystis* a aussi été observée après une exposition à l'Ibuprofène (Pomati *et al.*, 2004). Han *et al.*, (2006) révèlent que la mixture de Diclofénac, d'Ibuprofène et d'Acide Clofibric a montré de légers effets synergiques chez *D. magna* dans les deux essais de toxicité aiguë et chronique. Les travaux de Parolini *et al.*, (2009) montrent que le Diclofénac est très toxique comparativement à l'Ibuprofène.

L'exposition des lentilles d'eau *Lemna minor* à des concentrations croissantes de Paracétamol après 10 jours de culture, influence de manière significative la croissance et les paramètres physiologiques (Pomati *et al.*, 2004). Hussein *et al.*, (2008) ont montré des effets néfastes du Paracétamol sur le plancton. Et selon Sarma *et al.*, (2014), le Diclofénac serait plus nocif que le Paracétamol pour les deux zooplanctons *Patulus* et *macrocopa*.

Après le Diclofénac, nous nous sommes penchés sur un β -bloquant largement prescrit, l'Aténolol, tout comme le Diclofénac, il a provoqué une diminution de la cinétique de croissance, et ce, quelque soit le mode de traitement appliqué, le métabolisme respiratoire s'est également accéléré en fonction des concentrations croissantes d'Aténolol. Cette hyper consommation d'oxygène s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la GST et d'une diminution du taux de GSH, particulièrement à la plus forte concentration, une réponse anti-oxydante est alors évidente, d'ailleurs l'augmentation du taux de MDA témoigne des lésions membranaires occasionnées. Pourtant, certains travaux revendiquent le contraire, Claessens *et al.*, (2013) soulignent que l'Aténolol ne présente aucun risque chronique potentiel, Cleuvers, (2005) n'a également observé aucun effet toxique de l'Aténolol chez des algues vertes *Desmodesmus subspicatus*, contrairement au Propranolol qui a inhibé leur croissance. Steger-Hartmann *et al.*, (1999) ont observé que l'exposition à 500 g/L de Propranolol, réduit les taux de croissance de médaka, les taux de stéroïdes plasmatiques ont été modifiés à la fois chez les mâles et les femelles poissons, même à des

Chapitre 2 : Discussion

concentrations aussi faibles que 1 g/L, l'exposition a entraîné aussi une diminution de la production d'œufs. Huggett *et al.*, (2002) affirment que le Propranolol a également diminué la reproduction de deux invertébrés *H. azteca* et *C. dubia*, d'ailleurs, selon Fent *et al.*, (2006), le Propranolol est également le seul β -bloquant à manifester une toxicité pour les algues. D'autre part, selon Carballa *et al.*, (2004), l'exposition aiguë de la truite arc au Propranolol n'a montré aucune réduction significative de son rythme cardiaque. Le Métoprolol quant à lui, a été bio-accumulé par des moules jusqu'à 20 fois sa concentration dans l'environnement, induisant même après quatre jours d'exposition, une régulation significative de l'ARNm de la Protéine de Choc Thermique (HSP) (Contardo-Jara *et al.*, 2010).

L'Erythromycine, un Antibiotique Macrolide, a aussi été testé sur les Paramécies, les résultats obtenus sur la cinétique de croissance, montre leur sensibilité face au xénobiotique, particulièrement lorsqu'elles sont traitées en début de cycle cellulaire. Une augmentation de la consommation d'oxygène ainsi que de l'Activité de la GST, indique le stress oxydant induit par l'Erythromycine, des lésions membranaires sont également occasionnées, elles sont justifiées par l'augmentation du taux de MDA. Selon Thacker, (2005), les Antibiotiques peuvent être classés comme extrêmement toxiques pour les micro-organismes et très toxiques pour les algues. On doit garder à l'esprit, que les algues constituent la base de la chaîne alimentaire, une diminution de leur population affectera directement l'ensemble des écosystèmes aquatiques (Lanzky & Halling-Sørensen, 1997). Des études récentes ont rapporté que la Ciprofloxacine (Fluoroquinolone) a des effets sur le plancton et les algues (Richardson & Ternes, 2011). Selon Besse, (2010), les Macrolides apparaissent être les Antibiotiques les plus toxiques pour les algues, notamment l'Erythromycine. D'ailleurs, Liu *et al.*, (2014a, 2014b) révèlent que l'exposition de la carpe *Carassius commun* à l'Erythromycine et à la Roxithromycine, montre une bioconcentration dans le muscle et le foie, augmentant l'activité de la SOD. Christensen *et al.*, (2006) ont même observé des effets synergiques avec des combinaisons d'Erythromycine et d'Oxytétracyclines sur des microorganismes de boues activées de STEP.

L'effet des Antibiotiques sur l'activité des communautés microbiennes soulève d'importantes interrogations quant à la possible sélection de souches résistantes aux

Chapitre 2 : Discussion

Antibiotiques, en effet, elle peut induire des résistances chez les bactéries même à de faibles concentrations (Petrovic *et al.*, 2005). D'ailleurs, Costanzo *et al.*, (2005) affirment que des cultures bactériennes de souches provenant de STEP, présentent une résistance à au moins deux Antibiotiques (l'Erythromycine et l'Ampicilline), tandis que les bactéries isolées à partir des eaux de surface ne l'étaient pas. Kohanski *et al.*, (2010) mettent en évidence l'effet de concentrations sub-inhibitrices de Norfloxacin, sur la production de radicaux libres responsables de l'émergence de bactéries multi-résistantes aux Antibiotiques, à la suite de mutations. Des effets génotoxiques sont également observés pour des concentrations de Ciprofloxacine de l'ordre de 10 µg/L (Hartmann *et al.*, 1998).

Concernant les mixtures médicamenteuses, Fent *et al.*, (2006) remarquent l'inhibition jusqu'à 100% de la reproduction chez les Daphnies par un mélange d'AINS, la toxicité aiguë du mélange était significativement plus importante que celle de chaque composé agissant séparément. En revanche, les concentrations testées étaient 1000 à 5000 fois plus élevées que celles que nous détectons dans l'environnement. Láng & Köhidai, (2012) ont étudié les effets combinés du Diclofénac, de l'Ibuprofène, du Métoprolol et du Propranolol, dans ses 6 compositions binaires possibles, chez les ciliés d'eau douce *Tetrahymena pyriformis*, pour tous les mélanges binaires des 4 composés à différentes concentrations, un effet de type antagoniste a été observé dans 59% des combinaisons, additif à 37% et synergique dans seulement 4% des combinaisons. Borgmann *et al.*, (2007) ont testé l'effet du mélange Diclofénac, Ibuprofène, Paracétamol, Gemfibrozil (Hypolipémiant), Naproxène, Acide Acétylsalicylique et Triclosan (ATB), à des concentrations de 0,1 µg/L pour chaque médicament. Ce mélange induit une légère augmentation de 17% de la proportion des mâles chez les *Hyaella azteca* (crustacés d'eau douce) après trois générations. Parolini *et al.*, (2011) mettent en évidence que l'exposition à court-terme au Diclofénac, Ibuprofène et Paracétamol dans des concentrations environnementales, affecte la moule d'eau douce (*Dreissena polymorpha*), en causant des dommages cyto-génotoxiques plus graves que ceux obtenus par l'exposition des substances de manière individuelle. Khetan & Collins, (2007) ont effectué des tests in vitro sur des cellules embryonnaires de foie humain, ils ont démontré qu'un mélange de médicaments de l'ordre du ng/L (Ibuprofène et 12 autres médicaments), peut inhiber la prolifération cellulaire et par la suite affecter la

Chapitre 2 : Discussion

physiologie et la morphologie, avec comme conséquence la possibilité d'avoir des effets sur l'environnement aquatique.

Le Lévonorgestrel a été la dernière molécule testée, il s'agit d'un Progestatif de synthèse agissant à de très faibles concentrations, contrairement aux médicaments précédemment testés. Les tests de toxicité sur les Paramécies montrent l'action toxique de cette Hormone, la dynamique de croissance est perturbée et diminuée par rapport aux témoins, néanmoins, le seuil de tolérance des Paramécies est plus important lors du traitement en phase exponentielle. Comme pour les molécules précédentes, l'exposition au Lévonorgestrel induit un stress oxydant chez les Paramécies, en effet, l'augmentation de la respiration et de l'activité de la GST ainsi que la diminution du GSH le prouvent. Certains travaux confortent nos résultats. En effet, *Zucchi et al., (2012)* ; *Kroupová et al., (2014)* ; *Burkina et al., (2015)* constatent que les Progestatifs et les Anti-progestatifs affectent les comportements hormonaux chez les poissons, étant donné que leur développement et reproduction dépendent d'évènements biochimiques, ainsi, différents processus physiologiques sont particulièrement perturbés par ces xénobiotiques hormonaux. *Kobayashi et al., (2002)* soulignent même, que les Progestatifs agissent également comme des phéromones et sont donc, impliqués dans le contrôle du comportement de frai chez les poissons. *Kolodziej et al., (2003)* ; *Sorensen et al., (1990)* affirment d'ailleurs, qu'à des concentrations élevées, les Progestatifs pourraient interférer avec des phéromones naturelles, et donc altérer les réponses physiologiques et le comportement reproducteur des poissons. Pris séparément, les Progestatifs pourraient ne pas présenter un risque pour l'environnement aquatique. Cependant, vu leur présence sous forme de mélanges, il existe un risque additif ou même synergique. *Fernandes et al., (2014)* montrent que le Lévonorgestrel, interfère avec la biosynthèse des Androgènes au niveau des gonades de la carpe. *Parrott & Blunt, (2005)* observent que l'exposition d'un poisson d'eau douce *Pimephales promelas* à 1ng/L de 17 α -éthynylestradiol (EE2), a provoqué une réduction significative de la fécondation, une production d'œufs accrue et une diminution de l'expression des caractères sexuels secondaires masculins, des essais étendus sur une période de trois semaines, à des concentrations inférieures à 1 ng/L, ont même induit une population accrue de femelles. Des résultats similaires ont été obtenus par *Pawlowski et al., (2004)*, d'ailleurs, les concentrations au dessus de 1 ng/L de EE2 ont également induit des

Chapitre 2 : Discussion

concentrations plasmatiques de vitellogénine supérieures dans les deux sexes. Nash *et al.*, (2004) ont enregistré des résultats semblables pour les poissons zèbres mâles. Kidd *et al.*, (2007) rapportent qu'une exposition chronique des *Pimephales promelas* à des concentrations de EE2 de l'ordre 5 et 6 ng/L, conduit à la féminisation des poissons mâles, ces modifications ont provoqué un effondrement de la population. Orlando & Guillette, (2007) ; Gyllenhammar *et al.*, (2009) ont même démontré que les amphibiens et reptiles également exposés aux Œstrogènes environnementaux, ont montré une inversion des sexes ainsi que d'importants changements dans les caractéristiques sexuelles secondaires. D'un autre côté, Haguenoer, (2010) souligne que l'Œstrone a montré un fort pouvoir de bioaccumulation chez *Daphnia magna* par l'intermédiaire de *Chlorella vulgaris*, un détail important à souligner dans le cadre de la contamination des chaînes alimentaires. Un des effets les plus souvent rencontrés aussi, est la présence de poissons hermaphrodites à proximité de sources d'eaux usées. Ils peuvent avoir des conduits reproductifs féminins et/ou un développement d'oocytes dans leurs testicules, et présenter des concentrations élevées d'Hormones Stéroïdiennes sexuelles ainsi que des concentrations sanguines élevées de vitellogénine (Haguenoer, 2010).

4. Hypothèse :

A la fin de ce chapitre, nous constatons que manifestement, les quatre molécules testées ont induit un stress oxydatif chez les Paramécies.

La forte similitude du métabolisme de celle-ci avec celui des mammifères (Kosmala *et al.*, 1999), nous permet de bien comprendre ses réactions face aux xénobiotiques. En effet, leur pénétration à travers la membrane cellulaire va occasionner l'augmentation des ROS qui à leur tour, vont troubler l'équilibre pro-oxydants/antioxydants. Ces perturbations entraînent des lésions et des dommages oxydatifs des biomolécules (Protéines, lipides, ADN, mitochondries...), fragilisant ainsi la cellule, induisant même sa mort (Figure. 53).

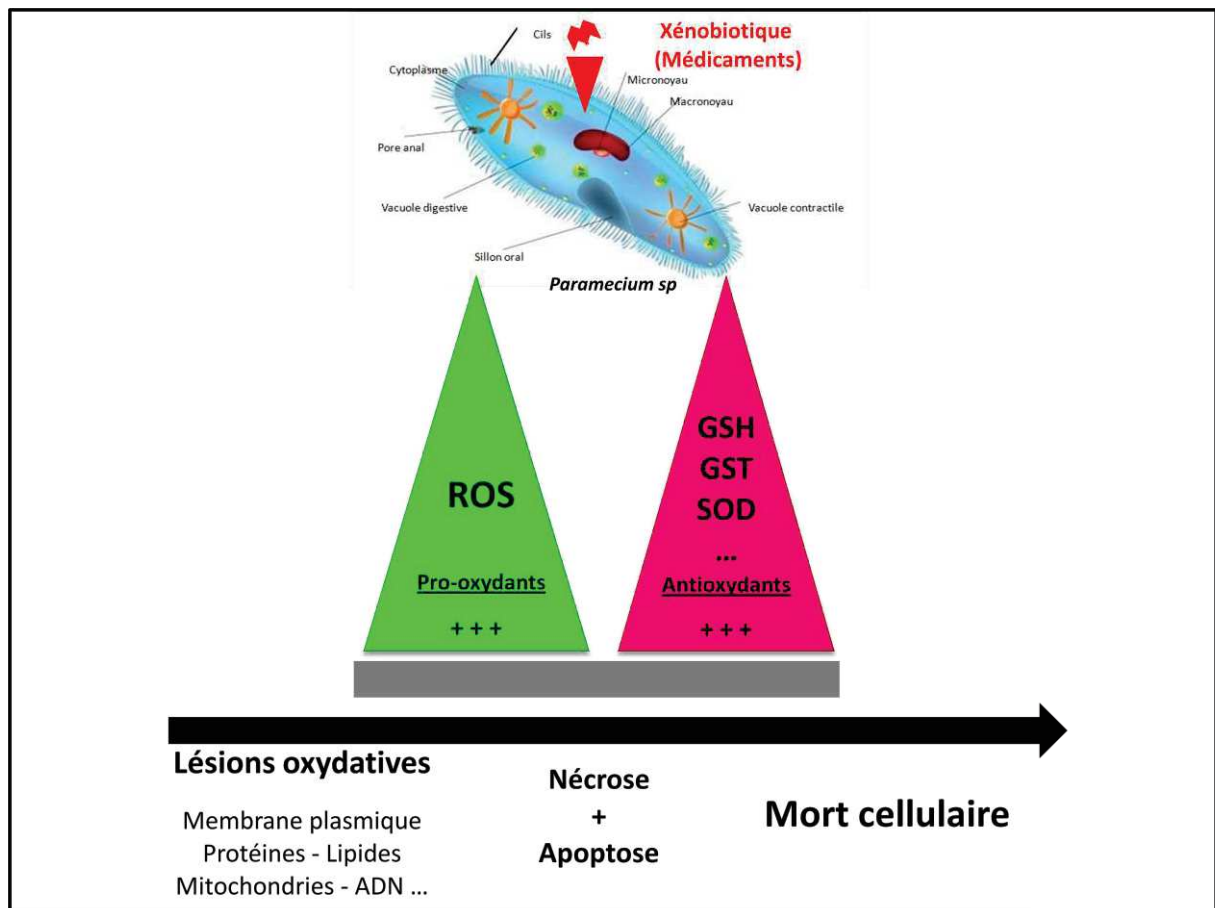


Figure 53. Schéma illustrant l'action des xénobiotiques (médicaments) sur le déclenchement d'un stress oxydatif chez *Paramécium sp.*

Chapitre 3 :

**Phytoremédiation d'un Antibiotique
(Ciprofloxacine) par *Phragmites australis*
et *Typha latifolia*.**

Chapitre 3 : Phytoremédiation d'un Antibiotique (Ciprofloxacin) par *Phragmites australis* et *Typha latifolia*.

1. Matériel et Méthodes :

1.1. Matériel végétal :

Notre travail s'est effectué avec deux plantes aquatiques connues pour leurs propriétés épuratrices : *Phragmites australis* et *Typha latifolia*.

1.1.1. *Phragmites australis* :

Phragmites australis ou communément appelée roseau, est une plante herbacée largement répandue dans le monde (Mal & Narine, 2004). Préférant les sols frais et humides, on la retrouve aux bords des rivières, lacs et étangs (Gaugous, 1995), de faible profondeur (2 à 3 mètres) (Scholz & Xu, 2001) et de hauteur pouvant atteindre les 5 mètres, ses feuilles longues de forme rubanée se dressent tout le long des tiges qui se terminent par des inflorescences (Cronk & Fennessy, 2001). Les roseaux sont réputés pour leur pouvoir épurateur vis-à-vis de divers polluants comme les métaux lourds et les produits pharmaceutiques (Semadi, 2010 ; Vymazal *et al.*, 2007). Ainsi que pour leur résistance au stress hydrique et aux grands écarts de température (Fauteux, 2002) (Figure. 54).

La classification taxonomique selon USDA NRCS, (2010) est la suivante:

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

Règne: Végétal.

Embranchement: Magnoliophyta.

Classe: Liliopsida.

Sous classe : Commelinidae.

Ordre : Cyperales.

Famille : Poacée.

Genre: *Phragmites*.

Espèce: *australis*.



Figure 54. *Phragmites australis*.

1.1.2. *Typha latifolia* :

Typha latifolia, appelée aussi massette à larges feuilles, est une plante d'eau vivace qui peut atteindre la hauteur de 3 mètres. Elle se caractérise par des racines rampantes, une tige robuste, de longues feuilles aplaties, et un fruit de forme ovoïdale, duveteux et de couleur brune. (Esser & Pronost, 2005). La *Typha* est retrouvée un peu partout dans le monde (Gagnon, 2012), elle vit dans les zones où le sol reste humide voire inondé lors de la saison de croissance. Ce qui justifie sa présence dans les marais d'eau douce et les rivières (Esser & Pronost, 2005) (Figure. 55).

La classification taxonomique selon USDA NRCS, (2010) est la suivante:

Règne : Végétal.

Embranchement: Magnoliophyta.

Classe: Liliopsida.

Sous-classe: Commelinidae.

Ordre: Typhales.

Famille: Typhacées.

Genre: *Typha*.

Espèce : *latifolia*.

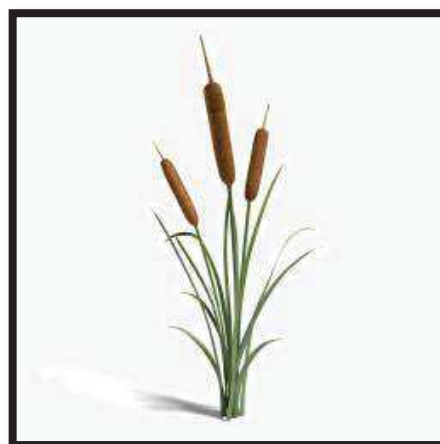


Figure 55. *Typha latifolia*.

1.2. Matériel chimique :

Nous avons choisi un Antibiotique appartenant à la famille des Fluoroquinolones : la Ciprofloxacin. Utilisée sous la forme de Chlorhydrate de Ciprofloxacin pour des raisons de solubilité (Figure. 56).

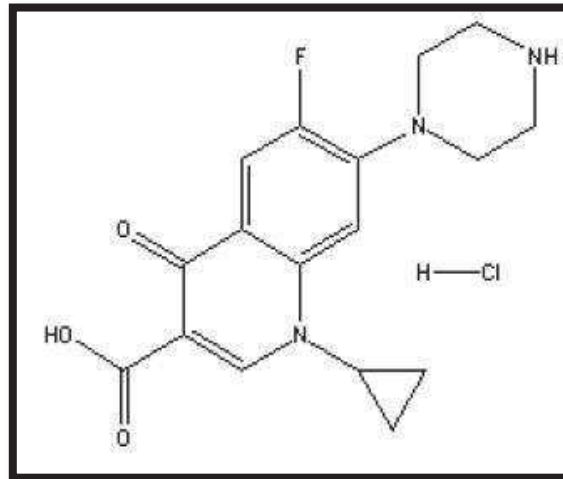


Figure 56. Chlorhydrate de Ciprofloxacin (Pharmacopée Européenne, 2004).

1.3. Zone d'étude :

Notre échantillonnage s'est effectué essentiellement au niveau de la région de Sidi Salem, aux abords du littoral Annabi (Figure. 57).

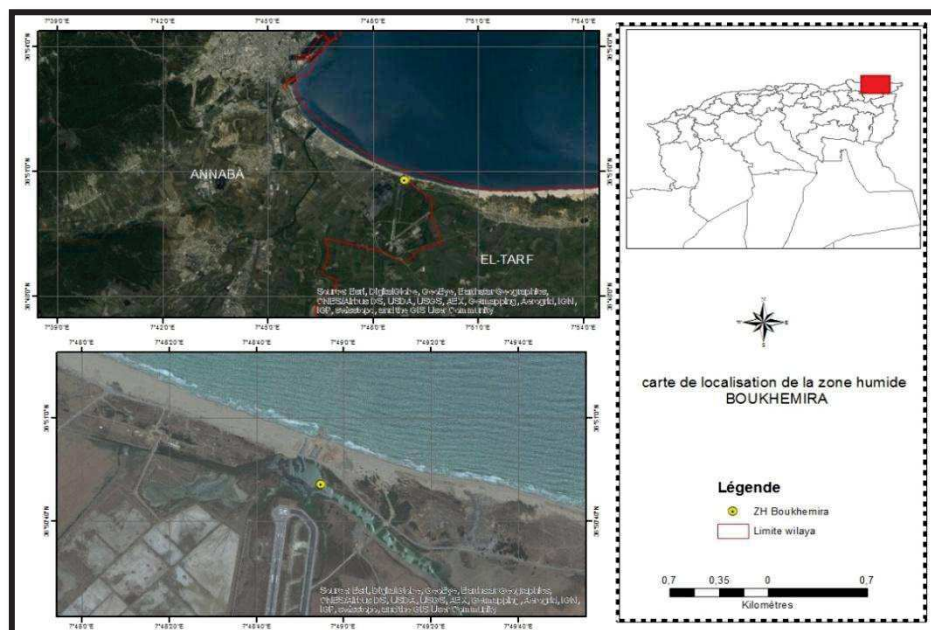


Figure 57. Situation géographique de la zone d'étude (Logiciel QGIS).

1.4. Prélèvement de l'eau :

Le mode de prélèvement de l'eau est une opération délicate, elle influence directement la qualité des résultats analytiques obtenus et ainsi leur interprétation. Des précautions élémentaires doivent donc être prises en compte pour avoir des échantillons homogènes et ainsi des résultats représentatifs (Rodier, 2009).

Nous avons effectué les prélèvements au mois de Mars, à une certaine distance et profondeur du bord et de la surface de 30cm, suivant les recommandations de Rodier, (2009).

Dans un premier temps ; quelques paramètres physico-chimiques (Température, pH, conductivité et salinité) ont été mesurés sur place à l'aide d'un appareil multi-paramètres (HI 9811-5).

Ensuite, les prélèvements destinés à d'autres analyses physico-chimiques ont été transportés vers des laboratoires spécialisés dans les analyses de l'eau, dans une glacière à l'abri de la lumière à une température de 4°C conformément au guide général pour la conservation et la manipulation des échantillons (Rodier, 2009).

1.5. Récolte des plantes :

La récolte des roseaux et des massettes est effectuée sur le même site de prélèvement de l'eau, en préservant au mieux l'état des racines. Les plantes sont placées par la suite dans une grande cuve protégée de la lumière, avec de l'eau provenant de leur milieu naturel pendant 48h, afin de les acclimater et de les préparer au mieux avant le processus expérimental.

1.6. Traitement des plantes :

Le but dans cette expérience est d'exposer à la fois les roseaux, les massettes séparément puis les deux ensembles au même Antibiotique, afin d'évaluer la propriété épuratrice de chacune des plantes ainsi que le potentiel de leur action commune face à ce xénobiotique.

Une fois les plantes de même taille choisies et conditionnées, elles sont placées dans des cuves de 5 litres de volume avec 4 litres d'eau à raison de 2 plantes/cuve (Figure. 58).

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

L'eau utilisée est celle de leur milieu naturel. Pour éliminer tout risque de dégradation du xénobiotique par la biomasse du milieu, l'eau subira au préalable une stérilisation spécifique (Tyndallisation). Les cuves ont été protégées de la lumière pour reproduire dans un premier lieu, les conditions naturelles des plantes et spécialement les racines, puis dans un second lieu, éviter un éventuel phénomène de photo-dégradation de notre xénobiotique (Bui, 2013).

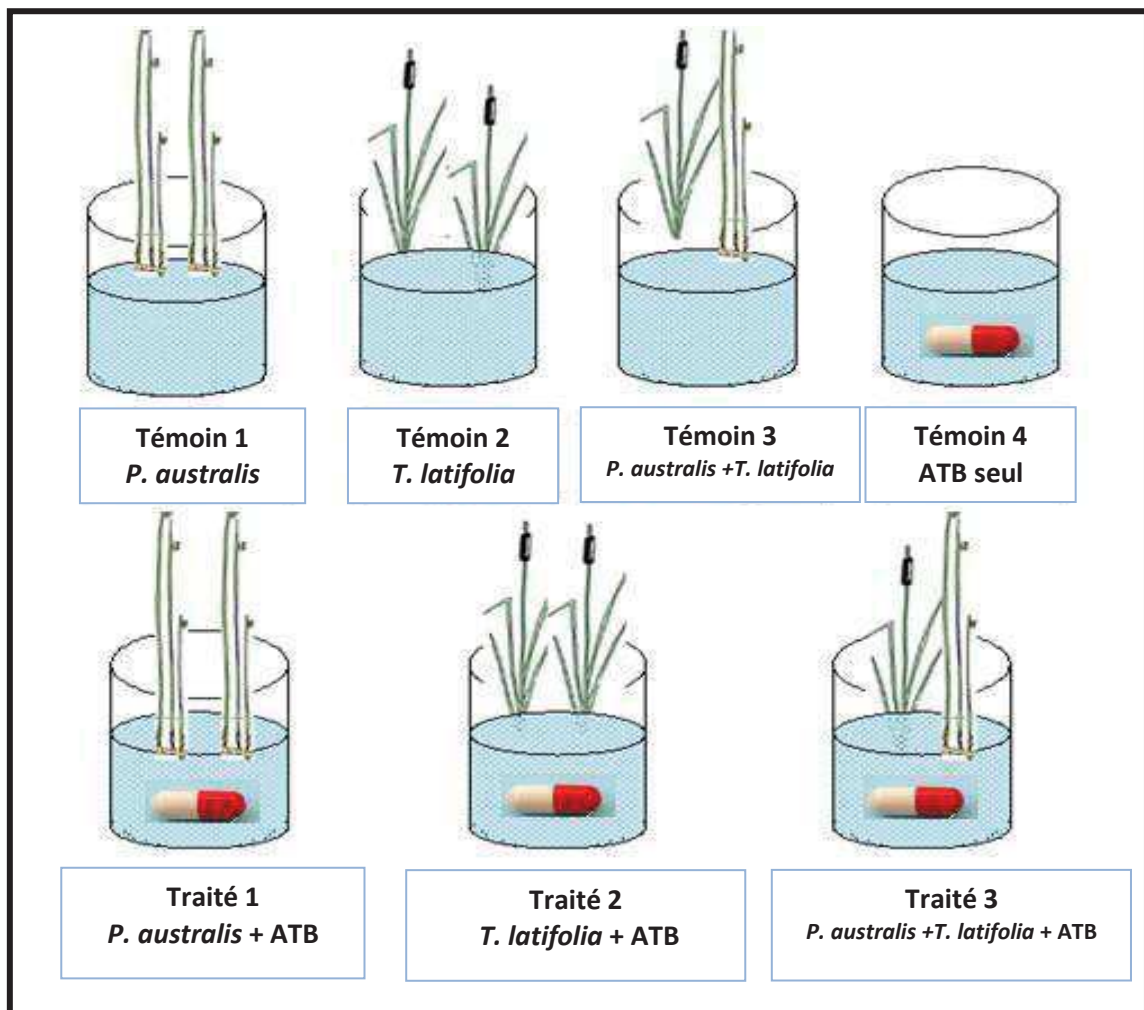


Figure 58. Schéma de la mise en place du processus expérimental.

1.7. Paramètres physico-chimiques :

En plus des paramètres physico-chimiques mesurés sur place, d'autres paramètres plus élaborés (DBO₅, DCO et MES) ont été effectués par un laboratoire spécialisé :

La température :

La température est un paramètre important d'autant plus qu'elle influence la majorité des réactions physiques, chimiques et biologiques (Swaine *et al.*, 2006).

Le pH :

Le pH est un paramètre essentiel dans la qualité de l'eau (Rodier, 2009). Il influence la plupart des mécanismes chimiques et biologiques dans le milieu aquatique (Derwich *et al.*, 2010).

La conductivité électrique (CE) :

Exprimée en siemens par mètre (S/m), la conductivité électrique peut être utilisée comme mesure de la concentration des composants ionisables présents dans l'échantillon, et ainsi, elle traduit le degré de minéralisation globale (Shilton *et al.*, 2005).

La salinité :

La salinité mesure la concentration d'une eau en sels dissous (Chlorure de Sodium, Chlorure de Magnésium, Sulfate de Magnésium...etc.). D'après Servant, (1978), la salinité est ordinairement exprimée par la conductivité électrique en desiemens par mètre (dS/m) à 25°C.

La Demande Biologique en Oxygène (DBO₅) :

La demande biologique en oxygène exprime la quantité d'oxygène nécessaire à la biodégradation des matières organiques présentes dans l'eau, au bout de 5 jours d'incubation. Ce paramètre est un bon indicateur de la teneur en matière organique biodégradable d'une eau au cours des procédés d'autoépuration (Rejsek, 2002).

La demande chimique en oxygène (DCO) :

La demande chimique en oxygène correspond à la quantité d'oxygène (mg/L) qui a été consommée par voie chimique, pour oxyder l'ensemble des matières oxydables présentes dans l'eau. La DCO est particulièrement indiquée pour mesurer la pollution d'un effluent industriel (Rodier, 2009).

Les matières en suspension (MES) :

Les matières en suspension comprennent toutes les matières minérales ou organiques qui ne se solubilisent pas dans l'eau. Leur concentration dans l'eau est nécessaire à l'évaluation de l'impact de la pollution sur le milieu aquatique. Elles agissent d'une façon négative sur les caractéristiques physico-chimiques de l'eau telles que : la turbidité ou la transparence de la lumière donc : la photosynthèse (Aassiri, 2001).

Le taux d'abattement :

Le calcul du taux d'abattement d'un élément est exprimé en %, il est basé sur la formule suivante :

$$\% \text{ d'abattement (X)} = [(C_i - C_f)/C_i] \times 100$$

C_i : Concentration initiale de (x) dans l'eau usée brute.

C_f : Concentration finale de (x) dans l'eau usée traitée.

1.8. Activité Antibactérienne :

La capacité épuratrice des plantes est évaluée par la capacité inhibitrice de l'Antibiotique encore présent dans l'eau de culture sur un micro-organisme, en l'occurrence *Escherichia Coli* (ATTC 25922). La bactérie est sélectionnée en raison de sa sensibilité à la Ciprofloxacine. La méthode de diffusion en milieu solide de Mueller-Hinton (MH) est utilisée (CA-SFM, 2014). La technique consiste à faire des cultures de 18 à 24 heures de souches bactériennes exposées à un Antibiotique donné, sur des boites de Pétri dans lesquelles nous coulons le milieu de culture (MH), nous ensemençons *E. coli*, puis nous l'exposons aux échantillons d'eaux du procédé expérimental ; ceci est réalisé avec des disques de papier buvard, le tout est incubé à 37°C (Rahal, 2008). Les diamètres des zones d'inhibition produits nous indiqueront les concentrations d'Antibiotique dans le milieu et ainsi la capacité épuratrice des plantes (Figure. 59).

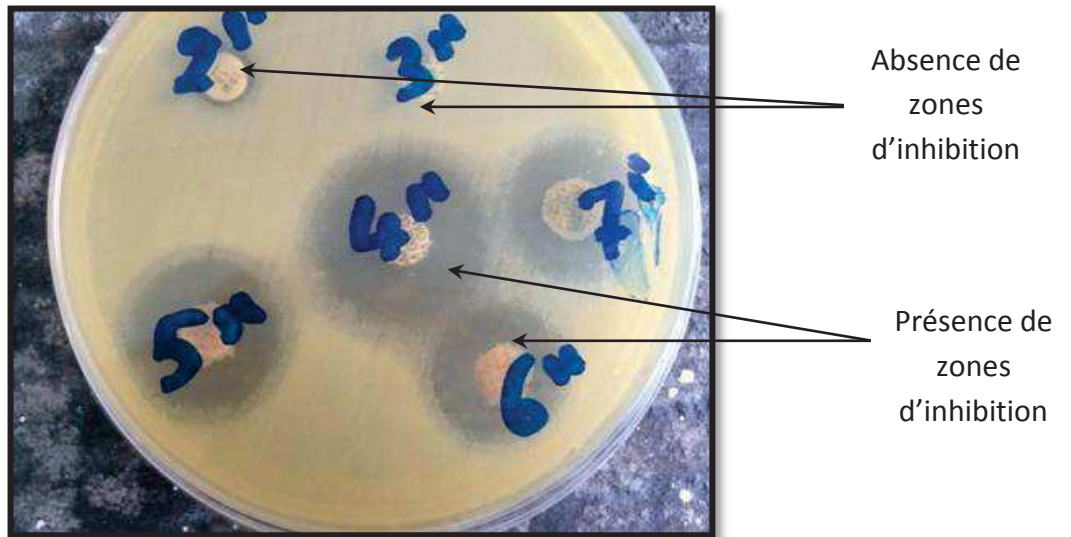


Figure 59. Exemple de zones d'inhibition

(Laboratoire de microbiologie, Faculté de Médecine, Université Badji Mokhtar).

1.9. Régression linéaire :

Dans le but de quantifier l'Antibiotique éliminé lors du processus d'épuration, une optimisation avec une droite de régression et son coefficient de corrélation a été réalisée (Figure. 60).

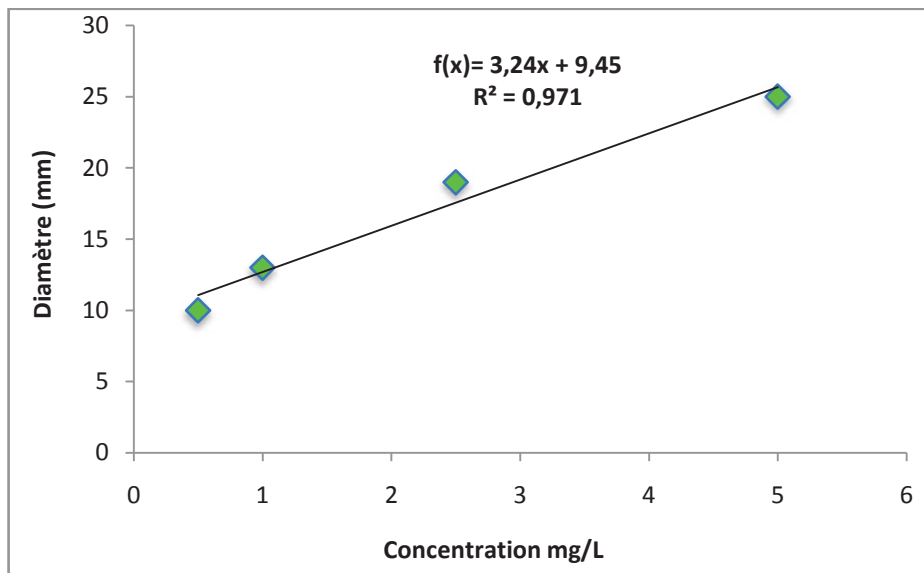


Figure 60. Régression linéaire exprimant les diamètres d'inhibition (mm) en fonction des concentrations de Ciprofloxacin testées (mg/L).

1.10. Pourcentage d'élimination de l'Antibiotique :

Les pourcentages d'élimination de la Ciprofloxaciné à partir de l'eau de culture sont calculés comme suit :

$$\% \text{ d'élimination} = 100 - [(C_t / C_0) \times 100]$$

C_0 et C_t : Les concentrations de l'Antibiotique aux temps t_0 et t .

1.11. Temps de Demi-vie de l'Antibiotique :

Le temps de Demi-vie a été calculé sur les bases des travaux de Hoang *et al.*, (2012) selon la formule :

$$C_t = C_0 \cdot e^{-kt}$$

C_0 et C_t : Les concentrations de l'Antibiotique aux temps t_0 et t .

k : La constante de vitesse.

1.12. Tests statistiques :

Les essais sont effectués à 3 reprises et les valeurs sont exprimées en moyennes \pm Ecart-types. Les valeurs dépendantes ont subi une analyse de la variance à 1 critère (ANOVA 1) en utilisant le logiciel de statistiques MINITAB 16.

2. Résultats :

2.1. Paramètres physico-chimiques :

2.1.1. Paramètres physico-chimiques pré-expérimentaux de l'eau :

Le tableau 7 représente les différents paramètres physico-chimiques de l'eau, au moment de son prélèvement ainsi qu'après son conditionnement.

Tableau 7 : Paramètres physico-chimiques pré-expérimentaux de l'eau.

Paramètres	Eau prélevée	Eau conditionnée
Température(C°)	14	14,3
pH	9,2	8,9
Salinité	2250	720
Conductivité (µS/cm)	4440	1460
MES (mg/L)	13,8	29
DBO ₅ (mg/L)	2,8	4,2
DCO (mg/L)	23,3	46,5
DCO/DBO ₅	8,32	11,07

Les résultats indiquent une pollution modérée conformément aux normes algériennes (JORA, 2006). Le conditionnement du milieu modifie quelque peu certains paramètres tels que la salinité et la conductivité. Par ailleurs, on constate une augmentation des MES de 13,8 à 29 mg/L.

2.1.2. Paramètres physico-chimiques post-expérimentaux de l'eau :

Les paramètres physico-chimiques de l'eau en fin d'expérience sont exprimés dans les tableaux (8) et (9).

Chapitre 3 : Résultats

Tableau 8 : Paramètres physico-chimiques post-expérimentaux de l'eau.

Paramètres	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3	Témoin 4	Traité 1	Traité 2	Traité 3
	<i>P. australis</i>	<i>T. latifolia</i>	<i>P. australis</i> + <i>T. latifolia</i>	ATB	<i>P. australis</i> + ATB	<i>T. latifolia</i> + ATB	<i>P. australis</i> + <i>T. latifolia</i> + ATB
Température (C°)	14	14	14	14	13,7	13,7	13,7
pH	7,9	7,9	7,9	8,9	8,4	8,1	7,7
Salinité	750	760	760	730	750	780	790
conductivité (μ S/cm)	1510	1540	1540	1480	1510	1570	1600
MES (mg/L)	59,5	43,5	41	36,5	36,5	41,5	78,5
DBO ₅ (mg/L)	4,7	4,6	5,1	7,3	6,7	4,6	17,3
DCO (mg/L)	72,8	29	52,2	47,6	38,4	28,8	107
DCO/DBO ₅	15,5	6,3	10,2	6,5	5,7	6,3	6,2

On constate que les paramètres sont assez perturbés, particulièrement pour le Traité 3 où les taux d'abattement indiquent une augmentation des MES de plus de 310%, il en est de même pour les demandes biologiques et chimiques de l'oxygène avec 130% et 170% respectivement.

Tableau 9 : Taux d'abattement des paramètres physico-chimiques.

Taux d'abattement	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3	Témoin 4	Traité 1	Traité 2	Traité 3
	<i>P. australis</i>	<i>T. latifolia</i>	<i>P. australis</i> + <i>T. latifolia</i>	ATB	<i>P. australis</i> + ATB	<i>T. latifolia</i> + ATB	<i>P. australis</i> + <i>T. latifolia</i> + ATB
DCO (%)	-11,9	-9,5	-21,4	-73,8	-59,5	-9,5	-311,9
DBO ₅ (%)	-56,56	37,63	-12,26	-2,37	17,42	38,06	-130,11
MES (%)	-105,17	-50	-41,38	-25,86	-25,86	-43,1	-170,69

2.2. Détermination du pouvoir épurateur:

2.2.1. Tests antibactériens :

Le tableau (10) exprime les différentes zones d'inhibition liées à l'exposition d'*E. coli* à l'eau des différentes cuves expérimentales.

Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des tests antimicrobiens, valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($m \pm e$).

	<u>Témoin 1</u> <i>P. australis</i>	<u>Témoin 2</u> <i>T. latifolia</i>	<u>Témoin 3</u> <i>P. australis</i> + <i>T. latifolia</i>	<u>Témoin 4</u> ATB	<u>Traité 1</u> <i>P. australis</i> + ATB	<u>Traité 2</u> <i>T. latifolia</i> + ATB	<u>Traité 3</u> <i>P. australis</i> + <i>T. latifolia</i> + ATB
Jours	Diamètres d'inhibition (mm)						
0,25	12,67 \pm 1,25	12,7 \pm 1,97	8,77 \pm 1,15	25,03 \pm 2,53	23,30 \pm 3,29	25,70 \pm 1,51	25,77 \pm 2,31
1	<6	<6	<6	24,67 \pm 1,1	23,67 \pm 1,4	24,70 \pm 0,53	25,97 \pm 0,12
2	<6	<6	<6	24,67 \pm 1,15	21 \pm 1	21,33 \pm 1,15	23,67 \pm 0,58
5	<6	<6	<6	24,57 \pm 0,31	20,33 \pm 0,21	20,27 \pm 0,55	20,87 \pm 0,67
7	<6	<6	<6	23,67 \pm 0,58	19,33 \pm 0,58	19,00 \pm 0,87	20,33 \pm 0,58
9	<6	<6	<6	23,50 \pm 0,5	19,50 \pm 0	18,85 \pm 0,21	20,33 \pm 0,29
Diminution du Diamètre (%)	-	-	-	6,11	16,30	26,65	21,1

Ainsi, chez les témoins 1, 2 et 3, les diamètres d'inhibition sont non significatifs du fait de l'absence de Ciprofloxacin dans l'eau, ce qui permet d'éliminer l'action d'éventuels résidus d'Antibiotiques antérieurs qui risqueraient de perturber les tests d'activité antibactérienne ; on note également, que les plantes utilisées n'ont pas influencé les diamètres d'inhibition de *E. coli*. Le 4^{ème} témoin quant à lui, sert à observer le comportement de la molécule dans ce milieu, le diamètre d'inhibition d'*E. coli* diminue sensiblement de 6 % contrairement à ceux exposés aux plantes épuratrices qui diminuent jusqu'à 26% (cas de la *T. latifolia*).

2.2.2. Détermination des quantités d'Antibiotique :

La figure (61) et le tableau (11) déterminent les quantités d'Antibiotique calculées grâce à l'optimisation avec la droite de régression.

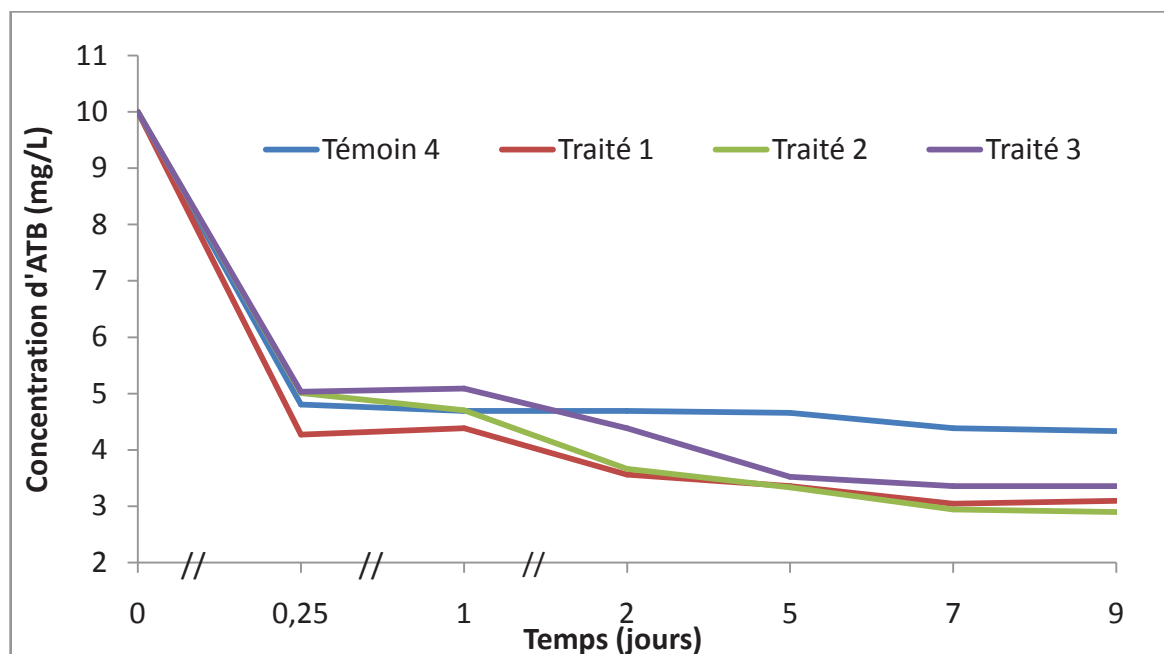


Figure 61. Concentrations de Ciprofloxacine (mg/L) en fonction du temps (jours).

Tableau 11 : Le pourcentage d'élimination (%) de la Ciprofloxacine tout au long de l'expérience.

Temps	% d'élimination de la Ciprofloxacine			
	Témoin 4	Traité 1	Traité 2	Traité 3
$J_0 - J_{0,25}$ (6h)	51,96	57,30	49,90	49,70
$J_1 - J_9$	9,84	27,43	42,15	33,30
$J_0 - J_9$	56,69	69,02	71,02	66,45

Les résultats mettent en évidence, un abattement d'environ 50 % de l'Antibiotique dans le milieu au bout des 6 premières heures seulement, chez les témoins comme chez les traités (Figure. 61).

Chapitre 3 : Résultats

Au-delà de ces premières heures, nous constatons une diminution du taux de Ciprofloxacine dans les échantillons d'eau dans laquelle les plantes ont séjourné. Ainsi, nous remarquons avec *T. latifolia* une diminution de 42,15 % contre seulement 27,43 % pour *P. australis*. En présence des deux plantes associées, nous remarquons une diminution de 33,3% (Tableau 11).

En fin d'expérience, nous constatons une diminution très hautement significative ($P= 0,000$). D'ailleurs, avec *T. latifolia*, la concentration de départ de Ciprofloxacine a été réduite de près de 71% (Tableau 11).

2.2.3. Détermination du temps de Demi-vie :

La figure (62) présente les temps de Demi-vie de la Ciprofloxacine en présence des deux plantes testées.

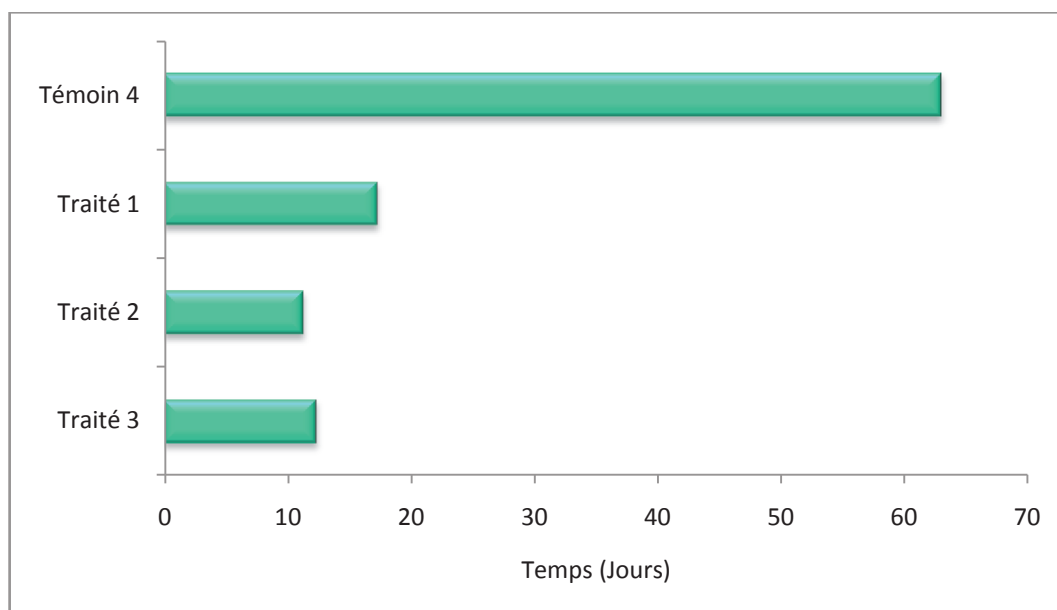


Figure 62. Le temps de Demi-vie de la Ciprofloxacine en présence des plantes épuratrices.

Les valeurs obtenues confirment l'effet épurateur des plantes utilisées, en effet, il varie entre 11 et 17 jrs en présence des *T. latifolia* et *P. australis* respectivement contre 63 jrs en absence de traitement.

3. Discussion :

Les Antibiotiques font partie des substances les plus rejetées quotidiennement dans l'environnement, des résidus persistants qui impactent l'ensemble de la chaîne alimentaire, avec principalement des phénomènes de résistances inquiétants. La phytoremédiation peut être une solution de dépollution intéressante, écologique et économique, elle offre des possibilités d'action prometteuses vis-à-vis des résidus pharmaceutiques.

D'ailleurs, dans ce travail, les essais effectués sur *P. australis* et *T. latifolia*, nous permettent de mettre en évidence le rôle épurateur de ces deux modèles végétaux. En fin d'expérience, le taux d'élimination de la Ciprofloxacine est d'environ 70 % pour les traités alors que le témoin atteint tout juste les 56 %. Nos résultats montrent que *T. latifolia* joue un rôle épurateur plus performant que *P. australis* (42,15 % et 27,43 % respectivement). En revanche, l'action des deux plantes associées conduit à un taux d'abattement de 33,3 %.

Nos résultats montrent que l'épuration de la Ciprofloxacine s'est effectuée en deux phases distinctes :

La première a lieu dès les premières heures de traitement (0-6h), avec une diminution de l'ATB dans le milieu de près de 50% chez les témoins comme chez les traités, ce résultat peut être justifié par le phénomène d'adsorption de la Ciprofloxacine sur les matières en suspension (MES). Plusieurs auteurs décrivent ce phénomène, et suggèrent qu'il est lié aux propriétés physico-chimiques de la molécule (Grassi *et al.*, 2013). En comparaison, au niveau des STEP, le taux d'élimination des Fluoroquinolones est d'environ 90%, mesuré dans l'eau épurée, soit la phase liquide des rejets (Miège *et al.*, 2009 ; Deblond *et al.*, 2011), En réalité, ce taux d'élimination est trompeur, il est plutôt dû au piégeage de l'Antibiotique sur la phase solide (la boue), sachant que les boues peuvent contenir jusqu'à 2 mg de Fluoroquinolones/kg de matière sèche. (Golet *et al.*, 2002 ; Giger *et al.*, 2003 ; Lindberg *et al.*, 2007). Ceci pose le problème du devenir des boues revalorisées en agriculture, elles vont plus servir à contaminer les sols plutôt qu'à les enrichir. Ainsi, le phénomène d'adsorption en soi, n'est en aucun cas une solution d'élimination du Xénobiotique, car contrairement à la

Chapitre 3 : Discussion

phytoépuration qui accumule et/ou métabolise le xénobiotique, l'adsorption elle, ne fait que déplacer le polluant d'une phase à une autre, et ainsi, faire emprunter un circuit différent au polluant. D'ailleurs, des Quinolones/Fluoroquinolones, ont été détectés dans une carotte sédimentaire d'un fleuve fortement anthropisé depuis plus de 50 ans en France (Tamtam *et al.*, 2011).

La seconde phase d'épuration a lieu au-delà des 6 premières heures, pendant laquelle le pourcentage d'élimination de l'ATB dans le milieu est supérieur au témoin, 17,59 % pour *P. australis* et 32,31 % pour *T. latifolia*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Zhang *et al.*, (2015) ; ils démontrent que *T. latifolia* et *P. australis* sont les plantes les plus efficaces pour l'élimination de l'Ibuprofène ; à la fin de leur expérience, l'accumulation au niveau des plantes était très faible, suggérant que ces dernières agissaient en facilitant la dégradation du xénobiotique par la libération d'exsudats racinaires. Dordio *et al.*, (2009) de leur côté, ont également évalué la capacité de *Typha sp* à résister et à éliminer un hypolipémiant l'Acide Clofibrac (AC) de l'eau, à une concentration de 20 µg/L, le taux d'abattement avec *Typha* est de plus de 50% dans les premières 48 heures, il atteint même 80% au bout de 21 jours ; tout cela en l'absence de photo-dégradation, d'adsorption sur les parois des vaisseaux et de dégradation microbienne ; cette exposition n'a même pas affecté la photosynthèse de *Typha* ; une augmentation globale de l'activité enzymatique (GPx, Catalase, SOD) indique que même si la plante est affectée par le xénobiotique, elle a pu faire face aux dommages oxydatifs de l'AC, confirmant sa capacité de phytoremédiation. Liu *et al.*, (2013) démontrent aussi que *P. australis* accumule les ATB par absorption passive. Gujarathi *et al.*, (2005) ont également observé une forte réduction de la Tétracycline, en présence d'une plante aquatique *Myriophyllum aquaticum*. Buser *et al.*, (1999) ont réussi à l'aide des plantes à éliminer 95% de résidus d'Ibuprofène dans des eaux usées. Selon Herklotz *et al.*, (2010), le chou est capable de fixer un nombre varié de résidus tels que les pesticides, les Antibiotiques et autres substances organiques, il en est de même pour le ray-grass (Winker *et al.*, 2010), le peuplier (Burken & Schnoor, 1997) et l'iris aquatique (Wang *et al.*, 2010). Li, (2014) a mis en évidence la capacité de *Cyperus alternifolius* et *Eichhornia crassipe* à diminuer les résidus de Lévonorgestrel présents dans l'eau en les bio-transformant, pareillement pour *Armoracia rusticana*, Huber *et al.*, (2009) ont constaté que la plante est en mesure d'absorber et d'éliminer les résidus de Paracétamol.

Chapitre 3 : Discussion

L'action modérée de *P. australis* peut se justifier par la toxicité de la Ciprofloxacine, Liu *et al.*, (2013) remarquent que les roseaux peuvent tout à fait tolérer, accumuler et ainsi épurer la Ciprofloxacine ; mais lorsqu'ils sont exposés à des concentrations faibles (<10 µg/L), au-delà de ces teneurs, les feuilles et les racines sont affectées, avec une augmentation de la SOD, de la Catalase et de la Peroxydase.

Le $T_{1/2}$ de la Ciprofloxacine, en l'absence et en présence des plantes épuratrices, nous permet de confirmer que *T. latifolia* est plus performante avec un $T_{1/2}$ de 11 jrs pour la Ciprofloxacine contre 63 jrs chez le témoin. Egalement, Hoang *et al.*, (2012) confirment l'action épuratrice des plantes *C. zizanioides* et *C. demersum*, avec des $T_{1/2}$ compris entre 14 et 16 jrs pour des concentrations de 5 et 10 mg/L de Ciprofloxacine. De plus, le phénomène de photo-dégradation peut jouer un rôle dans l'élimination des résidus pharmaceutiques. Ainsi, Hoang & Loan, (2014) ont obtenu un $T_{1/2}$ de la Ciprofloxacine de 9 jrs en présence de lumière contre 16 jrs dans l'obscurité.

Dans les STEP, la photolyse par les ultra-violets et l'adsorption lors des traitements des eaux usées, sont les deux processus majeurs impliqués dans la dégradation et/ou élimination des Fluoroquinolones. En absence de photolyse, l'adsorption devient donc, le processus majoritaire de l'élimination de la Ciprofloxacine (Githinji *et al.*, 2011). Ce qu'il faut néanmoins savoir, c'est que sur le terrain, cette photo-dégradation se fait dans des conditions environnementales particulières, (Types de rayons UV, pH, salinité...) (Andreozzi *et al.*, 2003 ; Cardoza *et al.*, 2005 ; Ge *et al.*, 2010). Cela justifie l'élimination relativement lente de la Ciprofloxacine dans l'environnement naturel, même si elle est en principe photodégradable, et qu'elle soit, retrouvée dans les eaux de surface (Giger *et al.*, 2003 ; Tuan & Munekage, 2004 ; Duong *et al.*, 2008). D'un autre côté, (Turiel *et al.*, 2004 ; Alexy *et al.*, 2004 ; Chenxi *et al.*, 2008) soulignent aussi que La plupart des Fluoroquinolones ne sont pas bio-transformables ou biodégradables.

Conclusion générale
et perspectives

3. Conclusion générale et perspectives :

Dans le monde actuel, les substances pharmaceutiques sont essentielles à la santé de l'homme et de l'animal, en effet, elles augmentent la qualité voire même l'espérance de vie. Mais malgré cela, beaucoup de chercheurs s'intéressent ces dernières années au devenir de ces substances dans l'environnement, ainsi qu'à leurs impacts écologiques. D'ailleurs, leur accumulation tout au long de la chaîne alimentaire est particulièrement redoutée, en raison des atteintes multiples y compris sur l'homme.

Dans un premier temps, et par le biais d'une étude épidémiologique préliminaire, nous nous sommes intéressés à la consommation des médicaments par l'homme et l'animal, qu'ils soient prescrits ou par automédication, nous avons déterminé les catégories thérapeutiques les plus consommées à Annaba, il s'agit des Anti-infectieux avec presque une prescription sur deux, et des Analgésiques. D'ailleurs, la pratique d'auto-administration des médicaments ou automédication, est apparue comme une pratique assez répandue dans la société quelque soit l'âge, le sexe ou le niveau d'instruction.

En plus de l'excrétion naturelle des médicaments après leur consommation et leur acheminement vers les eaux usées, nous nous sommes rendus compte que plus de 65% des médicaments non utilisés ou périmés finissaient dans nos poubelles ménagères, donc, dans nos décharges publiques, qui par lessivage de leur lixiviat, finissent par contaminer et polluer nos sols.

Dans un second temps, et dans l'intérêt d'évaluer l'impact de ces résidus pharmaceutiques sur des organismes non visés, nous avons pratiqué des tests toxicologiques sur un modèle de laboratoire *Paramecium sp*, évaluant leurs effets sur la croissance cellulaire, le métabolisme respiratoire ainsi que l'évolution de certains biomarqueurs du stress oxydatif.

Conclusion générale et perspectives

Sur les quatre molécules testées (Diclofénac, Aténolol, Erythromycine et Lévonorgestrel), les quatre ont manifesté un effet toxique chez les Paramécies, la cinétique de croissance s'est significativement ralentie par rapport aux témoins, avec la mise en place d'un système de défense antioxydant. En effet, nous avons constaté dans tous les cas, une accélération du métabolisme respiratoire, signe de stress cellulaire, et une augmentation de l'activité de la GST, accompagnée d'une diminution du taux de GSH. Nous avons même conclu à des lésions membranaires caractérisées par l'augmentation du taux de MDA dans le cas de l'Aténolol et de l'Erythromycine.

Pour finir, nous avons pensé à expérimenter un modèle d'épuration qui a déjà fait ses preuves par le passé, il s'agit de la phytoépuration, un procédé écologique, économique et facilement applicable. Pour cela, deux plantes macrophytes spontanées et disponibles ont été utilisées : *Phragmites australis* et *Typha latifolia*, le choix de l'Antibiotique s'est porté sur un fluoroquinolone « Ciprofloxacine », avec son action à large spectre, il est largement prescrit par le corps médical et par conséquent, parmi les Antibiotiques les plus persistants dans l'environnement.

Les résultats obtenus lors de notre expérience sont en faveur d'un bon pouvoir épurateur des plantes testées, avec une meilleure performance pour *T. latifolia*. D'ailleurs les temps de Demi-vie de la Ciprofloxacine en présence des plantes épuratrices sont de quelques jours seulement.

Des résultats forts encourageants nous poussent à remettre en question les procédés actuels de traitement des eaux usées dans les STEP, qui brillent par leur inefficacité vis-à-vis des polluants pharmaceutiques.

En associant différents processus de dégradations (L'adsorption aux matières solides, La phyto-épuration, La photo-dégradation et autres), on pourrait optimiser les taux d'élimination des résidus pharmaceutiques, et apporter ainsi, une nouvelle réflexion quant à l'élimination de ces polluants.

Conclusion générale et perspectives

Naturellement, d'autres perspectives de recherche s'imposent à nous afin de compléter ce travail, nous pouvons en citer quelques-unes :

- Etendre nos enquêtes sur le territoire national, afin de déterminer les quantités et les catégories de médicaments déversés chaque jour dans notre environnement.
- Effectuer des analyses qualitatives et quantitatives de résidus pharmaceutiques dans différents échantillons environnementaux.
- Evaluer les capacités et performances des procédés d'épuration utilisés en STEP (boue activée...) vis-à-vis des résidus pharmaceutiques.
- Effectuer des tests biochimiques, enzymatiques et comportementaux avec les médicaments et leurs mixtures, sur d'autres organismes animaux et végétaux non visés.
- Procéder au suivi du système oxydatif (ROS) ainsi qu'à la mesure des composés antioxydants biologiques (BAPs).
- Tester le pouvoir épurateur des plantes sur d'autres groupes de médicaments persistants tels que les AINS ou les Hormones.
- Optimiser la phytoépuration en y associant d'autres voies de dégradation telles que la photo-dégradation ou la biodégradation.

Références bibliographiques

4. Références bibliographiques :

- Aassiri A., 2001.** Impact des eaux usées déversées par Oued Sebou sur le littoral de l’océan atlantique : Évaluation de la contamination par les métaux toxiques. Mémoire de DESA, INRH, Université Mohammed V, faculté des sciences, Rabat.
- Abay S.M & Amelo W., 2010.** Assessment of self-medication practices among medical, pharmacy, and health science students in gondar university, Ethiopia. *J Young Pharm*(3): 306-310.
- AFIPA., 2015.** 14^{ème} Baromètre AFIPA des produits du selfcare.
- Alder A.C., Mc Ardell C.S., Golet E.M., Ibric S., Molnar E., Nipales N.S & Giger W., 2001.** Occurrence and fate of fluoroquinolone, macrolide, and sulfonamide antibiotics during wastewater treatment and in ambient waters in Switzerland. *ACS Symp Ser* (791): 56-69.
- Alexy R., Kümpel T & Kümmerer K., 2004.** Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed bottle test. *Chemosphere* (57): 505-512.
- Amore B.M., Kalthorn T.F., Skiles G.L., Hunter A.P., Bennett G.D., Finnell R.H., Nelson S.D & Slattery J.T., 1997.** Characterization of carbamazepine metabolism in a mouse model of carbamazepine teratogenicity. *Drug Metabol Dispos* (25): 953-962.
- Andersen L., Holbech H., Gessbo A., Norrgren L & Petersen G.I., 2003b.** Effects of exposure to 17 alpha-ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* (134): 365-374.
- Andreozzi R., Raffaele M & Nicklas P., 2003.** Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50(10): 1319-1330.
- Ankley G.T., Brooks B.W., Huggett D.B & Sumpter J.P., 2007.** Repeating history: pharmaceuticals in the environment. *Environ Sci Technol* (41): 8211-8217.

Références bibliographiques

- ANSM., 2013.** Agence nationale de la sécurité du médicament et des produits de santé. Rapport. Analyse des ventes de médicaments en France 2012.
- Arnott J.A & Planey S.L., 2012.** The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opin Drug Discov* 7(10): 863-875.
- Aronson J.K., 2001.** “Antibiotics and anti-infective drugs”. In: The Oxford Companion to Medicine. Lock S., Last J.M & Dunea G., (Eds.), Oxford University Press.
- Awad A.I., Eltayeb B.I & Capps P.A., 2006.** Self-medication practices in Khartoum State, Sudan. *Eur J Clin Pharmacol* (62): 317-324.
- Azaizeh H., Salhani N., Sebesvari Z & Emons H., 2003.** The potential of rhizosphere microbes isolated from a constructed wetland to biomethylate selenium. *J Environ Qual* (32): 55-62.
- Baquero F., Martínez J & Cantón R., 2008.** Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* (19): 260-265.
- Barnes K.K., Kolpin D.W., Furlong E.T., Zaugg S.D., Meyer M.T & Barber L.B., 2008.** A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—I) groundwater. *Sci Total Environ* (402): 192–200.
- Batt A.L., Bruce I.B & Aga D.S., 2006.** Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. *Environ Pollut* (142): 295-302.
- Bendz D., Paxéus N.A., Ginn T.R & Loge F.J., 2005.** Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of hazardous materials* (122): 195-204.
- Benotti M., Trenholm R.A., Vanderford B.J., Holady J.C., Stanford B.D & Snyder S.A., 2009.** Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S drinking water. *Environ Sc Technol* (43): 597-603.

Références bibliographiques

- Besse J.P., 2010.** Impact environnemental des médicaments à usage humain sur le milieu récepteur : évaluation de l'exposition et des effets biologiques pour les écosystèmes d'eau douce. Thèse de doctorat, l'Université de Metz, France. 309p.
- Blasco J & Delvals A., 2008.** Impact of Emergent Contaminants in the Environment : Environmental Risk Assessment. *Hdb Env Chem* (5): 169-188.
- Borgmann U., Bennie D.T., Ball A.L & Palabrica V., 2007.** Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations. *Chemosphere* (66): 1278-1283.
- Bottoni P., Caroli S & Barra Caracciolo A., 2010.** Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicol Environ Chem* (92): 549-565.
- Boulassel A., 2013.** Evaluation de la toxicité de deux médicaments: le Paracétamol et l'ibuprofène, sur un modèle cellulaire: *Paramecium tetraurelia*. Thèse de doctorat, Faculté Badji Mokhtar, Annaba, 134p.
- Bound J.P & Voulvoulis N., 2005.** Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environ Health Perspect* (113): 1705-1711.
- Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the Principe of protein-dye binding. *Anal Biochem* (72): 278-254.
- Braund R., Peake B.M & Shieffelbien L., 2009.** Disposal practices for unused medications in New Zealand. *Environment international* (35): 952-955.
- Buchsbaum R., Buchsbaum M., Pearse J & Pearse V., 1987.** *Animals Without Backbones*, 3rd Ed. University of Chicago Press, Chicago.
- Bueno M.J., Gomez M.J., Herrera S., Hernando M.D., Agüera A & Fernández-Alba A.R., 2012.** Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot survey monitoring. *Enviro. Pollut* (164): 267-273.

Références bibliographiques

- Bui V.H., 2014.** Contribution à l'étude de la présence et du devenir des résidus de médicaments dans les compartiments aquatiques. Thèse de doctorat en chimie analytique et environnement, Université de Bordeaux. 235p.
- Burken J.G & Schnoor J.L., 1997.** Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. *Environ Sci Technol* 31 (5): 1399-1406.
- Burkina V., Zlabeka V & Zamaratskaia G., 2015.** Effects of pharmaceuticals present in aquatic environment on Phase I metabolism in fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (40): 430-444.
- Buser H.R., Poiger T & Mueller M.D., 1999.** Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environ Sci Technol* (33): 2529-2535.
- Campion S., Catlin N., Heger N., Mc Donnell E., Pacheco S., Saffarini C., Sandrof M & Boekelheide K., 2012.** Male reprotoxicity and endocrine disruption. *EXS* (101): 315-360.
- Carballa M., Omil F., Lema J.M., Lompart M., Garcia-Jares C., Rodriguez I., Gomez M & Ternes T., 2004.** Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res* (38): 2918-2926.
- Cardoza L.A., Knapp C.W., Larive C.K., Belden J.B., Lydy M. & Graham D.W., 2005.** Factors affecting the fate of ciprofloxacin in aquatic field systems. *Water Air Soil Pollut* (161): 383-398.
- Carlsson C., Johansson A.K., Alvan G., Bergman K & Kühler T., 2006.** Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of the Total Environment* (364): 67-87.
- Carvalho P.N., Basto M.C.P., Almeida C.M.R & Brix H., 2014.** A review of plant pharmaceutical interactions: from uptake and effects in crop plants to phytoremediation in constructed wetlands. *Environ Sci Pollut Res* (21): 1-35.
- Casellas C., Carre J., Duchemin J., Levi Y., Mazellier P., Montiel A & Rosin C., 2010.** Résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine : Volet

Références bibliographiques

«Méthodologie générale d'évaluation de l'exposition de l'Homme aux résidus de médicaments via l'eau destinée à la consommation humaine ». AFSSA, p26.

CA-SFM EUCAST., 2014. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

Chang H., Wu S., Hu J., Asami M & Kunikane S., 2008. Trace analysis of androgens and progesterones in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromato A* (1195): 44-51.

Chenxi W., Spongberg A.L & Witter J.D., 2008. Determination of the persistence of pharmaceuticals in biosolids using liquid-chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere* (73): 511-518.

Chiribagula V.B., Mboni H.M., Amuri S.B., Sangwa G., Byanga J.K., Duez P & Lumbu Simbi J.B., 2015. Prévalence et caractéristiques de l'automédication chez les étudiants de 18 à 35 ans résidant au Campus de la Kasapa de l'Université de Lubumbashi, *Pan African Medical Journal* (8688): 1-12.

Christensen A.M., Ingerslev F & Baun A., 2006. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. *Environ Toxicol Chem* (25): 2208-2215.

Claessens M., Vanhaecke L., Wille K & Janssen C.R., 2013. Emerging contaminants in Belgian marine waters: single toxicant and mixtures risk of pharmaceuticals. *Mar Pollut Bull* (71): 41-50.

Cleuvers M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters* (142): 185-194.

Cleuvers M., 2005. Initial risk assessment for three β -blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* (59): 199-205.

Colborn T & Clément C., 1992. Chemically-induced alterations in sexual and functional development : the wildlife/human connection. Princeton Scientific Publishing, Princeton.

Références bibliographiques

- Colborn T., Vom Saal F.S & Soto A.M., 1993.** Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspec* (101): 378-384.
- Combalbert S & Hernandez-Raquet G., 2010.** Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Appl Microbiol Biotechnol* (86): 1671-1692.
- Contardo-Jara V., Lorenz C., Pflugmacher S., Nützmann G., Kloas W & Wiegand C., 2011.** Molecular effects and bioaccumulation of levonorgestrel in the non-target organism *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution* 159(1): 38-44.
- Contardo-Jara V., Pflugmacher S., Nützmann G., Kloas W & Wiegand C., 2010.** The β -receptor blocker metoprolol alters detoxification processes in the non-target organism *Dreissena polymorpha*. *Environ Pollut* (158): 2059-2066.
- Corliss J.O., Lacy D & Palay S.O., 1961.** Fixing and staining of Protozoa in the Microtome's Vade-Mecum (Bolles-Lee). XII (Ed.), London.
- Costanzo S., Murby J & Bates J., 2005.** Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin* (51): 218-223.
- Cronk J. K & Fennessy MS., 2001.** Wetland Plants, Biology and Ecology. Lewis Publishers, USA, 462p.
- Cui L.H., Ouyang Y., Gu W.J., Yang W.Z & Xu Q.L., 2013.** Evaluation of nutrient removal efficiency and microbial enzyme activity in a baffled subsurface-flow constructed wetland system. *Bioresour Technol* (146): 656-662.
- Daughton C.G & Ternes T.A., 1999.** Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect* 107 (6): 907-938.
- Dave G & Herger G., 2012.** Determination of detoxification to *Daphnia magna* of four pharmaceuticals and seven surfactants by activated sludge. *Chemosphere* (88): 459-466.
- Deblonde T., Cossu-Leguille C & Hartemann P., 2011.** Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int J Hyg Environ Health* (214): 442-248.
- Derradji M., 2015.** Contribution à l'étude de la tolérance des plantes épuratrices dans l'épuration des eaux usées : stratégie et application. Thèse de doctorat en

Références bibliographiques

Toxicologie, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie. 140p.

- Derwich E., Benaabidate L., Zian A., Sadki O & Belghity D., 2010.** Caractérisation physicochimique des eaux de la nappe alluviale du haut sebou en aval de sa confluence avec oued Fes. *Larhyss Journal* (8): 101-112.
- Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P & Waldock M., 1998.** Identification of estrogenic chemicals in STW effluent: 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Environ Sci Technol* (32): 1549-58.
- Djebar M.R & Djebar H., 2000.** Bioénergétique, les mitochondries végétales, Synthèse (8): 23-25.
- Doi H & Horie T., 2010.** Salicylic acid-induced hepatotoxicity triggered by oxidative stress. *Chem-Biol Interact* 183 (3): 363-368.
- Doi H., Iwasaki H., Masubuchi Y., Nishigaki R., & Horie T., 2002.** Chemiluminescence associated with the oxidative metabolism of salicylic acid in rat liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions* (140): 109-119.
- Dordio A.V., Duarte C., Barreiros M., Carvalho A.J.P., Pinto A.P & Da Costa C.T., 2009.** Toxicity and removal efficiency of pharmaceutical metabolite clofibric acid by *Typha spp* potential use for phytoremediation? *Bioresour Technol* (3): 1156-1161.
- Dorne J.L., Skinner L., Frampton G.K., Spurgeon D.J & Ragas A.M., 2007.** Human and environmental risk assessment of pharmaceuticals: differences, similarities, lessons from toxicology. *Anal Bioanal Chem* (387): 1259-1268.
- Draper H.H & Hadley M., 1990.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol* (186): 241-431.
- Duong H.A., Pham N.H., Nguyen H.T., Hoang T.T., Pham H.V., Pham V.C., Berg M., Giger W & Alder A.C., 2008.** Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Viet Nam. *Chemosphere* (72): 968-973.
- Eades C & Waring CP., 2010.** The effects of diclofenac on the physiology of the green shore crab *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res* (69): 46-48.
- Ekedahl A., 2006.** Reasons why medicines are returned to Swedish pharmacies unused.

Références bibliographiques

Pharmacy World & Science 28 (6): 352-358.

El-Bassat R.A., Touliabah H.E & Harisa G.I., 2012. Toxicity of four pharmaceuticals from different classes to isolated plankton species. *Afr J Aquat Sci* 37(1): 71-80.

Esser D & Pronost J., 2005. Traitement de l'azote et du phosphore des stations filtres plantées de roseaux pour dépasser le niveau d'épuration D4. *Environnement et Technique* (246): 35-41.

Fardeheb Y., 2015. Evaluation du phénomène d'automédication dans la Wilaya de Tlemcen. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Tlemcen, Algérie. 117p.

Fauteux A., 2002. Des roseaux contre les eaux usées. Revue de la science au Québec. Nouvelle édition, p340.

Fenchel T., 2008. The microbial loop – 25 years later. *J Exp Mar Biol Ecol* (366): 99-103.

Fent K., Weston A.A & Caminada D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* 76 (2): 122-159.

Fernandes D., Pujol S., Aceña J., Perez S., Barceló D & Porte C., 2014. The in vitro interference of synthetic progestogens with carp steroidogenic enzymes. *Aquat Toxicol* (155): 314-321.

Flippin J.L., Huggett D & Foran C.M., 2006. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in japanese medaka *Oryzias latipes*. *Aquat Toxicol* (76): 193-204.

Flippin J.L., Huggett D & Foran C.M., 2007. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka *Oryzias latipes*. *Aquat Toxicol* (81): 73-78.

Flynn W.T., 2012. The judicious use of medically important antimicrobial drugs in food-producing animals, center for veterinary medicine (HFV- 1), Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services.

Focazio M.J., Kolpin D.W., Barnes K.K., Furlong E.T., Meyer M.T., Zaugg S.D., Barber L.B & Thurman M.E., 2008. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water

Références bibliographiques

- sources. *Science of the Total Environment* (402): 201-216.
- Fok A.K & Paeste R.M., 1982.** Lysosomal enzymes of *Paramecium caudatum* and *Paramecium tetraurelia*. *Exp Cell Res* (1396): 159-169.
- Forbes V.E & Calow P., 1999.** Is the per capita rate of increase a good measure of population level effects in ecotoxicology ? *Environ Toxicol Chem* (18): 1544-1556.
- Gagnon V., 2012.** Effet de l'espèce de plante en marais filtrants artificiels selon la saison, le type de marais filtrant et la nature des polluants. Rapport de Thèse de Doctorat. Université de Montréal, Canada.
- Gao L., Shi Y., Li W., Niu H., Liu J & Cai Y., 2012a.** Occurrence of antibiotics in eight sewage treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere* (86): 665-671.
- Garrison A.W., Pope J.D & Allen F.R., 1976.** Identification and analysis of organic pollutants in water. In : Keth C.H (Ed), Ann Arbor Science, Ann Arbor, 517-566.
- Gaugous D., 1995.** La pollution des milieux aquatiques. Aide-mémoire, 2ème édition. Edition Masson, 136p.
- Ge L., Chen J., Wei X., Zhang S., Qiao X., Cai X & Xie Q., 2010.** Aquatic photochemistry of fluoroquinolone antibiotics, kinetics, pathways, and multivariate effects of main water constituents. *Environ Sci Technol* (44): 2400-2405.
- Giger W., Alder A.C., Golet E. M., Kohler H.P.E., Mc Ardell C.S., Molnar E., Siegrist H & Suter M.J.F., 2003.** Occurrence and Fate of Antibiotics as Trace Contaminants in Wastewaters, Sewage Sludges, and Surface Waters. *CHIMIA* 57(9): 485-491.
- Giri P & Pal C., 2014.** Ecotoxicological Aspects of Pharmaceuticals on Aquatic Environment. *American Journal Of Drug Discovery* (1): 10-24.
- Githinji L.J.M., Musey M.K & Ankumah R.O., 2011.** Evaluation of the Fate of Ciprofloxacin and Amoxicillin in Domestic Wastewater. *Water Air & Soil Pollution* 219(1): 191-201.
- Golet E.M., Strehler A., Alder A.C & Giger W., 2002.** Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Analytical Chemistry* (74): 5455-5462.

Références bibliographiques

- Gomez M.J., Martinez Bueno M.J., Lacorte S., Fernandez-Alba A.R & Aguera A., 2007.** Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* (66): 993-1002.
- Grassi M., Rizzo L & Farina A., 2013.** Endocrine disruptors compounds, pharmaceuticals and personal care products in urban wastewater: implications for agricultural reuse and their removal by adsorption process. *Environ Sci Pollut Res* (6): 3616-3628.
- Greczek-Stachura M., Pothekin A., Przyboś E., Rautian M., Skoblo I & Tarcz S., 2012.** Identification of *Paramecium bursaria* syngens through molecular markers – comparative analysis of three loci in the nuclear and mitochondrial DNA. *Protist* (163): 671-685.
- Green R.E., Newton I., Shultz S., Cunningham A.A., Gilbert M., Pain D.J & Prakash V., 2004.** Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian subcontinent. *J Appl Ecol* (41): 793-800.
- Gros M., Petrović M., Ginebreda A & Barceló D., 2011.** Sources, Occurrence, and Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals in the Ebro River Basin. In : Barceló D. & Petrović M (Ed.), *The Ebro River Basin, Hdb Env Chem*, Berlin Heidelberg, 209-237.
- Guillette L.J.Jr., 2000.** Contaminant-induced endocrine disruption in wildlife. *Growth Horm IGF Res* 10 (Suppl B): 45-50.
- Gujarathi N.P., Haney B.J & Linden J.C., 2005.** Phytoremediation potential of *Myriophyllum aquaticum* and *Pistia stratiotes* to modify antibiotic growth promoters, tetracycline, and oxytetracycline, in aqueous wastewater systems. *Int J Phytoremed* 7(2): 99-112.
- Gyllenhammar I., Holm L., Eklund R & Berg C., 2009.** Reproductive toxicity in *Xenopus tropicalis* after developmental exposure to environmental concentrations of ethynylestradiol. *Aquat Toxicol* (91): 171-178.
- Haap TR., Triebkorn & Köhler H. 2008.** Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna* : immobilisation and hsp70-induction. *Chemosphere* (73): 353-359.
- Habig W.H., Pabst M.J & Jakoby W.B., 1974.** Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249 (22): 7130-7139.

Références bibliographiques

- Haguenoer J.M., 2010.** Les résidus de médicaments présentent-ils un risque pour la santé publique? *Santé publique* 22 (3): 325-342.
- Halling-Sørensen B., 2001.** Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Arch Environ Contam Toxicol* (40): 451-460.
- Halling-Sorensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Lutzhoft H.C.H & Jorgensen S.E., 1998.** Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review -. *Chemosphere* (36): 357-394.
- Han G.H., Hur H.G & Kim S.D., 2006.** Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea : occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* (25): 265-271.
- Han S., Choi K., Kim J., Ji K., Kim S., Ahn B., Yun J., Choi K., Khim J.S., Zhang X & Giesy J.P., 2010.** Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat Toxicol* (98): 256-264.
- Hartmann A., Alder A.C., Koller T & Widmer R.M., 1998.** Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(3): 377-382.
- Heberer T., 2002.** Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* (131): 5-17.
- Heckmann L.H., Callaghan A., Hooper H.L., Connon R., Hutchinson T.H., Maund S.J & Sibly R.M., 2007,** Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters* (172): 137-145.
- Heidler J & Halden, R.U. 2008.** Meta-Analysis of Mass Balances Examining Chemical Fate during Wastewater Treatment. *Environmental Science & Technology*, 42 (17): 6324-6332.
- Herklotz P.A., Gurung P., Vanden Heuvel B & Kinney C.A., 2010.** Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere* (78): 1416-1421.

Références bibliographiques

- Hernando M.D., Mezcua M., Fernandez-Alba A.R & Barcelo D., 2006.** Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69 (2): 334-342.
- Hignite C & Azarnoff D.L., 1977.** Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci* (20): 337-341.
- Hinrichsen R.D., Schultz J.E., 1988.** *Paramecium*: a model system for the study of excitable cells. *Trends Neurosci* (11): 27-32.
- Ho Y.B., Zakaria M.P., Latif P.A & Saari N., 2012.** Simultaneous determination of veterinary antibiotics and hormone in broiler manure, soil and manure compost by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* (1262): 160-168.
- Hoang T.T & Loan T., 2014.** Degradation of Selected Pharmaceuticals in Coastal Wetland Water and Sediments. *Water Air Soil Pollut* (225): 1940.
- Hoang T.T., Loan T., Nga P.L & Quoc P., 2012.** Fate of fluoroquinolone antibiotics in Vietnamese coastal wetland ecosystem. *Wetlands Ecol Manage* (20): 399-408.
- Hoang T.T.T., Tu L.T.C., Le N.P & Dao Q.P., 2012.** A preliminary study on the phytoremediation of antibiotic contaminated sediment. *Int J Phytoremed* 15(1): 65-76.
- Huang C.H., Renew J.E., Smeby K.L., Pinkerston K & Sedlak D.L., 2001.** Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. *Water Resour* (20): 30-40.
- Huber C., Bartha B., Harpaintner R & Schröder P., 2009.** Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants - two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *ESPR* 16(2): 206-213.
- Huggett D.B., Brooks B.W., Peterson B., Foran C.M & Schlenk D., 2002.** Toxicity of select Beta Adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Arch Environ Contam Toxicol* (43): 229-235.

Références bibliographiques

- Hussein E.T., Randa E.A., El-Shimmy A & Gamal I.H., 2008.** Oxidative stress of plankton community and some isolated species during paracetamol toxicity. *test J Biol Sc* (8): 13-23.
- IMS Health., 2008.** Global Pharmaceutical and Therapy Forecast. IMS Health, Norwalk, Connecticut, USA.
- Jelic A., Gros M., Ginebreda A., Cespedes-Sánchez R., Ventura F., Petrovic M & Barceló D., 2011.** Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Res* (45): 1165-1176.
- Ji K., Liu X., Lee S., Kang S., Kho Y., Giesy J.P & Choi K., 2013.** Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic- pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. *J Hazard Mater* : 254-255.
- Journal Officiel de la République Algérienne., 2006.** Les valeurs limites des paramètres de rejet dans un milieu récepteur. Art. n°26 (23 avril).
- Joyeux M., 2006.** Résidus médicamenteux et risques sanitaires d'origine hydrique. *Environ Risques Santé* (5): 301-306.
- Katz B.G & Griffin D.W., 2008.** Using chemical and microbiological indicators to track the impacts from the land application of treated municipal wastewater and other sources on groundwater quality in a karstic springs basin. *Environmental Geology* (55): 801-821.
- Keil F., 2008.** Les Moyens d'Intervention pour Réduire la Pollution de l'Eau : Principes Actifs de Médicaments pour l'Homme. Guide Pratique. In : ISOE GmbH (Ed.), Francfort-sur-le-Main, Allemagne, 49p.
- Khetan S.K & Collins T.J., 2007.** Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to Green Chemistry. *Chem Rev* (107): 2319-2364.
- Kidd K.A., Blanchfield P.J., Mills K.H., Palace V.P., Evans R.E., Lazorchak J.M & Flick R.W., 2007.** Collapse of a fish population after exposure to synthetic estrogen. *P Natl Acad Sci USA* (104): 8897-8901.
- Kleche M., 2013.** Utilisation des systèmes biologiques dans l'épuration des eaux usées cas de la région de Annaba. Thèse de doctorat en Biologie Végétale, Université Badji

Références bibliographiques

Mokhtar, Annaba, Algérie. 135p.

Kobayashi M., Sorensen P.W & Stacey N.E., 2002. Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiol Biochem* (26): 71-84.

Kohanski M. A., De Pristo M.A & Collins J.J., 2010. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular cell* 37 (3): 311-320.

Kolodziej E.P., Gray J.L & Sedlak D.L., 2003. Quantification of steroid hormones with pheromonal properties in municipal wastewater effluent. *Environ Toxicol Chem* (22): 2622-2629.

Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D & Buxton H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol* (36): 1202-1211.

Konate L., 2005. Etude de l'automédication dans les officines de la ville de Sikasso. Thèse de doctorat, Université de Bamako. 78p.

Kosmala A., Charvet S., Roger M.C & Faessel., 1999: impact assessment of a wastewater treatment plant effluents using in stream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Water res* 33(1): 266-278.

Koutsouba V., Heberer T.H., Fuhrmann B., Schmidt-Baumler K., Tsipi D & Hiskia A., 2003. Determination of polar pharmaceutical substances in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* 51 (2): 69-75.

Krifa M., Dellai A., Bouhlel I., Robert J., Ameer C., Barillier D., Mosrati R., Chekir-Ghedira L & Ben Mansour H., 2013. Human cell death in relation to DNA damage after exposure to the untreated and biologically treated pharmaceutical wastewater. *Environmental Science and Pollution Research* (20): 3836-3842.

Kroupova H.K., Trubiroha A., Lorenz C., Contardo-Jara V., Lutz I., Grabic R., Kocour M & Kloas W., 2014. The progestin levonorgestrel disrupts gonadotropin expression and sex steroid levels in pubertal roach (*Rutilus rutilus*). *Aquat Toxicol* (154): 154-162.

Références bibliographiques

- Kumar A & Xagorarakis I., 2010.** Pharmaceuticals, personal care products and endocrine-disrupting chemicals in U.S surface and finished drinking waters: a proposed ranking system. *Sci Total Environ* (408): 5972-5989.
- Kümmerer K & Schuster A., 2008.** Substance Flows Associated with Medical Care Significance of Different Sources. Chapter 4. In : Kümmerer K (Ed.), Pharmaceuticals in the environment. Sources, Fate, Effects and Risks, 43-59.
- Kümmerer K., 2001.** Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere* (45): 957-969.
- Kümmerer K., 2008.** Pharmaceuticals in the Environment. *Springer* : p6.
- Kümmerer K., 2009a.** Antibiotics in the aquatic environment - a review - part I. *Chemosphere* (75): 417-434.
- Kümmerer K., 2009b.** Antibiotics in the aquatic environment - a review - part II. *Chemosphere* (75): 435-441.
- Kümmerer K., 2010.** Pharmaceuticals in the Environment. *Annu Rev Environ Resour* (35): 57-75.
- Láng J & Kóhidai L., 2012.** Effects of the aquatic contaminant human pharmaceuticals and their mixtures on the proliferation and migratory responses of the bioindicator freshwater ciliate *Tetrahymena*. *Chemosphere* (89): 592-601.
- Lanzky P.F & Halling-Sørensen B., 1997.** The toxic effect of the antibiotic metronidazol on aquatic organisms. *Chemosphere* (35): 2553-2561.
- Lapworth D.J., Baran N., Stuart M.E & Ward R.S., 2012.** Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. *Environ Pollut* (163): 287-303.
- Li G., Zhai J., He Q., Zhi Y., Xiao H & Rong J., (2014).** Phytoremediation of Levonorgestrel in aquatic environment by hydrophytes, *Journal of environmental sciences* (26): 1869-1873.

Références bibliographiques

- Li W., 2014.** Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution* (187): 193-201.
- Lindberg R.H., Bjorklund K., Rendahl P., Johansson M.I., Tysklind M & Andersson B.A.V., 2007.** Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants. *Water Research* (41): 613-619.
- Liste des médicaments vétérinaires., 2011.** Liste des médicaments vétérinaires prévus au deuxième alinéa de l'article L. 5143-6 du code de la santé publique ; Arrêté du 28 juin 2011 journal officielle, France.
- Liu J., Lu G., Ding J., Zhang Z & Wang Y., 2014a.** Tissue distribution, bioconcentration, metabolism, and effects of erythromycin in crucian carp (*Carassius auratus*). *Sci Total Environ* (490): 914-920.
- Liu J., Lu G., Wang Y., Yan Z., Yang X., Ding J & Jiang Z., 2014b.** Bioconcentration, metabolism, and biomarker responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to roxithromycin. *Chemosphere* (99): 102-108.
- Liu L., Liu Y.H., Liu C.X., Wang Z., Dong J., Zhu G.F & Huang X., 2013.** Potential effect and accumulation of veterinary antibiotics in *Phragmites australis* under hydroponic conditions. *EcolEng* 53(0): 138-143.
- Liu X., Lee J., Ji K., Takeda S & Choi K., 2012.** Potentials and mechanisms of genotoxicity of six pharmaceuticals frequently detected in freshwater environment. *Toxicol Lett* (211): 70-76.
- Liu Z.H., Kanjo Y & Mizutani S., 2009c.** Urinary excretion rates of natural estrogens and androgens from humans, and their occurrence and fate in the environment - a review -. *Sci Total Environ* (407): 4975-4985.
- Loos R., Wollgast J., Huber T & Hanke G., 2007.** Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (387): 1469-1478.
- López J.J., Dennis R & Moscoso S.M., 2009.** A study of self-medication in a neighborhood in Bogotá. *Rev Salud Publica* (3): 432-342.

Références bibliographiques

- Lu Q., 2009.** Evaluation of Aquatic Plants for Phytoremediation of Eutrophic Storm Waters. PhD, University of Florida, Florida.
- Lynn D.H., 2008.** The Ciliated Protozoa. Characterization, Classification, and Guide to the Literature. 3rd Ed. Springer Publ, New York.
- Mal T.K & Narine L., 2004.** The biology of Canadian weeds.129. *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. *Canadian Journal of Plant Science* (84): 365-396.
- Matamoros V., Nguyen L.X., Arias C.A., Salvadó V & Brix H., 2012b.** Evaluation of aquatic plants for removing polar microcontaminants: a microcosm experiment. *Chemosphere* 88 (10): 1257-1264.
- Mbutiwi I.N.F., Lepira B.F., Dramaix-Wilmet M., Meert P., Malengreau M., Nseka M.N., Tsoho F.M & Koné D., 2012.** l'automédication chez des patients reçus aux urgences médicales des cliniques universitaires de kinshasa. *S.F.S.P. « Santé Publique »* (25): 233-240.
- Médicaments essentiels., 2011.** Liste modèle de l'OMS, 17ème édition.
- Mehinto A.C., Hill E.M & Tyler C.R., 2010.** Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Technol* (44): 2176 - 2182.
- Memmert U., Peither A., Burri R., Weber K., Schmidt T., Sumpter J.P & Hartmann A., 2013.** Diclofenac: new data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. *Environ Toxicol Chem* (32): 442-452.
- Menager M.T., Garnier-Laplau J & Gayffon M., 2009.** Toxicologie nucléaire, environnementale et humaine. In : Lavoisier (Ed.), France, p812.
- Miège C., Choubert J.M., 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. *Environmental Pollution* 157(5): 1721-1726.
- Mikami K & Koizumi S., 1977.** Studies on *Paramecium*, its basis and application. *live teaching materials information service* (39): 331-346.

Références bibliographiques

- Monteiro S.C & Boxall A.B.A., 2010.** Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment. In : Whitacre D.M (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Volume 202, Heslington, York, Springer, 53-154.
- Morley N.J., 2009.** Environmental risk and toxicology of human and veterinary waste pharmaceutical exposure to wild aquatic host-parasite relationships. *Environ Toxicol Pharmacol* (27): 161-175.
- Mwambete K.D & Andrew R., 2010.** Knowledge on management of fever among mothers of undertens in Dar es Salaam, Tanzania. *East Afr J Public Health* (2): 177-181.
- Nash J.P., Kime D.E., Van der Ven L.T.M., Wester P.W., Brion F., Maack G., Stahlschmidt-Allner P & Tyler C.R., 2014.** Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ Health Perspect* (112): 1725-1733.
- Nassef M., Matsumoto S., Seki M., Khalil F., Kang I.J., Shimasaki Y., Oshima Y & Honjo T., 2010.** Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* (80): 1095-1100.
- Nicholas-Bateman D., 2012.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Medicine* (40): 140.
- Nikolaou A., Meric S & Fatta D., 2007.** Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal Bioanal Chem* (387): 1225-1234.
- Oaks J.L., Gilbert M., Virani M.Z., Watson R.T., Meteyer C.U., Rideout B.A., Shivaprasad H.L., Ahmed S., Chaudhry M.J., Arshad M., Mahmood S., Ali A & Khan A.A., 2004.** Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* (427): 630-633.
- Orlando E.F & Guillette Jr L.J., 2007.** Sexual dimorphic responses in wildlife exposed to endocrine disrupting chemicals. *Environ Res* (104): 163-173.
- Pamplona R & Costantini D., 2011.** Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (301): 843-863.

Références bibliographiques

- Parolini M., Binelli A., Cogni D., Riva C & Provini A., 2009.** An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicology In Vitro* 23 (5): 935-942.
- Parolini M., Quinn B., Binelli A & Provini A., 2011.** Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes, gills and digestive gland primary cell cultures. *Chemosphere* (84): 91-100.
- Parrott J.L & Blunt B.R., 2005.** Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and desmasculinizes male. *Environ Toxicol* (20): 131-141.
- Pawlowski S., van Aerle R., Tyler C.R., Braunbeck T., 2004.** Effects of 17a-ethiny- lestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicol Environ Saf* (57): 330-345.
- Petrovic M., Hernando M.D., Díaz-Cruz S & Barceló D., 2005.** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. *Journal of Chromatography A*, 1067(1-2): 1-14.
- Pharmacopée Européenne., 2004.** 5ème édition, Conseil de l'Europe, Strasbourg, France.
- Pignorel C., 2014.** Automédication et effets indésirables : Etude transversale descriptive auprès de 666 personnes consultant dans le quart Nord-Ouest de l'île de la Réunion entre septembre 2013 et mai 2014. Thèse de Doctorat en Médecine, Université Victor Segalen, Bordeaux II, France. 116p.
- Pilon-Smits E., 2005.** Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* (56): 15-39.
- Pomati F., Netting A.G., Calamari D & Neilan B.A., 2004.** Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis sp* and *Lemna minor*. *Aquat Toxicol* (67): 387-396.
- Pouillard J., 2001.** Rapport adopté lors de la session du Conseil national de l'Ordre des médecins sur l'automedication.
- Prescot D.M., 1957.** Change in physiological state of a cell population as a function of culture

Références bibliographiques

growth and age (*Tetrahymena geleii*). *Exp Cell Res*: 126-134.

Quinn B., Schmidt W., O'Rourke K & Hernan R., 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere* 84 (5): 657-663.

Radjenović J., Petrović M & Barceló D., 2009. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research* (43): 831-841.

Rahal K., 2008. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale.

Rejsek F., 2002. Analyse des eaux – aspects réglementaire et techniques-. Edition scérén.

Richardson M.L & Bowron J.M., 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the environment. *J Pharm Pharmacol* (37): 1-12.

Richardson S.D & Ternes T.A., 2011. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal Chem* (83): 4614-4648.

Rivera-Utrilla J., Sánchez-Polo M., Ferro-García M.A., Prados-Joya G & Ocampo-Pérez R., 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water -A review-. *Chemosphere* (93): 1268-1287.

Roberts L.J., Morrow J.D., 2001. Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman JG, Limbird LE (Eds.), Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics 10th Ed, McGraw-Hill, New York, USA, 687-732.

Rodier J., 2009. L'analyse de l'eau. 9^{ème} édition. Dunod. Paris, p1526.

Roex E.W.M., Van Gestel C.A.M., Van Wezel A.P & Van Straalen N., 2000. Ratios between acute aquatic toxicity and effects on population growth rates in relation to toxicant mode of action. *Environ Toxicol Chem* (19): 685-693.

Roongtanakiat N., Tangruangkiat S & Meesat R., 2007. Utilization of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) for removal of heavy metals from industrial waste waters. *Sci Asia* (33): 397-403.

Références bibliographiques

- Sacher F., Lange F.T., Brauch H.J & Blankenhorn I., 2001.** Pharmaceuticals in ground waters: analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *J Chromatogr A* (938): 199-210.
- Sallam S.A., Khallafallah N.M., Ibrahim N.K & Okasha A.O., 2009.** Pharmacoepidemiological study of self-medication in adults attending pharmacies in Alexandria, Egypt. *East Mediterr Health J* (3): 683-691.
- San Juan-Reyes N., Gómez-Oliván L.M., Galar-Martínez M., García-Medina S., Islas-Flores H., Neri-Cruz N., 2013.** Effluent from an NSAID-manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus carpio*. *Water, Air and Soil Pollution* (224) : 1689.
- Santos L., Araujo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C & Montenegro M., 2010.** Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater* (175): 45-95.
- Saravanan M & Ramesh M., 2013.** Short and long-term effects of clofibric acid and diclofenac on certain biochemical and ionoregulatory responses in an Indian major carp *Cirrhinus mrigala*. *Chemosphere* (93): 388-396.
- Saravanan M., Devi K.U., Malarvizhi A & Ramesh M., 2012.** Effects of Ibuprofen on hematological, biochemical and enzymological parameters of blood in an Indian major carp *Cirrhinus mrigala*. *Environmental toxicology and pharmacology* (34): 14-22.
- Saravanan M., Karthika S., Malarvizhi A & Ramesh M., 2011.** Ecotoxicological impacts of clofibric acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses. *J Hazard Mater* (195): 188-194.
- Sarma S.S.S & Nandini S., 2006.** Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans, *J Environ Sci Hlth* (41): 1417-1430.
- Sarma S.S.S., Gonzàlez- Pérez B.K., Moreno-Gutiérrez R.M & Nandini S., 2014.** Effect of paracetamol and diclofenac on population growth of *Platyonus patulus* and *Moina macrocopa*. *J Environ Biol* (35): 119-126.

Références bibliographiques

- Sarmah A.K., Meyer M.T & Boxall A.B., 2006.** A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* (65): 725-759.
- Scheytt T., Mersmann P., Leidig M., Pekdeger A & Heberer T., 2004.** Transport of pharmaceutically active compounds in saturated laboratory columns. *Ground Water* (42): 767-773.
- Schmidt W., O'Rourke K., Hernan K & Quinn B., 2011.** Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus spp.*) and their comparison with standardized toxicity tests. *Mar Pollut Bu* (62): 1389-1395.
- Schmitt-Jansen M., Bartels P., Adler N & Altenburger R., 2007.** Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Anal Bioanal Chem* (387): 1389-1396.
- Scholz M & Xu J., 2001.** Performance comparison of experimental constructed wetlands with different filter media and aérophytes treating industrial wastewater contaminated with lead and copper. *Bioresource Technology* (83): 71-79.
- Schwaiger J., Ferling H., Mallow U., Wintermayr H & Negele D.R., 2004.** Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug Diclofenac Part I: Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat Toxicol* (68): 141-150.
- Sekou F., 2011.** Automédication chez les patients souffrants de pathologies ORL dans les unités ORL des csref du district de Bamako, Université de Bamako, Mali. 65p.
- Semadi F., 2010.** Faisabilité du traitement des eaux d'un oued chargé en éléments traces métalliques (ETM) par filtres plantés de macrophytes (*Phragmites australis*) : cas de la région d'Annaba. de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie. 65p.
- Servant J. M., 1978.** La salinité dans le sol et les eaux. Caractéristique et problème d'irrigation drainage. *Bull B R G M* (2): 123-142.
- Sharif A., Ashraf M., Anjum A.A., Javeed A., Altaf I., Akhtar M.F., Abbas M., Akhtar B & Ammara Saleem., 2015.** Pharmaceutical wastewater being composite mixture of environmental pollutants may be associated with mutagenicity and genotoxicity, *Environ Sci Pollut Res Int* 23 (3): 2813-2820.

Références bibliographiques

- Sharpe R.M & Skakkebaek N.E., 1993.** Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341 (8857): 1392-1395.
- Shenker M., Harush D., Ben-Ari J & Chefetz B., 2011.** Uptake of carbamazepine by cucumber plants a case study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chemosphere* (82): 905-910.
- Shilton A., Walmsley N., Pearson H., Paterson C., Curtis T., Craggs R., Davies-Colley R & Mara D., 2005.** Pond treatment technology, IWA Publishing, London, Seattle, p479.
- Shultz S., Baral H.S., Charman S., Cunningham A.A., Das D., Ghalsasi G.R., Goudar M., Green R.E., Jones A., Nighot P., Pain D.J & Prakash V., 2004.** Diclofenac poisoning is widespread in declining vulture populations across the Indian subcontinent. *Proc Roy Soc* (271): 458-460.
- Simon M & Plattner H., 2014.** Unicellular eukaryotes as models in cell and molecular biology: critical appraisal of their past and future value. *Int Rev Cell Mol Biol* (309): 141-198.
- Sirés I & Brillas E., 2012.** Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies - a review. *Environ Int* (40): 2012-2229.
- Snell T.W & Joaquim-Justo C., 2007.** Workshop on rotifers in ecotoxicology. *Hydrobiologia* (593): 227-232.
- Sorensen P.W., Hara T.J., Stacey N.E & Dulka J.G., 1990.** Extreme olfactory specificity of male goldfish to the preovulatory steroidal pheromone 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one. *J Comp Physiol Sens Neural Behav Physiol A* (166): 373-383.
- Stankiewicz A., Giebułtowicz J., Stankiewicz U., Wroczynski P., Nafé G & Jawecki C.Z., 2015.** Determination of selected cardiovascular active compounds in environmental aquatic samples – Methods and results, a review of global publications from the last 10 years, *Chemosphere* (138): 642-656.
- Steger-Hartmann T., Lange R & Schweinfurth H., 1999.** Environmental risk assessment for the widely used iodinated X-ray contrast agent iopromide (Ultravist). *Ecotoxicol Environ Saf* (42): 274-281.

Références bibliographiques

- Stumpf M., Ternes T.A., Wilken R.D., Rodrigues S.V & Baumann W., 1999.** Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci Total Environ* (225): 135-141.
- Sumpter J.P., 2005.** Endocrine disrupters in the aquatic environment: - an overview- . *Acta Hydrochem Hydrobiol* (33): 9-16.
- Swaine M.D., Adomako J., Ameka G., Johnston K.A & Cheek M., 2006.** Forest river plants and water quality in Ghana. *Aquatic Botany* (85): 299-308.
- Tamtam F., Le Bot B., Dinh T., Mompelat S., Eurin J., Chevreuil M., Bonté P., Mouchel J.M & Ayrault S., 2011.** A 50-year record of quinolone and sulphonamide antimicrobial agents in Seine River sediments. *Journal of Soils and Sediments* (5): 852-859.
- Taylor D., & Senac T., 2014.** Human pharmaceutical products in the environment - The “problem” in perspective. *Chemosphere* 115(1): 95-99.
- Thacker P.D., 2005.** Pharmaceutical data elude researchers. *Environ Sci Technol* (39): 193-194.
- Timbrell J., 2002.** Principles of Biochemical Toxicology. In : third ed, Taylor & Francis, London.
- TNS Sofres., 2013.** Les Français, le médicament et les enjeux de santé, 23p.
- Tsao D.T., 2003.** Phytoremediation. In: Tsao D.T. (Ed.). Advances in bio- chemical engineering biotechnology, Springer, Berlin.
- Tuan X.L & Munekage Y., 2004.** Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Vietnam. *Mar Pollut Bull* (49): 922-929.
- Turiel E., Martin-Esteban A., Bordin G & Rodriguez A.R., 2004.** Stability of fluoroquinolone antibiotics in river water samples and in octadecyl silica solid-phase extraction cartridges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (380): 123-128.
- Tyler C.R., Jobling S & Sumpter J.P., 1998.** Endocrine disruption in wildlife. *Critical Reviews in Toxicology* 28 (4): 319-361.
- U.S.D.A., N.R.C.S., 2010.** The Plants Database.National Plant Data Center, Baton Rouge, LA, USA.

Références bibliographiques

- Van Der Linden S.C., Heringa M.B., Man H.Y., Sonneveld E., Puijker L.M., Brouwer A & Van Der Burg B., 2008.** Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surfacewater, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ Sci Technol* (42): 5814-5820.
- Verlicchi P & Zambello E., 2014.** How efficient are constructed wetlands in removing pharmaceuticals from untreated and treated urban waste-waters? A review. *Sci Total Environ* (470): 1281-1306.
- Vieno N., Tuhkanen T & Kronberg L., 2006.** Removal of pharmaceuticals in drinking water treatment : effect of chemical coagulation. *Environ Technol* (27): 183-192.
- Vymazal J., Svehla J., Kropfelova L & Chrastny V., 2007.** Trace metals in *Phragmites australis* and *Phalaris arundinacea* growing in constructed and natural wetlands. *Sci Total Environ* (380): 154-162.
- Wang Q., Yang J., Wu J., Zhang G & Li R., 2010.** Phytoremediation of Chlorpyrifos in Aquatic Environment by Three Emergent Macrophytes. *Journal of Agro-Environment Science* 9(4): 769-772.
- Weckbercker G & Cory G., 1988.** Ribonucléotide reductase activity and growth of glutathion-dyleted mouse lenkemial L 1210 cells in vitro. *Cancer letters* (40): 257-264.
- Winker M., Clemens J., Reich M., Gulyas H & Otterpohl R., 2010.** Ryegrass uptake of carbamazepine and ibuprofen applied by urine fertilization. *Sci Total Environ* 408(8): 1902-1908.
- Wong C.K., Cheung & Ming-Ho Y., 1999.** Toxicological assesement of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate *Dunalliella tertiolecta*. *Environ Pol* (105): 175-183.
- Wu X., Conkle J.L & Gan J., 2012.** Multi-residue determination of pharmaceutical and personal care products in vegetables. *J Chromatogr A* 1254: 78-86.
- Ying G.G., 2007.** Analysis of endocrine disrupting chemicals and pharmaceuticals and personal care products in water. In : Nollet L.M.L (Ed.), *Handbook of Water Analysis*, Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis, Group, 693-727.
- Yuan F., Hu C., Hu X., Qu J & Yang M., 2009.** Degradation of selected pharmaceuticals in

Références bibliographiques

aqueous solution with UV and UV/H₂O₂. *Water Res* (43): 1766-1774.

Zhang X.J., Qin H.W., Su L.M., Qin W.C., Zou M.Y., Sheng L.X., Zhao Y.H & Abraham M.H., 2010. Interspecies correlations of toxicity to eight aquatic organisms: theoretical considerations. *Sci Total Environ* (408): 4549-4555.

Zhang Y., Lv T., Carvalho P.N., Arias C.A., Chan Z & Brix H., 2015. Removal of the pharmaceuticals ibuprofen and iohexol by four wetland plant species in hydroponic culture: plant uptake and microbial degradation. *Environmental Science and Pollution Research* 23 (3):2890-2898.

Zhang Y.J., Geissen S.U & Gal C., 2008. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* (73): 1151-1161.

Zucchi S., Castiglioni S & Fent K., 2012. Progestins and antiprogestins affect gene expression in early development in zebrafish (*Danio rerio*) at environmental concentrations. *Environ Sci Technol* (46): 5183-5192.

Annexes

Annexe 1 :

Questionnaire des médecins/dentistes

1. Code :

2. Spécialité :

3. Secteur : Libéral Privé.

4. Parmi vos consultations, vous avez plutôt affaire aux :

Classement 1, 2 et 3.

a. HommesFemmesEnfants.

b. ...0 à 14ans ...15–34ans ...35–54ans ...55–64ans ...65– 74ans ... 75–84ans ...85 et +

5. Les voies d'administration les plus utilisées : Classement de 1 à 5 :

.....Orale Parentérale ... PercutanéeTransmuqueuse.....Pulmonaire

↓ ↓
(Intraveineuse, Sous cutanée, Intramusculaire) (Sublinguale, Rectale, Vaginale, Nasale, Oculaire)

6. Par classement de 1 à 10. Cochez les groupes de médicaments que vous prescrivez le plus (Voir tableau):

7. Toujours à l'aide du classement numérique, cochez dans la liste les médicaments les plus prescrits (Voir tableau) :

GROUPES DE MEDICAMENTS	1	2		X
ANESTHESIQUES				
ANALGESIQUES, ANTIPYRETIQUES, ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIENS (AINS), ANTIGOUTTEUX ET MEDICAMENTS UTILISES POUR LE TRAITEMENT DE FOND DES AFFECTIONS RHUMATISMALES				
ANTIALLERGIQUES ET ANTIANAPHYLACTIQUES				
ANTIDOTES ET AUTRES SUBSTANCES UTILISEES POUR LE TRAITEMENT DES INTOXICATIONS				
ANTICONVULSANTS/ANTIEPILEPTIQUES				
ANTI-INFECTIEUX				
ANTIMIGRAINEUX				
ANTINEOPLASIQUES				
IMMUNOSUPPRESSEURS ET				
MEDICAMENTS DES SOINS PALLIATIFS				
ANTIPARKINSONIENS				
MEDICAMENTS UTILISES EN HEMATOLOGIE				
PRODUITS SANGUINS ET SUBSTITUTS DU PLASMA				
MEDICAMENTS UTILISES EN CARDIO-ANGEIOLOGIE				
MEDICAMENTS UTILISES EN DERMATOLOGIE (Topiques)				
PRODUITS DE DIAGNOSTIC				
DESINFECTANTS ET ANTISEPTIQUES				
DIURETIQUES				
MEDICAMENTS INDIQUES EN GASTROENTEROLOGIE				
HORMONES, AUTRES MEDICAMENTS INDIQUES EN ENDOCRINOLOGIE ET CONTRACEPTIFS				
PREPARATIONS POUR L'IMMUNOLOGIE				
MYORELAXANTS (PERIPHERIQUES) ET INHIBITEURS DE LA CHOLINESTERASE				
PREPARATIONS POUR L'OPHTALMOLOGIE				
OCYTOCIQUES ET ANTIOCYTOCIQUES				
MEDICAMENTS DES DESORDRES MENTAUX ET COMPORTEMENTAUX				
MEDICAMENTS INDIQUES EN PNEUMOLOGIE				
CORRECTION DES TROUBLES HYDRO-ELECTROLYTIQUES ET ACIDO-BASIQUES				
VITAMINES ET ELEMENTS MINERAUX				

Liste modèle des médicaments essentiels selon l'OMS

1 . ANESTHESIQUES

1.1 Anesthésiques généraux et oxygène	Code 1	Code 2	Code 3	Code X
1.1.1 Médicaments inhalables				
halothane				
isoflurane				
oxygène				
protoxyde d'azote				
1.2 Anesthésiques locaux				
kétamine				
propofol				

...Etc.

Annexe 2 :

Questionnaire des Vétérinaires

1. Code :

2. Spécialité :

3. Secteur : Libéral Privé.

4. Parmi vos consultations, vous avez plutôt affaire aux : Classement 1, 2 et 3.

a. Animaux de ferme.

Animaux de compagnie.

b.

Bovins		Ovins		Caprins		Volailles	
Chevaux		Ânes		Autres (Citer)			

Chiens		Chats		Lapins		Poissons	
Hamsters		Cochons dindes		Oiseaux		Autres (Citer)	

5. Les voies d'administration les plus utilisées : Classement de 1 à 5 :

.....Orale Parentérale ... PercutanéeTransmuqueuse.....Pulmonaire

↓
(*Intraveineuse, Sous cutanée, Intramusculaire*) ↓
(*Sublinguale, Rectale, Vaginale, Nasale, Oculaire*)

6. Toujours à l'aide du classement numérique, cochez dans la liste les médicaments les plus prescrits (Voir tableau) :

Production bovine	1	2		x
1. Médicaments antiparasitaires				
1.1. Douvicides				
Clorsulo				
Closantel				
Nitroxinil				
Oxyclozanide				
Triclabendazole				

Etc....

Annexe 3 :

Questionnaire des citoyens

1. Code :.....

2. Âge:Sexe :

3. Êtes-vous un adepte de l'automédication ?

.....Souvent RarementJamais.

4. Vous êtes plutôt automédication :

.....Douce (Tisane, sport, plante, massages, sois de grand-mère).

..... Forte (Médicaments).

5. A quel rythme allez-vous chez le médecin ?

.....Par semainePar moisPar trimestrePar semestrepar an.

6. A quel rythme pratiquez-vous l'automédication ?

.....Par semainePar moisPar trimestrePar semestrepar an.

7. Finissez-vous souvent vos traitements prescrits par le médecin ?

.....Souvent RarementJamais

8. Que faites vous des médicaments non consommés?

..... Jetés aux toilettes.Rangés dans la pharmacie.

.....Jetés à la poubelle.Don au pharmacien.

9. Comment vous débarrassez-vous des médicaments périmés?

..... Jetés aux toilettes. Rangés dans la pharmacie.
.....Jetés à la poubelle. Don au pharmacien.

10.L'automédication pour quels maux ?

Les maux de tête :

.....

Les maux d'estomac et les problèmes de digestion :

.....

Les maux de gorge, la toux grasse ou sèche :

.....

Les boutons de fièvre (Herpès) :

.....

Les rhumes et les rhinites :

.....

Le sevrage tabagique :

.....

Les petites plaies, les brûlures légères et les piqûres d'insectes :

.....

Les bains de bouche et la prévention des caries :

.....

Annexe 4 :

Questionnaire des pharmaciens :

1. Quels médicaments pour quels maux en automédication? Max de 5 :

- Les maux de tête :

.....

.

- Les maux d'estomac et les problèmes de digestion :

.....

- Les maux de gorge, la toux grasse ou sèche :

.....

- Les boutons de fièvre (Herpès) :

.....

- Les rhumes et les rhinites :

.....

- Le sevrage tabagique :

.....

- Les petites plaies, les brûlures légères et les piqûres d'insectes :

.....

- Les bains de bouche et la prévention des caries :

.....

2. Les médicaments les plus vendus pour l'automédication :

- Antalgiques

.....

- Antitussifs

.....

- Anti-inflammatoires

.....

- Vitamines

.....

- Antibiotiques

.....

- Laxatifs

.....

- Contraceptifs

.....

- Corticoïdes

.....

- Pansements gastriques

.....

- Antispasmodiques

.....

- Antiseptiques

.....



E-ISSN: 2320-7078
P-ISSN: 2349-6800
JEZS 2016; 4(5): 187-191
© 2016 JEZS
Received: 28-07-2016
Accepted: 29-08-2016

Fella Kermiche
Laboratory of Cellular Toxicology,
Department of Biology, Faculty of
Science, University Badji Mokhtar,
Annaba, Algeria

Houria Berrebah
Laboratory of Cellular Toxicology,
Department of Biology, Faculty of
Science, University Badji Mokhtar,
Annaba, Algeria

Mohamed Reda Djebar
Laboratory of Cellular
Toxicology, Department of
Biology, Faculty of Science,
University Badji Mokhtar,
Annaba, Algeria

Correspondence
Fella Kermiche
Laboratory of Cellular
Toxicology, Department of
Biology, Faculty of Science,
University Badji Mokhtar,
Annaba, Algeria

Toxicological effects of drugs (Diclofenac, Ibuprofen, mixture) and Hormesis on a non-target organism: *Paramecium sp*

Fella Kermiche, Houria Berrebah and Mohamed Reda Djebar

Abstract

The exposure to pharmaceutical residues is inevitable, they are present in all ecosystems, particularly Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and their mixtures. In fact, the impact studies of these compounds on microorganisms are infrequent. In this context, the toxicity evaluation of Diclofenac, Ibuprofen and mixture, is undertaken on *Paramecium sp*, researching the effects of these xenobiotics on cellular growth and respiratory metabolism. The results show that cells exposure to low concentrations of Ibuprofen (1 and 10 µg/L), induces a insignificant stimulation, of cell growth and respiratory metabolism, in contrast to cells treated with Diclofenac, where an inhibition of cell growth is observed. The two xenobiotics mixture treatments show a significant toxicity in the presence of Diclofenac. The specific behavior of *Paramecia* with low concentrations of Ibuprofen may suggest a hormetic dose-response curve, expressed by an increase in the two measured physiological processes, cell growth and respiration.

Keywords: Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, toxicity, *Paramecium sp*, growth kinetics, respiratory metabolism

1. Introduction

The use of chemicals, especially medicines and other pharmaceuticals in the world is significant. The presence of pharmaceutical residues in the environment creates a major problem for human's health, making this, issue a recent investigation subject [1]. Contrary to most other xenobiotics, pharmaceutical residues products have an important peculiarity, they can interact together and thus, act at very low concentrations (of around 1 ng/L) [2]. Among many drugs, Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) constitute an important group, besides the fact that their sale is not subject to medical prescription [3], which is the case in Algeria. In addition, once these compounds get expired, they are directly dumped into the environment, further increasing the danger of contamination even after expiration [4, 5]. Pharmaceuticals consumed by humans and animals can be either completely, partially or not metabolized at all, which generates either intact molecules or metabolites [6]. This represents a real danger, especially that these discharges into the environment are continuous. In the literature, many research studies reveal the toxicity of these substances in sewage [7]. Gibson *et al.* [8] have recorded the presence of high concentrations of Diclofenac in wastewater of the Tula region in Mexico. Fent *et al.* [5] have reported the presence of NSAIDs in domestic drinking water. Hussein *et al.* [9] have studied that the presence of Paracetamol doesn't seem to have adverse effects on plankton. In this context, NSAIDs may have different toxicological profiles because of their chemical composition, their internal (same molecules) or external (different molecules) interactions. All these factors are able to influence the dose-response relationship at many biological phenomena. Therefore, hormesis is defined as the relationship between dose and response, characterized by stimulation at low concentrations and inhibiting at high concentrations [10]. This phenomenon is generally described as a dose-response curve inverted "U" or "β". The hormesis is observed in many microorganisms, plants and other various animal groups. In the order to explore the effects of the two NSAIDs (Diclofenac, Ibuprofen and their mixture) on a food chain link, we work on the possible highlighting of the hormetic dose-response on cell growth and respiratory metabolism of *Paramecium sp* in laboratory conditions.

2. Materials and Methods

2.1 Chemical products

Both xenobiotics used for this work are Diclofenac and Ibuprofen, they belong to NSAIDs family, and were obtained from Sigma-Aldrich.

2.2 Culture and cell growth

The *Paramecium sp* are eukaryotic protozoa, well known by biologists, and frequently used to study the effects of water pollution [11]. They are cultivated inside plant infusion enriched with *Saccharomyces cerevisiae*, to encourage growth, and incubated at 27 ± 3 °C away from light. The cell culture will grow exponentially until attain a stationary phase [12].

2.3 Toxicity tests

After reaching this stationary phase, the paramecia were exposed to increasing concentrations of Diclofenac and Ibuprofen (1, 10, 100 and 1000 µg/L) and their mixtures (1 and 1000 µg/L).

2.4 Growth kinetics

Growth kinetics are made by counting cells using a manual counter under an optical microscope (x 10) at 24, 48, 72 and 96h [13].

2.5 Respiratory activity

Oxygen consumption is measured in stationary phase, it is made with a Hansatech oxygen electrode [14].

2.6 Statistical analyses

All experiments were repeated three times, results are presented as average \pm standard error (SE) values. Statistical analysis used for comparison between the control and treated values are: one-way ANOVA, the Paired T test for dependent samples data which are normally distributed, and the Wilcoxon test for non normal data. (α - level for significant differences is at $P \leq 0.05$, and for high significant differences is at $P \leq 0.01$).

3. Results

Effects of Diclofenac and Ibuprofen on the growth of *Paramecium sp* cells.

Fig. 1(A,B,C,D,E). show the results of the effects of both NSAIDs and their mixtures on the cell growth of *Paramecium sp*.

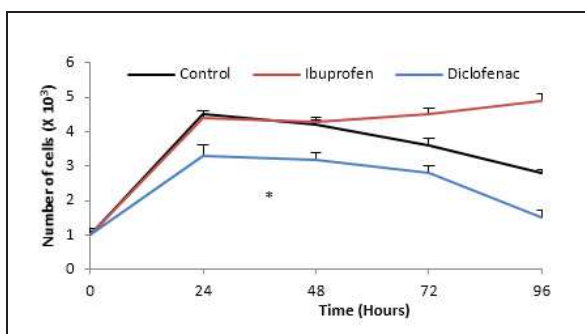


Fig 1A: Effect of xenobiotic Diclofenac and Ibuprofen (1 µg/L) on Cell number of *Paramecium sp*. Each data point represents the mean of three dependent assays \pm standard error. *: Significant values compared with control $P \leq 0.05$.

Low concentrations (1 µg/L and 10 µg/L) act differently on paramecia. When Ibuprofen seems to stimulate, even not

significantly, growth starting at 48h, with a progression of 75% with 1 µg/L and 35% with 10 µg/L at 96h, Diclofenac, slows the growth significantly ($P = 0.02$ and 0.01 respectively) of about 55% at 96h compared to controls Fig.1. (A, B). Against, high concentrations (100 µg/L and 1 mg/L) act similarly, they inhibit significantly ($P \leq 0.05$) the growth of 11% with 100 µg/L and 61% with 1 mg/L for Ibuprofen and about 60% for Diclofenac Fig. 1. (C, D).

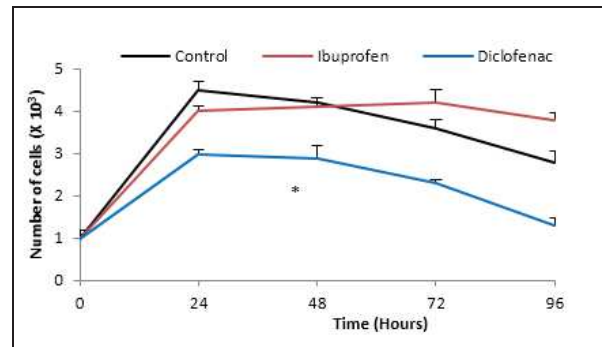


Fig 1B: Effect of xenobiotic Diclofenac and Ibuprofen (10 µg/L) on Cell number of *Paramecium sp*. Each data point represents the mean of three dependent assays \pm standard error. *: Significant values compared with control $P \leq 0.05$.

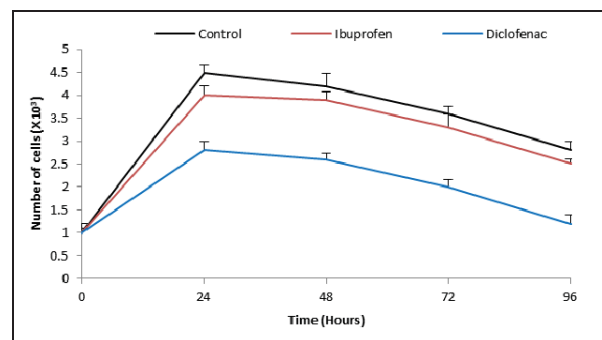


Fig 1C : Effect of xenobiotic Diclofenac and Ibuprofen (100 µg/L) on Cell number of *Paramecium sp*. Each data point represents the mean of three dependent assays \pm standard error. Significant values compared with control $P \leq 0.05$.

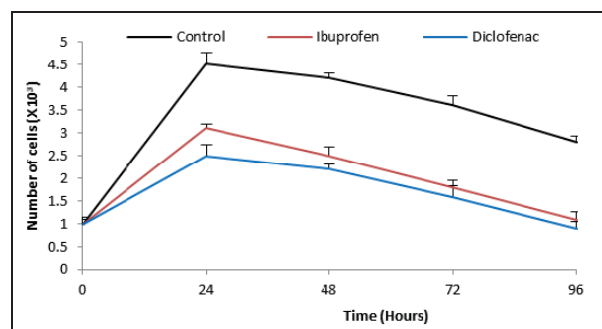


Fig 1D: Effect of xenobiotic Diclofenac and Ibuprofen (1 mg/L) on Cell number of *Paramecium sp*. Each data point represents the mean of three dependent assays \pm standard error. Significant values compared with control $P \leq 0.05$.

Fig. 1E. shows the effects of the two NSAIDs mixtures on cell growth of *Paramecium sp*. There is a significant growth slowdown with observed inhibitions with all tested concentrations ($P \leq 0.05$), the presence of Diclofenac alone can reverse the stimulatory effect of Ibuprofen at low

concentrations. The high concentration of Diclofenac or Ibuprofen or both (1 mg/L) leads to a inhibition of growth up to 60% Fig. 1E., this confirms the frequently unexplained effect of different mixtures that are formed and accumulated in the environment, in direct contact with non-target organisms.

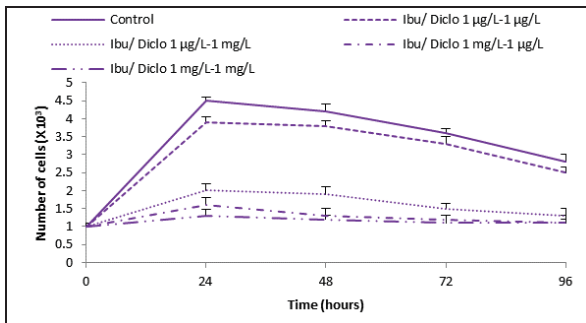


Fig 1E: Effect of Ibuprofen / Diclofenac mixtures on Cell number of *Paramecium sp.* Each data point represents the mean of three dependent assays \pm standard error. Values compared with control are significant with $P \leq 0.05$.

Effects of Diclofenac and Ibuprofen on the respiratory metabolism of *Paramecium sp.* cells.

Fig. 2 (A.B.C) show the results of the effects of both NSAIDs and their mixtures on the respiratory metabolism of *Paramecium sp.*

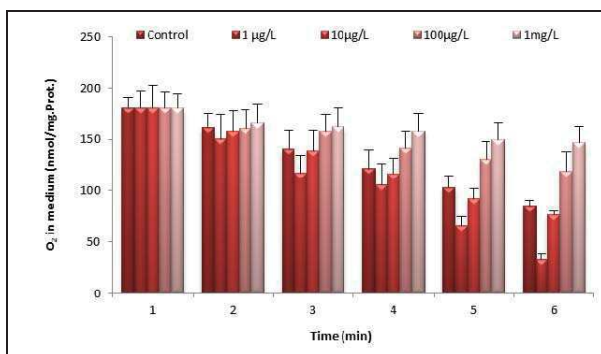


Fig 2A: Effect of Ibuprofen on respiratory metabolism of *Paramecium sp.* Each data point represents the mean of three dependent assays \pm standard error.

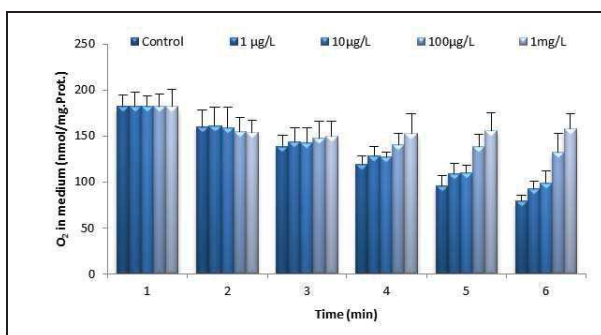


Fig 2B: Effect of Diclofenac on respiratory metabolism of *Paramecium sp.* Each data point represents the mean of three dependent assays \pm standard error.

Fig. 2A. Shows that Ibuprofen is in two different ways according to the used concentrations. In the presence of low concentrations (1 and 10 $\mu\text{g/L}$), treated cells breathe strongly

and oxygen of the medium decreases, indicating cells hyperactivity, probably due to the paramecia defense mechanisms Fig. 2A. Meanwhile, high concentrations (100 $\mu\text{g/L}$ and 1 mg/L) affect the respiratory metabolism, expressing the inhibitory effect of Ibuprofen. Fig. 2B. shows that Diclofenac inhibits respiration as function of time and this, from the lowest concentration tested.

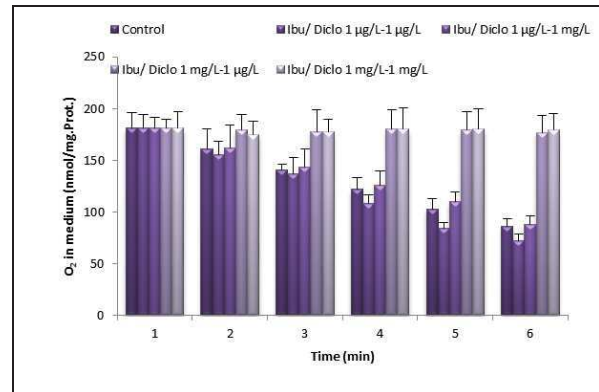


Fig 2C: Effect of Ibuprofen / Diclofenac mixtures on respiratory metabolism of *Paramecium sp.* Each data point represents the mean of three dependent assays \pm standard error. Values Highly significant with $P \leq 0.01$.

Fig. 2C. shows the effects of two NSAIDs mixtures on respiration of *Paramecium sp.* ($P = 0.003$). First, there is a slight positive effect recorded to low concentrations of two NSAIDs (1 $\mu\text{g/L}$), followed by a start inhibition of respiration observed at the concentration of 1 mg/L of Diclofenac. At last, we observe a cessation of cells respiratory metabolism treated with high concentrations.

4. Discussion

In this work, we noted two types of responses for the two NSAIDs studied and their mixture, on cell growth and respiratory metabolism of *Paramecium sp.* The first observation is that cells exposure to low concentrations of Ibuprofen (1-10 $\mu\text{g/L}$), seems to induce a stimulation of growth and respiration. Beyond all these concentrations, a significant inhibition of the cellular growth is observed. Furthermore, the cells exposure to different concentrations of Diclofenac causes high toxicity, reflected in a sharp reduction in cell growth and cessation of breathing at different concentrations. Generally, it is accepted that both NSAIDs studied are used in humans to relieve pain and suppress inflammation [15]. Their mode of action consists in inhibiting an enzyme (COX) that catalyzes the biosynthesis of prostaglandins [16]. Thus, in birds for example, prostaglandins participate in the biosynthesis of shells, the inhibition of COX causes eggshell thinning which results in reduction of hatching [17]. Pomati *et al.* [18] have studied that 1 mg/L of Ibuprofen reduced the growth of duckweed *Lemna minor* of 25%, while conversely, the growth of cyanobacteria *Synechocystis sp* was stimulated to 10 $\mu\text{g/L}$. Han Guk *et al.* [19] have compared chronic toxicity of Diclofenac and Ibuprofen, Diclofenac was more toxic than Ibuprofen. Indeed, a concentration of 40 mg/L of Diclofenac was enough to achieve a 100% mortality in *Daphnia magna* unlike 80mg/L concentration for Ibuprofen. Cleuvers [4] has demonstrated the high toxicity of a mixture of Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen and Acetylsalicylic Acid on algae and daphnia. This toxicity was as high or higher than the toxicity

of each molecule used alone. Gómez-Oliván *et al.* [20] have demonstrated that different NSAIDs, isolated and binary mixtures, induce oxidative stress on *Hyalella azteca*. A decrease in the activity of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* was also noticed when in contact with Ibuprofen at concentrations of 1 and 10 ng/L [21]. Nieto *et al.* [22] have studied that Diclofenac may produce respiratory deficiencies in the freshwater shrimp, *Atyaephyra desmarestii* under certain temperature and water oxygenation conditions. However, after chronic exposure, several authors observed histopathological effects in trout species at relatively low concentrations of Diclofenac, around 1 to 5 µg/L [23, 24]. Moreover, a study conducted *in vitro* on a bivalve mollusc gives an LC₅₀ of 178 µg/L for Diclofenac and 1312 µg/L for Ibuprofen, thus demonstrating the seriousness of Diclofenac toxicity [25]. In more recent work, Boulassel [26] shows a toxic effect of Ibuprofen in high concentrations resulting in a slowdown of cell growth, presence of cellular defects, decreased number of vacuoles and inhibition of paramecia respiration. Trombini *et al.* [27] they have found that after 48 hours exposure of neonate nauplii (<24 h-old) of the harpacticoid copepod *Tisbe battagliai*, that Diclofenac was the most toxic compound with a LC₅₀ 5 to 7 times lower than LC₅₀ value for Paracetamol, Carbamazepine and Ibuprofen. The observations made in our work on the exposure of cells to mixtures of two NSAIDs show a global effect representing the sum of the effects of both xenobiotics, and this is due to different interactions and other synergies that may occur [28]. Studies of combinations give an antagonist effect in 59% of cases, additive effect in 37% and only 4% of synergy effect [29]. Thus, the observed effects following exposure to both individual NSAIDs and their mixture are very different [30, 4]. After comparing the different results obtained with all concentrations used for each compound and for the mixtures, it is clear that the low concentrations of Ibuprofen are the origin of a cell growth and a respiratory metabolism stimulation. In fact, this seems to be the induction of a hormetic response specific to measured parameters, and directly related to the cell model used known *Paramecium sp.*

5. Conclusion

The review of the toxicological effects of Diclofenac and Ibuprofen on *Paramecium sp.* shows that, contrary to high concentrations, at lower, Ibuprofen doesn't affect Paramecia significantly, although, a possible hormetic response remains to explore. Nevertheless, the toxicity results obtained with Diclofenac and mixtures are not sufficient to draw definitive conclusions. Therefore, research is required with a larger number of samples, and should be focused on the use of a wide range of concentrations with temporal evaluations.

6. References

1. Santos LMLM, Araujo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MCBSM. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater.* 2010; 175:45-95.
2. Escher BI, Bramaz N, Eggen RIL, Richter M. *In vitro* assessment of modes of toxic action of pharmaceutical in aquatic life. *Environ Sci Technol.* 2005; 39:3090-3100.
3. Sarma SSS, González-Pérez BK, Moreno-Gutiérrez RM, Nandini S. Effect of paracetamol and diclofenac on population growth of *Platyonus patulus* and *Moina macrocopa*. *J Environ Biol.* 2014; 35:119-126.
4. Cleuvers M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2004; 59:309-315.
5. Fent K, Weston AA, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 2006; 76:122-159.
6. Kümmerer K. Pharmaceuticals in the Environment. *Annu Rev Environ Resour.* 2010; 35:57-75.
7. Zhang Y, Geißen SU, Gal C. Carbamazepine and diclofenac. Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere.* 2008; 73:1151-1161.
8. Gibson R, Durán-Álvarez JC, Estrada KL, Chávez A, Jiménez Cisneros B. Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley Mexico. *Chemosphere.* 2010; 81:1437-1445.
9. Hussein ET, Randa EA, El-Shimmy A, Gamal IH. Oxidative stress of plankton community and some isolated species during paracetamol toxicity test. *J Biol Sc.* 2008; 8:13-23.
10. Eaton DL, Klaassen CD. Principles of toxicology. Ed CD Klaassen, The Basic Science of Poisons, New York, 2001, 11-34.
11. Simon M, Plattner H. Unicellular eukaryotes as models in cell and molecular biology: critical appraisal of their past and future values. *Rev Cell Mol Biol.* 2014; 309: 141-198.
12. Prescott DM. Change in the physiological state of a cell population as a function of culture growth and age (*Tetrahymena Geleii*). *Exp Cell Res.* 1957; 12:126-134.
13. Sauvant MP, Pepin D, Piccini E. *Tetrahymena pyriformis*: a tool for toxicological studies. *Chemosphere.* 1999; 38:1631-1669.
14. Djebar MR, Djebar H. Bioénergétique, les mitochondries végétales, Synthèse. 2000; 8:23-25.
15. Monteiro SC, Boxall ABA. Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2010; 202:53-154.
16. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev of Pharmacol Toxicol.* 1998; 38:97-120.
17. Lundholm CE. DDE-induced eggshell thinning in birds: effects of p,p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. *Comp Bio Physiol.* 1997; 118:113-128.
18. Pomati F, Netting AG, Calamari D, Neilan BA. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis sp* and *Lemna minor*. *Aquat Toxicol.* 2004; 67:387-396.
19. Han Guk h, Hur Hor G, Kim Sang D. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem.* 2006; 25:265-271.
20. Gómez-Oliván LM, Neri-Cruz N, Galar-Martínez M, Islas-Flores H, García-Medina S. Binary mixtures of diclofenac with paracetamol, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid and these pharmaceuticals in isolated form induce oxidative stress on *Hyalella azteca*. *Environ Monit Assess.* 2014; 186:7259-7271.
21. De Lange HJ, Noordoven W, Murk AJ, Lürling M, Peeters ETHM. Behavioural responses of *Gammarus*

- pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 2006; 78:209-216.
22. Nieto E, Hampel M, González-Ortegón E, Drake P, Blasco J. Influence of temperature on toxicity of single pharmaceuticals and mixtures, in the crustacean *A. Desmarestii*. *J Hazard Mater.* 2016; 313:159-169.
 23. Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele DR. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part 1: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat Toxicol.* 2004; 68:141-150.
 24. Mehinto AC, Hill EM, Tyler CR. Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Technol.* 2010; 44:2176-2182.
 25. Parolini M, Binelli A, Cogni D, Riva C, Provini A. An *in vitro* biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicol Vitro.* 2009; 23:935-942.
 26. Boulassel A. Evaluation de la toxicité de deux médicaments: le Paracétamol et l'Ibuprofène, sur un modèle cellulaire: *Paramecium tetraurelia*. Ph.D. Thesis, Fac. of Sci., Badji Mokhtar University., Annaba, 2013, 134.
 27. Trombini C, Hampel M, Blasco J. Evaluation of acute effects of four pharmaceuticals and their mixtures on the copepod *Tisbe battagliai*. *Chemosphere.* 2016; 155:319-328.
 28. Khetan SK, Collins TJ. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to Green Chemistry. *Chem Rev.* 2007; 107:2319-2364.
 29. Láng J, Köhidai L. Effects of the aquatic contaminant human pharmaceuticals and their mixtures on the proliferation and migratory responses of the bioindicator freshwater ciliate *Tetrahymena*. *Chemosphere.* 2012; 89:592-601.
 30. Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. Something from nothing: eight weak chemicals combined at concentrations below NOEC's produce significant mixture effects. *Environ Sc Technol.* 2002; 36:1751-1756.