

# L'éponge marine *Hymeniacidon perlevis* présente-t-elle des propriétés bioremédiatrices vis-à-vis de l'acétaminophène ?

Charline Danthu<sup>1</sup>, Laure Taupin<sup>1</sup>, Pierre Sauleau<sup>2</sup>

1. Univ. Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56100 Lorient, France

2. Centre de recherche St Maudé, 56321 Lorient, France

\*Auteur correspondant : [pierre.sauleau@univ-ubs.fr](mailto:pierre.sauleau@univ-ubs.fr)

## RESUME

La présence de médicaments dans la colonne d'eau, les sédiments et les organismes marins pourrait à terme affecter la biodiversité marine, l'aquaculture mais également la santé du consommateur. L'acétaminophène (Paracetamol®) est la molécule pharmaceutique la plus consommée dans le Monde et se détecte désormais dans le milieu marin. L'éponge *Hymeniacidon perlevis* est une espèce ubiquitaire, déjà connue pour sa capacité à digérer des bactéries d'origine fécale et à accumuler des teneurs non négligeables d'éléments traces métalliques, d'hydrocarbures aromatiques polycycliques ou de polychlorobiphényles. Dans le cadre de cette étude, les propriétés bioremédiatrices de l'espèce *H. perlevis* ont été étudiées vis-à-vis de l'acétaminophène. Les expérimentations ont consisté à mesurer la cinétique de biodégradation de la molécule par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

**Mots clés :** bioremédiation ; éponge marine ; *Hymeniacidon perlevis* ; acétaminophène ; LC-MS

## ABSTRACT

The occurrence of pharmaceutical drugs in the water column, sediments and marine organisms may affect the marine biodiversity, aquaculture but also human health. Acetaminophen (Paracetamol®) is the pharmaceutical drug the most consumed in the world and is now detected in seawater. The marine sponge *Hymeniacidon perlevis* is an ubiquitous species, already known for its capacity to digest fecal bacteria and accumulate large amount of metallic trace elements, polycyclic aromatic hydrocarbons or polychlorobiphenyles. In this study, the bioremediation properties of the species *H. perlevis* were evaluated on acetaminophen. Experimentations consisted in measuring the kinetic of biodegradation of the molecule by liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

**Keywords:** bioremediation; marine sponge; *Hymeniacidon perlevis*; acetaminophen; metabolomic

## INTRODUCTION

L'acétaminophène, mieux connu sous le nom de paracétamol, est le principe actif médicamenteux le plus largement prescrit dans le monde, seul ou en association. La France est le plus gros consommateur en Europe, le paracétamol arrivant en tête de liste des médicaments les plus vendus en pharmacie (ANSM, 2014, Hider-

Mlynarz et al., 2018). Essentiellement métabolisé par le foie, le paracétamol est éliminé sous forme glyco- ou sulfo-conjuguée par voie urinaire. Rejetés dans le circuit des eaux usées, le paracétamol et ses dérivés de métabolisation traversent les différents système d'épuration sans être totalement dégradés. Ils se retrouvent au final avec les effluents urbains avant d'être dilués dans le milieu marin. La présence d'acétaminophène a

ainsi été détectée dans l'eau de mer à différentes profondeurs dans le Golfe Saronique (40,5 ng/L), au pied d'Athènes, ainsi qu'au large de Porto (53,2-269,7 ng/L) (Alygizakis et al., 2016 ; Paiga et al., 2017). Sa toxicité chronique vis-à-vis de la biocénose marine par bioaccumulation, seule ou en association avec d'autres contaminants, reste méconnue.

Peu de stratégies visant à limiter voire réduire les teneurs en contaminants chimiques existe actuellement. Parmi les différents procédés envisageables, la bioremédiation consiste à exploiter le processus de décontamination de l'eau, de l'air, du sol par les organismes vivants. Suivant le modèle biologique utilisé, on parlera de phytoremédiation s'il s'agit de plantes, de bioaugmentation s'il s'agit de micro-organismes introduits ou de biostimulation si la croissance de la flore microbienne endémique est stimulée (Perelo, 2010). Dans le milieu marin, différents modèles de bivalves, d'holothuries et d'annélides ont été proposés comme agent bioremédiateurs. Ils font actuellement l'objet d'études *in situ* comme dans le cadre du projet européen Remedialife, en Italie, qui expérimente divers invertébrés marins dans un contexte d'aquaculture multitrophique intégrée (AMTI). Grâce à leur système de filtration, les éponges marines semblent être des organismes bioaccumulateurs prometteurs.

L'éponge marine *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1814) est une espèce ubiquitaire de la classe des Demospongiae et de la famille des Halichondriidae (WoRMS). Elle est naturellement présente sur le littoral atlantique et supporte aisément l'exondation. Ses propriétés de filtration, de bioaccumulation et, potentiellement, de bioremédiation ont déjà été étudiées vis-à-vis de bactéries fécales, d'éléments traces métalliques (ETMs) et du lindane, un insecticide (Aresta et al., 2015).

Dans le cadre de cette étude, les propriétés potentiellement bioremédiatrices de l'espèce *H. perlevis* vis-à-vis de l'acétaminophène ont été étudiées *in vitro*. A notre connaissance, c'est la première fois que de telles études sont menées sur un spongiaire vis-à-vis d'un médicament. Les teneurs en acétaminophène ont ainsi été mesurées dans l'eau des aquariums en présence ou non d'éponges ainsi que dans les éponges elles-mêmes et ce, en fonction du temps.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### *Matériel biologique*

Les spécimens d'éponge *H. perlevis* ont été prélevés à la main à Locoal (47.716655, -3.143028), en ria d'Etel, Morbihan, France, lors des basses mers de vives eaux. L'identification des spécimens collectés a été réalisée sur la base des caractéristiques morphologiques des spicules d'éponge. Au laboratoire, les spécimens de spongiaires fraîchement collectés ont été plongés dans un aquarium de 50 L contenant de l'eau de mer prélevée sur le même site de collecte. Les individus ont été acclimatés pendant 48h à 16°C avant de démarrer les expérimentations.

### *Matériel chimique*

Des comprimés de Doliprane effervescent 1g (Sanofi) ont été achetés en pharmacie et réduits en poudre dans un mortier. Tous les solvants utilisés pour l'extraction et l'analyse étaient de qualité CLHP (VWR).

### *Expérimentations en aquarium*

Les expérimentations ont été réalisées dans des aquariums remplis avec 5 L d'eau de mer avec ou sans éponges du genre *H. perlevis*. L'eau de mer a été maintenue à température constante (16°C) grâce à un groupe froid et oxygénée en permanence grâce à une pompe. Le pH a été mesuré régulièrement et est resté constant à 8,7 pendant toute la durée des expérimentations. Une solution d'acétaminophène a été préparée de façon à obtenir une concentration initiale de 1 g.L<sup>-1</sup> dans chaque aquarium. Après 20 minutes d'agitation, des spécimens d'éponge de 25 cm<sup>3</sup> ont été plongés dans les aquariums. Dix mL d'eau de mer ont ensuite été prélevés, en triplicat, toutes les deux heures la première journée puis une fois par jour les 3 jours suivants. Deux spécimens de spongiaires ont été prélevés uniquement la première journée, toutes les deux heures, pendant 7 heures, en duplicat.

### *Préparation des échantillons*

Les échantillons d'eau de mer ont été filtrés sur des filtres 0,2 µm en nylon et stockés à -20 °C. Les spécimens de spongiaires ont été collectés, congelés à -80°C et lyophilisés avant d'être extraits pendant 24h sous agitation à 120 rpm

avec un mélange de dichlorométhane et de méthanol 1:1 (v/v) de qualité CLHP (VWR). Les extraits organiques ont ensuite été filtrés sur papier filtre Whatman puis évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi). Ces extraits secs ont été repris dans du méthanol de qualité CLHP de façon à ajuster leur concentration à 1 mg/mL puis filtrés sur filtre 0,45 µm. Les échantillons d'eau et d'éponges marines ont été conservés à -20 °C en attendant les analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).

#### *Analyse par LC-MS*

Les analyses par chromatographie liquide haute performance (CLHP) ont été effectuées sur une chaîne Ultimate 3000 de chez Dionex. La colonne utilisée était une colonne Interchrom YP5C18-25QS (250 × 4,6 mm). L'élution a été réalisée en mode isocratique par un mélange de solvants constitué de 90% d'eau de qualité CLHP (VWR) contenant 0,1% d'acide formique et de 10% d'acétonitrile (VWR) contenant 0,1% d'acide formique pendant 20 minutes à un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. Les volumes injectés étaient de 20 µL. L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée sur un appareil Q-Tof de chez Bruker. L'ionisation a été réalisée par électrospray (ESI), la sélection des ions par le quadropôle a été réalisée en mode positif, la tension appliquée au niveau du capillaire était de 4500 V, la pression du nébuliseur était de 40,0 psi, le débit du gaz sécheur (azote) était de 12 L/min et sa température de 200 °C.

Les concentrations en acétaminophène dans l'eau des aquariums ont été déterminées par étalonnage externe à l'aide d'une droite d'étalonnage de 1.10<sup>-3</sup> à 0,2 g/L d'acétaminophène dissous dans de l'eau ultra-pure. Le coefficient de détermination R<sup>2</sup> était supérieur à 0,96. Les teneurs en acétaminophène dans les extraits méthanoliques d'éponges ont été calculées à partir des surfaces sous la courbe des chromatogrammes de l'ion extrait (EIC) *m/z* 152,07 ± 0,02. Chaque analyse a été effectuée en duplicat.

#### *Analyses statistiques*

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Rstudio (1.1.453). Les comparaisons de moyennes ont été réalisées à

l'aide d'une ANOVA à un facteur et ont été suivies du test post-hoc HSD de Tukey. Le test non paramétrique apparié de Wilcoxon a été utilisé pour comparer les deux conditions, avec ou sans éponges marines. Le seuil de signification  $\alpha$  a été fixé à 0,01.

## RÉSULTATS

### *Cinétique de dégradation de l'acétaminophène dans l'eau de mer*

Dans un premier temps, la concentration en acétaminophène contenu dans l'eau de mer des aquariums a été mesurée sur 5 jours (Fig. 1). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative les 4 premiers jours (*p*-value > 0,01). Une différence significative (*p*-value = 0,0031) des concentrations en acétaminophène dans l'eau de mer apparaît au bout du 5<sup>ème</sup> jour (J+4) où la concentration chute de 0,852 ± 0,020 g/L à 0,766 ± 0,010 g/L. Ces résultats indiquent que les tests de bioaccumulation par les éponges marines vis-à-vis de l'acétaminophène ne peuvent pas se faire *in vitro* au-delà de 4 jours, période au-delà de laquelle la molécule commence à se dégrader.

### *Cinétique de bioaccumulation de l'acétaminophène dans les éponges marines*

L'absence du pic à *m/z* 152,07 correspondant à l'acétaminophène dans les extraits d'éponges prélevées dans leur milieu naturel en rias d'Étel suggère que les éventuelles traces de ce médicament sont inférieures aux limites de détection de notre spectromètre de masse (résultats non présentés).

*In vitro*, les résultats indiquent qu'au bout de 3 heures de filtration, les éponges ont accumulé 74,21 ± 4,22 µg d'acétaminophène par mg d'extrait méthanolique (Fig. 2). Au bout de 5h, une différence significative (*p*-value = 0,0111) de la teneur en acétaminophène est observée dans l'extrait d'éponge qui ne contient plus que de 47,33 ± 5,46 µg de principe actif par mg d'extrait méthanolique. Au bout de 7h d'incubation, les teneurs en acétaminophène sont similaires à celles initialement mesurées au début de l'expérimentation (*p*-value > 0,05). Ces résultats, réalisés en duplicat et sur simplement 2 individus à chaque fois, suggèrent que l'espèce *H. perlevis* pourrait momentanément et *in vitro* réduire les teneurs en acétaminophène dans ses tissus après 5h de filtration.

### Dosage de l'acétaminophène dans l'eau de mer en présence de l'espèce *H. perlevis*

La concentration en acétaminophène a été mesurée dans l'eau de mer des aquariums en présence d'éponges marines pendant 4 jours (Fig. 3). Les résultats indiquent une différence peu significative ( $p\text{-value} = 0,014$ ) de la concentration en acétaminophène dans l'eau de mer des aquariums au bout de 4 jours de filtration (J+3) par les éponges. Le test de rang de Wilcoxon ne permet pas non plus de mettre en évidence de différence significative entre les

deux conditions expérimentales, c'est-à-dire avec (Fig. 3) ou sans éponges marines (Fig. 1) dans les aquariums contenant 1g/L d'acétaminophène, sur 4 jours ( $p\text{-value} > 0,05$ )

Enfin, les analyses (Fig. 4) réalisées sur une journée avec un dosage toutes les deux heures du principe actif ne permettent pas de mettre en évidence de différences significatives entre les concentrations moyennes de l'acétaminophène dans l'eau de mer les 7 premières heures ( $Pr = 0,31$ ).

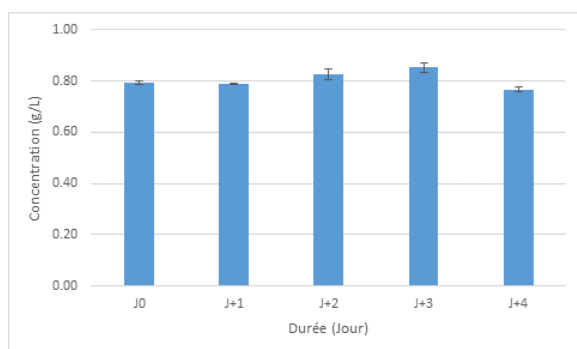


Figure 1. Cinétique de dégradation de l'acétaminophène dans l'eau de mer. La concentration en principe actif a été mesurée par LC-MS dans l'eau des aquariums tous les jours pendant 5 jours ( $n = 3$ ).

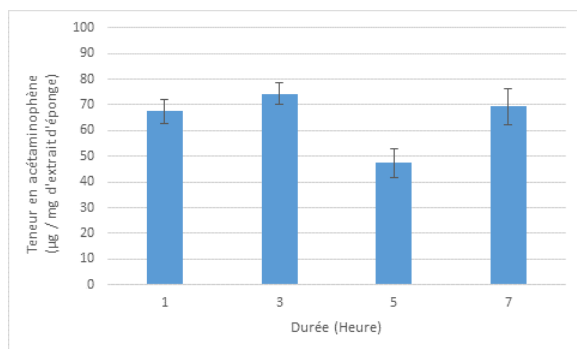


Figure 2. Dosage de l'acétaminophène dans les éponges marines. Les teneurs en principe actif ont été mesurées par LC-MS dans des fragments de 25 cm<sup>3</sup> d'éponges marines *H. perlevis* ( $n=2$ ) toutes les 2h pendant 7 heures après dissolution d'1g/L d'acétaminophène.

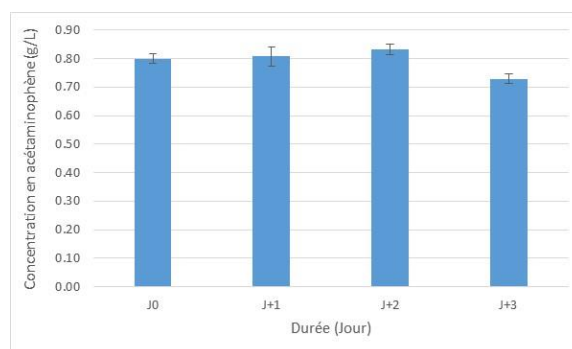


Figure 3. Dosage de l'acétaminophène dans l'eau de mer en présence d'éponges marines. Les concentrations en principe actif (g/L) ont été mesurées par LC-MS tous les jours pendant 4 jours dans l'eau des aquariums contenant 1g/L d'acétaminophène en présence d'un fragment de 25 cm<sup>3</sup> d'éponges *H. perlevis* ( $n=3$ ).

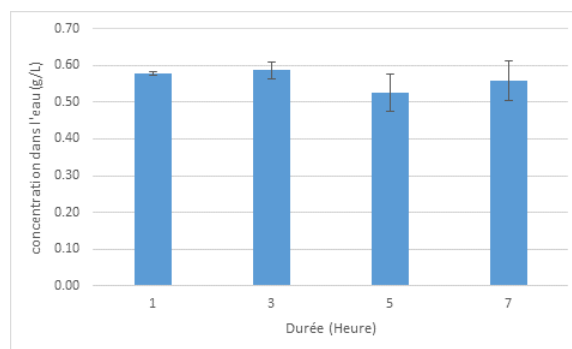


Figure 4. Dosage de l'acétaminophène dans l'eau de mer en présence d'éponges marines. Les concentrations en principe actif (g/L) ont été mesurées par LC-MS toutes les 2h pendant 7h dans l'eau des aquariums contenant 1g/L d'acétaminophène en présence d'un fragment de 25 cm<sup>3</sup> d'éponges *H. perlevis* ( $n=3$ ).

## DISCUSSION

Les éponges marines sont des organismes filtreurs. Grâce (ou à cause) de ce mode d'alimentation, les éponges marines accumulent divers contaminants chimiques et biologiques. La capacité de bioaccumulation des spongiaires varie évidemment suivant les espèces et suivant la nature du contaminant lui-même. Lors de précédentes études, la présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, de polychlorobiphényles et d'éléments traces métalliques en quantité plus importantes par rapport aux autres spongiaires fait d'*H. perlevis* un excellent modèle (Gentric et al., 2016). A notre connaissance, la bioaccumulation d'acétaminophène ou de tout autre principe actif médicamenteux dans les invertébrés marins présents dans leur milieu naturel n'a pas fait l'objet de travaux scientifiques. Dans notre étude, nous avons utilisé une concentration importante d'acétaminophène de l'ordre de 1 g/L, c'est-à-dire à une concentration  $10^7$  à  $10^8$  plus élevées que celles présentes dans le milieu marin. Des teneurs de l'ordre de quelques dizaines de  $\mu\text{g}$  d'acétaminophène ont ainsi pu être mesurées par LC-MS par mg d'extrait organique d'éponge. Il serait intéressant par la suite de renouveler ces expérimentations avec des concentrations plus fortes en acétaminophène de façon à estimer les capacités maximales de bioaccumulation de l'espèce marine. Selon la dose de principe actif et malgré l'absence de système nerveux chez le spongiaire, celui-ci pourrait stopper l'activité de filtration de ses choanocytes de façon à limiter la toxicité du contaminant. Au cours de notre étude, nous n'avons pas observé de mortalité parmi les échantillons d'éponges ce qui suggère que des doses plus importantes de molécules pourraient être testées.

Au cours de nos travaux, nous avons pu mettre en évidence dans les extraits d'éponges une baisse de la teneur en acétaminophène au bout de 5h de filtration. Cette baisse pourrait s'expliquer par une biodégradation de la molécule ou par une libération de celle-ci par l'éponge. Par rapport aux larges quantités d'acétaminophène présentes dans l'eau des aquariums, cette potentielle activité bioremédiatrice par les éponges ne suffit pas pour observer de changement réel de la concentration en acétaminophène dans l'eau. Il serait intéressant par la suite de renouveler ces expérimentations avec des concentrations plus faibles en acétaminophène de façon à observer des différences significatives entre les deux

conditions expérimentales, c'est-à-dire avec ou sans éponges. En fonction des résultats, il sera par la suite nécessaire de suivre le devenir de l'acétaminophène dans l'éponge marine c'est-à-dire sa métabolisation en dérivés potentiellement actifs vis-à-vis de l'écosystème marin et étudier le rôle du microbiome dans cette métabolisation. Enfin, il sera important de mesurer le risque de libération du principe actif par l'éponge marine arrivée à saturation avant de conclure quant aux potentialités de bioremédiation de l'espèce.

Au vu de la consommation croissante de médicaments dans le monde, des teneurs de plus en plus importantes de principes actifs médicamenteux sont mesurées dans la colonne d'eau et dans les sédiments marins. Leur bioaccumulation dans le réseau trophique et leurs effets, sur le long terme, sur la biocénose marine sont, par contre, peu étudiés. Leur métabolisation par les micro- et macro-organismes marins est également susceptible de conduire à des dérivés structuraux méconnus, potentiellement actifs, et d'entraîner des effets sur la biocénose. Enfin, les synergies possibles entre principes actifs, dérivés ou par l'intervention d'autres contaminants chimiques comme les pesticides sont autant de sources de contamination qui rendent encore plus complexe voire illusoire l'évaluation de leurs impacts sur l'écosystème marin.

## CONCLUSION

Au cours de cette première étude sur les propriétés potentiellement bioremédiatrices de l'éponges marine *H. perlevis* vis-à-vis de l'acétaminophène, nous avons pu mettre en évidence la présence de plusieurs dizaines de  $\mu\text{g}$  de principe actif dans l'extrait méthanolique de l'éponge. Par ailleurs, une différence significative de cette teneur en principe actif dans l'éponge a pu être observé au bout de 5h de filtration suggérant un mécanisme de biodégradation ou d'expulsion de la molécule dans le milieu. Toutefois, cette bioaccumulation dans l'éponge n'est pas suffisante pour observer une réelle diminution de la concentration en acétaminophène dans l'eau de mer des aquariums. De nouvelles expérimentations sont envisagées prochainement.

## REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du stage de première année du Master Biotechnologies de C. Danthu. Ces recherches font partie du projet « Anticelto » financé par l'AFB. Les auteurs tiennent à remercier Q. Sotto, ostréiculteur à Local, ainsi que le Service des Affaires Internationales de l'UBS pour nous avoir permis de présenter ces travaux à l'occasion des 25 ans de l'IHSM de Toliara, à Madagascar.

WoRMS Editorial Board 2018. World Register of Marine Species. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2018-10-15 [doi:10.14284/170]

## REFERENCES

- ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicaments et des produits de Santé) 2014. Analyse des ventes de médicaments en France en 2013, p36.
- Alygizakis NA, Gago-Ferrero P, Borova VL, Pavlidou A, Hatzianestis I, Thomaidis NS 2016. Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. *Sci Total Environ* 541: 1097–1105.
- Aresta A, Marzano CN, Lopane C, Corriero G, Longo C, Zambonin C, Stabili L 2015. Analytical investigations on the lindane bioremediation capability of the demosponge *Hymeniacidon perlevis*. *Mar Pollut Bull* 90: 143–149.
- Gentric C, Rehel K, Dufour A, Sauleau P 2016. Bioaccumulation of metallic trace elements and organic pollutants in marine sponges from the South Brittany Coast, France. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 51: 213–9
- Hider-Mlynarz K, Cavalié P, Maison P 2018. Trends in analgesic consumption in France over the last 10 years and comparison of patterns across Europe. *Br J Clin Pharmacol* 84: 1324–1334.
- Paíga P, Santos LHMLM, Delerue-Matos C 2017. Development of a multi-residue method for the determination of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in aqueous environmental matrices by SPE-UHPLC–MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 135: 75–86.
- Perelo LW 2010. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J Hazard Mater* 177: 81–89.