



N° ORDRE 37/2013

**UNIVERSITE DE CARTHAGE**

N° ORDRE 42250

**FACULTE DES SCIENCES DE BIZERTE**

**UNIVERSITE DE LILLE**

## **THESE EN COTUTELLE**

**Présentée pour l'obtention du titre**

**Docteur en chimie**

par

**Ines TLILI**

### **DÉVELOPPEMENT ANALYTIQUE ET SUIVI DANS L'ENVIRONNEMENT DES TRACES DES ANTIBIOTIQUES À USAGES HUMAIN ET VÉTÉRINAIRE**

Soutenue le 20 décembre 2016 devant le jury composé de :

<b>Mme Sameh AKRICHE-TOUMI</b>	Professeur, F.S. Bizerte	Présidente
<b>M. Rafik KALFAT</b>	Professeur, INRAP	Rapporteur
<b>M. Pascal WONG WAH CHUNG</b>	Professeur, Université d'Aix Marseille	Rapporteur
<b>M. Moomen BAROUDI</b>	Professeur, Université Libanaise	Examineur
<b>Mme Ibtissem GHORBEL-ABID</b>	Maitre-assistante, INRAP	Co-encadrant
<b>Mme Sopheak NET-DAVID</b>	Maitre de conférences, Université Lille 1	Co-encadrant
<b>M. Riadh TERNANE</b>	Professeur, F.S. Bizerte	Directeur de thèse
<b>M. Baghdad OUDDANE</b>	Professeur, Université Lille 1	Directeur de thèse
<b>M. Giovanni CARIA</b>	Ingénieur d'études, INRA	Invité

## Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une thèse en cotutelle entre la Faculté des Sciences de Bizerte au Laboratoire d'Application de la Chimie aux Ressources et Substances Naturelles et à l'Environnement (LACReSNE), équipe de chimie de l'environnement et l'Université de Lille1, Sciences et Technologies au Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR), équipe de chimie analytique et marine sous les directions respectives des Professeurs Riadh Ternane et Baghdad Ouddane. Les co-encadrements ont été assurés par Madame Ibtissem Ghorbel-Abid, Maitre-assistante à l'Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-chimique (INRAP) et Madame Sopheak Net-David, Maitre de conférences à l'Université de Lille1, Sciences et Technologies.

Cette thèse est la récolte des travaux de plusieurs personnes dont j'ai eu l'honneur de faire connaissance dans les deux laboratoires.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement au Professeur Malika Trabelsi-Ayadi pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire (LACReSNE) et qui m'a orientée vers les travaux de recherche sur l'environnement, sa confiance en moi et les discussions fructueuses m'ont permis de mener à bien ce projet de recherche.

Ma reconnaissance concerne spécialement Monsieur Riadh Ternane et Madame Ibtissem Ghorbel-Abid pour m'avoir accepté dans l'équipe de recherche de l'environnement (LACReSNE) et pour avoir accepté de diriger mes travaux de recherche et pour votre apport scientifique dans le cadre de la thèse de doctorat. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, la confiance que vous m'avez constamment témoignée.

Pour ses qualités humaines, pour son soutien et sa confiance en moi, mes sincères remerciements et mon respect s'adressent à Monsieur Baghdad Ouddane qui a accepté de m'accueillir et co-diriger ma thèse au laboratoire (LASIR).

Je suis très reconnaissante à Madame Sopheak Net-David, pour son accueil chaleureux, pour son encadrement, ses conseils judicieux, pour m'avoir apporté une compréhension plus approfondie des divers aspects du sujet de thèse, pour sa disponibilité, ses nombreux conseils et sa rigueur scientifique.

J'exprime des sincères remerciements à Monsieur Giovanni Caria, responsable technique du laboratoire d'analyse chromatographiques-INRA d'Arras, pour m'avoir accueilli

au sein de son équipe de recherche, pour son intérêt scientifique, l'aide et les améliorations dans le domaine de la chimie analytique qu'il m'a offert lors de ce travail.

Je remercie vivement tous les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Pascal Wong Wah Chung, Professeur à l'Université Aix Marseille et à Monsieur Rafik Kalfat, Professeur l'Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-chimique (INRAP), pour avoir accepté la tâche de rapporteur de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Gérôme Rose, technicien de laboratoire à l'INRA d'Arras, pour ses conseils, et les différentes formations sur les systèmes LC/MS/MS dont il m'a fait profiter. Je remercie également le directeur de l'INRA Monsieur Antoine Richard, tous les ingénieurs, techniciens et secrétaires de l'INRA pour leur aide et leurs conseils précieux.

Je tiens à remercier Anastasia, Tudor, Suzannah, Bochra, Christine ainsi que toute la famille de l'équipe de la chimie analytique et marine du laboratoire (LASIR) pour leur bonne humeur et tous les bons moments que nous avons partagé ensemble.

Je n'oublierai pas de remercier de tout mon cœur la petite famille du laboratoire LACReSNE, avec qui j'ai partagé d'innombrables moments de complicité et de bonne humeur et l'assistante du laboratoire Rim Dhif, pour son aide précieuse dans les procédures administratives.

## Remerciements particuliers

*Une grande part de ma reconnaissance va tout particulièrement à mes amours :*

*Ma chère MAMAN, qui a joué un rôle très important dans ma vie en me donnant un environnement idéal dans mon enfance et m'enseignant les valeurs d'humanité et d'honnêteté avec lesquelles j'ai essayé d'aborder mon travail scientifique. Merci de m'avoir supporté lors des moments difficiles de ma thèse, son amour, sa grande patience, sa tendresse, son soutien moral et matériel m'ont été indispensables tout au long de ces années.*

*Mon cher fiancé, MOHAMED, merci infiniment de m'avoir aussi supporté énormément lors des moments difficiles de ma thèse, ton amour, ta compréhension, ton soutien moral et surtout ton optimisme durant ces plusieurs années étaient bien évidemment indispensables pour accomplir ce travail.*

*Mes profonds remerciements à ma sœur « BASSOUMA » pour tout le soutien moral, la patience, l'aide qu'elle m'a apporté tout le long des années difficiles.*

*Je ne saurais oublier mon PERE pour son encouragement, soutien matériel et surtout moral ainsi que tout le reste de la famille*

*J'espère que ce travail que je vous dédie, témoigne toute ma reconnaissance et mon estime à votre regard.*

*J'exprime également mes sincères remerciements à mon amie, RAFIKA, son soutien et sa patience sont sans égal lors de ces longues journées de travail au laboratoire. Grâce à ses aides et conseils, J'ai pu surmonter toutes les difficultés.*

*Enfin, je tiens à remercier ma chère « binôme », MAROUA, pour son soutien, ses conseils et sa collaboration tout au long des dernières dix années, et je lui souhaite pleins de réussites familiales et professionnelles.*

## **Résumé**

En raison de leur utilisation répandue dans les soins de santé humaine et animale, les antibiotiques et autres résidus de médicaments sont omniprésents dans l'environnement et en particulier dans le milieu aquatique. Compte tenu de leurs impacts potentiels sur le fonctionnement de l'écosystème et la santé publique, la quantification des résidus de médicaments sur l'environnement est devenue une nécessité. Diverses techniques d'analyse se sont avérées être appropriées pour la détection fiable de tels composés. Cependant, la quantification peut être difficile car ces contaminants émergents sont présents à l'état de traces ou d'ultra-traces. Par conséquent, l'exactitude des analyses environnementales dépend à la fois de l'efficacité et de la robustesse de la méthode d'extraction et de quantification.

Des procédures d'analyse de traces de ces contaminants émergents, ont été mise au point et des méthodes basées sur des analyses LC-MS/MS ont été développées. Pour les échantillons aqueux, l'extraction est menée sur phase solide (SPE, OASIS HLB). Les MLOQ sont comprises entre 0,2 et 3 ng/L. Pour la matrice solide, la procédure d'extraction à haute température et pression a été utilisée suivie d'une purification SPE.

Afin d'évaluer le contexte de la pollution totale, la méthodologie analytique validée a été appliquée à des échantillons d'eaux potables et usées provenant de la France et de la Tunisie. Les résidus de médicament associés à la matière solide en suspension (MES) ont également été quantifiés pour compléter l'évaluation du degré de pollution environnementale.

### **Mots clés :**

Eau, sol, polluants émergents, traces, préparation d'échantillon, LC-MS/MS.

## **Abstract**

Due to their widespread use in human and animal health care, antibiotics and other drug residues are ubiquitous in the environment in general and the aquatic environment in particular. Given their potential impacts on the functioning of the ecosystem and public health, the quantification of drug residues on the environment has become a necessity. Various assay techniques have been found to be suitable for the reliable detection of such compounds. However, quantification can be difficult because these emerging contaminants are present in the trace or ultra-trace state. Therefore, the accuracy of environmental analyzes depends on both the effectiveness and the robustness of the extraction and quantification method.

Trace analysis procedures for these emerging contaminants were therefore developed and methods based on LC-MS / MS analyzes were also developed. For aqueous samples, extraction is carried out on solid phase (SPE, OASIS HLB). MLOQs range from 0.2 to 3 ng/L. For the solid matrix, the extraction procedure at high temperature and pressure was used followed by SPE purification.

To assess the context of total pollution, the validated analytical methodology was applied to drinking and wastewater samples from France and Tunisia. Drug residues associated with suspended solid matter (SSM) were also quantified to complete the assessment of the degree of environmental pollution.

## **Keywords :**

Water, Soil, emergents pollutants, traces, sample preparation, LC-MS/MS.

## Liste des abréviations

AMP: Ampicilline  
APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique en anglais (Atmospheric-Pressure Chemical Ionization)  
CBZ: Carbamazepine  
CEC : Capacité d'échange cationique  
CI : Ionisation chimique  
CIP : Ciprofloxacine  
CTC : Chlortétracycline  
CV : Coefficient de Variation  
DAN : Danofloxacine  
DIC: Dicyclanil  
DIF: Difloxacine  
DOX : Doxycycline  
EI: Ionisation d'électron (Electron Ionization)  
ENR : Enrofloxacine  
EP : Eau potable  
ESI+ et ESI- : Mode d'ionisation par electrospray positive et négative (Electrospray Ionization)  
EU : Eau usée  
Ff: Florfénicol  
FQs : Fluoroquinolones  
GC: Chromatographie en phase gazeuse (Gaz chromatography)  
GEM: Gemfibrozil  
HPLC:Chromatographie liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography)  
HPLC-MS/MS: Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem  
 $K_{ow}$  : Coefficient de partage octanol/eau  
LC: Chromatographie en phase liquide (Liquid Chromatography)  
LLE: Extraction liquide-liquide  
LOD: Limite de detection  
LOQ: Limite de quantification  
MAE: Extraction assistée par micro-onde  
MES : Matières en suspension  
MIN: Minocycline  
MLOD: Limite de Détection méthodologique  
MLOQ: Limite de Quantification méthodologique  
MMLLE: Microporous Membrane Liquid Liquid Extraction  
MON: Monensin  
MRM: Mode de transitions sélectionnées (Multiple Reaction Monitoring)

MS: Spectrométrie de masse  
MS/MS: Spectrométrie de masse en tandem  
ND : Non détecté  
NOR: Norfloxacin  
Nc: Nombre de cycle  
OASIS HLB : Type de colonne d'extraction en phase solide  
OFL: Ofloxacin  
ORB: Orbifloxacin  
OTC: Oxytétracycline  
PLE: Extraction liquide à haute pression (Pressurized Liquid Extraction)  
QqQ : Triple quadripole  
SAX: Strong Anion eXchange  
SBZ: Sulfabenzamide  
SDMX: Sulfadiméthoxazole  
SDZ: Sulfadiazine  
SMR: Sulfamérazine  
SMX: Sulfaméthoxazole  
SMZ: Sulfaméthazine  
SN: Sulfanilamide  
SNs: Sulfonilamides  
SPE : Extraction en phase solide (Solid Phase Extraction)  
SPLE: Extraction sélective de liquide pressurisé (Selective Pressurized Liquid Extraction)  
SPME: Micro-extraction en phase solide (Solid Phase Micro Extraction)  
STEP : Station d'épuration  
STZ: Sulfathiazole  
T° : Température  
TC : Tétracycline  
TCs : Tétracyclines  
Ts : Temps statique  
TRI: Triméthoprim  
TYL: Tylosine  
P: Pression  
UAE: Extraction assistée par ultrasons (Ultrasonic-Assisted Extraction)  
UV : Ultraviolet



# Sommaire

<i>Introduction générale</i>	1
<i>Chapitre I : Synthèse bibliographique</i>	5
I. MEDICAMENTS ET ENVIRONNEMENT	6
II. ANTIBIOTIQUES : GENERALITES ET DEFINITION	7
II.1. DIFFERENTS TYPES D'ANTIBIOTIQUES	7
II. 2. MODE D'ACTION	8
II. 3. ANTIBIOTIQUES A USAGE VETERINAIRE	9
II. 4. ANTIBIOTIQUES A USAGE HUMAIN	9
II. 5. CONSOMMATION D'ANTIBIOTIQUES	10
II. 5.1. EN FRANCE	10
II.5.2. EN TUNISIE	14
II.6. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES ANTIBIOTIQUES	16
II.7. DISTRIBUTION ENVIRONNEMENTALE DES ANTIBIOTIQUES	24
II.7.1. VOIES D'INTRODUCTION DANS LE MILIEU NATUREL	24
II.7.2. ÉTAT DE CONTAMINATION DES MILIEUX RECEPTEURS	25
II.8. TOXICITE DES MEDICAMENTS	31
II.8.1 EFFET SUR LE METABOLISME	31
II.8.2. EFFET SYNERGIQUE	33
II.8.3. EVALUATION DES RISQUES MEDICAMENTEUX SUR L'ENVIRONNEMENT	33
III. METHODES ANALYTIQUES DE DETECTION DES ANTIBIOTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT	34
III.1. PRETRAITEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	34
III.1.1. PRETRAITEMENT DES MATRICES AQUEUSES	34
III.1.2. PRETRAITEMENT DES MATRICES SOLIDES	34
III.1.3. PREPARATION DES ECHANTILLONS DANS LA MATRICE AQUEUSE	35
III.1.4. PREPARATION DES ECHANTILLONS DANS LA MATRICE SOLIDE	39
III.2. METHODES D'ANALYSE	43
III.2.1. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG)	43
III.2.2. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE (CPL)	44
III.2.3. DETECTEURS DE LA CHROMATOGRAPHIE	45
III.2.4. SPECTROMETRIE DE MASSE (MS) ET SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM (MS/MS)	46
<b>CHAPITRE II: MATERIELS E METHODES</b>	<b>60</b>
I. STANDARDS ANALYTIQUES ET REFERENCES	61
II. ANALYSE PAR SPE-LC/MS/MS	63
II.1. SEPARATION DES ANTIBIOTIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	63
II.2. DETECTION DES ANTIBIOTIQUES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM	64
II.2.1. SOURCE D'IONISATION	64
II.2.2. ANALYSEUR	65
II. 2.3. DETECTEUR	66
III. OPTIMISATION DES METHODES D'ANALYSE.	67
III.1. PROCEDURE D'ETUDE	67
III.2. PREPARATION D'ECHANTILLON	70
III.2.1. ECHANTILLONS EN PHASE LIQUIDE	70
III.2.2. ECHANTILLONS EN PHASE SOLIDE	71
	10

IV. VALIDATION DE L'EXTRACTION A HAUTE TEMPERATURE ET HAUTE PRESSION	75
IV.1. CRITERES D'UNE VALIDATION ANALYTIQUE	75
IV.1.1. LINEARITE	75
IV.1.2. SPECIFICITE	75
IV.1.3. LIMITE DE DETECTION	75
IV.1.4. LIMITE DE QUANTIFICATION	75
IV.1.5. FIDELITE	75
IV.1.6. RENDEMENT D'EXTRACTION	76
<b>CHAPITRE III DEVELOPPEMENT DE LA METHODOLOGIE POUR L'ANALYSE DES COMPOSES EN PHASE LIQUIDE</b>	<b>80</b>
I. OPTIMISATION METHODOLOGIQUE	80
I.1. SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE : CHOIX DE LA SEGMENTATION, DU GRADIENT ET DU DEBIT D'ELUTION	80
I.1.1. SEGMENTATION	81
I.1.3. DEBIT D'ELUTION	87
I.1.4. DETECTION	89
II. PREPARATION DES ECHANTILLONS	92
II.1. DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES	92
II.1.1. CHOIX DE LA CARTOUCHE SPE	93
II.1.2. AJUSTEMENT DU PH	95
II.1.3. CHOIX DE L'ELUANT	97
II.1.4. CHOIX DU VOLUME DE CHARGEMENT	99
II.2. COMPARISON DES RESULTATS	104
<b>CHAPITRE IV DEVELOPPEMENT DE LA METHODOLOGIE POUR L'ANALYSE DES MEDICAMENTS EN PHASE SOLIDE</b>	<b>109</b>
I. DEVELOPPEMENT DE LA METHODE ANALYTIQUE UTILISEE	109
I.1. EXTRACTION PAR PLE	109
I.1.1. CHOIX DES PARAMETRES	110
I.1.2. CHOIX DU SOLVANT D'EXTRACTION	111
I.2. EVAPORATION	119
I.3. PURIFICATION	121
II. VALIDATION DE LA METHODE	121
<b>CHAPITRE V APPLICATION</b>	<b>131</b>
I. ANALYSE DES ECHANTILLONS D'EAU POTBLE ET D'EAU USEE	131
I.1. DESCRIPTION DES DIFFERENTS SITES D'ECHANTILLONNAGE	131
I.1.1. EN TUNISIE	131
I.1.2. EN FRANCE	133
II. CONTAMINATION DES MATRICES LIQUIDES PAR LES ANTIBIOTIQUES	134
II.1. ANALYSE GLOBALE DES RESULTATS D'ANALYSE DES ECHANTILLONS PRELEVES EN TUNISIE	135
II.2. ANALYSE GLOBALE DES RESULTATS D'ANALYSE DES ECHANTILLONS PRELEVES EN FRANCE	137
II.3. TRACES DE TETRACYCLINES	140
II.3.1 EN TUNISIE	140
II.3.2 EN FRANCE	141
II.4. TRACES DE FLUOROQUINOLONES	142
II.4.1 EN TUNISIE	142
II.4.2 EN FRANCE	143
II.5. TRACES DE SULFONILAMIDES	144

II.5.1 EN TUNISIE	144
II.5.2 EN FRANCE	145
II.6. TRACES D'AUTRES MEDICAMENTS	146
II.6.1 EN TUNISIE	146
II.6.2 EN FRANCE	147
III.TRACES DES ANTIBIOTIQUES DANS DES MATRICES SOLIDES	148
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>154</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>157</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure I. 1. Cibles de l'action des antibiotiques	9
Figure I. 2. Comparaison de la consommation des antibiotiques en Tunisie avec d'autres pays	14
Figure I. 3. Consommation des antibiotiques en Tunisie en 2013	15
Figure I. 4. Squelette de base de la famille des tétracyclines	16
Figure.I. 5. Squelette de base de la famille des sulfonilamides	18
Figure I. 6. Squelette de base de la famille des fluoroquinolones	20
Figure I. 7. Voies d'introduction dans l'environnement des résidus de médicaments [2]	25
Figure I. 8. Evaluation de la présence de 17 résidus de médicaments dans les eaux potables	27
Figure I. 9. Schéma de la SPME	36
Figure I. 10. Principe de l'extraction Soxhlet	40
Figure I. 11. Schéma de principe d'un système CPG	44
Figure I. 12. Schéma de principe d'un système CPL	45
Figure I. 13. Schéma de principe de source d'ionisation ESI (a) et APCI (b)	47
Figure I. 14. Principe d'un spectromètre de masse en tandem	48
Figure II.1. Principe de chromatographie liquide	63
Figure II. 2. Principe de l'ionisation par une source électrospray	65
Figure II. 3. Principe de l'analyseur quadripolaire	66
Figure II. 4. Illustration du mode MRM	67
Figure II. 5. Equipement SPE-LC/MS/MS (Thermo Fisher Scientific)	68
Figure II. 6. Principe du spectromètre de masse avec triple-quadripôle	70
Figure II. 7. Schéma du principe de l'extraction en phase solide	71
Figure II. 8. Remplissage de la cellule PLE	72
Figure III. 1. Aires des pics des tétracyclines avec les différentes segmentations	82
Figure III. 2. Aires des pics des sulfonilamides avec les différentes segmentations	82
Figure III. 3. Aires des pics des fluoroquinolones avec les différentes segmentations	83
Figure III. 4. Aires des pics des autres médicaments avec les différentes segmentations	83
Figure III. 5. Pourcentages des réponses des tétracyclines avec les différents gradients d'élution	85
Figure III. 6. Pourcentages des réponses des sulfonilamides avec les différents gradients d'élution	85
Figure III. 7. Pourcentages des réponses des fluoroquinolones avec les différents gradients d'élution	86
Figure III. 8. Pourcentages des réponses des autres médicaments avec les différents gradients d'élution	86
Figure III. 9. Pourcentages des réponses, des tétracyclines avec trois différents débits d'élution en ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	87
Figure III. 10. Pourcentages des réponses, des sulfonilamides avec trois différents débits d'élution en ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	87
Figure III. 11. Pourcentages des réponses, des fluoroquinolones avec trois différents débits d'élution en ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	88
Figure III. 12. Pourcentages des réponses, des autres médicaments avec trois différents débits d'élution en ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	88
Figure III. 13. Paramètres de la détection de la Tétracycline	90
	13

Figure III. 14. Rendements d'extraction des tétracyclines, obtenus avec les trois cartouches : C8, C18 Hydra et OASIS HLB	93
Figure III. 15. Rendements d'extraction des sulfonilamides, obtenus avec les trois cartouches : C8, C18 Hydra et OASIS HLB	94
Figure III. 16. Rendements d'extraction des fluoroquinolones, obtenus avec les trois cartouches : C8, C18 Hydra et OASIS HLB	94
Figure III. 17. Rendements d'extraction des autres médicaments, obtenus avec les trois cartouches : C8, C18 Hydra et OASIS HLB	94
Figure III. 18. Effet du pH de l'échantillon sur la sensibilité de la détection des antibiotiques étudiés	95
Figure III. 19. Rendements d'extraction des tétracyclines, obtenus avec trois différentes solutions d'élution	97
Figure III. 20. Rendements d'extraction des sulfonilamides, obtenus avec trois différentes solutions d'élution	98
Figure III. 21. Rendements d'extraction des fluoroquinolones, obtenus avec les trois différentes solutions d'élution	98
Figure III. 22. Rendements d'extraction des autres médicaments, obtenus avec les trois différentes solutions d'élution	98
Figure III. 23. Rendements d'extraction des tétracyclines avec trois différents volumes de chargement	100
Figure III. 24. Rendements d'extraction des sulfonilamides avec trois différents volumes de chargement	100
Figure III. 25. Rendements d'extraction des fluoroquinolones avec trois différents volumes de chargement	101
Figure III. 26. Rendements d'extraction des autres médicaments avec les trois différents volumes de chargement	101
Figure IV. 1. Rendements d'extraction des tétracyclines par l'acétonitrile	112
Figure IV.2. Rendements d'extraction des Fluoroquinolones par l'acétonitrile	113
Figure IV. 3. Rendements d'extraction des sulfonilamides par l'acétonitrile	113
Figure IV. 4. Rendements d'extraction des autres médicaments par l'acétonitrile	114
Figure IV. 5. Rendements d'extraction des tétracyclines par le méthanol	115
Figure IV.6. Rendements d'extraction des fluoroquinolones par le méthanol	115
Figure IV. 7. Rendements d'extraction des sulfonilamides par le méthanol	116
Figure IV.8. Rendements d'extraction des autres médicaments par le méthanol	116
Figure IV.9. Rendements d'extraction des tétracyclines et fluoroquinolones avec le mélange M1 de solvants	118
Figure IV. 10. Rendements d'extraction des tétracyclines et fluoroquinolones avec le mélange M2 de solvants	119
Figure IV. 11. Rendements d'extraction des tétracyclines et des fluoroquinolones avec le mélange M3 de solvants	119
Figure V. 1. Localisation des sites d'échantillonnage en Tunisie	132
Figure V. 2. Localisation des sites d'échantillonnage en France	133
Figure V. 3. Concentrations des tétracyclines dans les différents échantillons d'eaux prélevées en Tunisie	140
Figure V. 4. Concentrations des tétracyclines dans les différents échantillons d'eaux prélevés en France	141

Figure V. 5. Concentrations des fluoroquinolones dans les différents échantillons d'eaux prélevés en Tunisie	142
Figure V. 6. Concentrations des fluoroquinolones dans les différents échantillons d'eaux prélevés en France	143
Figure V. 7. Concentrations des sulfonilamides dans les différents échantillons d'eaux prélevés en Tunisie	144
Figure V. 8. Concentrations des sulfonilamides dans les différents échantillons prélevés en France	145
Figure V. 9. Concentrations des autres médicaments dans les différents échantillons prélevés en Tunisie	146
Figure V.10. Concentrations des autres médicaments dans les différents échantillons d'eaux prélevés en France	147
Figure V. 11. Concentrations des médicaments dans les échantillons solides étudiés	148

## Liste des Tableaux

Tableau.I. 1. Différentes familles d'antibiotiques et mécanismes d'action.....	8
Tableau.I. 2. Comparaison de la consommation humaine d'antibiotique de différents pays .....	11
Tableau.I. 3. Taux de croissance annuel de la consommation des médicaments en Europe.....	12
Tableau.I. 4. Comparaison de la consommation des médicaments à usage vétérinaire des pays européen .....	13
Tableau.I. 5 . Propriétés physico-chimiques des tétracyclines .....	17
Tableau.I. 6. Propriétés physico-chimiques des sulfonamides et du triméthoprimé .....	18
Tableau.I. 7 . Propriétés physico-chimiques des fluoroquinolones .....	20
Tableau.I. 8. Propriétés physico-chimiques des macrolides.....	22
Tableau.I. 9. Propriétés physico-chimiques des autres médicaments sélectionnés .....	23
Tableau.I. 10. Concentrations des contaminants pharmaceutiques dans les eaux.....	28
Tableau.I. 11. Etat de contamination par classe de médicament des eaux destinées à la boisson .....	30
Tableau.I. 12. Teneurs des sols en antibiotiques .....	31
Tableau.I. 13. Avantages et inconvénients des techniques d'extraction des médicaments des matrices liquides .....	39
Tableau.I. 14. Avantages et inconvénients des techniques d'extraction des médicaments des matrices solides.....	42
Tableau.I. 15. Différents types de détecteurs utilisés en chromatographie .....	45
Tableau.I. 16. Les techniques d'extraction et les méthodes d'analyse utilisés dans la littérature pour la détection des produits pharmaceutiques dans les différentes matrices.....	50
Tableau.II. 1. Qualité, pureté et marque des différents composés étudiés .....	62
Tableau.II. 2. Gradient d'élution de la procédure utilisée .....	69
Tableau.II. 3. Conditions initiales opératoires en mode d'ionisation positif (ESI +).....	69
Tableau.II. 4. Paramètres expérimentaux fixés pour la SPE .....	71
Tableau III. 1. Différents gradients d'élution testés .....	84
Tableau III. 2. Paramètres analytiques des antibiotiques étudiés .....	89
Tableau III. 3. Valeurs optimales de la détection.....	91
Tableau III.4. Répétabilité des temps rétention des médicaments étudiés .....	92
Tableau III. 5. Conditions opératoires de la méthode SPE.....	102
Tableau III. 6. Répétabilité de la SPE .....	103
Tableau III.7. Rendements d'extraction à C= 1µg/L et comparaison à la littérature .....	104
Tableau.IV. 1. Paramètres expérimentaux fixés pour la PLE .....	111
Tableau.IV. 2. Composition des 5 sols étudiés .....	111
Tableau.IV. 3. Différents solvants d'extraction retenus.....	119
Tableau.IV. 4 Conditions opératoires fixées pour la purification .....	121
Tableau.IV. 5. Linéarité (R <sup>2</sup> ), rendement d'extraction R(%) et coefficient de variation (CV, %).....	123
Tableau.IV. 6. Limite de détection méthodologique (MLOD), limite de quantification méthodologique (MLOQ) et coefficient de variation (CV, %) .....	124
Tableau.IV. 7. Différents solvants d'extraction et moyenne des rendements d'extraction .....	125
pour différentes familles d'antibiotiques à trois concentrations de dopage dans les sols .....	125
Tableau.IV. 8. Comparaison des rendements d'extraction des sulfonamides avec les données de la littérature .....	126

Tableau.IV. 9. Comparaison des rendements d'extraction des tétracyclines avec les données de la littérature .....	126
Tableau.V. 1. Concentrations des composés cibles dans différents échantillons d'eaux prélevées en Tunisie.....	135
Tableau.V. 2. Concentrations des composés cibles dans différents échantillons d'eaux prélevées en France.....	137
Tableau.V. 3. Concentrations individuelles des composés cibles dans différents échantillons solides étudiés.....	148

## **Liste des annexes:**

Annexe. 1. Classifications des composés pharmaceutiques détectés dans l'environnement.....	157
Annexe. 2. Consommation des médicaments prescrits en détail en France (2007).....	158
Annexe. 3. Evaluation de la consommation globale des antibiotiques (princeps/générique)..... (ministère de la santé).....	159
Annexe. 4. Evaluation de la consommation globale des antibiotiques (Secteur officinal/ secteur hospitalier).....	159
Annexe. 5. Comparaison de la consommation par classe par rapport à d'autres pays en 2013 .....	159
Annexe. 6. Evaluation de la consommation de l'association Amoxicilline + Acide Clavulanique en (Princeps/Générique).....	160
Annexe. 7. Evaluation de la consommation de la Lévofloxacine en (Princeps/Générique) depuis son introduction (ministère de la santé) .....	160
Annexe. 8. Evaluation de la consommation de la Ciprofloxacine.....	160
Annexe. 9. Evaluation de la consommation de la Ciprofloxacine (Secteur officinal/secteur hospitalier) 2011-2013.....	161
Annexe. 10. Différentes cartouches d'extraction et leur utilisation .....	161
Annexe. 11. Paramètres de détection de la carbamazépine.....	162

# **Introduction générale**

Les différents compartiments environnementaux reçoivent de nombreux polluants de manière continue provenant des différentes activités humaines. Depuis une quinzaine d'années, l'attention des chercheurs s'est portée sur la présence dans les eaux superficielles, les eaux souterraines, les eaux potables et les sols, de composés qualifiés de polluants émergents parmi lesquels figurent les produits pharmaceutiques. En effet, la mise en évidence de ces contaminants n'a été possible que grâce à l'amélioration significative des instruments et des procédures analytiques qui permettent d'atteindre désormais des limites de quantification compatibles avec les concentrations environnementales relatives à ces contaminants. Cet intérêt pour la pollution de l'eau est justifié par les réserves mondiales en eau en matière de pénurie et de qualité. Ce problème de la rareté de l'eau et de sa qualité se pose essentiellement dans les pays tels que la Tunisie.

Plusieurs substances chimiques sont de plus en plus utilisées dans la vie quotidienne ainsi que pour les activités agricoles et industrielles. Ces composés se retrouvent ainsi dispersés dans les différents compartiments environnementaux. De nombreux médicaments et principes actifs sont présents dans l'environnement. Ces contaminants, persistants dans l'environnement, ne font encore l'objet d'aucune réglementation. Ces polluants qui préoccupent la communauté scientifique regroupent les antibiotiques à usage humain et vétérinaire. La contamination de l'environnement par ces substances présente un sujet très préoccupant car elle peut présenter, à long terme, divers dangers. En effet, la présence d'antibiotiques dans l'environnement peut entraîner la prolifération de micro-organismes résistants ce qui représente une réelle menace pour la santé humaine. De plus, ils peuvent avoir des effets toxiques sur les écosystèmes. Enfin, la répartition et le devenir de ces composés organiques émergents introduits régulièrement dans l'environnement sont loin d'être connus et caractérisés.

Ces substances consommées par les hommes et les animaux sont, par la suite, excrétées et se retrouvent dans le milieu récepteur. Les stations d'épuration qui reçoivent les différentes eaux usées domestiques, industrielles et autres éliminent partiellement ces contaminants.

Ces contaminants émergents sont présents dans les effluents et dans les boues des stations d'épuration ainsi que dans les lisiers qui sont épandus sur les terrains agricoles.

L'évaluation de l'état chimique de l'eau ainsi que celle du sol est réalisée aujourd'hui principalement par la mesure de la concentration de substances polluantes. Dans les années à venir, les contaminants dits « émergents » (stéroïdes hormonaux, détergents, cosmétiques, composés antibiotiques,...) seront de plus en plus ciblés par les différentes directives, nationale et internationale, en constante évolution pour la protection de l'Homme et de son environnement.

Les normes de qualité environnementale évoluent sans cesse, et les composés recherchés sont présents dans l'environnement à l'état de traces, il apparaît donc nécessaire de développer des outils fiables permettant de les analyser dans les différents compartiments de l'environnement (eaux et sols).

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail, est de nous intéresser aux antibiotiques à usages humain et vétérinaire appartenant à plusieurs familles (tétracyclines, fluoroquinolones, sulfonamides, macrolides, antiparasitaires et phénicolés).

Dans la littérature, de nombreuses méthodes ont été développées pour l'analyse d'une ou deux familles d'antibiotiques dans l'eau. En revanche, peu de procédures ont été décrites pour le sol, matrice relativement complexe (nombreux interférents, nécessité de rompre les interactions entre les substances et la matrice).

Etant donné le milieu et les conditions d'étude, il est indispensable de détecter et de quantifier, en un nombre réduit d'analyses, et donc en un temps raisonnable, diverses familles chimiques sur un même échantillon. Il est donc nécessaire de mettre en place des procédures permettant de détecter simultanément des composés ayant des propriétés physico-chimiques différentes.

La présente étude entre dans le cadre de la chimie analytique et de l'environnement qui est liée principalement aux phénomènes de pollution pour déterminer le niveau de contamination de l'environnement par les produits pharmaceutiques.

L'objectif principal de ce travail est de développer des méthodologies d'analyse simultanée de multi-familles en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour l'analyse de traces d'antibiotiques humains et vétérinaires se trouvant en phase aqueuse et en phase solide. Ces méthodes ont été appliquées à l'analyse d'échantillons environnementaux.

Après une étude bibliographique, dans le chapitre I, et une présentation du matériel et de la méthodologie, dans le chapitre II, nous présentons dans le troisième chapitre

le développement de la méthode multi-familles pour l'analyse des composés en phase liquide. La procédure pour la phase solide est développée au chapitre IV dans lequel nous optimisons et validons une méthode d'extraction innovante, la PLE (Pressurized Liquid Extraction). Dans le dernier chapitre, nous décrivons les résultats obtenus dans le cas d'échantillons de matrices prélevées dans l'environnement.

Enfin, ce mémoire est clot par une conclusion et une ouverture sur des perspectives de recherche.

# **Chapitre I**

## **Synthèse**

### **bibliographique**

## I. Médicaments et environnement

De nos jours, l'utilisation des médicaments par l'être humain ne cesse d'accroître de manière alarmante. Pour cela, l'élaboration et le développement des médicaments prennent de plus en plus d'ampleur et attirent l'attention de plusieurs centres de recherches. En France, plus de 3000 médicaments à usage humain et 300 médicaments à usage vétérinaire sont disponibles sur le marché.

La présence des produits pharmaceutiques dans l'environnement constitue un sujet de préoccupation actuelle à l'échelle française, européenne et mondiale dans le cadre des préservations des ressources en eau. En effet, grâce à l'amélioration des techniques analytiques, les études menées au cours des dix dernières années ont montré la présence à l'état de traces de ces micropolluants dans les milieux terrestres et les milieux aquatiques, y compris, dans certains cas, dans les eaux de boisson. Conçus pour être biologiquement actives, les médicaments peuvent avoir des risques écologiques et sanitaires liés à leur présence dans l'environnement. Parmi les contaminants médicamenteux (annexe 1), les principales classes de médicaments retrouvées dans l'environnement sont :

- ✓ Les analgésiques et anti-inflammatoires
- ✓ Les antiépileptiques
- ✓ Les  $\beta$ -bloquants
- ✓ Les hypolipémiants
- ✓ Les hormones et agents contraceptifs
- ✓ Les antibiotiques

Les antibiotiques sont considérés comme marqueurs de pollution largement utilisés dans la vie quotidienne et retrouvés régulièrement dans l'environnement. C'est dans cet axe de recherche que notre intérêt s'est porté sur la détection des antibiotiques dans les milieux naturels.

## **II. Antibiotiques : généralités et définition**

Un antibiotique est une substance qui peut être naturelle ou synthétique dont il bloque la croissance des bactéries, appelé bactériostatique, et détruit définitivement la croissance des bactéries, il s'agit de bactéricide. Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à dose plus élevée. Les antibiotiques à base naturelle constituent principalement des champignons ou d'autres bactéries. Ces dernières les produisent pour éliminer les bactéries concurrentes avec lesquelles ils sont en compétition dans leur biotope. Cependant, peu d'antibiotiques naturels sont utilisables en thérapeutique humaine, pour des raisons de disponibilité dans l'organisme.

Les antibiotiques agissent de manière spécifique sur les bactéries, en bloquant une étape essentielle de leur développement : synthèse de leur paroi, de l'ADN, des protéines, ou la production d'énergie, etc. Ce blocage se produit au moment que l'antibiotique se fixe sur sa cible, une molécule de la bactérie qui participe à l'un de ces processus métaboliques essentiels. Cette interaction entre l'antibiotique et sa cible est très sélective, spécifique des bactéries et ces composés ne sont en général pas actifs ni sur les champignons ni sur les virus. Outre les antibiotiques, il existe aussi d'autres molécules actives qui agissent en tant que des agents infectieux appelés des antifongiques ou des antiviraux

Comme étant la quatrième consommatrice au niveau mondial et deuxième consommatrice au niveau européen, la France doit particulièrement s'intéresser aux problèmes potentiels liés aux rejets de résidus de médicaments dans les milieux aquatiques.

### **II.1. Différents types d'antibiotiques**

Les antibiotiques, découverts dans la première moitié du XXe siècle, sont des substances chimiques organiques d'origine naturelle ou synthétique inhibant et tuant les bactéries. Elles peuvent être classées selon leur origine (produit naturel ou de synthèse), leur spectre d'activité (liste des espèces pathogènes sur lesquelles les antibiotiques sont actifs), leur nature chimique ou enfin selon leur mode d'action. Plus précisément et sur le plan biologique, ces antibiotiques sont des substances antibactériennes, produites par des microorganismes (champignons microscopiques ou bactéries) ou par synthèse chimique et qui sont capables d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres micro-organismes. Les différentes familles d'antibiotiques et leurs mécanismes d'action sont résumés dans le Tableau I.1.

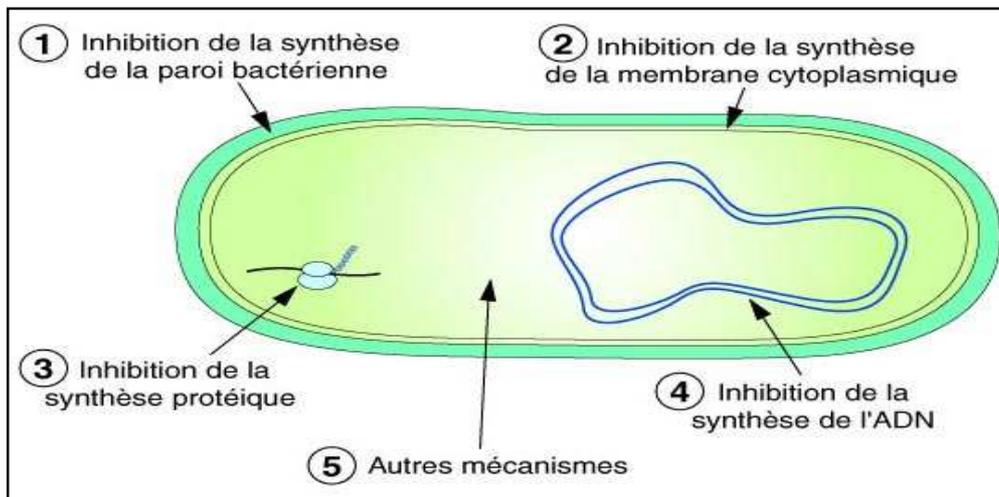
**Tableau I. 1. Différentes familles d'antibiotiques et mécanismes d'action**

<b>Famille</b>	<b>Exemple de composés</b>	<b>Exemple de médicaments</b>	<b>Mécanisme d'action</b>
Quinolones	Ofloxacin Norfloxacine	Oflocet Noroxin	Les fluoroquinolones inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe « ADN-ADN ».
Macrolides	Azithromycine Roxithromycine Tylosine	Rulid Roxithromycine- Sandoz	Les macrolides sont des antibactériens qui bloquent la synthèse protéique bactérienne. Ils sont bactériostatiques.
Tétracyclines	Tétracycline Chlortétracycline Dicyclanil	Toléxin	Les tétracyclines inhibent la synthèse des protéines au niveau de la sous unité 50 S du ribosome.
Sulfonilamides	Sulfanilamide Sulfaméthoxazole	Bactrim	Les sulfonilamides présentent une activité bactériostatique. Ils bloquent l'action de synthèse en entrant en compétition avec le PAB (Acide para-amino benzoïque).

## **II. 2. Mode d'action**

Tous les antibiotiques agissent à l'échelle moléculaire au niveau d'une ou plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie d'une bactérie.

Cependant, chaque antibiotique agit à un endroit spécifique de la bactérie. Certains inhibent la synthèse de la paroi bactérienne (B-lactames), d'autres agissent sur la membrane cytoplasmique (polymyxines), d'autres interfèrent avec la synthèse protéique bactérienne (tétracyclines, macrolides, phénicolés, et des antibiotiques inhibent le métabolisme des acides nucléiques (sulfonilamides,...) (Figure I.1). [1]



**Figure I. 1. Cibles de l'action des antibiotiques**

### **II. 3. Antibiotiques à usage vétérinaire**

Les antibiotiques à usage vétérinaire ont d'abord été employés pour traiter des maladies infectieuses graves. Parmi ces antibiotiques, nous pouvons citer : les tétracyclines, les fluoroquinolones, les macrolides etc... Actuellement, ils sont également utilisés comme additifs dans la nourriture des animaux, ce qui permet de promouvoir leur croissance.

Une partie des antibiotiques administrés n'est pas complètement métabolisée par l'organisme. Elle est rejetée via les urines et les fèces, partiellement sous forme inchangée (molécule native), l'autre partie étant sous forme de métabolites (il existe des métabolites de phase 1 sous forme non conjuguée issue d'oxydation, réduction, hydrolyse qui sont actifs et des métabolites de phase 2 conjugués, par exemple acétyles, qui sont rendus inactifs par cette conjugaison) (Bialk-Bielinska et al., 2012). Toutes ces substances sont susceptibles de se retrouver dans les différents milieux environnementaux.

Un code communautaire relatif aux médicaments vétérinaires (2001/82/CE) a été mis en application. Il regroupe les dispositifs en vigueur en matière de production, de mise sur le marché, de distribution et d'utilisation de ces médicaments pour un usage vétérinaire. Il permet notamment de limiter les risques pour les humains et l'environnement. Cependant, cette réglementation ne tient pas compte des aliments médicamenteux ou de certains additifs incorporés aux aliments des animaux (Tron et al., 2001).

### **II. 4. Antibiotiques à usage humain**

Outre les antibiotiques à usage vétérinaire, Il existe plusieurs antibiotiques à usage humain dont il englobe la famille des fluoroquinolones, des tétracyclines, les sulfonilamides et les macrolides. Ils sont excrétés via les urines et les selles sous forme inchangée ou de

métabolites. Ces composés proviennent principalement d'un usage domestique mais aussi des rejets d'industries chimiques pharmaceutiques et des établissements de soin (Bialic et al., 2013).

## **II. 5. Consommation d'antibiotiques en France et en Tunisie**

### **II. 5.1. Consommation humaine et vétérinaire des antibiotiques en France**

La France se place en quatrième position mondiale de la consommation des médicaments en termes de dépense moyenne de médicaments par habitant (Sabban, 2007 et Le Pen et al., 2007). Les substances biologiquement actives contenues dans chaque spécialité pharmaceutique se caractérisent par une grande diversité de structure chimique.

#### **II. 5.1.1. Consommation humaine**

La consommation des médicaments en France est renseignée dans différents rapports : (AFSSAPS/ANSM de 2004 – 2012 ; AMCN, 2011 ; Chevance et al., 2012 ; Haguenoer et al., 2008 ; Bouvier et al., 2010 et Viens et al., 2007).

Le rapport de l'académie nationale de pharmacie française montre que la France est une grande consommatrice des médicaments concernant les achats de médicaments par les pharmacies (Tableau I.2) : quatrième du monde après les Etats-Unis, le Japon et l'Allemagne, deuxième en Europe après l'Allemagne. Ce rapport montre aussi que la France et l'Allemagne sont les deux pays les plus consommateurs de l'Europe (près de 2 fois plus que le Royaume Uni (3<sup>ème</sup>) et l'Italie (4<sup>ème</sup>). Cependant, ces chiffres dépendent du nombre d'habitants, des conditions de vie et aussi des prix dans les pharmacies de chaque pays.

**Tableau I.2. Comparaison de la consommation humaine d'antibiotique de différents pays**

Pays	Année 2005	Année 2006
	En millions US\$	
Etats-unis	196190	197802
Japon	60273	56675
Allemagne	26733	27668
France	24520	25630
Royaume Uni	14985	15666
Italie	14496	14942
Canada	11994	13719
Espagne	10852	11629
Mexique	7481	8096
Brésil	6760	8366
Australie+ Nouvelle Zélande	5688	5803
Argentine	2037	2285
<b>Total en sélection</b>	<b>370015</b>	<b>388281</b>

**Extrait du rapport de l'académie nationale de pharmacie – 2008**

Un classement a été réalisé différemment par Sabban et al. et l'AMCN (Sabban *et al.*, 2007; AMCN, 2011) en utilisant comme source de données, la société IMS-HEALTH en 2006 et 2009 en unité standard par habitant (USH) sur 8 classes de médicaments très souvent utilisés dans 7 pays Européens (Tableau. I.3). Ils montrent que le Royaume-Uni est en tête pour la période 2006-2009 (419 USH en 2006 et 456 USH en 2009).

La France est en 2<sup>ème</sup> position (375 USH en 2006 et 382 USH en 2009), l'Espagne suit en 3<sup>ème</sup> position en 2006 mais arrive à égalité avec la France, en 2<sup>ème</sup> position en 2009. La consommation de ces trois pays est plus élevée que la moyenne des 7 pays étudiés (328 USH en 2006 et 360 USH en 2009) (Tableau. I.3).

Au regard des taux de croissance annuels moyens sur cette période, il est à conclure que la consommation en France est quasiment stable (seulement +0,5% pour 3 ans). L'Allemagne, l'Italie et l'Espagne possèdent une forte croissance : plus de 4% (4,3%, 4,5% et 4,6%) (Tableau.I.3).

**Tableau I.3. Taux de croissance annuel de la consommation des médicaments en Europe**

	2006		2009		Taux de croissance annuel moyen période 2006/2009
	Rang	Unité standard par habitant	Rang	Unité standard par habitant	
France	2	375 (380*)	2	382	+0,5%
Allemagne	4	290 (289*)	4	329	+4,3%
Italie	6	261 (265*)	6	298	+4,5%
Pays-Bas	5	277	5	310	+3,8%
Espagne	3	334 (309*)	2	382	+4,6%
Suisse	7	209	7	228	+2,9%
Royaume- Uni	1	419 (425*)	1	456	+2,9%
<b>Moyenne</b>		<b>328</b>		<b>360</b>	<b>+3,2%</b>

Point d'information de l'assurance Maladie mars 2011 ; \* : Point de repère n°12 de l'Assurance Maladie-décembre 2007

La consommation détaillée de plus 100 médicaments « hors hormones et anticancéreux » à usage humain en France a été présentée dans le rapport du CEMAGREF (Besse et Garric, 2007, Annexe 2).

Cette étude est basée sur les chiffres fournis par diverses sources au niveau national (AFSSAPS), régional (Alliance-Santé) ou local (CPAM).

#### II.5.1.2. Consommation vétérinaire

Il y a environ 600 ingrédients actifs qui sont commercialisés sur le marché européen. Cependant, les publications et les documents fournissant des données de ventes ou de consommation sont plutôt limités (Kools *et al*, 2008). Les travaux de Kools et al (2008) montrent que la France est la plus grosse consommatrice de médicaments vétérinaires en Europe (1208 Tonnes), suivie par l'Allemagne (716 Tonnes) et le Royaume-Uni (425 Tonnes). La Finlande est le pays ayant la plus faible consommation (seulement 15 Tonnes). En considérant d'une part les données rapportées pour certains pays, et d'autre part, les données extrapolables pour d'autres pays, il apparaît que l'Espagne passe en 2<sup>ème</sup> position en termes de consommation (742 Tonnes) (Tableau. I.4).

En rapportant la consommation des médicaments à la production de la viande, la France reste largement en tête : 0,21 tonnes de médicaments par tonnes de viande (tm/tv). Le

Pays-Bas passe devant l'Allemagne en 2ème position : 0, 20 tm/tv suivi par le Royaume-Uni : 0,13 tm/tv. La Suède et la Finlande sont les 2 pays où les médicaments vétérinaires sont les moins consommés : seulement 0,04 tm/tv. La France est le 2<sup>ème</sup> pays producteur de viande mais aussi le pays qui consomme le plus de médicaments vétérinaires en Europe (Tableau I.4)

**Tableau I.4. Comparaison de la consommation des médicaments à usage vétérinaire des pays européens**

Pays	Production de viande (×1000 ta)	Antibiotiques (T)	Antiparasitiques (T)	Hormone (T)
Denmark	2149	111	0,24	0,03
Finlande	377	13,3	1,8	0,0
France	5869	1179	28,5	0,7
Allemagne	6612	668,8	46,3	0,67
Suède	536	16,1	3,86	0,28
Pays -bas	2321	453	11,3	0,3
UK	3329	414	10,84	0,48
Sous-totaux (données déclarées)	21193	2855,2	61,24	1,46
<i>Données d'utilisation extrapolées</i>				
Austria	837	113	4,1	0,10
Belgique	1320	178	6,4	0,15
Cyprus	66	9	0,32	0,008
Republique tchèque	755	102	3,7	0,09
Estonia	54	7	0,26	0,006
Grec	485	65	2,4	0,06
Hongrie	909	123	4,4	0,11
Irlande	981	132	4,8	0,11
Italie	3556	479	17,2	0,41
Latvia	73	10	0,35	0,008
Lithuania	195	26	0,94	0,02
Luxembourg	22	3	0,11	0,003
Malte	16	2	0,08	0,002
Polande	3152	425	15,3	0,36
Portugale	693	93	3,36	0,08
Slovakia	291	39	1,41	0,03
Slovenia	127	17	0,62	0,015
Espagne	5308	715	26	0,61
Total	40034	5393	194	4,63
Utilisation globale totale				5592
Total EU-15	34397	4634	165	4

(Extrait de Kools et al., 2008)

Les antibiotiques constituent plus de 90% du total des médicaments à usage vétérinaire en France (Kools *et al.*, 2008, Annexe.3). La famille des tétracyclines est plus souvent utilisée (plus de 40% de ventes), la famille des sulfonilamides est en deuxième position (près de 20% de ventes), les pénicillines et les macrolides arrivent en troisième et quatrième position (autour de 10% de vente). Quatre premières familles contribuent à plus de 80% du total des ventes des antibiotiques à usage vétérinaire.

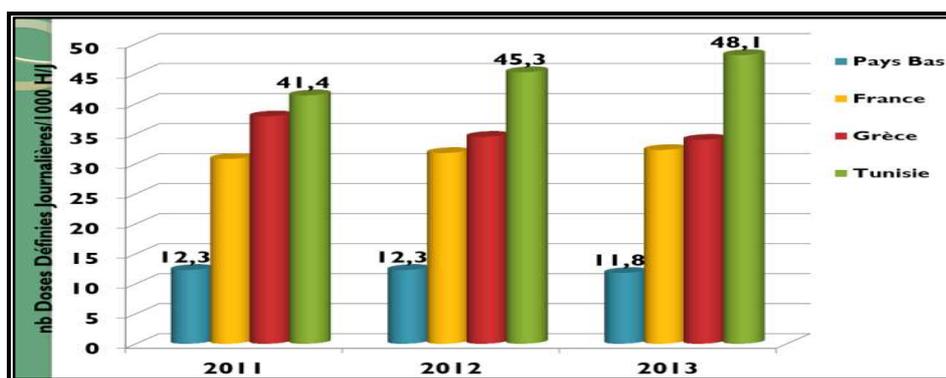
## II.5.2. En Tunisie

D'une manière générale, entre 2005 et 2013, la consommation d'antibiotiques en Tunisie a augmenté de 35 à 48,1%. Les données sont principalement issues du rapport du ministère de la santé suivant :

**Etats des lieux sur la consommation nationale des antibiotiques** (Ministère de la santé, Direction de la Pharmacie et du Médicament (DPM) dont les médicaments étudiés sont exclusivement les antibiotiques, la période d'étude s'étale entre 2011 et 2013.

Les données sont recueillies à partir de la base de données de la DPM « SIAMED », la consommation a été évaluée en Doses Définies Journalières (DDJ)/ 1000 Habitants/jour). L'évaluation a été réalisée par rapport au nombre de doses journalières par mille habitants.

Cette étude a bien montré que la Tunisie est une grande consommatrice des médicaments par rapport au Pays- Bas, la Grèce ou la France (Figure I.2).



**Figure I. 2. Comparaison de la consommation des antibiotiques en Tunisie avec d'autres pays**

Dans toutes les classes d'antibiotiques, au moins une substance active a été retirée du marché. L'innovation thérapeutique est désormais trop modeste pour assurer le renouvellement du marché. Cette situation a eu pour corollaire un développement important du marché des génériques en Tunisie. Les génériques représentaient, en 2012, 63 % de la

consommation d'antibiotiques en ville (exprimée en pourcentage de nombre de DDJ). Cette proportion a diminué à 60% en 2013 avec l'augmentation d'utilisation des principes (de 37% en 2012 à 40% en 2013) (Annexe 3).

Concernant la répartition de la consommation d'antibiotiques entre le secteur de ville et l'hôpital durant la période (2011, 2013), en volume, et en doses définies journalières, les antibiotiques sont plus largement utilisés dans le secteur de ville que dans le secteur hospitalier. La consommation dans le secteur de ville passe en 2011 de 23,3% à 32,5% en Doses Définies Journalières pour 1000 habitants. La consommation dans le secteur hospitalier diminue entre 2011 et 2012 mais reste plus ou moins stable entre 2012 et 2013 (Annexe 3).

La consommation des antibiotiques par classe thérapeutique dans les secteurs officinal et hospitalier (2013) est illustrée dans la Figure I.3. Cette étude a montré que les Pénicillines occupent la 1ere position avec 60,8% dans le secteur officinal ( beaucoup plus élevée par rapport à la consommation en Grèce avec 38%) et atteint 71% dans le secteur hospitalier , suivi par les macrolides et lincosamides qui présentent 9,8% dans le secteur hospitalier et presque le double (16,6%) dans le secteur officinal tandis que les aminosides occupent la dernière position avec une valeur inférieur à 1% dans les deux secteurs (Annexes 4, 5, 6, 7,8 et 9).

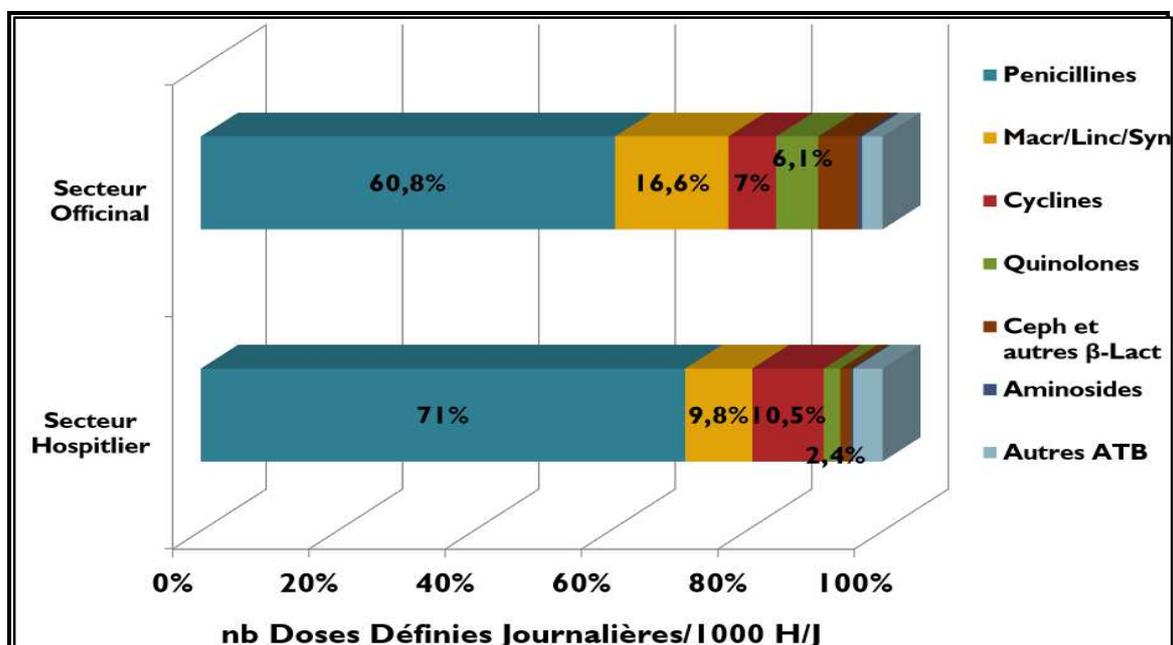


Figure I. 3. Consommation des antibiotiques en Tunisie en 2013

(Ministère de la santé)

## II.6. Propriétés physico-chimiques des antibiotiques

Des antibiotiques appartenant à différentes familles chimiques ont été choisis en fonction de leur consommation en médecine vétérinaire et humaine.

### Tétracyclines :

Ces molécules ont un caractère amphotère, possédant trois sites ionisables et peuvent exister sous formes cationique, anionique ou neutre. Elles ont pour caractéristique de posséder quatre cycles associés (Figure I.4). Ce sont donc des composés plutôt lipophiles ce qui leur permet, par exemple, de traverser la membrane cellulaire pour atteindre leurs cibles dans l'organisme. Elles sont substituées par des groupements plus ou moins hydrophiles (hydroxyle, amide, cétone). Ces substances sont polaires ( $\log K_{ow}$  entre -1,30 et -0,02) et sont solubles dans l'eau.

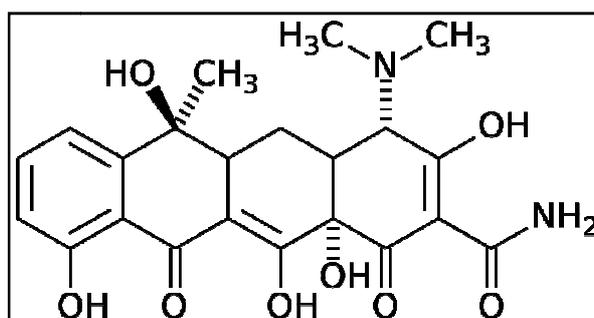
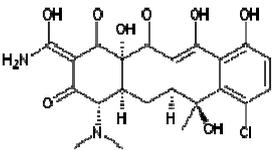
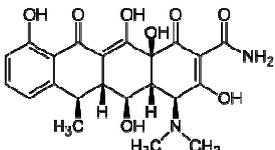
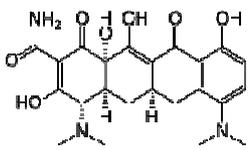
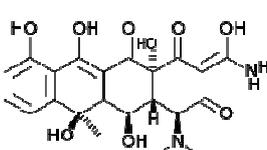
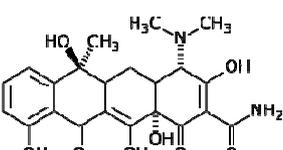


Figure I. 4. Squelette de base de la famille des tétracyclines

Les tétracyclines étant très utilisées en médecine vétérinaires. Cinq substances appartenant à cette famille ont été choisis dans cette étude : la tétracycline, l'oxytétracycline, la chlortétracycline, la doxycycline et la minocycline. Leurs propriétés sont rassemblées dans le Tableau I.5.

**Tableau I. 5. Propriétés physico-chimiques des tétracyclines**

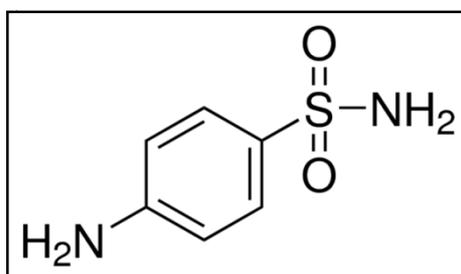
Composé	Structure chimique	log K <sub>ow</sub>	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pKa
Chlortétracycline		-0, 62	630 (25°C)	pKa <sub>1</sub> = 3, 30 pKa <sub>2</sub> = 7, 44 pKa <sub>3</sub> = 9, 27
Doxycycline		-0, 02	630 (25°C)	pKa <sub>1</sub> = 3, 50 pKa <sub>2</sub> = 7, 70 pKa <sub>3</sub> = 9, 50
Minocycline		0, 05	52000 (25°C)	pKa <sub>1</sub> = 2, 81 pKa <sub>2</sub> = 5, 0 pKa <sub>3</sub> = 7, 8
Oxytétracycline		-0, 90	313 (25°C)	pKa <sub>1</sub> = 3, 27 pKa <sub>2</sub> = 7, 32 pKa <sub>3</sub> = 9, 11
Tétracycline		-1, 30	231(25°C)	pKa <sub>1</sub> = 3, 30 pKa <sub>2</sub> = 7, 68 pKa <sub>3</sub> = 9, 30

K<sub>ow</sub>= coefficient de partage octanol/ eau (Sassman et al., 2005 ; Pubchem).

### **Sulfonilamides et molécule associée (triméthoprime) :**

Les substances appartenant à la famille des sulfonilamides possèdent un groupement sulfonilamide (Figure I.5) qui leur confère un caractère polaire (log K<sub>ow</sub> entre -0,62 et 1,63). Ces composés sont relativement solubles dans l'eau. Comme les tétracyclines, les sulfonilamides sont des substances amphotères avec deux fonctions ionisables, l'amine aromatique étant faiblement basique et l'amide sulfoné étant, quant à lui, faiblement acide. Les sulfonilamides sont plus ou moins mobiles en fonction du pH dans les matrices

environnementales, les composés sous leur forme anionique étant solubles dans l'eau (Kurdwadkar et al., 2007).



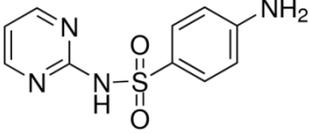
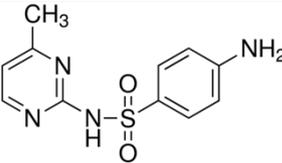
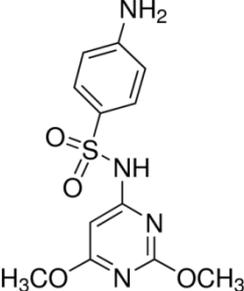
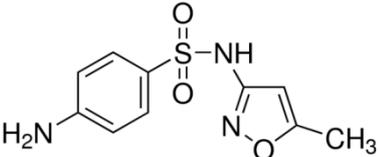
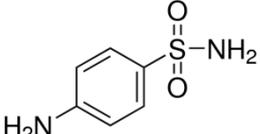
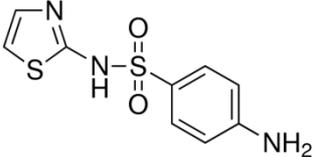
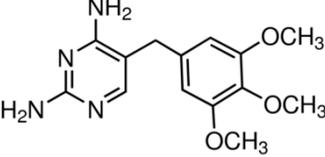
**Figure.I. 5. Squelette de base de la famille des sulfonilamides**

Etant donné que les sulfonilamides sont très fréquemment administrées aux animaux, notre choix s'est porté sur huit composés appartenant à cette famille d'antibiotiques: la sulfanilamide, le sulfathiazole, la sulfadiméthoxine, la sulfamérazine, la sulfadiazine, le sulfaméthoxazole, le sulfaméthazine et la sulfabenzamide.

Le triméthoprime a été également choisi car il s'agit d'un antibiotique très souvent utilisé en association avec un sulfonilamide, notamment le sulfaméthoxazole. Cette combinaison représente une méthode efficace pour combattre les bactéries. Il appartient à la famille diaminopyrimidines qui inclut deux groupes amines et un cycle pyrimidine. Ces substances ont un caractère basique lié aux deux groupements aminés. Le triméthoprime est relativement polaire et soluble dans l'eau, présentant ainsi des propriétés physico-chimiques très proches des sulfonilamides. Les propriétés des sulfonilamides et du triméthoprime sont données dans le Tableau I.6.

**Tableau I.6. Propriétés physico-chimiques des sulfonilamides et du triméthoprime**

Composé	Formule semi-développée	log $K_{ow}$	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pKa
Sulfabenzamide		1, 30	310 (30°C)	pKa <sub>1</sub> = 1, 20 pKa <sub>2</sub> = 4, 60

Sulfadiazine		-0, 09	77 (25°C)	pKa <sub>1</sub> = 2, 00 pKa <sub>2</sub> = 6, 50
<b>Composé</b>	<b>Formule semi-développée</b>	<b>log K<sub>ow</sub></b>	<b>Solubilité dans l'eau (mg/L)</b>	<b>pKa</b>
Sulfamérazine		0, 89	1500 (25°C)	pKa <sub>1</sub> = 2, 40 pKa <sub>2</sub> = 7, 40
Sulfadiméthoxine		1, 63	343 (25°C)	pKa <sub>1</sub> = 2, 00 pKa <sub>2</sub> = 6, 70
Sulfaméthoxazole		0, 89	610 (30°C)	pKa <sub>1</sub> = 1, 90 pKa <sub>2</sub> = 6, 00
Sulfanilamide		0, 62	7500 (25°C)	pKa <sub>1</sub> = 2, 40 pKa <sub>2</sub> = 10, 40
Sulfathiazole		0, 05	373 (25°C)	pKa <sub>1</sub> = 2, 40 pKa <sub>2</sub> = 7, 10
Triméthoprime		0, 91	400 (25°C)	pKa <sub>1</sub> = 1, 32 pKa <sub>2</sub> = 7, 45

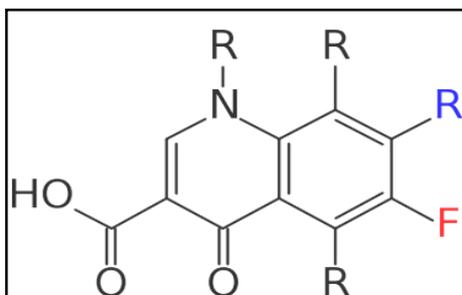
K<sub>ow</sub>= coefficient de partage octanol/ eau (Pubchem).

### Fluoroquinolones :

Les quinolones présentent une structure bicyclique avec un azote en position 1, une fonction acide carboxylique en position 3 et un carbonyle en position 4. Les fluoroquinolones contiennent, en plus, un atome de fluor en position 7 (Figure I.6). La présence du fluor ainsi

que d'une fonction acide carboxylique confèrent aux molécules un caractère polaire ( $\log K_{ow}$  entre -1,03 et 0, 89), elles sont relativement solubles dans l'eau.

En outre, ces composés ont pour la plupart deux fonctions ionisables, le groupe carboxyle et l'atome d'azote dans le cycle (Figure I.6). Les différentes formes à savoir cationique, neutre et anionique seront présentes dans le milieu selon le pH ce qui influera sur sa mobilité.

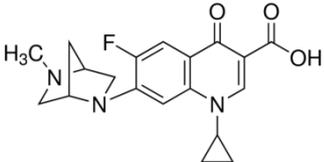
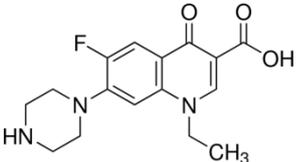
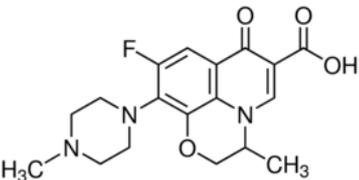
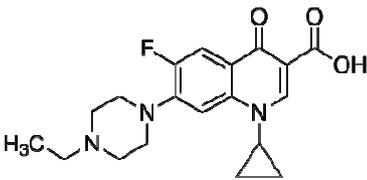
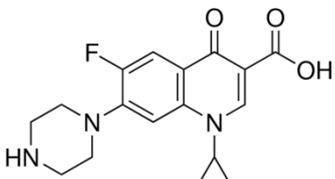


**Figure I. 6. Squelette de base de la famille des fluoroquinolones**

Sept fluoroquinolones sont choisies pour cette étude : difloxacin, orbifloxacin, danofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, enrofloxacin et ciprofloxacin. Leurs propriétés sont regroupées dans le Tableau I.7.

**Tableau I.7. Propriétés physico-chimiques des fluoroquinolones**

Composé	Formule semi-développée	$\log K_{ow}$	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pKa
Difloxacin (hydrate)		0, 89	1330 (25°C)	$pK_{a1}=4, 33$ $pK_{a2}= 9, 05$
Orbifloxacin		-0, 78	909 (25°C)	$pK_{a1}= 5, 95$ $pK_{a2}= 9, 01$

Danofloxacin		-0,3	172000 (25°C)	pK <sub>a1</sub> = 6,07 pK <sub>a2</sub> = 8,56
<b>Composé</b>	<b>Formule semi-développée</b>	<b>log K<sub>ow</sub></b>	<b>Solubilité dans l'eau (mg/L)</b>	<b>pKa</b>
Norfloxacin		-1,03	178000 (25°C)	pK <sub>a1</sub> = 6,23 pK <sub>a2</sub> = 8,55
Ofloxacin		-0,39	28300 (25°C)	pK <sub>a1</sub> = 5,97 pK <sub>a2</sub> = 8,28
Enrofloxacin		0,70	3400 (25°C)	pK <sub>a1</sub> = 6,27 pK <sub>a2</sub> = 8,30
Ciprofloxacin		0,28	30000 (20°C)	pK <sub>a1</sub> =5,90 pK <sub>a2</sub> = 8,89

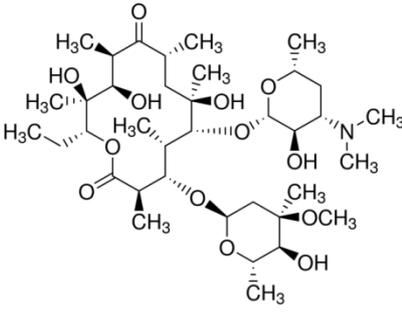
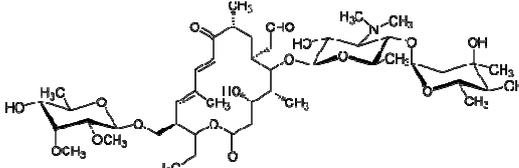
K<sub>ow</sub>= coefficient de partage octanol/ eau (Babic et al., 2007 ; Bidgood., 2004 ; DailyMed. ,2016 )

### **Macrolides :**

Les macrolides sont des antibiotiques qui présentent des macrocycles lactoniques comprenant un ensemble de 14, 15 ou 16 atomes. Ces substances sont peu polaires et peu solubles dans l'eau. Ces composés ont un caractère basique (pKa entre 7 et 9).

Deux macrolides sont inclus dans cette étude : l'érythromycine et la tylosine. Leurs propriétés sont exposées dans le Tableau I.8.

Tableau I. 8. Propriétés physico-chimiques des macrolides

Composés	Classe thérapeutique	Formule semi-développée	log K <sub>ow</sub>	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pKa
Erythromycine	Anti microbien		3, 06	1, 44 (25°C)	8, 80
Tylosine	Bactériostatique		1, 63	5 (25°C)	7, 73

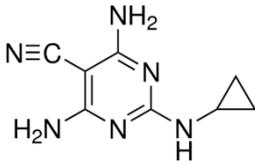
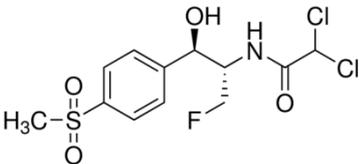
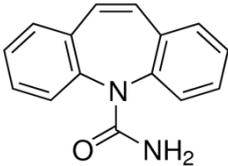
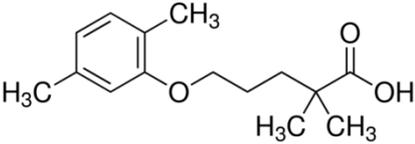
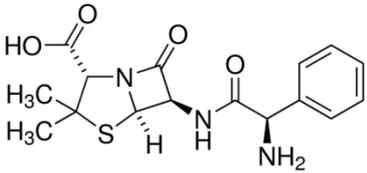
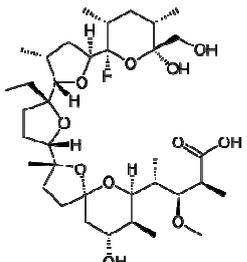
K<sub>ow</sub>= coefficient de partage octanol/ eau (Pubchem).

### Autres médicaments :

Un antiparasitaire et un phénicolé ont été sélectionnés afin d'élargir le spectre des familles d'antibiotiques étudiés : le dicyclanile (un antiparasitaire fréquemment utilisé chez les animaux), et le florfenicol. Leurs propriétés sont données dans le Tableau I.9. Le dicyclanile est peu polaire, à caractère basique (molécule protonée à pH inférieur à pKa). Le florfenicol est neutre et polaire, ce qui est probablement dû à la présence de l'atome de fluor, des atomes de chlore ou encore du groupement SO<sub>2</sub> dans la molécule.

Finalement, et pour enrichir cette étude, nous avons sélectionné deux antibiotiques, un antiépileptique et un hypépigment détectés régulièrement dans l'environnement à des concentrations élevées et considérés comme marqueurs de pollution.

**Tableau I.9. Propriétés physico-chimiques des autres médicaments sélectionnés**

Composés	Classe thérapeutique	Formule semi-développée	log $K_{ow}$	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pKa
<b>Dicyclanile</b>	Anti bactérien		2,90	50000 (20°C)	4,58
<b>Florfénicol</b>	Anti bactérien		-0,12	1300 (25°C)	9,03
<b>Carbamazépine</b>	psycholeptique-antiépileptique		2,45	17,7 (25°C)	13,90
<b>Gemfibrozil</b>	régulateur lipidique		4,77	11 (25°C)	4,5
<b>Ampicilline</b>	bêtalactamines		1,35	10100 (21°C)	2,5
<b>Monensine</b>	Antibiotique		2,89	59 (25°C)	3,4

$K_{ow}$  = coefficient de partage octanol/ eau (Pubchem, SPARC, 2008).

## **II.7. Distribution environnementale des antibiotiques**

### **II.7.1. Voies d'introduction dans le milieu naturel**

Les antibiotiques sont majoritairement fabriqués par des usines pharmaceutiques et pour une faible quantité, ou produit par des processus naturels (hormones sexuelles, pénicillines...).

Trois principales voies d'introduction des résidus de médicaments dans l'environnement sont présentées dans la Figure I.7 : usines de fabrication, usage et excrétion humains et animaux.

Pour les deux premières voies d'introduction, les résidus pharmaceutiques sont tout d'abord dirigés vers des STations d'EPuration (industrielles ou urbaines) (STEP). Les pollutions industrielles peuvent être liées à des procédures de purification ou bien des chutes d'emballage ou lors du transport ou encore les rejets des déchets de stockage.

Ces métabolites peuvent également être des formes conjuguées des molécules actives. Ces résidus médicamenteux sont plus ou moins éliminés par les traitements dans les STEP.

Les eaux traitées avec les résidus restants et leurs métabolites sont directement rejetés dans les eaux de surface où les résidus de médicaments peuvent continuer à se dégrader par les processus naturels comme l'hydrolyse, la photolyse et la biodégradation. De plus, ils peuvent aussi migrer dans les eaux souterraines grâce à des échanges irréversibles entre ces deux eaux (Figure I.7).

Dans la troisième voie, les résidus à usage vétérinaire sont rejetés directement dans le sol via les excréments des animaux. Ils vont ensuite arriver dans les eaux de surface par entraînement avec les eaux de ruissellement ou bien migrer en profondeur dans le sol. Dans le cas de l'aquaculture, les résidus de médicaments sont directement placés dans les eaux d'élevage [2].

En plus, il existe aussi des voies d'introduction supplémentaires des résidus de médicaments dans l'environnement comme des fuites des égouts, les épandages de boues des stations d'épuration sur les sols agricoles (pour les résidus d'antibiotiques qui seraient piégés dans ces boues) ou bien le rejet des médicaments non utilisés (Figure.I.7).

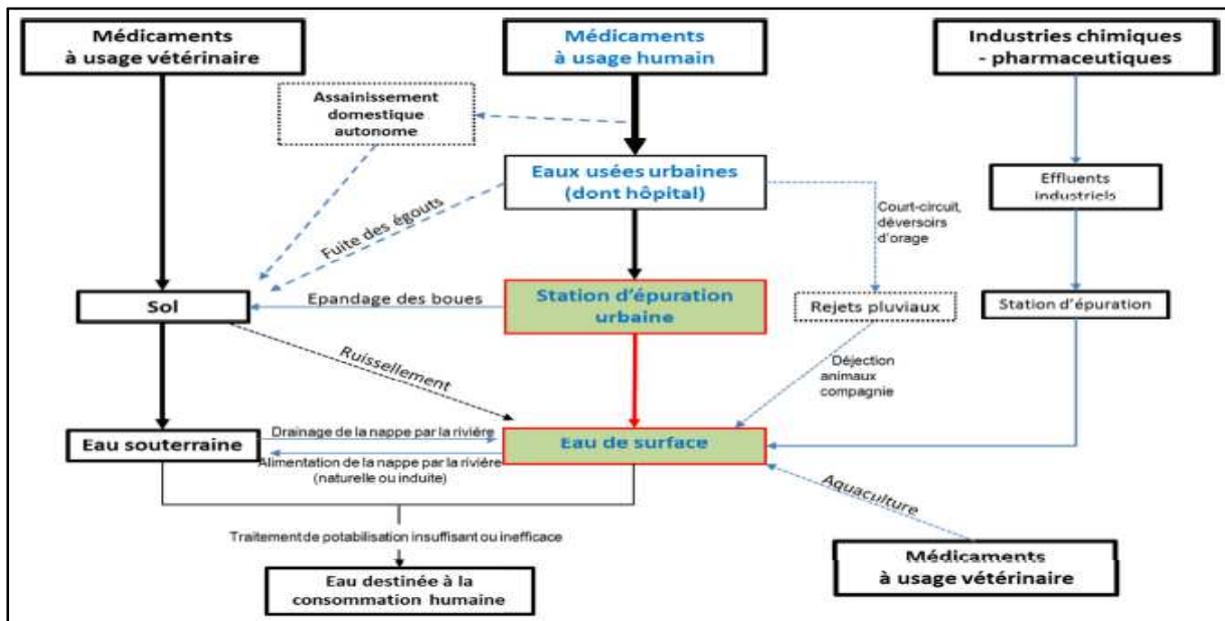


Figure I. 7. Voies d'introduction dans l'environnement des résidus de médicaments [2]

## II.7.2. État de contamination des milieux récepteurs

Grâce aux progrès dans l'analyse physico-chimique des dix dernières années, la présence de traces d'antibiotiques a été largement établie à l'échelle mondiale, dans les effluents, les eaux souterraines et de surface, les boues de station d'épuration et les sols. Ceci a permis d'élucider le niveau de contamination de l'eau et du sol par les produits pharmaceutiques.

### II.7.2.1. Eau

Les eaux superficielles (eaux des entrées et sorties des stations d'épurations, les eaux des rivières, les eaux de ruissellements, les eaux des systèmes de lagunages) constituent la destination principale des résidus de médicaments dans l'environnement. Depuis une dizaine d'années, des centaines de publications scientifiques chaque année ont étudié la problématique de la contamination de l'environnement par les composés pharmaceutiques.

**Les stations d'épurations** sont une des principales sources de contamination des eaux. Les déchets d'antibiotiques non utilisés ainsi que les antibiotiques rejetés par les humains et animaux à la fois sous forme non métabolisée et sous formes conjuguées parviennent jusqu'aux stations d'épuration. Une partie de ces composés n'est pas éliminée lors du traitement des eaux, Kummer et al., (2005) ont rapporté que l'élimination partielle des antibiotiques varie entre 54 et 99 %.

**Pour les eaux de surface**, le domaine de concentration détectée est plutôt dans l'intervalle du 1 à 10 ng/L mais les valeurs peuvent atteindre plusieurs µg/L (Yan et al., 2013).

**Pour les eaux souterraines**, il existe jusqu'à maintenant peu d'articles concernant l'occurrence des résidus pharmaceutiques. En effet, ce type de ressources en eau est censé, être peu impacté par les contaminants. Les résultats sont détaillés dans le Tableau I.10.

**Pour les eaux potables**, En général, les résidus pharmaceutiques sont peu retrouvés. Les concentrations rapportées sont de l'ordre de centaines µg/L à quelques ng/L. La carbamazépine, la caféine, la sulfaméthoxazole sont des molécules le plus souvent trouvées dans ces eaux. La carbamazépine a été détectée à des concentrations allant de 1 ng/L en France (AFSSA, 2009) jusqu'à 601 ng/L au Canada (Kleywegt et al., 2011). Dans cette même dernière étude, la lincomycine, même si elle a été très rarement détectée, a été mesurée une fois à 1413 ng/L. Parmi 28 molécules étudiées dans notre synthèse bibliographique, hormis la carbamazépine et la lincomycine, seules 3 autres molécules sont présentes à des concentrations maximales supérieures à 100 ng/L : l'acétaminophène 210,1 ng/L (Togola *et al.*, 2008), la metformine 238 ng/L en (AFSSA, 2009) et l'érythromycine 155 ng/L (Kleywegt *et al.*, 2011). Les Anti-inflammatoires (diclofénac, ibuprofène, ketoprofène et naproxène) sont aussi présents dans les eaux potables mais leur niveau de concentration est très faible. L'ibuprofène et la naproxène sont dosées jusqu'à 25 et 34 ng/L au Canada (Kleywegt *et al.*, 2011 ; Broseus *et al.*, 2009). En revanche, l'ibuprofène est trouvé seulement à 1,3 ng/L en France (Vulliet *et al.*, 2011), 8,5 ng/L en Finland (Vieno *et al.*, 2005). Le diclofénac et la naproxène ont été mesurés à des valeurs maximales de l'ordre de 3 ng/L en France (Vulliet *et al.*, 2011 ; Togola *et al.*, 2008 ; AFSSA, 2009). Les résidus pharmaceutiques les plus détectés dans les eaux potables sont regroupés dans la Figure I.8.

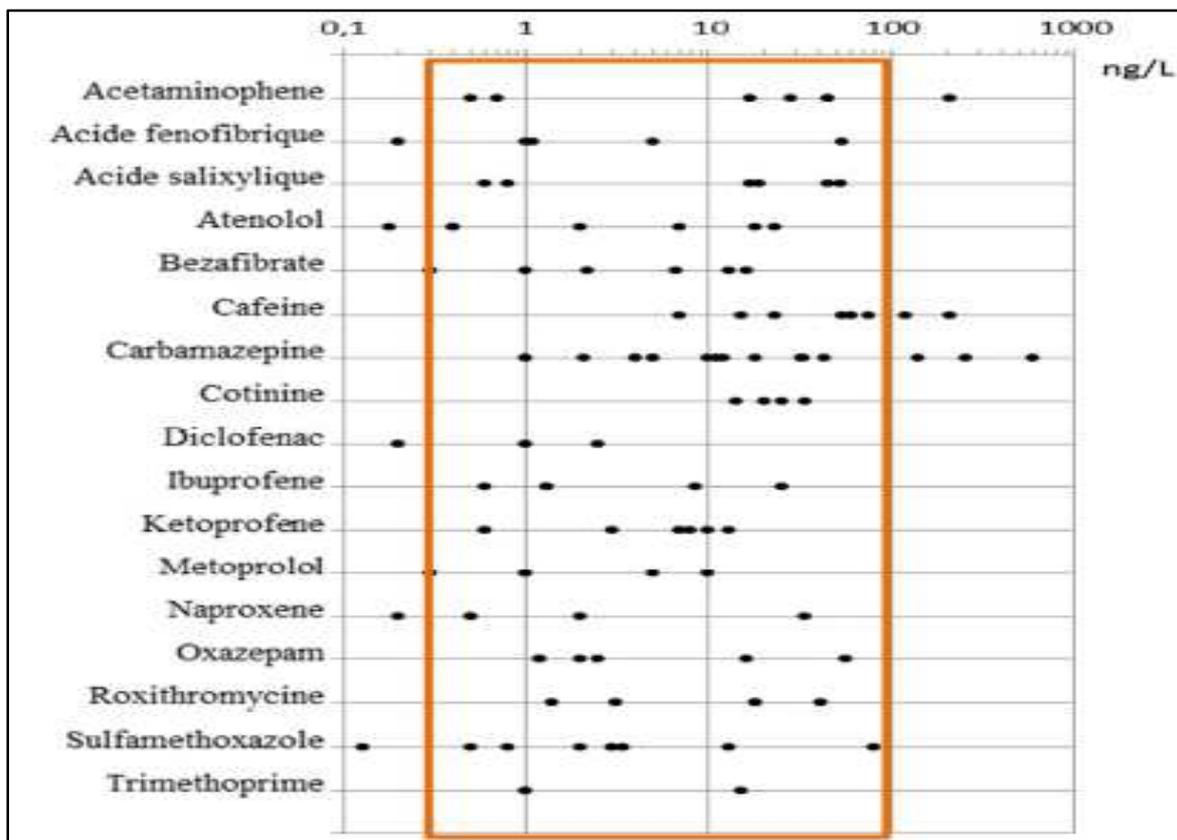


Figure I. 8. Evaluation de la présence de 17 résidus de médicaments dans les eaux potables

**Tableau I.10. Concentrations des contaminants pharmaceutiques dans les eaux**

Concentration (ng/L)										Référence
Localisation	Amérique			Europe			Asie			
	Eau de surface		Eau sou- terrine	Eau de surface		Eau sou- terrine	Eau de surface		Eau sou- terrine	
	STEP	rivière, canal		STEP	rivière, canal		STEP	rivière, canal		
	New Mexico, Balkan	New Jersey, Canada		Espagne, Italie	Espagne		Corée Taïwan,	Taïwan, chine, Vietnam		
<b>Médicament</b>										
Trimethoprim	2550	145	18	39	59.9	--	2000	1808	--	W. C. LI, 2014
Ciprofloxacine	--	77	2,8	499	ND	--	2050	40	143	W. C. LI, 2014
Sulfaméthoxazole	310	170	58	185	33	38	397	4330	248	Watkinson et al., 2009
Naproxène	1550	555	--	--	80,5	--	--	--	--	W. C. LI, 2014
Ibuprofène	11900	203	4	8000	468	395	1600	30	--	W. C. LI, 2014
Ketoprofène	--	16	--	940	293	2886	128	620	--	W. C. LI, 2014
Acide salicylique	--	--	--	3170	184	--	--	--	--	W. C. LI, 2014
Diclofénac	4200	--	--	740	794	24	1760	62	--	W. C. LI, 2014

Carbamazepine	1810	--	110	--	113	--	11500	--	--	Huerta-Fontela et al., 2009 ; Sim et al. 2011;Kleywegt et al., 2011
Spyramycine	--	--	--	--	--	--	--	160	--	Blair et al., 2013
Roxythromycine	1500	--	--	--	--	--	--	70	--	Blair et al., 2013 ; Gao et al., 2012
Oxytétracycline	--	--	--	--	--	7	--	7	--	Pailler et al., 2009 ; Zhou et al., 2012
Tétracycline	--	--	--	--	--	85	--	167	--	Pailler et al., 2009 ; Zhou et al., 2012
Chlortétracycline	--	--	--	--	--	--	1302	40	5	Sim et al., 2011
Sulfaméthazine	--	--	--	--	--	--	--	--	360	Barnes et al., 2008
Spiramycine	--	--	--	--	--	--	--	--	2980	Lopez-Serna et al., 2013
Acide amidotrizoïque	--	--	1100	--	--	--	--	--	--	Sacher et al., 2001

**Tableau I.11. Etat de contamination par classe de médicament des eaux destinées à la boisson**

Composés	Classe thérapeutique	Concentration maximale (ng.L <sup>-1</sup> )	Pays	Références
Carbamazépine	Antidépresseur	258	Etats-Unis	(Stackelberg et al.,2004)
Caféine	Stimulant	119		
Gemfibrozil	Hypolipémiant	70	Canada	(Tauber, 2003)
Ibuprofène	Anti-inflammatoire	120	Etats-Unis	(Loraine et Pettigrove, 2006)
Diclofénac		6	Allemagne	(Heberer, 2002)

### II.7.2.2. Sol

Comme les boues de station d'épuration, les fumiers contiennent des antibiotiques sous forme non conjuguée (Sukul et Spitteller, 2006). En effet, il a été montré que les formes sulfatées ou glucuronidées redonnent la molécule mère lors du stockage du fumier (Białk-Bielinska et al., 2012).

Les sols sont potentiellement contaminés par les antibiotiques suite à un transfert des composés de la boue ou du fumier jusqu'au sol (K. Kümmerer., 2003). Les épandages de boues sont réglementés, ils sont les plus encadrés de tous les épandages de matières sur les sols (fumiers, engrais...). Nous pouvons citer, la directive sur les boues de station d'épuration (86/278/CEE), qui concerne uniquement les métaux lourds (Cr, Hg, Cd, Cu, Pb, Zn). Cependant, les réglementations ne prennent pas en compte la présence de polluants organiques (à l'exception des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des polychlorobiphényles (PCB)).

En particulier, des mesures doivent être adoptées pour limiter l'introduction de substances dangereuses dans le sol qui entraîneraient des risques pour la santé humaine ou pour l'environnement.

Cependant, à l'heure actuelle, aucune liste de composés dangereux susceptibles de polluer les sols n'a été élaborée. L'écoulement des eaux provenant des sols contaminés représente également une source de contamination des eaux de surface. Peu de données sont

disponibles pour le sol par rapport à celles des eaux. Les résultats sont présentés dans le Tableau I.12.

**Tableau I.12. Teneurs des sols en antibiotiques**

Composés	Pays	Echantillons	Concentrations	Références
Tétracyclines	Allemagne	Sols traités avec lisier	Jusqu'à 0,2 ng/g	(K . Kümmer, 2003 ; Hamscher et al., 2002)
Chlortétracycline			4,6- 7,3 ng/g	(J. Beausse, 2004)
Carbamazépine	Tunisie	Sols agricoles	111 – 293 ng/g	(Fenet et al., 2012)
Carbamazépine	Mexique	Sols irrigués avec des eaux usées	5-7 ng/g	(Durán-Alvarez et al., 2009)
Macrolides	Allemagne	Sols agricoles	13-67 ng/g	(Thiele-Bruhn, 2003)
Fluoroquinolones	Suisse	Sols traités avec du lisier Sols traités avec des boues	Jusqu'à 300 ng/g	(J. Beausse, 2004)

Le manque d'étude sur l'occurrence des antibiotiques dans le sol s'explique par le manque de techniques analytiques de routine disponibles à l'heure actuelle.

Pour cette raison, il est nécessaire d'optimiser des méthodes sensibles et sélectives pour analyser ces contaminants émergents dans les sols. Ceci permet bien évidemment d'évaluer le niveau de contamination des sols.

## **II.8. Toxicité des médicaments**

### **II.8.1 Effet sur le métabolisme**

Le terme toxicité englobe les deux volets d'une part la toxicologie, d'autre part l'écotoxicologie. La première étudie les effets sur la santé de l'individu humain et animal par l'exposition à des concentrations excessives de composés minéraux ou organiques ; La deuxième étudie les effets des agents polluants sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes. Plusieurs études ont été développées sur plusieurs classes de médicaments et leur influence sur le métabolisme de la faune aquatique.

Des expositions prolongées d'organismes essentiellement aquatiques à des concentrations très faibles de molécules médicamenteuses ont permis de mettre en évidence des effets sublétaux, en particulier sur les fonctions comportementales, de reproduction ou de développement des espèces (Ferrari et al., 2003; Isidori et al., 2005; Grung et al., 2008).

Le paracétamol, couramment utilisé comme agent analgésique et antipyrétique induit la prolifération des cultures de cellules cancéreuses via les récepteurs oestrogéniques, mais ne montre pas d'activité oestrogénique chez les rongeurs (Harnagea-Theophilus *et al.*, 1999). Certaines études rapportent une augmentation de la fécondité chez la moule zébrée pour une exposition à  $36 \mu\text{g.L}^{-1}$  de fluoxétine (Fong, 1998) et une augmentation de la production d'oeufs chez le crustacé *Ceriodaphnia dubia* après exposition à  $56 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Brooks *et al.*, 2003).

La fluoxétine semble agir en augmentant la biodisponibilité de la sérotonine, qui régule l'oogenèse et la ponte chez les invertébrés. Des daphnies exposées à  $36 \mu\text{g.L}^{-1}$  ont 3 fois plus de progénitures par ponte que les daphnies témoins (Flaherty et Dodson, 2005). Certaines études rapportent des mesures de fluoxétine, norfluoxétine, paroxétine supérieures au  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dans les muscles de poissons exposés dans l'environnement (Chu et Metcalfe, 2007).

Concernant l'action des bêtabloquants, des bêta-adrénorécepteurs ont aussi été identifiés dans le foie et les muscles de poisson (*Oncorhynchus mykiss*), avec une importante similitude de séquence avec ceux des vertébrés, supposant un rôle similaire à celui observé chez les humains (Nickerson *et al.*, 2001).

Mimeault *et al.*, (2005) ont montré que le gemfibrozil (Regulateur lipidique) s'accumule dans les poissons rouges générant des perturbations du système endocrinien et une hépatotoxicité chez le rat (Sausen *et al.*, 1995).

Pour les hypolipémiants, il a été mis en évidence que les statines affectaient la synthèse hormonale chez les insectes (Debernard *et al.*, 1994).

Il a été noté une diminution significative de l'activité de la glutathion peroxydase après exposition du crustacé *Artemia parthenogenetica* à une concentration de  $3,09 \text{ mg.L}^{-1}$  de clofibrate (Nunes *et al.*, 2006).

### **II.8.2. Effet synergique**

En général, les connaissances sur la toxicité des mélanges des composés sont très limitées. Dans l'environnement les organismes (y compris les humains) sont exposés non seulement aux micropolluants isolés, mais aussi aux mélanges chimiques complexes. Les effets additifs ou même synergiques peuvent rendre de tels mélanges dangereusement puissants. Il a été longtemps supposé que seuls les composés de même mode d'action toxique étaient additifs, mais des recherches récentes ont prouvé que même les mélanges de composés de différents modes d'action toxique peuvent induire des effets non négligeables, voir même synergiques (Altenburger et al, 2004; Backhaus et al., 2004; Cleuvers, 2004; Silva et al., 2002).

Le diéthylstilbestrol (DES) reste l'un des très rares exemples pour lequel il existe des preuves tangibles de répercussion au niveau de l'espèce humaine suite à l'exposition à un perturbateur endocrinien (Burdof et Nieuwenhuijsen 1999).

### **II.8.3. Evaluation des risques médicamenteux sur l'environnement**

Kümmerer (2001) suggère que le mécanisme d'action devrait être pris en compte lors des évaluations des effets de médicaments sur les organismes utilisés dans les tests standards. Certains groupes nécessitent une attention particulière :

- les hormones par leur haute efficacité et leur faible seuil d'effet.
- les cytotoxiques et les médicaments immunosuppresseurs, étant donné leurs propriétés cancérogènes, mutagènes ou embryotoxiques.
- les antibiotiques et les désinfectants, étant donné leur forte toxicité bactérienne et leur potentiel à favoriser la résistance de souches bactériennes aux antibiotiques.

### **III. Méthodes analytiques de détection des antibiotiques dans l'environnement**

Un protocole analytique regroupe plusieurs étapes. Un prétraitement de l'échantillon est nécessaire. Par la suite, une étape de préparation d'échantillon est effectuée, qui consiste à extraire ou concentrer les substances d'intérêt tout en limitant la présence d'interférents. Les extraits obtenus sont ensuite analysés généralement par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse.

La suite résume les techniques de préparation d'échantillon, la séparation et la détection les plus souvent employées pour analyser les produits pharmaceutiques et plus précisément les cinq groupes d'antibiotiques étudiés.

#### **III.1. Prétraitement et préparation des échantillons**

##### **III.1.1. Prétraitement des matrices aqueuses**

Dans les eaux prélevées, les résidus pharmaceutiques sont présents dans la fraction dissoute et/ou la matière en suspension. Les eaux environnementales sont donc filtrées à travers un filtre de microfibrilles de verre (généralement inférieur à 1µm) (Alda et al., 2003 ; Jia et al., 2009). Les parties liquide et solide sont ensuite traitées et analysées séparément. Afin de limiter la prolifération bactérienne qui pourrait conduire à des dégradations avant analyse, plusieurs acides peuvent être utilisés : HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>... (CEAEQ, 2012).

##### **III.1.2. Prétraitement des matrices solides**

Le sol est une matrice hétérogène, une étape de prétraitement est indispensable pour obtenir des résultats analytiques représentatifs. Les solides à analyser contiennent de l'eau en proportions variables. Pour garantir la reproductibilité de la méthode, la teneur en eau doit être constante. Un séchage est indispensable puisqu'un résultat analytique est souvent exprimé en quantité de matière sèche.

Le séchage peut être réalisé par lyophilisation à l'étuve ou encore par séchage à l'air libre. Quand la lyophilisation est utilisée, les substances à analyser ne doivent pas être volatiles. De plus, l'échantillon doit être homogénéisé pour assurer la répétabilité des résultats. Pour cela, le sol sera donc tout d'abord broyé pour réduire la taille des particules puis tamisé. La taille des particules devant être inférieures ou égales à 2 mm. Un échantillon homogène composé de fines particules est obtenu.

Cette préparation permettra, en outre, une extraction efficace car le solvant pourra être facilement en contact avec une grande surface d'échantillon.

### **III.1.3. Préparation des échantillons dans la matrice aqueuse**

#### Extraction liquide-liquide (LLE)

L'extraction liquide-liquide est souvent utilisée pour extraire des antibiotiques et des stéroïdes hormonaux de matrices aqueuses (Kolpin et al., 2002 ; Reverté et al., 2003 ; Chen et al., 2006 et Balakrishnan et al., 2006 ). Le principe est basé sur le transfert des analytes entre deux phases liquides. Un inconvénient majeur de cette technique est l'utilisation d'une grande quantité de solvant organique (Suna et al., 2009).

#### Extraction sur membrane

Cette technique dérive de la LLE, c'est l'extraction la plus importante à trois phases (aqueuse/organique/ aqueuse) appelée « Supported Liquid Membrane (SLM) extraction ». Une phase organique est contenue dans un polymère poreux hydrophobe et placé entre deux liquides aqueux (le donneur et l'accepteur). Différents mécanismes de transport peuvent être mis en jeu les analytes ne pouvant passer dans la membrane organique par diffusion uniquement sous forme non chargée.

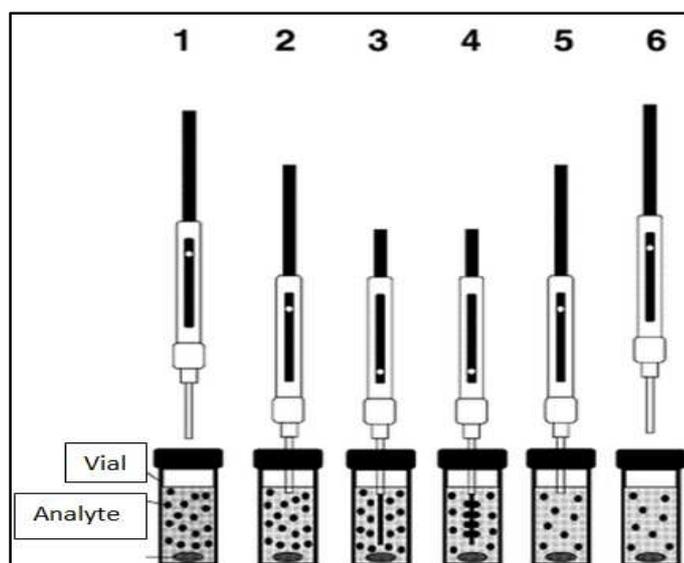
Cette technique a été utilisée seulement pour l'extraction des fluoroquinolones et des sulfonamides d'eau distillée ou d'eaux de surface (Msagati et al., 2004). Les limites de détections obtenues en utilisant l'extraction sur membrane varient entre 3 et 25 ng/L selon la substance et le type d'eau (Poliwoda et al., 2010).

#### Microextraction sur phase solide (SPME)

C'est une méthode qui peut être utilisée pour isoler et pré-concentrer des molécules organiques d'échantillons liquides (Alda et al., 2003 ; Pavlovic et al., 2007 ; Kostopoulou et Nikolaou., 2008 et Kumazawa et al., 2003). Les composés sont extraits par adsorption sur une fibre en silice sur laquelle est greffée la phase stationnaire.

Les revêtements les plus employés sont le polyacrylate et le polydiméthylsiloxane divinylbenzène (PDMS-DVB) ou encore la phase C18 (Kostopoulou et Nikolaou, 2008).

Les analytes cibles adsorbés sur la phase SPME sont élués avec un solvant organique, comme pour l'extraction en phase solide (SPE), ou désorption thermique lorsque la chromatographie gazeuse est utilisée.



**Figure I. 9. Schéma de la SPME**

(Kumazawa et al., 2003)

Le volume de sorbant étant plus petit que pour la SPE. La SPME nécessite moins d'échantillon et de solvant. Cependant la SPE permet d'obtenir de plus importants facteurs de concentrations comme l'ont illustré Balakrishnan et al (2006) lors d'une comparaison entre la SPE et la SPME pour l'extraction des sulfonilamides dans les eaux usées.

Les composés sont partagés entre le sorbant et la solution dans laquelle est immergée la fibre et seulement une partie des substances est adsorbée sur la phase, alors que la SPE est une extraction quantitative pour laquelle la totalité de la solution est passée à travers la cartouche qui retient les composés (Balakrishnan et al., 2006). Contrairement à la SPE, très peu de phases sont disponibles sur la SPME et son utilisation est plus limitée (Alda et al., 2003).

#### Extraction sur phase solide (SPE)

C'est une des techniques d'extraction, de purification et de concentration la plus employée pour tous les types des matrices liquides. Généralement, 4 étapes sont utilisées, à savoir, le conditionnement, le chargement, le lavage et l'élution.

##### 1. Conditionnement

Il correspond au passage d'un solvant approprié sur la phase solide extractante contenue dans une cartouche pour la mouiller, suivi par le passage d'un deuxième solvant de même nature que celui dans lequel est dissout l'échantillon à analyser. Cette étape a pour but d'assurer la solvation des groupements fonctionnalisés du support, d'éliminer l'air et les impuretés éventuelles présentes sur la cartouche. Il est recommandé de ne pas sécher la cartouche avant

l'étape suivante, afin d'assurer une bonne rétention des solutés. Les volumes extraits sont généralement compris entre 100 et 1000 mL selon les matrices.

## 2. Dépôt

Il correspond à la percolation de l'échantillon. En fonction du volume disponible pour l'échantillon et la quantité d'adsorbants, les volumes des échantillons déposés de quelques  $\mu\text{L}$  à plusieurs mL. La vitesse de passage doit être suffisamment faible pour assurer la rétention des solutés. Dans la plupart des cas, les solutés sont concentrés sur l'adsorbant pendant cette étape. Certains composants de la matrice peuvent être retenus, également, sur le support, et d'autres peuvent passer.

## 3. Lavage

C'est le passage de solvants appropriés pour éliminer les composants de la matrice qui sont retenus sur le support, mais sans affecter la rétention des solutés. L'élution préalable qui réduit les constituants indésirables permet d'éviter les phénomènes d'interférence au cours de l'analyse (Togola et Budzinski., 2007). Cette étape est suivie du séchage de la phase solide, sous flux d'air ou d'azote afin d'éliminer toutes traces d'eau.

## 4. Elution

Elle correspond à l'élution spécifique des solutés à l'aide d'un solvant approprié, tout en évitant l'élution des composants de la matrice qui seraient encore retenus sur le support. Le volume de solvant doit être optimisé de manière à éluer l'intégralité de la quantité de soluté retenu sur le support tout en limitant au maximum la dilution. La vitesse de passage du solvant doit être ajustée de manière à assurer l'élution efficace des solutés (Kolpin et al., 2002).

### Différents types de phases adsorbantes

Le choix de la phase adsorbante dépend de la matrice à traiter et du type des composés à extraire. Avec les progrès techniques le nombre de phases disponibles est de plus en plus important. La grande diversité des caractéristiques chimiques des produits pharmaceutiques (acides, basiques ou neutres et polaires ou apolaires) a conduit à l'évaluation et à l'utilisation de nombreuses phases hydrophiles, lipophiles ou mixtes.

- des sorbants à base de silice (Belfroid et al., 1999 ; Alda et al., 2003 ; Matejcek et al., 2013 ; García-Galán et al., 2010 ; Pailler et al., 2009 ; Vulliet et al., 2008 ; Filali-Meknassi et al., 2007). Cette phase est plutôt utilisée pour les substances apolaires ou très peu polaires.

Plusieurs cartouches polymères de surfaces modifiées sont aussi employées :

- copolymère constitué de styrène et de divinylbenzène modifiés résultants en une surface ayant des propriétés non polaires : la PPL Bond Elut. Cette phase a été employée pour extraire des composés pharmaceutiques appartenant aux familles des analgésiques et des B-bloquants d'échantillons d'eaux souterraines (Matejicek et al., 2013).
- cartouches Lichrolut EN, chromabond EASY, ENV+ et Bond Elut Plexa, composées de polystyrène et de divinylbenzène modifiées à la surface. Les deux dernières étant hydroxylés (Matejicek et al., 2013 ; Garcia-Galon et al., 2010 ; Pailler et al., 2009). A titre d'exemple, la Lichrolut EN a été utilisée pour extraire des produits de contraste à base d'iode présents dans des eaux souterraines. La cartouche ENV+ a été employée pour extraire des substances appartenant aux macrolides et pénicillines des memes eaux souterraines (Matejicek et al., 2013). Des essais ont été effectués avec la chromabond EASY et la Bond Elut Plexa pour extraire des sulfonilamides, des analgésiques et des hormones d'eaux usées et de surface mais la cartouche OASIS HLB a été préférée (Pailler et al., 2009).
- des matériaux à échange cationique (HLB\_MCX (Mixed Mode Cation eXchange) (Gros et al., 2006 ; Alda et al., 2003 ; Kostopoulou et Nikolou., 2008). Il s'agit à la fois d'une phase inverse et à échange cationique. Ce mode mixte permet d'utiliser cette cartouche pour des composés neutres et basiques. Cependant, elle a essentiellement été conçue pour extraire des substances basiques de matrices complexes.
- des MIPs (Molecularly Imprinted Polymers) peuvent également être employés. La phase stationnaire est un polymère rigide ayant des cavités bien définies complémentaires en forme et en groupements fonctionnels aux composés à extraire, ce qui permet de les retenir. Comme les immunosorbants. Cette technique n'est utilisable que pour une famille cible. Les MIPs ont déjà été utilisées pour extraire et concentrer des sulfonilamides présents dans les eaux (Pavlovic et al., 2007).
- Les cartouches les plus employées sont : Les cartouches Oasis HLB (N-vinylpyrrolidone-divinylbenzène) et STRATA-X (styrène-divinylbenzène) qui possèdent des caractéristiques mixtes hydrophiles et lipophiles ont montré une grande efficacité pour l'extraction de composés aussi bien basiques, qu'acides, ou neutres (Bones *et al.*, 2006a; Hilton et Thomas, 2003; Lajeunesse et Gagnon, 2007; Van De Steene *et al.*, 2006). L'emploi de l'adsorbant Oasis HLB tend à se généraliser. Il semble présenter l'avantage de ne pas nécessiter

l'ajustement du pH pour la rétention des médicaments acides (Marchese et al., 2003; Weigel et al., 2004) tout en favorisant la rétention des médicaments basiques (Gros et al., 2006).

Le tableau I.13 regroupe les principaux avantages et inconvénients des techniques utilisées pour l'extraction des médicaments et des antibiotiques, en particulier, des matrices liquides.

**Tableau I. 13. Avantages et inconvénients des techniques d'extraction des médicaments des matrices liquides**

<b>Techniques</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
LLE	-Simple -Robuste -Efficace -Coût raisonnable	- Temps de réalisation lent -Difficilement automatisable -Peu reproductible -Consommatrice de solvants organiques souvent toxiques -Ne permet pas une bonne extraction des molécules très polaires
SLM	-Simple -Peu coûteux -Très sélectif - Ne perturbe pas le milieu analysé	- Ne permet pas de déceler les très faibles concentrations - Temps de réalisation lent -Consommatrice de solvants organiques souvent toxiques
SPME	-Technique sans solvant -Augmentation de la sensibilité -Abaissement des limites de quantification et de détection des techniques d'analyse. -Automatique donc plus reproductible	-Fragilité des fibres -Volume de chargement très faible donc une faible concentration des cibles a analysé
SPE	-Extraction d'un grand nombre de substances de natures chimiques variées -Réduction du volume de solvant organique requis pour l'extraction -Peut être automatisable -Reproductible -Donne des extraits plus propres pour l'analyse par GC/MS et LC/MS -Très bons rendements d'extraction	-Cartouches à usage unique

### **III.1.4. Préparation des échantillons dans la matrice solide**

#### **III.1.4.1. Extraction**

La première étape de la préparation d'échantillons solides est d'extraire les substances cibles contenues dans la matrice avec un solvant organique (ou mélange de plusieurs solvants organiques) adapté. Plusieurs méthodes d'extraction existent.

### Extraction liquide/solide sous agitation

Les antibiotiques peuvent être extraits par simple agitation dans un solvant adéquat suivi d'une centrifugation (Diaz-Cruz et Barcelo., 2005 et Hamscher et al., 2007).

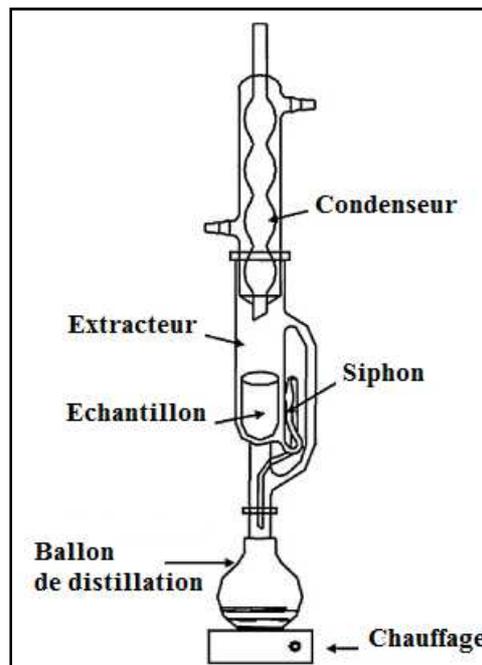
L'avantage de cette technique est qu'elle est rapide. Cependant, elle nécessite la plupart du temps deux ou trois manipulations consécutives pour atteindre un taux d'extraction correct.

De plus, cette technique est pénible car elle n'est pas automatisée (Zloaga et al., 2012).

### Extraction Soxhlet

Le principe de l'extraction de Soxhlet repose sur une extraction continue par un solvant à sa température d'ébullition (Figure I. 10).

Cette technique a été créée en 1979 par Soxhlet, il s'agit de la méthode considérée comme référence pour l'extraction de substances organiques de matrices solides.



**Figure I. 10. Principe de l'extraction Soxhlet**

L'inconvénient de cette technique c'est qu'elle consomme une importante quantité de solvant (entre 100 et 500 mL) et nécessite beaucoup du temps (par exemple entre 16 et 24 heures pour extraire des antibiotiques du sol. Une extraction par Soxhlet pouvant durer jusqu'à 48 heures) (EPA, 2016). Cependant, cette procédure permet d'obtenir de bons rendements d'extraction (entre 60 -75 %) et a été largement employée pour extraire des composés organiques de matrices solides (Zuloaga et al., 2012).

En 1994, une extraction automatisée Soxhlet a été mise en place : le Soxtec. Cette technique présente de nombreux avantages. En effet, elle permet une extraction plus rapide (entre 1 à 4 heures), plus économique (meilleure récupération de solvant entre 50 et 100 mL

de solvant) et plus sûre (dissociation des unités de chauffage et d'extraction) et des rendements d'extraction élevés (entre 70 - 95%) (Zuloaga et al., 2012).

#### Extraction assistée par micro-onde (MAE)

L'extraction (MAE) a été déjà utilisée pour extraire certains antibiotiques essentiellement les fluoroquinolones et des estrogènes du sol ou de sédiments (Pavlovic et al., 2007 ; Pico et Andreu., 2007 ; Diaz-Cruz et Barcelo., 2005 et Liu et al., 2004). Un tube contenant l'échantillon et le solvant d'extraction est introduit dans une enceinte soumise à des micro-ondes émises par un générateur de micro-ondes aussi appelé magnétron. Deux types de MAE existent. En effet, l'irradiation micro-onde peut être réalisée avec un applicateur d'onde monomode ou avec un applicateur à cavité multimodes.

La technique MAE peut s'effectuer soit à pression atmosphérique (focused MAE) soit sous atmosphère pressurisée (Pressurized MAE) ce qui permet de travailler à des températures supérieures au point d'ébullition des solvants utilisés (Michel., 2011).

Une des limitations de cette technique est que seuls les solvants qui absorbent les micro-ondes peuvent être utilisés. Il sera alors difficile d'appliquer cette procédure d'extraction aux tétracyclines qui se dégradent à la chaleur.

#### Extraction assistée par ultrasons (UAE)

L'extraction assistée par ultrasons est utilisée pour extraire les antibiotiques des différents matrices solides (Glover et al., 1996 ; Pharmaceuticals. 2006 ; Karci et al., 2009 ; Kim et Carlson., 2005 et Rabolle et Spliid., 2000). Un tube contenant l'échantillon et le solvant d'extraction est immergé dans un bain à ultrasons.

Les analytes extraits sont ensuite séparés de la matrice soit par filtration sous vide, soit par centrifugation. Cette procédure est alternative à l'extraction Soxhlet, l'utilisation des ultrasons permettant de réduire le temps d'extraction (10 - 30 minutes) et le volume de solvant utilisé. Cependant, son inconvénient principal c'est que cette technique est peu reproductible (Backwell et al., 2004 et Zuloaga et al., 2012). Elle a été utilisée, par exemple, pour extraire plusieurs antibiotiques comme l'oxytétracycline et la tylosine du sol (Backwell et al., 2004).

#### Extraction par liquide pressurisé (PLE)

La PLE est une extraction à haute température et à haute pression. Elle est utilisée pour l'analyse des composés en matrice solide. La température élevée permet une meilleure solubilisation des solutés dans le solvant alors que la haute pression permet de maintenir le solvant au-dessus de son point d'ébullition. Dans ces conditions, le solvant pénètre mieux à l'intérieur de l'échantillon permettant une extraction plus efficace en utilisant un volume

minimal. Cinq facteurs sont généralement optimisés afin d'obtenir les meilleurs rendements d'extraction :

- 1- La température
- 2- La pression
- 3- Le temps statique
- 4- Le nombre de cycle
- 5- Le ou les solvants d'extraction

Cette méthode est, depuis de nombreuses années, très largement employée pour extraire des polluants organiques persistants (non dégradables) tels que les PCB (polychlorobiphényles) ou le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) contenus dans des matrices environnementales.

Au cours de la dernière décennie, cette technique a été utilisée pour extraire des contaminants émergents essentiellement les médicaments, de sols, de sédiments, de boues de station d'épuration et de fumier. Elle est largement utilisée pour l'extraction de différentes familles d'antibiotiques tétracyclines, sulfonilamides, macrolides, fluoroquinolones du sol (Barcellos-Hoff et al., 2015 ; Schlusener et al., 2003 ; Jacobsen et al., 2004 ; Schlusener et Bester, 2006 ; Runnqvist et al., 2010; Ferrer et Furlong., 2002 et Armenta et al., 2008).

Le tableau I.14 présente quelques avantages et inconvénients des principales techniques utilisées pour l'extraction des médicaments des matrices solides.

**Tableau I. 14. Avantages et inconvénients des techniques d'extraction des médicaments des matrices solides**

<b>Techniques</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
Agitation	-Rapide -Facile	-Méthode peu efficace : plusieurs extractions successives sont nécessaires, plus de consommation de solvant
Soxhlet	-Méthode de référence -Très bons rendements d'extraction	- Temps d'extraction long (4 à 48 heures) - Volume de solvant consommé important (100 à 500 mL)
Soxtec	-Soxhlet automatisé	-Temps d'extraction long (1 à 4 h) -Volume de solvant utilisé encore important (50 à 150 mL)
MAE	-Temps d'extraction relativement court (2 à 35 minutes) -Peu de consommation de solvant (5 à 50 mL)	-Le solvant doit être polaire -Les composés à extraire doivent être stables thermiquement

<b>Techniques</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
UAE	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Extraction rapide (10 à 30 minutes)</li> <li>-Volume de solvant consommé raisonnable (4 à 60 mL)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Moins reproductible que les autres techniques</li> <li>-Contrôle continue de la stabilité de la température</li> </ul>
PLE	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Extraction assez rapide (environ 30 minutes)</li> <li>-Consommation de solvant réduite</li> <li>-Très reproductible</li> <li>-Automatisée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Préparation manuelle des cellules PLE</li> <li>-Les composés à extraire doivent être stables thermiquement</li> </ul>

### III.1.4.2. Purification

Après l'étape d'extraction, une étape supplémentaire est souvent nécessaire pour purifier et concentrer un extrait de sol.

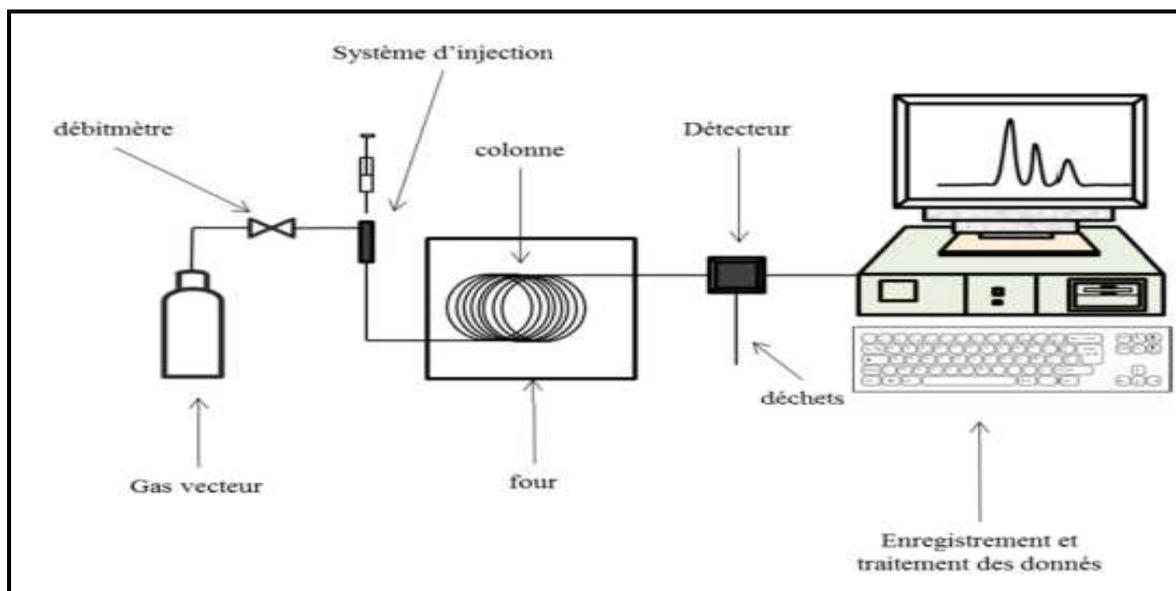
La SPE est la méthode la plus souvent utilisée, cependant, d'autres chercheurs utilisent aussi l'extraction liquide-liquide ou encore la chromatographie par perméation du gel (GPC) (Alda et al., 2003), qui permettent de séparer les analytes par rapport à leur taille mais leur emploi est assez rare. Pour l'extraction en phase solide, les cartouches (généralement OASIS HLB) sont utilisés pour extraire, purifier et concentrer des échantillons.

### III.2. Méthodes d'analyse

Pour identifier et quantifier un composé dans une matrice donnée, la chromatographie liquide (CPL) ou encore gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS) sont très souvent employées (Choi et al., 2007 ; Kostopoulou et Nikolaou., 2008 ; Pedrouzo et al., 2009 ; Dagnac et al., 2005 et Petrie et al., 2016).

#### III.2.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) s'applique aux composés gazeux ou ceux facilement vaporisés par chauffage sans décomposition. Le principe de séparation se base sur l'équilibre des composés présents entre deux phases: la phase stationnaire (emprisonnée dans la colonne) permettant d'éluer les composés selon leur taille, leurs propriétés physico-chimiques et la phase mobile qui est un gaz inerte (azote, argon, hélium) qui traverse la colonne en entraînant les composés vers la sortie de la colonne.



**Figure I. 11. Schéma de principe d'un système CPG**

### III.2.2. Chromatographie en phase liquide (CPL)

La chromatographie en phase liquide (CPL) se base sur le partage de l'analyte entre une phase liquide mobile et une phase stationnaire solide finement divisée. En se basant sur la nature des analytes à séparer et les différents types de colonnes utilisées, plusieurs types de la CPL sont souvent utilisés. La chromatographie de partage en phase normale ou inversée est la plus souvent utilisée pour l'identification et la détection des antibiotiques.

Grâce aux divers types de séparation et à la capacité de réaliser le mélange de phase mobile (gradient), la CPL a plus d'avantage que la CPG pour séparer des molécules ayant des masses molaires très proches, des mêmes groupes fonctionnels des isomères.

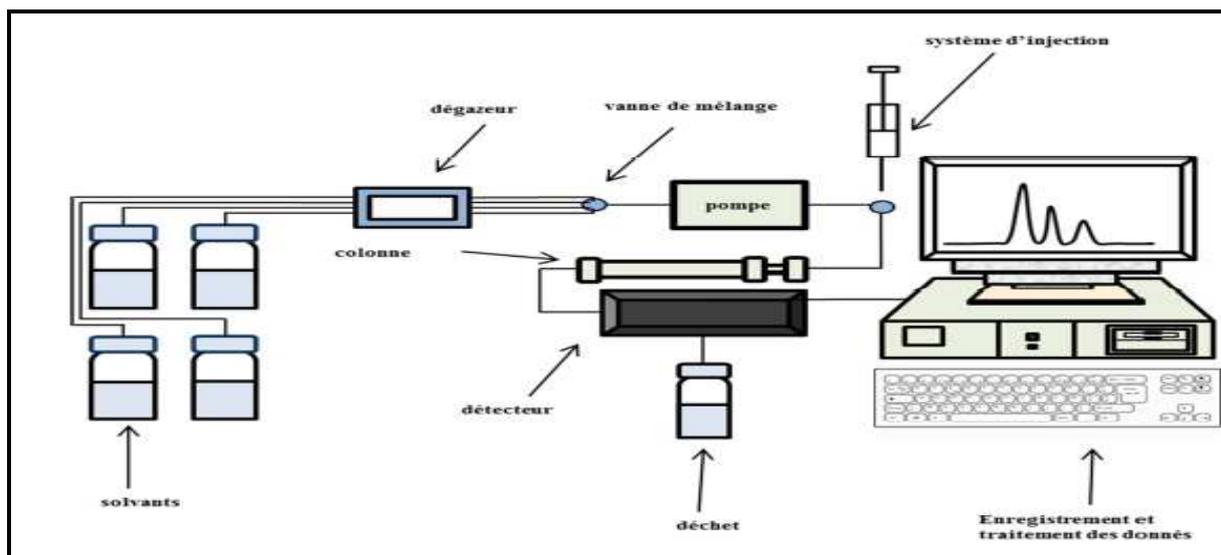


Figure I. 12. Schéma de principe d'un système CPL

La chromatographie LC-MS ou encore la LC-MS/MS sont les méthodes les plus adaptées à l'analyse des différentes familles d'antibiotiques à usage humain et vétérinaire.

### III.2.3. Détecteurs de la chromatographie

Il existe différents types de détecteurs pour les différentes méthodes de séparation (Skoog et al., 2003) (Tableau I.15).

Tableau I. 15. Différents types de détecteurs utilisés en chromatographie

Chromatographie en phase gazeuse	Chromatographie en phase liquide
Détecteur à ionisation de flamme	Détecteur d'absorption (UV-Vis et infrarouge)
Détecteur à conductivité thermique	Détecteur de fluorescence
Détecteur de chimiluminescence au soufre	Détecteur de réfractométrie
Détecteur d'émission atomique	Détecteur de conductivité
Détecteur à capture d'électrons	Détecteur électrochimique
Détecteur thermoioniques	
Autre (détecteur par photométrie de flamme et détecteur à photo-ionisation)	

La sensibilité de ces types de détecteurs ne permet pas d'atteindre les limites de détection et de quantification adaptées au domaine de l'environnement : de quelques centaines ng/L à quelques µg/L. Le développement d'autres détecteurs ayant une sensibilité suffisante pour la recherche environnementale a été nécessaire. Depuis une vingtaine d'années, les systèmes de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse sont développés et

constituent désormais la technique principale pour la recherche et la surveillance des résidus de médicaments dans l'environnement.

Comme les différentes familles d'antibiotiques étudiées sont souvent polaires, solubles dans l'eau et non volatiles, une ou plusieurs étapes de dérivation sont nécessaires avant leur analyse par chromatographie gazeuse pour rendre les molécules volatiles à des températures ne provoquant pas leur décomposition (Diaz-Cruz et Barcelo., 2007). Ces différentes étapes augmentent le temps d'analyse et représentent des sources potentielles de perte d'échantillon ou de contamination. La chromatographie liquide est la plus souvent utilisée (Kostopoulou et Nikolaou., 2008 et Alda et al., 2003).

#### **III.2.4. Spectrométrie de masse (MS) et spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)**

La spectrométrie de masse est connue comme une technique d'analyse plus récente dont l'application est fortement utilisée en couplage aux systèmes de CPL ou de CPG pour les analyses environnementales.

Son principe se base sur l'analyse des rapports masse/charge ( $m/z$ ) de différents ions formés par ionisation des molécules séparées par la technique de chromatographie (Menet., 2011).

La détection de la spectrométrie de masse simple n'étant pas très sensible, elle peut être favorisée par l'utilisation du mode SIM (Selected Ion Monitoring). Ce mode peut améliorer fortement la sensibilité pour la quantification des composés ciblés (Cahill *et al.*, 2004 et Suenami *et al.*, 2007). Cependant, il ne peut pas distinguer le composé ciblé et le composé non ciblé si ces deux composés ont le même rapport ( $m/z$ ) (Pietrogrande et Basaglia., 2007). Le développement de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a résolu ce problème. La MS/MS permet de diminuer les effets matriciels et améliorer la sensibilité, la sélectivité et les capacités de caractérisation de la structure chimique.

Un spectromètre de masse contient principalement trois parties :

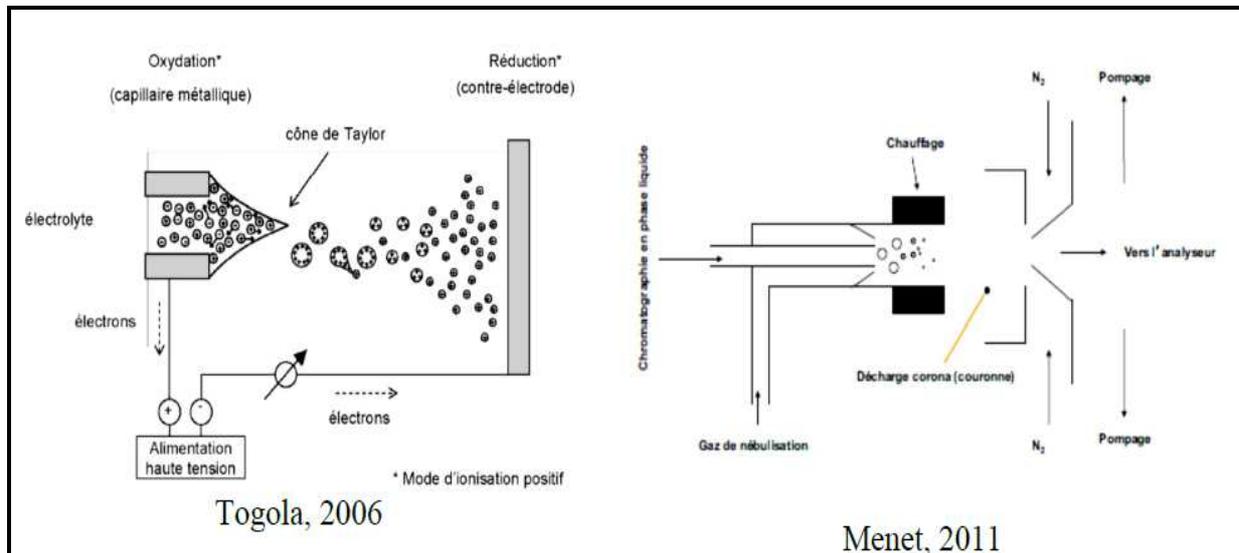
##### **Source d'ionisation**

Cette partie permet d'évaporer l'éluant sortant de la CPL et d'ioniser les analytes dans l'échantillon.

Il existe plusieurs types de source d'ionisation : impact électronique ou bombardement électronique (EI), ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), Ionisation de champ (FI), Désorption de champ (FD), Nébulisation électrostatique ou Electro-nébulisation (ESI),

Désorption assistée par matrice ou Ionisation par désorption-désolvatation (MALDI), Désorption par plasma (PD), Bombardement par ions rapides (SIMS) et Nébulation thermique (TS).

Cependant, seules ESI et APCI (Figure I.13) sont utilisables en couplage avec la chromatographie liquide.



**Figure I. 13. Schéma de principe de source d'ionisation ESI (a) et APCI (b)**

### Analyseur

Cette partie a pour but de séparer les ions formés dans la source en fonction de leur rapport m/z.

Un analyseur doit être capable de distinguer les masses dont la différence est la plus faible possible. Différents types d'analyseur ont été développés ces dernières années comme l'analyseur à la dispersion des ions, l'analyseur à piégeage d'ions et l'analyseur à temps de vol (TOF). La trappe ionique est également utilisée dans certaines études pour l'analyse de produits pharmaceutiques (Grujic et al., 2009 et Thiele-Bruhn, 2003), Résonance cyclotronique d'ions à transformée de fourrier (FT-ICR).

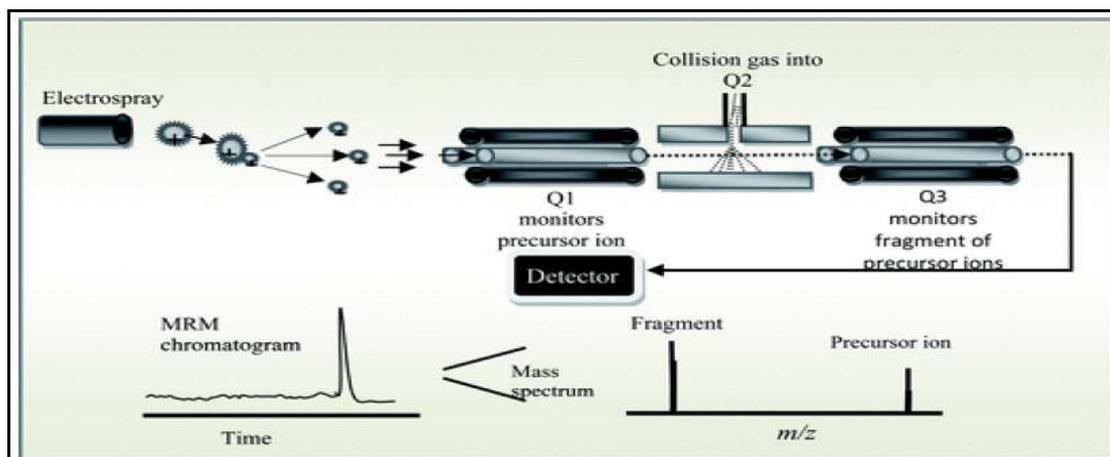
L'analyseur quadripolaire (Q), est généralement le plus utilisé (Diaz-Cruz et Barcelo., 2007).

## Détecteur

Plusieurs types de détecteur sont développés et utilisés dans le spectromètre de masse comme le détecteur à plaques photographiques, le détecteur au cylindre de Faraday, le détecteur au multiplicateur d'électron ou de photons.

L'analyseur quadripôle est préféré lorsque de hautes sensibilités et sélectivités sont nécessaires. Effectivement, Snow et al., (2002) ont montré que le triple quadripôle apporte des sensibilités et sélectivités supérieures à celles obtenues avec la trappe ionique pour les antibiotiques (comprises entre 5 et 50  $\mu\text{g}$  alors que celles atteintes avec le triple quadripôle sont inférieures au  $\mu\text{g}$ ).

La LC-ESI-MS et notamment la LC-ESI-MS/MS est des techniques sélectives et sensibles. Ce sont des techniques de choix pour analyser à la fois des antibiotiques à usage humain et vétérinaire et autre médicaments marqueurs de pollution contenus dans des matrices environnementales.



**Figure I. 14. Principe d'un spectromètre de masse en tandem**

(Dahab et Smith, 2012)

Les méthodes d'analyse les plus souvent utilisés pour la détection et la quantification des médicaments et les antibiotiques particulièrement qui sont présents dans les différents compartiments de l'environnement (eau, sol), sont la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse simple ou en tandem. De plus, les procédures développées à l'heure actuelle se concentrent en général sur différents composés appartenant à une seule famille soit sur les matrices aqueuses seulement (Tableau I. 16).

Or, très peu de travaux portent sur des analyses de plusieurs familles dans l'eau et le sol. Des méthodes à la fois spécifiques et sensibles doivent être mises en place pour analyser et quantifier les traces des différents composés présents dans l'eau et/ou le sol.

Les différentes techniques d'extraction et méthodes d'analyse, utilisées, pour la détection des produits pharmaceutiques dans les matrices solides et liquides, sont regroupées dans le Tableau. I.16.

**Tableau I. 16. Techniques d'extraction et méthodes d'analyse utilisées pour la détection des produits pharmaceutiques dans différentes matrices**

<b>Composés</b>	<b>Matrice</b>	<b>Technique d'extraction</b>	<b>Méthode de détection</b>	<b>LOQ/LOD</b>	<b>R%</b>	<b>Références</b>
17 antibiotiques	Eau de surface	SPE /cartouches : MCX et HLB	LC-ESI-MS/MS	LOQ : 10 ng.L <sup>-1</sup>	70-120	Tamtam et al., 2008
7 antibiotiques	Eau souterraine	SPE/cartouches : HLB	LC-ESI-MS/MS	LOD : 30-190 ng.L <sup>-1</sup> LOQ : 100-650 ng.L <sup>-1</sup>	71-119	Opris et al., 2013
14 produits pharmaceutiques 6 hormones 2 antibiotiques	Eau potable Eau de surface Eau usée	SPE/cartouches : HLB	LC-MS/MS ESI et APCI	LOD : 1-10 ng.L <sup>-1</sup>	68-112	Kim et al., 2007
25 antibiotics	Eau minérale Eau de ruissellement	LLE	UHPLC/DAD	LOD : 350-1050 ng.L <sup>-1</sup>	78-117	Herrera et al., 2013
14 antibiotiques 24 pesticides 6 phtalates	Eau de surface Sédiments	SPE (matrice liquide)/cartouche HLB- ASE (matrice solide)	GC/MS	LOD (sédiment) : 10- 1200 ng. kg <sup>-1</sup> LOD (eau) : 0.1- 50 ng.L <sup>-1</sup>	-	Net et al., 2015
19 antibiotiques 5 hormones	WWTP effluents	SPE/cartouches : HLB	GC-MS/MS	LOD : 0,1-5 ng.L <sup>-1</sup>	72-96	Ryu et al., 2011
4 antibiotiques	Eau de ruisselemnt sol	SPE/cartouche : HLB et LLE (matrice liquide) Bi-solvant LLE (matrice solide)	HPLC-MS	LOD (eau) : 15,15-18 ng.L <sup>-1</sup>  LOD (sol) : 760-1250 ng.kg <sup>-1</sup>	92-95 (eau)  79-83 (sol)	Sun et al., 2013
6 antibiotiques	Eau de surface Sédiments	SPE (eau) Agitation (sediment)	HPLC-MS/MS	LOQ (eau) : 10-20ng.L <sup>-1</sup>  LOQ (sédiment) 60-230 ng.kg <sup>-1</sup>	76-124 (eau)  40-114 (sédiment)	Awad at al., 2014

## Références bibliographiques :

[1] : <http://www.123bio.net/cours/antibio/modedaction.html>, 27/12/2016.

[2] : <http://www.ecotoxicologie.fr/medicaments.php>, 27/12/2016.

A :

Abuin, S., Codony, R., Compano, R., Granados, M., Prat, M. D., 2006. Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography– mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1114, 73.

AFFSA, 2009. Synthèse des résultats de campagnes d'analyses de résidus de médicaments dans les eaux effectuées par les drass dans trois bassins pilotes. 95 p.

Aga, D. S., O'Connor, S., Ensley, S., Payero, J. O., Snow, D., Tarkalason, D., 2005. Determination of the Persistence of Tetracycline Antibiotics and Their Degradates in Manure- Amended Soil Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Liquid Chromatography. *Env Sci Technol* 51, 383-392.

Alda, M. J. L. d., Diaz-Cruz, S., Petrovic, M., Barcelo, D., 2003. Liquid chromatography– (tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *J ChromatogrA* 1000, 503.

Altenburger, R., Walter H., Grote M., 2004. What contributes to the combined effect of a complex mixture. *Env Sci Technol* 38, 6353-6362

AMCN, 2011. Consommation et dépenses de médicaments en France et en Europe : Evolution 2006-2009.

Armenta, S., Garrigues, S., Guardia, M. d. I., 2008. Green Analytical Chemistry. *Trends in Anal Chem* 27, 497.

Awad, Y. M., Kim, S. C., El-Azeem, S. A. A., Kim, K. H., Kim, K. R., Kim, K., ... & Ok, Y. S. (2014). Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility. *Env earth sci* 71, 1433-1440.

B:

Babic, S., Horvat, A. J. M., Pavlovic, D. M., Kastelan-Macan, M., 2007. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends in anal chem* 26, 1043.

Balakrishnan, V. K., Terry, K. A., Toito, J., 2006. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *J Chromatogr A* 1131, 1142.

Backhaus, T, Arrhenius, A. and Blanck, H. 2004. Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: Predictive power and limitations of Independent Action and Concentration Action. *Env Sci Technol*. 38, 6363-6370

Barcellos-Hoff, R., Pizzolato, T. M., Peralba, M. C. R., Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D., 2015. Determination of sulfonamide antibiotics and meTableauolites in liver, muscle and kidney samples by pressurized liquid extraction or ultrasound-assisted extraction followed by liquid chromatography–quadrupole linear ion trap-tandem mass spectrometry (HPLC– QqLIT-MS/MS). *Talanta* 134: 768-778.

Beausse, J. H., 2004. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends in Anal Chem* 23, 753.

Belfroid, A. C., Horst, A. V. d., Vethaak, A. D., Schafer, A. J., Rijs, G. B. J., Wegener, J., Cofino, W. P., 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci Tot Env* 225, 101.

Ben, W., Quiang, Z., Adams, C., Zhang, H., Chen, L., 2008. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1202, 173.

- Besse, J.P., Garric, J., 2007. Médicaments à usage humain: risque d'exposition et effets sur les milieux récepteurs. Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à surveiller dans les eaux de surface continentales. Agence de l'Eau R.M.C., Lyon, 241 p.
- Bester, K., 2007. Personal Care Compounds in the Environment. Wiley.
- Bialic, M., Segonzac, D. D. d., Faure, A., Swaelmen, S. V. d., 2011. Ibuprofène, Paracétamol ou Aspirine : quels risques pour notre environnement, Poly Tech Nice-Sophia, Département Génie Biologique.
- Bialk-Bielinska, S., Stolte, M., Matzke, A., Fabianska, J., Maszkowska, M., Kolodziejaska, B., Liberek, P., Stepnowski, J., Kumirska, P., 2012. Hydrolysis of sulfonilamides in aqueous solutions. *J haz Mat* 221-222, 264.
- Bidgood, T. L., 2004. Factors that influence the distribution of antimicrobials into the north Calorina States University, Doctor of philosophy.
- Blackwell, P. A., Lutzhoft, H. C. H., Ma, H. P., Halling-Sorensen, B., Boxall, A. B. A., Kay, P., 2004. Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detector. *J Chromatogr A* 1045, 111.
- Blackwell, P. A., Lutzhoft, H. C. H., Ma, H. P., Halling-Sorensen, B., Boxall, A. B. A., Ka, P., 2004. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. *Talanta* 64, 1058.
- Blair, B.D., Crago, J.P., Hedman, C.J., Treguer, R.J.F., Magruder, C., Royer, L.S., Klaper, R.D., 2013. Evaluation of a model for the removal of pharmaceuticals, personal care products, and hormones from wastewater. *Sci Tot Env* 444, 515–521.
- Bouvier M., Durand F., Guillet R., 2010. Médicament et environnement : La régulation du médicament vis-à-vis du risque environnemental. Rapport N° 007058-01. 119p.
- Brooks, B.W., Turner, P. K., Stanley, J. K., Weston, J. J., Glidewell, E. A., Foran, C. M., Slattery, M., La Point, T.W. et Huggett, D.B., 2003. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemos* 52, 135-142.
- Broséus, R., Vincent, S., Aboulfadl, K., Daneshvar, A., Sauvé, S., Barbeau, B., Prévost, M., 2009. Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticides during drinking water treatment. *Wat Res* 43, 4707–4717.
- Burdorf, A., et Nieuwenhuijsen, J.J., 1999. Endocrine disrupting chemicals and human reproduction: Factor fiction. *Annals of Occup Hyg* 43 (7):435-437.
- C:
- Cahill, J.D., Furlong, E.T., Burkhardt, M.R., Kolpin, D., Anderson, L.G., 2004. Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1041, 171–180.
- Chen, J., Lichwa, J., Snehota, M., Mohanty, S., Ray, C., 2006. Determination of Hormones and Non-ionic Surfactant Degradation Products in Small-Volume Aqueous Samples from Soil Columns Using LC-ESI-MS-MS and GC-MS. *Chromatographia* 64, 413.
- Chevance, A., Moulin G., Chauvin, C., Gay, E., 2012. La consommation des antibiotiques à usage vétérinaires en France entre 1999-2010. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* N°53, p 4.
- Chevance, A., Moulin, G. 2011. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2009-2011. *AFSSA-ANMV*, p : 44, 57 et 72.
- Chinchilla, J. J. S., 2007. Nuevas aportaciones al análisis de residuos de plaguicidas y antibióticos en aguas y alimentos. Universidad di granada, PhD.
- Choi, K. J., Kim, S. G., Kim, C. W., Kim, S. H., 2007. Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD. *Chemosphere* 66, 977.
- Cleuvers, M., 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Env Saf* 59, 309-315.

- Colin, R., 2009. Les perturbateurs endocriniens dans l'eau Un enjeu environnemental et sanitaire. L'eau, l'industrie, les nuisances.
- Cousins, I. T., Staples, C. A., Kelcha, G. M., Machay, D., 2002. A multimedia assessment of the environmental fate of Bisphenol A. *Humain ecol risk* 8,55.
- D :
- Dagnac, T., Bristeau, S., Coton, C., Leroy, C., Fleury, N., Jeannot, R., 2005. Analyse de polluants organiques et organométalliques dans l'environnement. Convention Région Centre et BRGM.
- Dahab, A. A., Smith, N.W., 2012. Drug-induced hepatotoxicity: application of mass spectrometry based metabolomics. *Anal. Methods* 4, 1887–1902.
- Díaz-Cruz, M. S., Barcelo, D., 2005. LC-MS/MS trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. *Trends in Anal Chem* 24, 645.
- Díaz-Cruz, M. S., Barcelo, D., 2007. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. *Trends in anal Chem* 26, 637.
- Dinh, Q. T., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Eurin, J., Chevreuil, M., Labadie, P., 2011. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. *Talanta* 85, 1238.
- Debernard, S., Rossignol, F. et Couillaud, F., 1994. The HMG-CoA Reductase Inhibitor Fluvastatin Inhibits Insect Juvenile Hormone Biosynthesis. *General and Comp Endoc* 95(1), 92-98.
- Dolar, D., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Moreno, J., Comas, J., Rodriguez-Roda, I., Barceló, D., 2012. Removal of emerging contaminants from municipal wastewater with an integrated membrane system, MBR-RO. *J Haz Mat* 239–240, 64–69.
- Durán-Alvarez, J. C., Becerril-Bravo, E., Castro, V. S., Jiménez, B., Gibson, R., 2009. The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 78, 1159.
- Durán-Alvarez, J. C., Becerril-Bravo, E., Castro, V. S., Jiménez, B., Gibson, R., 2009. The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1244, 123–138.
- F :
- Fenet, H., Mathieu, O., Mahjoub, O., Li, Z., Hillaire-Buys, D., Casellas, C., Gomez, E., 2012. Carbamazepine, carbamazepine epoxide and dihydroxycarbamazepine sorption to soil and occurrence in a wastewater reuse site in Tunisia. *Chemosphere*, 88, 49-54.
- Ferrari, B., Paxeus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. et Garric, J., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotox Env Saf* 55, 359-370.
- Ferrer, I., Furlong, E. T., 2002. Accelerated solvent extraction followed by on-line solid-phase extraction coupled to ion trap LC/MS/MS for analysis of benzalkonium chlorides in sediment samples. *Anal Chem* 74, 1275.
- Fong, P., 1998. Zebra Mussel Spawning Is Induced in Low Concentrations of Putative Serotonin Reuptake Inhibitors. *Biol Bulletin* 194(2), 143-149.
- Filali-Meknassi, Y., Auriol, M., Adams, C. D., Surampalli, R. Y., 2007. Quantification of Steroids Sex Hormones Using Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Wat Env Res* 79, 687.
- Flaherty, C.M. et Dodson, S.I., 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* 61, 200-207.
- G :
- Gao, L., Shi, Y., Li, W., Niu, H., Liu, J., Cai, Y., 2012. Occurrence of antibiotics in eight sewage treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere* 86, 665–671.

- García-Galán, M. J., Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D., 2010. Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS). *Talanta* 81, 355.
- Glover, D. D., Lalka, D., Monif, G. R. G., 1996. Ampicillin Vs Penicillin for In Utero Therapy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 4, 43.
- 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. *Anal Chem* 74, 5455.
- Gomez, M. J., Petrovic, M., Fernandez-Alba, A. R., Barcelo, D., 2006. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *J Chromatogr A* 1114, 224-237.
- Gros, M., Petrović, M., Barceló, D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70, 678-690.
- Grujic, S., Vasiljevic, T., Lausevic, M., 2009. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216, 4989-4988.
- Grung, M., Kallqvist, T., Sakshaug, S., Skurtveit, S., Thomas, K. V., 2008. Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. *Ecotox Env Saf* 71, 328-340.
- H:
- Haguenoer, J.-M., Rouban, A., Aourousseau, M., Bouhuon, C., Bourillet, F., Bourrinet, P., Capentier, A., Delage, M., Dûchene, D., Festy, B., 2008. Fast liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. *J Chromatogr A* 1217, 4212-4222.
- Harnagea-Theophilus, E., Gadd, S.L., Knight-Trent, A.H., De George, G.L. et Miller, M.R., 1999. Acetaminophen-induced proliferation of breast cancer cells involves estrogen receptors. *Tox Applied Pharma* 155(3), 273-279.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Hoper, H., Nau, H., 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 74, 1509.
- Hung, O. Pharmaceuticals, 2006. Ruggedness of analytical methods developed for hormones, antibiotics and pharmaceutical products in sludge, soil and biowaste. CAE / ANJOU RECHERCHE, Veolia Water.
- I:
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L. et Parrella, A., 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci Tot Env* 346, 87-98.
- J:
- Jacobsen, A. M., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, F., Hansen, S. H., 2004. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1038, 157.
- Jeannot, R., Sabik, H., Sauvard, E., Dagnac, T., Dohrendorf, K., 2002. Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *J Chromatogr A* 974, 143.
- Jia, A., Xiao, Y., Hu, J., Asami, M., Kunikane, S., 2009. Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216, 4655.
- Jiang, L., Hu, X., Yin, D., Zhang, H., Yu, Z., 2011. Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere* 82, 822-828.

Justino, C. I. L., Duarte, K. R., Freitas, A. C., Panteleitchouk, T. S. L., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T. A. P., 2016. Contaminants in aquaculture: Overview of analytical techniques for their determination. *Trends in Anal Chem* 80, 293-310.

K:

Karci, A., Balcioglu, I. A., 2009. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Sci Tot Env* 407, 4652-4664.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Wat Res* 42, 3498–3518.

Kim, S. C., Davis, J. G., Truman, C. C., WII, J. C. A., Carlson, K., 2010. Simulated rainfall study for transport of veterinary antibiotics - mass balance analysis. *J of Haz Mat* 175, 836.

Kim, S. C., Carlson, K., 2005. LC–MS2 for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices. *Trends in Anal Chem* 24, 635.

Kolpin, D., Furlong, E., Meyer, M., Thurman, E. M., Zaugg, S., 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Env Sci Tech* 36, 1202.

Kools, S., A., E., Moltmann, J., F., Knacker, T., 2008. Estimating the use of veterinary medicines in the european union. *Regulatory tox and pharma* 50, 59-65.

Kostopoulou, M., Nikolaou, A., 2008. Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *Trends in Anal Chem* 27, 1023.

Kumar, K., Gupta, S. C., Chander, Y. Singh, A. K., 2005. Antibiotic use in agriculture and its impacts on the terrestrial environment. *Advanced in agronomy* 87, 1.

Kumazawa, T., Lee, X. P., Sato, K., Suzuki, O., 2003. Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis. *Analytica Chimica Acta* 492, 49.

Kümmerer, K., 2003. Significance of antibiotics in the environment. *J Antimi Chemo* 52, 53-62.

Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75, 417–434.

Kurdwadkar, S. T., Adams, C. D., Meyer, M. T., Kolpin, D. W., 2007. Effects of Sorbate Speciation on Sorption of Selected Sulfonilamides in Three Loamy Soils. *J Ag Food chem* 55, 1370.

L:

Labadie, P., Budzinski, H., 2005. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Anal and Bioanal Chem* 381, 1199.

Lacey, C., McMahon, G., Bones, J., Barron, L., Morrissey, A., Tobin, J. M., 2008. An LC–MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Talanta* 75, 1089.

Le Pen, C., Lemasson, H., Roulliere-Lelidec, C., 2007. La consommation médicamenteuse dans 5 pays européens : une réévaluation. *Etude pour LEMM*, 62p.

Lillenberg, M., Yurchenko, S., Kipper, K., Herodes, K., Pihl, V., Sepp, K., Löhmus, R., Nei, L., 2009. Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216, 5949.

Lin, A. Y. C., Tsai, Y. T., 2009. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. *Sci Tot Env* 407, 3793.

Liu, R., Zhou, J. L., Wilding, A., 2004. Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. *J Chromatogr A* 1038, 19.

- Liu, S., Ying, G. G., Zhao, J. L., Chen, F., Yang, B., Zhou, L. J., Lai, H. J., 2011. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218, 1367.
- López-Serna, R., Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., Petrović, M., Barceló, D., 2013.
- Maraninchi, D., 2011. Analyse des ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France-1999-2009. *Affsaps*.
- M:
- Martinez-Carballo, E., Gonzalez-Barreiro, C., Scharf, S., Gans, O., 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Env Poll* 148, 570.
- Matejcek, D., Grycova, A., Vlcek, J., 2013. The use of molecularly imprinted polymers for the multicomponent determination of endocrine-disrupting compounds in water and sediment. *J Sep Sci* 36, 1097.
- Menet, M.-C., 2011. Principe de la spectrométrie de masse. *Revue francophone des laboratoires*. N°437, 41-53.
- Michel, T., 2011. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Université d'Orléans, Thèse.
- Mimeault, C., Woodhouse, A., Miao, X. S., Metcalfe, C. D., Moon, T. W. et Trudeau, V. L., 2005. The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquat Toxicol* 73, 44-54.
- Msagati, T. A. M., Nindi, M. M., 2004. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. *Talanta* 64, 87.
- N:
- Nickerson, J.G., Dugan, S.G., Drouin, G. et Moon, T.W., 2001. A putative bêta2-adrenoceptor from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular characterization and pharmacology*. *Euro J Biochem*. 268(24), 6465-6472.
- Nunes, B., Carvalho, F. et Guilhermino, L., 2006. Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*. 62, 581-594.
- O:
- O'Connor, S., Aga, D. S., 2007. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification. *Trends in Anal Chem* 26, 456.
- Oprîș, O., Soran, M. L., Coman, V., Copaciu, F., & Ristoiu, D. (2013). Determination of some frequently used antibiotics in waste waters using solid phase extraction followed by high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection. *Op Chem*, 11, 1343-1351.
- P:
- Pailler, J. Y., Krein, A., Pfister, L., Hoffmann, L., Guignard, C., 2009. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Sci Tot Env* 407, 4736.
- Pavlovic, D. M., Babic, S., Horva, A. J. M., Kastelan-Macan, M., 2007. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends in Anal Chem* 26, 1062.
- Pedrouzo, M., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R. M., 2009. Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 78, 1327.
- Petrie, B., Youdan, J., Barden, B., Kasprzyk-Hordern, R., 2016. Multi-residue analysis of 90 emerging contaminants in liquid and solid environmental matrices by ultra-high-

- performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J chromatogr A* 1431, 64-78.
- Piatkowska, M., Jedziniak, P., Zmudzki, J., 2016. Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food chemistry* 197 :571-580.
- Picó, Y., Andreu, V., 2007. Fluoroquinolones in soil—risks and challenges. *Anal and Bioanal Chem* 387, 1287.
- Pietrogrande, M.C., Basaglia, G., 2007. GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. *Trends in Anal Chem* 26, 1086– 1094.
- Poliwoda, A., Krzyzak, M., Wieczorek, P.P., 2010. Supported liquid membrane extraction with single hollow fiber for the analysis of fluoroquinolones from environmental surface water samples. *J Chromatogr A* 1217, 3590.
- R :
- Rabolle, M., Spliid, N. H., 2000. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere* 40, 715.
- Reverté, S., Borull, F., Pocurull, E., Marcé, R. M., 2003. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1010, 225.
- Runnqvist, H., Bak, S. A., Hansen, M., Styrihave, B., Halling-Sorensen, B., Björklund, E., 2010. Determination of pharmaceuticals in environmental and biological matrices using pressurised liquid extraction—Are we developing sound extraction methods, *J Chromatogr A* 1217, 2447.
- Ryu, J., Yoon, Y., & Oh, J. (2011). Occurrence of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals in 11 WWTPs in Seoul, Korea. *KSCE J of Civ Eng*, 15, 57-64.
- S:
- Sausen, P.J., Teets, V.D., Voss, K.S., Miller, R.T. et Cattley, R.C., 1995. Gemfibrozil-induced peroxisome proliferation and hepatomegaly in male F344 rats. *Cancer Letters* 97, 263-268.
- SUQ, H; Kallury, K; Extraction and analysis of sulfonilamides from honey by LC/MS/MS using strata™ X-C Polymeric SPE Sorbent and Gemini™ C18 HPLC Column. Phenomenex.
- Sabban, C., Courtois, J., Comparaisons européennes sur huit classes de médicaments. *Points de repère*, N°12, 8p.
- Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.-J., Blankenhorn, I., 2001. Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *J Chromatogr A* 938, 199–210.
- Santos, J. L., Aparicio, I., Callejón, M., Alonso, E., 2009. Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *J Haz Mat* 164, 1509–1516.
- Sassman, S. A., Li. L. S., 2005. Sorption of three tetracyclines by several Soils : Assessing the Role of pH and Cation Exchange. *Env Sci Technol* 39, 7452.
- Schlusener, M. P., Bester, K., 2006. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Env Poll* 143, 565.
- Schlusener, M. P., Spiteller, M., Bester, K., 2003. Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J chromatogr A* 1003, 21.
- Shah, A., McCallum, E., Park, A., Huang, C., Kim, H J. H., 2005. Effect of water Quality on Rejection of selected Human and veterinary antibiotics by nanofiltration and reverse osmosis membranes. *Membrane tech. Conference*.
- Sim, W. J., Kim, H. Y., Choi, S. D., Kwon, J. H., Oh, J. E., 2013. Evaluation of pharmaceuticals and personal care products with emphasis on anthelmintics in human sanitary waste, sewage, hospital wastewater, livestock wastewater and receiving water. *J Haz Mat* 248–249, 219–227.

- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., 2003. Principes d'analyse instrumentale. Chapitre 20, 498 – 534.
- Stobberingh, E., Bogaard, A. E. V. d., London, N., Christel, D., Janetta, T., Willems, R., 1999. Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub) urban residents in South of the Netherlands: Evidence for transmission of Vancomycin resistance from animals to humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 2215.
- Stoob, K., Singer, H. P., Goetz, C. W., Ruff, M., Mueller, S. R., 2005. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tandem mass spectrometry Quantification of sulfonamides antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. *J chromatogr A* 1097, 138.
- Suenami, K., Lim, L.W., Takeuchi, T., Sasajima, Y., Sato, K., Takekoshi, Y., Kanno, S., 2007. On-line sample extraction and enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs by precolumn in capillary liquid chromatography mass spectrometry. *J chromatogr B* 846, 176–183.
- Sukul, P., Spiteller, M., 2006. Sulfonilamides in the environment as veterinary drugs. *Rev env cont toxicol* 187, 67.
- Sun, P., Barmaz, D., Cabrera, M. L., Pavlostathis, S. G., & Huang, C. H. (2013). Detection and quantification of ionophore antibiotics in runoff, soil and poultry litter. *J chromatogr A*, 1312, 10-17.
- Suna, L., Yong, W., Chu, X., Lina, J. M., 2009. Simultaneous determination of 15 steroidal oral contraceptives in water using solid-phase disk extraction followed by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J chromatogr A* 1216, 541.
- T:
- Thiele-Bruhn, S., 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *J Plant Nutr Soil Sci* 166, 145.
- Togola, A., 2006. Présence et devenir des substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques. Thèse, Université Bordeaux 1, 331p.
- Tong, L., Li, P., Wang, Y., Zhu, K., 2009. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* 74, 1090.
- V:
- Viens, G., Levesque, K., Chahwakilian, P., El Hasnaoui, A., Gaudillat, A., Nicol, G., Crouzier, C., 2007. Evolution comparée de la consommation de médicaments dans 5 pays européen entre 2000 et 2004 : analyse 7 classes pharmaco-thérapeutique. *ESSEC*, 21p.
- Viglino, L., Aboufald, K., Prévost, M., Sauvé, S., Detection of pharmaceuticals, personal care products, and pesticides in water resources by APCI-LC-MS/MS. Thermo scientific.
- Vulliet, E., Cren-Olivé, C., 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Env Poll* 159, 2929.
- Vulliet, E., Cren-Olivé, C., Grenier-Loustalot, M.-F., 2009. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Envir Chem Letters*, 9, p. 103-114.
- Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R., Grenier-Loustalot, M. F., 2008. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J chromatogr A* 1210, 84.
- W:
- Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., Costanzo, S. D., 2009. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Sci tot env* 407, 2711-2723.

- Wei, R., Ge, F., Huang, S., Chen, M., Wang, R., 2011. Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere* 82, 1408.
- Whitehead, B., 2011. Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada — Occurrence and treatment efficiency. *Sci Tot Env* 409, 1481–1488.
- Wunder, D. B., 2010. Fate and impact of antibiotics in slow-rate biofiltration processes coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, University of Minnesota, Doctor of philosophy
- X :
- Xu, J., Wu, L., Chen, W., Chang, A. C., 2008. Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry. *J chromatogr A* 1202, 189.
- Xu, W., Zhang, G., Li, X., Zou, S., Li, P., Hu, Z., Li, J., 2007. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the pearl river delta (PRD), south china. *Wat res* 41, 4526.
- Y:
- Y. Pico, V. Andreu, 2007. Fluoroquinolones in soil-risks and challenges. *Anal and bioanal chem* 387, 1287.
- Yamini, Y., Asghari-Khiavi, M., Bahramifar, N., 2002. Effects of different parameters on supercritical fluid extraction of steroid drugs, from spiked matrices and Tablets. *Talanta* 58, 207.
- Yan, C., Yang, Y., Zhou, J., Liu, M., Nie, M., Shi, H., Gu, L., 2013. Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: Occurrence, distribution and risk assessment. *Env sci technol* 45:75-78.
- Yang, Y. 2013., degradation and transport pathways of steroid hormones from human and animal waste. Colorado State University, For the degree of Doctor of Philosophy.
- Yang, Y. Y., Degradation and transport pathways of steroid hormones from human and animal waste. Colorado State University, For the Degree of Doctor of Philosophy.
- Ying, G. G., Kookana, R. S., Ru, Y. J., 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Env Int* 28, 545.
- Z:
- Zhang, Z., Li, X., Ding, S., Jiang, H., Shen, J., Xia, X., 2016. Multiresidue analysis of sulfonamides, quinolones, and tetracyclines in animal tissues by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food chem* 204 :252-262.
- Zhao, L., 2007. Determination of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol in honey using agilent sampli Q OPT solid-phase extraction cartridges and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Agilent technologies*.
- Zhou, L. J., Ying, G. G., Liu, S., Zhao, J. L., Chen, F., Zhang, R. Q., Peng, F. Q., Zhang, Q. Q., 2012. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various matrices, *Env Int* 5, 47-50.
- Zuloaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Vallejo, A., Olivares, M., Prieto, A., 2012. Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Anal Chim Acta* 736, 7.

# **Chapitre II**

## **Matériels et méthodes**

Pour étudier la présence des contaminants dits « émergents » dans l'environnement, des méthodes d'analyses doivent être mise en place pour les différents types de matrices liquides (eau de surface, entrée et sortie des stations d'épuration, eau souterraine, eau potable) ou dans les matrices solides (sol, sédiments, boues...).

Cependant, peu de travaux ont porté sur l'analyse de plusieurs familles d'antibiotiques dans l'environnement. Des méthodes à la fois spécifiques et sensibles doivent être mises en place pour analyser et quantifier les traces des différents composés présents dans l'eau et le sol, ce qui permettra, par la suite, d'étudier le niveau de contamination des milieux naturels.

## **I. Standards analytiques et références**

Pour effectuer les analyses quantitatives, des standards (composés de grande pureté) sont indispensables. La plupart des standards analytiques utilisés dans cette étude sont de qualité Vetranal (V) ou certifiés USP (United States Pharmacopeia). Tous les composés sont de marque Sigma-Aldrich. Les standards sont les molécules représentant les principes actifs. Après une analyse bibliographique, les substances choisies sont présentées dans le Tableau II.1.

**Tableau II. 1. Qualité, pureté et marque des différents composés étudiés**

<b>Composés</b>	<b>Qualité</b>	<b>Pureté</b>
Difloxacin	V	98,4%
Orbifloxacin	V	99,6%
Ofloxacine	V	99,9%
Enrofloxacin	V	99,1%
Danofloxacin	V	99,8%
Ciprofloxacine	V	99,9%
Norfloxacin	V	99,7%
Chlortétracycline	nd*	>98%
Oxytétracycline	nd	98,1%
Minocycline	nd	>98%
Doxycycline	nd	>98%
Tétracycline	V	>98%
Sulfabenzamide	V	99%
Sulfadiazine	V	99,7%
Sulfanilamide	V	99,9%
Sulfaméthoxazole	V	>98%
Sulfathiazole	V	99%
Sulfadiméthoxine	V	> 98%
Sulfamérazine	V	99,8%
Triméthoprime	V	99,1%
Erythromycine	USP	>98%
Tylosine	V	>98%
Carbamazépine	USP	99,6%
Ampicilline	V	98%
Gemfibrozil	V	>99%
Monensin	V	98%
Florfénicol	V	>98%

\*inconnue

Les étalons internes sont des composés deutérés (Sigma –Aldrich). Ces composés ne sont disponibles commercialement que pour un nombre restreint de produits. Nous avons toutefois réussi à obtenir quelques uns. Le triméthoprime-d<sub>3</sub> (99,6%) et la carbamazépine d-10

(99%) ont été, respectivement, utilisés pour le triméthoprime (diaminopyrimidine) et la carbamazépine. Le sulfaméthoxazole-d<sub>4</sub> (>98%) a été choisi pour la famille des sulfonilamides et les autres antibiotiques étudiés.

Les solutions mères individuelles de chacun des composés ont été préparées dans le méthanol par pesée à 1 mg/mL et conservées à -10°C. Les solutions qui ont servi aux analyses, ont été préparées à partir des solutions mères par dilutions adéquates dans l'eau grade HPLC. Le méthanol, l'acétonitrile (grade HPLC), l'acétate d'éthyle, l'eau grade HPLC, l'acide formique (98%, grade HPLC), l'acide acétique et l'acide citrique sont de marque Sigma-Aldrich. L'acide phosphorique (min 85%) et la soude sont de marque Prolabo.

## II. Analyse par LC/MS/MS

L'analyse des micropolluants ciblés, après l'étape de préparation de l'échantillon, a été réalisée par extraction sur phase solide en ligne avec l'ultrachromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

### II.1. Séparation des antibiotiques par chromatographie liquide

La chromatographie liquide est basée sur des interactions entre la phase stationnaire (adsorbant), la phase mobile (éluant) et les solutés (Figure.II.1).

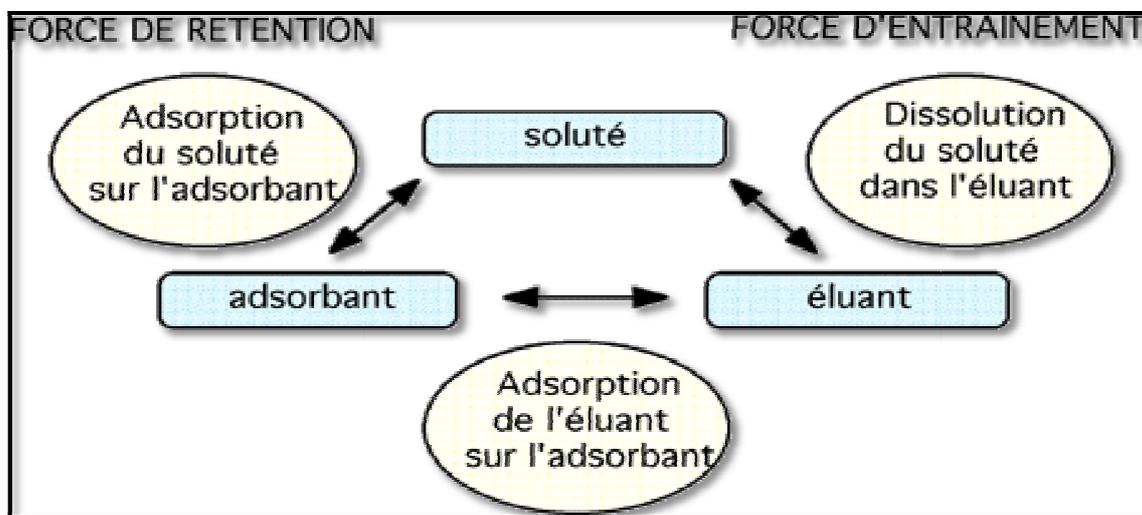


Figure II.1. Principe de chromatographie liquide

L'échantillon est injecté dans une phase mobile liquide en contact avec la phase stationnaire contenue dans la colonne chromatographique. Les solutés se répartissent selon leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire ce qui permet leur séparation.

Il existe deux types de phases stationnaires : Une phase polaire et acide et une phase inverse. La phase polaire et acide est constituée de gel de silice présentant à sa surface des groupes siloxanes (Si-O-) et silanol (Si-OH) qui permettent le greffage des composés à analyser par les liaisons hydrogènes. Cette phase sert principalement à séparer les composés polaires. Dans ce cas, un éluant apolaire est utilisé.

La phase inverse est la même que la phase précédente sur laquelle des chaînes alkyles (C8 ou le plus souvent C18) ont été greffées sur les groupements silanols. Les composés polaires seront élués en premier dans ce cas. Un éluant polaire sera utilisé avec une phase inverse.

Dans le présent travail, nous utilisons la phase inverse. Plusieurs paramètres seront optimisés pour séparer au mieux l'ensemble des composés : le choix de segmentation, le choix du gradient d'éluant et enfin le choix du débit et l'éluant. Pour permettre une meilleure séparation des solutés ainsi que la diminution du temps d'analyse, les modes isocratique et gradient de solvant sont généralement utilisés :

- Mode isocratique : la nature des solvants ne change pas au cours de l'analyse.
- Mode gradient : la composition relative des solvants varie au cours de l'analyse.

## **II.2. Détection des antibiotiques par spectrométrie de masse en tandem**

Un spectromètre de masse est composé de trois parties :

- une source d'ionisation permettant de volatiliser et d'ioniser les molécules pour obtenir des ions en phase gazeuse.
- un analyseur permettant la séparation des ions en fonction de leur rapport m/z.
- un détecteur qui permet la conversion du courant ionique en courant électrique proportionnel au nombre d'ions détectés.

### **II.2.1. Source d'ionisation**

L'ionisation électrospray (ESI) a été utilisée dans cette étude. Le principe de l'ionisation électrospray (Figure II.2) est le suivant :

L'échantillon liquide traverse, à pression atmosphérique, un tube capillaire auquel est appliquée une différence de potentiel de 4000 à 6000 eV. Le champ électrique ainsi créé est de l'ordre de  $10^6$  V/m.

A la sortie, un bouillard de gouttelettes de soluté forme un cône de Taylor (jet de particules chargées). Un champ électrique intense leur confère une densité de charge élevée, positif ESI+ ou négatif ESI- selon le mode d'ionisation. Ces modes permettent de produire

respectivement des ions chargés positivement (par une protonation des molécules) ou des ions chargés négativement (par une déprotonation des molécules). Les gouttelettes seront chargées positivement ou négativement selon le mode d'ionisation appliqué. Le choix du mode d'ionisation est guidé par la structure chimique de la molécule.

Sous l'effet d'un gaz ( $N_2$ ) chaud injecté, le solvant s'évapore petit à petit. Leur densité de charge devient trop importantes, les gouttelettes subissent une explosion coulombienne et se divisent en gouttelettes encore plus petites. Le phénomène se poursuit jusqu'à l'obtention d'ions complètement désolvatés et sont par la suite dirigés vers l'analyseur (Figure II.2).

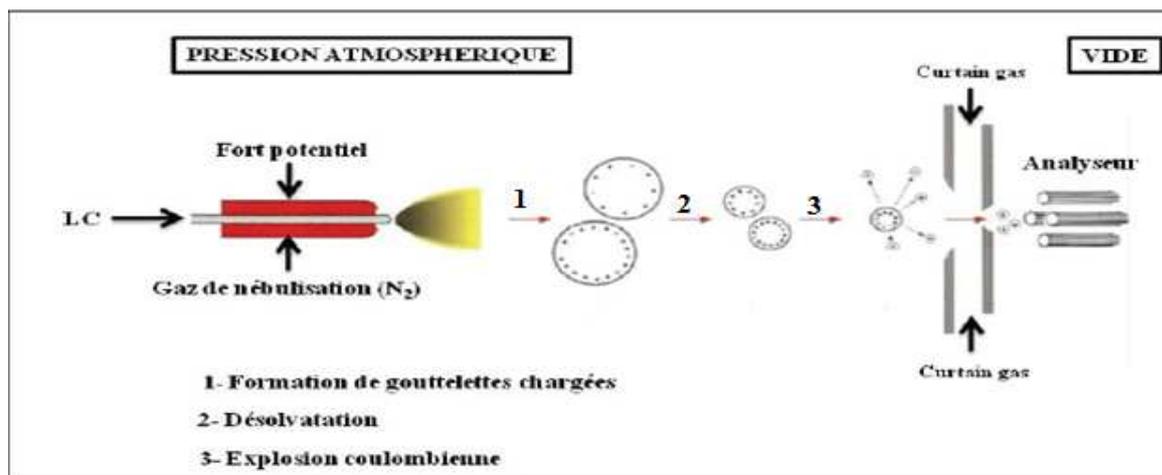


Figure II. 2. Principe de l'ionisation par une source électrospray

### II.2.2. Analyseur

L'analyseur quadripolaire a été utilisé dans ce travail. Il est constitué de quatre électrodes parallèles connectées électriquement deux à deux, pour séparer les ions en fonction de leur rapport  $m/z$ . Les ions traversant le quadripôle suivant l'axe  $z$  sont soumis à l'influence d'un champ électrique total (constitué d'un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant) résultant de l'application sur les barres des potentiels  $Q_0$  et  $-Q_0$ .  $Q_0$  est calculé par la formule  $Q_0 = U + V \cos(\omega t)$ , où  $U$  est la composante continue et  $V \cos(\omega t)$  est la composante sinusoïdale. Pour séparer les ions en fonction de leur rapport  $m/z$ , les valeurs de  $U$  et de  $V$  sont régulièrement modifiées tout en maintenant le rapport  $U/V$  constant. Les tensions appliquées affectent la trajectoire des ions traversant les quatre électrodes. Pour une valeur de  $U$  et de  $V$ , une valeur unique de  $m/z$  aura une trajectoire stable selon l'axe  $z$ . La Figure II.3 illustre le principe de l'analyseur quadripolaire.

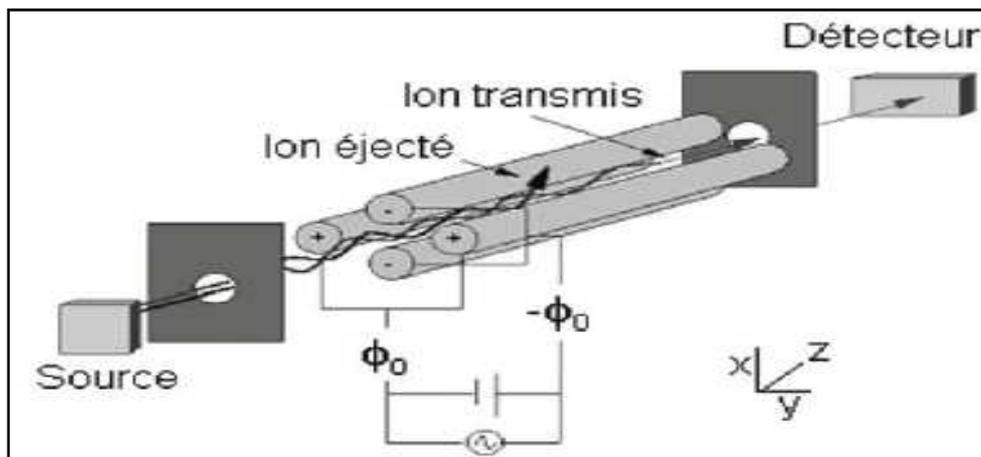
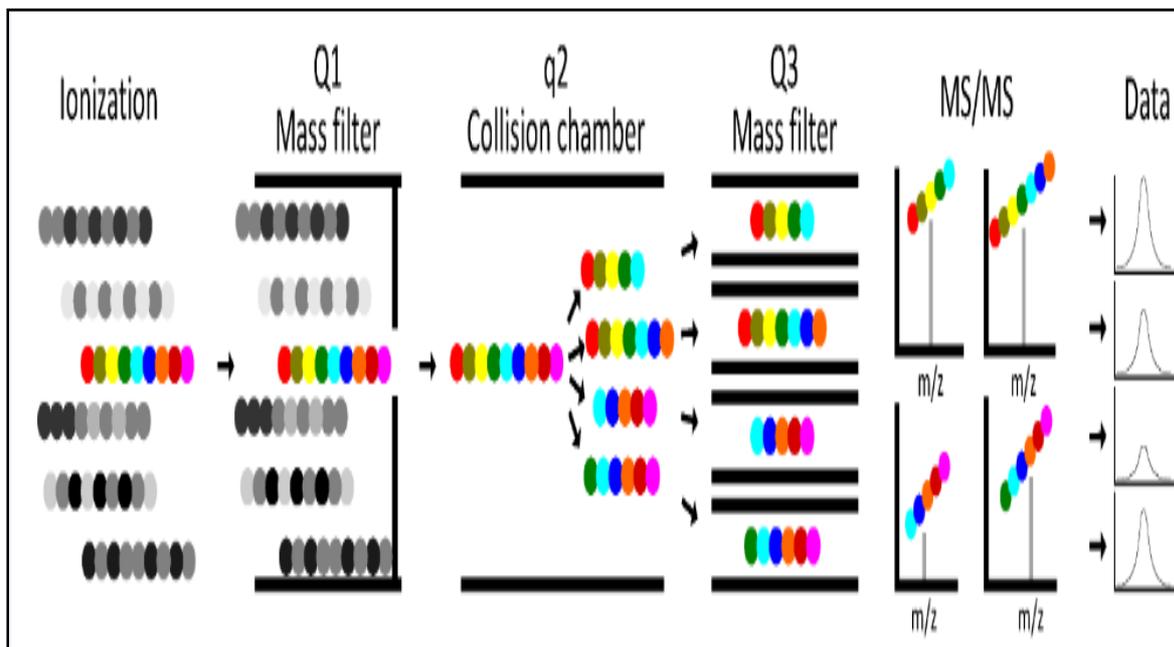


Figure II. 3. Principe de l'analyseur quadripolaire

### II. 2.3. Détecteur

Le détecteur résulte de l'association de deux analyseurs quadripolaires en série, séparés par une cellule de collision. Selon l'information recherchée, quatre différents modes de détection existent. Le mode descendant est utilisé pour obtenir des informations structurales. Les deux modes ascendant et de perte de neutre sont d'un usage plus restreint. Ils permettent de mettre en évidence des ions ayant des particularités communes. Le mode Multiple Reaction Monitoring (MRM), dérivé du mode descendant est dédié à la quantification. C'est ce dernier mode qui a été utilisé dans notre étude.

En mode MRM, l'ion parent ou précurseur (souvent l'ion pseudo-moléculaire  $[M+H]^+$  en ESI+ et  $[M-H]^-$  en ESI-) issu de la source d'ionisation est sélectionné par le premier quadripôle puis fragmenté dans la cellule de collision pour former des ions fils. Le second analyseur est, quant à lui, focalisé uniquement sur les ions fils. Ce mode présente une double sélectivité, au niveau des sélections de l'ion parent et de l'ion produit. Dans ce mode, sont obtenues des transitions MRM de l'ion parent à l'ion fils (Figure.II.4).



**Figure II. 4. Illustration du mode MRM**

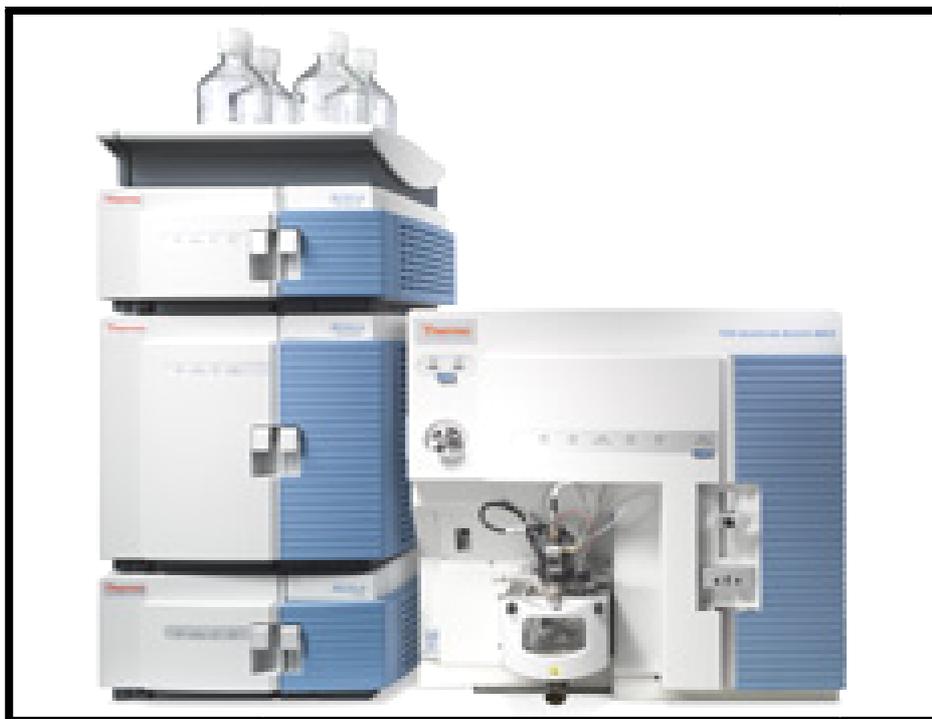
Le mode MS/MS très sensible, il est utilisé pour des analyses ciblées. Pour réaliser des analyses non ciblées, l'analyseur à temps de vol (TOF) est employé parce qu'il donne des informations sur l'ensemble des spectres. Cependant, sa sensibilité reste toujours plus faible.

### III. Optimisation des méthodes d'analyse.

Après la préparation des échantillons, l'analyse a été effectuée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS).

#### III.1. Procédure d'étude

La procédure utilisée est la même pour tous les médicaments étudiés. La chromatographie liquide a été réalisée sur un équipement (Thermo Fisher Scientific) constitué d'une chaîne équipée d'un passeur automatique d'échantillon, deux pompes, un dégazeur, un four à colonne et un système de pré-concentration en ligne permettant la purification de l'échantillon.



**Figure II. 5. Equipement SPE-LC/MS/MS (Thermo Fisher Scientific)**

Les extraits des matrices aqueuses et solides sont pré-concentrés par SPE (extraction en phase solide) en ligne sur une cartouche C18 en phase inverse de marque Thermo Fisher de type Hypersil Gold de 2,1 mm de diamètre, de 20 mm de longueur et 12  $\mu\text{m}$  de taille des particules, et en utilisant une pompe Surveyor. La SPE en ligne a été utilisée afin d'injecter un grand volume d'extrait. Un millilitre (1 mL) d'extrait a été chargé, en utilisant une pompe Surveyor, sur la cartouche SPE en ligne où des composés pharmaceutiques ont été adsorbés.

La séparation des analytes a été réalisée à l'aide d'une pompe Accela, (Thermo Fisher Scientific) équipée d'une colonne analytique C18 Hypersil GOLD en phase inverse de paramètres 2,1 mm de diamètre, 50 mm de longueur et de 1,9  $\mu\text{m}$  de taille des particules.

Les composés ont été ensuite élués par la phase mobile puis distribués par une pompe Accela. La séparation a été effectuée par un gradient d'éluion du mélange de 0,1% d'acide formique et 0,1%, acétate d'éthyle d'ammonium dans l'eau de qualité HPLC (éluant A); 0,1% d'acide formique dans une solution de méthanol (éluant B). Le temps d'analyse est de 25 min. Les produits pharmaceutiques sont ensuite dirigés vers la source électrospray de l'appareil (Tableau II.2).

Dans ces conditions, la SPE en ligne permet d'atteindre des valeurs minimales de la limite de quantification (LOQ). La température du four de la colonne a été réglée à 40  $^{\circ}\text{C}$  et le débit de la phase mobile est de 0,2 mL / min.

**Tableau II. 2. Gradient d'élution de la procédure utilisée**

<b>Temps (min)</b>	<b>Eluant A (%)</b>	<b>Eluant B (%)</b>
0	95	5
5	50	50
20	50	50
20,1	95	5
25	95	5

Les conditions opératoires correspondent à une augmentation linéaire en fonction du temps des compositions relatives des éluants et de différentes valeurs de tensions établies aux bornes de chaque partie de l'appareillage (Tableau II.3).

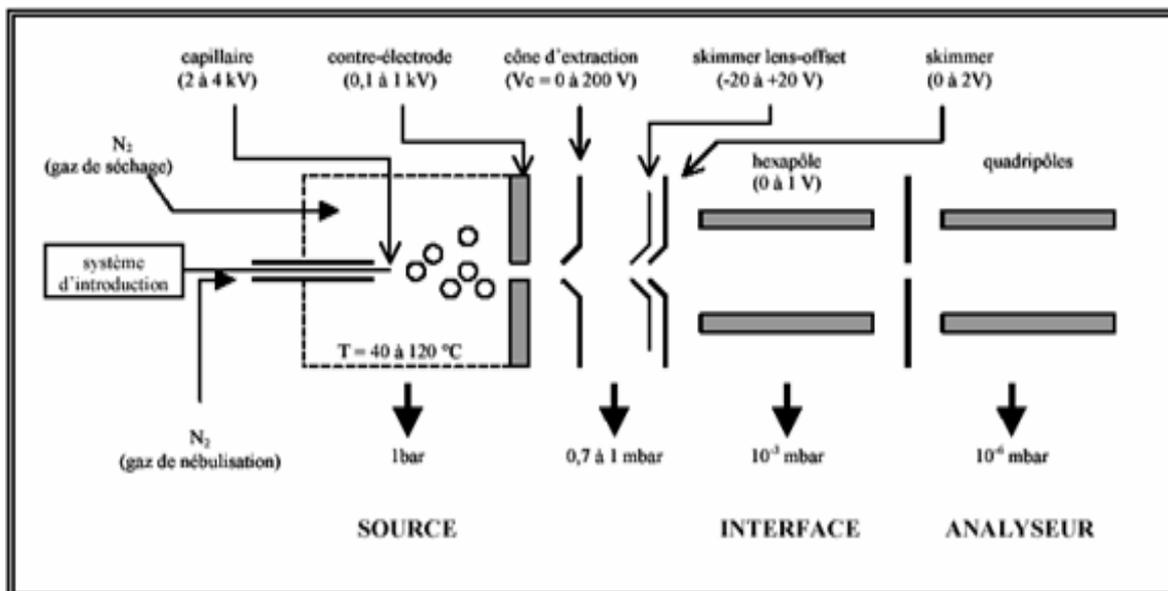
**Tableau II. 3. Conditions initiales opératoires en mode d'ionisation positif (ESI +)**

<b>Tension de pulvérisation (V)</b>	<b>Tension Skimmer (V)</b>	<b>Tension capillaire (V)</b>	<b>Tension tube lentille (V)</b>	<b>Température de chauffage (°C)</b>	<b>Température de capillaire (°C)</b>
3500	18	35	95	300	225

La précision de l'appareillage a été soigneusement contrôlée comme suit :

- Vérification quotidienne en utilisant les normes de précision.
- Evaluation hebdomadaire et un étalonnage externe si nécessaire bimensuel avec des normes de précision (Togola et al., 2008 et Kolpin et al., 2002).

Les données sont traitées en utilisant XCalibur™ version 2.1 (Thermo Fisher Scientific). Les transitions MRM permettent de sélectionner 2 ions fils qui correspondent à une quantification et à la confirmation. Dans le dernier quadripôle (Figure II.6), les ions fils choisis suivent le chemin focalisé. Et enfin, la dynode accueille ces ions et transforme leur signal chimique en signal électrique. La figure II.6 illustre ces étapes de sélection de l'ion parent, de fractionnement et de sélection des deux ions fils.



**Figure II. 6. Principe du spectromètre de masse avec triple-quadripôle**

Les données MS/MS ainsi que les paramètres de la source d'ionisation ESI (en mode positif et négatif) ont été optimisés par injection manuelle des standards en flux continu à des concentrations comprises entre 0,5 et 2 mg/L selon les composés.

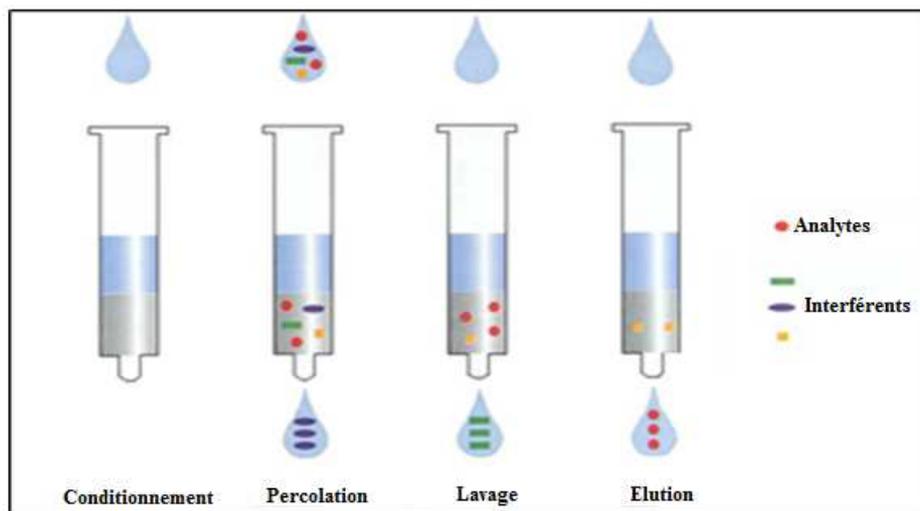
### III.2. Préparation d'échantillon

Pour l'étape de préparation de l'échantillon, deux étapes sont généralement utilisées : l'extraction suivie par la purification. Plusieurs méthodes d'extraction et de purification ont été testées.

#### III.2.1. Échantillons en phase liquide

##### III.2.1.1. Extraction en phase solide (SPE)

La technique SPE d'extraction, de purification et de concentration la plus employée pour tous les types des matrices liquides. Le principe est basé sur les interactions entre une phase solide contenue dans une cartouche, la phase mobile (matrice aqueuse, solution éluante) et les composés à extraire (Figure II.7). La SPE consiste à faire percoler l'échantillon aqueux à travers la cartouche pour piéger les analytes recherchés ou les interférents. Son large succès est dû à sa rapidité, son efficacité et le large choix des phases adsorbantes disponibles. De plus, cette technique nécessite une faible quantité de solvant ce qui est, pour la chimie verte, un avantage non négligeable.



**Figure II. 7. Schéma du principe de l'extraction en phase solide**

### III.2.1.2. Méthode optimisée

Pour l'optimisation de l'extraction sur phase solide (SPE) de la matrice aqueuse, l'eau grade HPLC, dopée par les 28 composés étudiés à raison de 1µg/L, a été utilisée. La SPE a été effectuée en utilisant un collecteur sous vide de type Supelco SPE (Sigma-Aldrich). Plusieurs paramètres ont été testés tels que le volume d'échantillon, le choix de la cartouche et le choix du pH de l'échantillon.

**Tableau II. 4. Paramètres expérimentaux fixés pour la SPE**

<b>Conditionnement</b>	6 mL de m éthanol 6 mL d'eau HPLC
<b>Chargement</b>	500 mL de l'échantillon pH= 2,5 Débit = 1 mL/ min
<b>Lavage</b>	6 mL d'eau HPLC Débit= 1 mL/min
<b>Séchage</b>	30 min sous flux d'azote Pression = 1 bar
<b>Elution</b>	6 mL de méthanol Débit= 1 mL/min

En effet, la SPE off-ligne permet à la fois la pré-concentration de l'extrait et la réduction des interférents potentiels (Hernandez et al., 2007 ; Gros et al., 2013 et Seifrtova et al., 2009).

### III.2.2. Echantillons en phase solide

La méthode utilisée lors de l'analyse des résidus pharmaceutiques passe par quatre grandes étapes :

- La préparation des cellules.

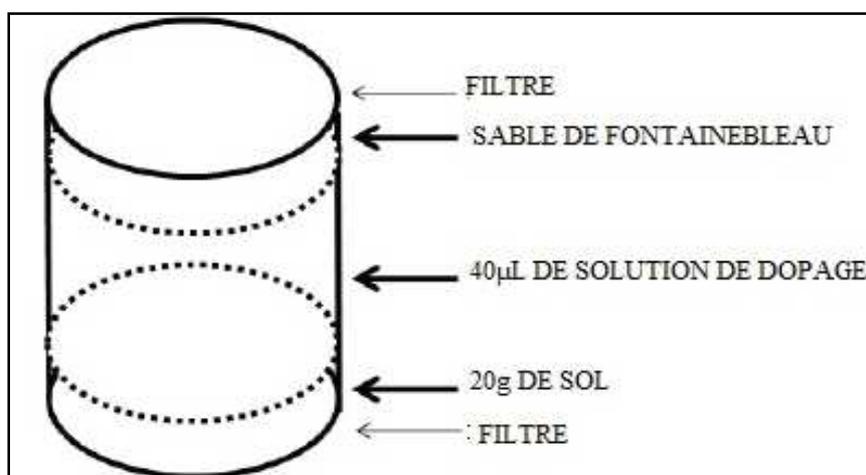
- L'extraction
- L'évaporation
- La purification

Les échantillons de sol sont séchés à l'air libre pendant 5 jours dans une salle à 35°C, tamisés à 2 mm et stockés dans des flacons appropriés.

### III.2.2.1 Préparation des cellules

Avant d'extraire les produits des sols, les cellules seront préparées. Cette étude porte sur 5 sols du Haut de France. Ce choix permet d'étudier le niveau de contamination de cette région. Les sites étudiés sont : Steenwerck, Liévin, Airon St Vaast, Marcq-en-Ostrevent et le site de Dompierre. Ces sols utilisés présentent des propriétés physico-chimiques très variées afin d'étudier l'influence de ces différents paramètres sur les rendements d'extraction de la PLE.

Une cellule métallique PLE de 40 mL est remplie avec 20 g de sol. La cellule est complétée avec du sable de Fontainebleau (un sable de référence) pour limiter le plus possible le volume mort. Deux filtres en cellulose sont placés aux deux extrémités de la cellule. Son remplissage est illustré (Figure II.8).



**Figure II. 8. Remplissage de la cellule PLE**

Pour l'optimisation de la procédure, lors de l'étude de rendement d'extraction, les cellules sont dopées au centre en proportions de 1ng/g avec un mélange contenant les 28 composés. Avant d'effectuer la PLE, les cellules sont laissées 7 à 8 heures à la température ambiante pour homogénéiser son contenu ce qui permet l'intégration totale des substances. Six cellules sont préparées soit les 5 sols et un blanc d'extraction contenant seulement le sable de Fontainebleau et le dopage.

### III.2.2.2. Extraction de l'échantillon par PLE (extraction à haute température et pression)

La PLE est une extraction à haute température et à haute pression. Le solvant choisi permet de solubiliser la totalité des analytes, et la polarité de ce dernier doit se rapprocher de la polarité des composés. Un mélange de solvants de polarité différente peut être utilisé pour extraire des substances de polarité très différente.

Cinq mélanges d'extraction ont été testés : l'acétonitrile, le méthanol, un mélange contenant du méthanol et l'acide citrique à 0,2 mol/L (50/50 ; V/V) ajusté à pH=3. Un mélange contenant de méthanol, l'acétonitrile et l'acide citrique à 0,2 mol/L (25/25/50 ; V/V/V) à pH=3 et un dernier mélange contenant du méthanol, l'acétonitrile et l'acide citrique à 0,2 mol/L (40/40/20 ; V/V/V) à pH 4, 5.

- ✓ **La température** : plus la température est élevée, plus la viscosité du solvant diminue, ce qui favorise sa pénétration dans la matrice et solubilise mieux les composés.

Afin d'éviter la dégradation des composés cibles, plusieurs valeurs sont généralement utilisées 60, 80 et 100 °C.

- ✓ **La pression** : doit être assez élevée pour maintenir le solvant dans son état liquide.

Trois pressions sont généralement utilisées 80, 100 et 120 bars.

- ✓ **Le temps statique** correspond à la durée de l'extraction pendant laquelle la température et la pression sont stables. Certaines matrices retiennent les substances à extraire dans leurs pores. Augmenter le temps statique permet aux composés de mieux diffuser dans le solvant d'extraction. Plusieurs valeurs allant de 5 à 10 minutes sont généralement utilisées.

- ✓ **Le nombre de cycles** permet de multiplier le nombre de passage de solvant à travers l'échantillon et d'augmenter le taux de récupération.

Une fois les cellules remplies, elles seront introduites dans l'extracteur PLE (Figure II.9).



Figure.II. 9. Extracteur PLE (Buchi, SpeedExtractor E-914/E-916)

### III.2.2.3. Evaporation des extraits

Environ 20 mL d'extrait sont obtenus après 40 minutes. Ils sont transférés dans un erlenmeyer de 100 mL. 50 µL de keeper n-dodécane sont ajoutés selon la méthode développée par Salvia et al., (2013).

Un keeper est un composé peu volatil utilisé pour empêcher la volatilisation des composés, de structure enchainées ramifiées, ce dernier sert à protéger les molécules d'intérêts.

Le contenu de l'erlenmeyer est évaporé partiellement à l'évaporateur rotatif dans un bain marie fixé à 60°C et une pression de 450 mbar jusqu'à obtention de 2 à 5 mL d'échantillon.

Le volume restant est évaporé à sec dans l'évaporateur à effet vortex sous flux d'azote de 0,8 bar. Le résidu obtenu est repris dans 6 mL de mélange eau/méthanol (97/3 ; V/V).

### III.2.2.4. Purification des extraits

L'étape de purification a pour but de limiter la présence d'interférents extraits en même temps que les composés susceptibles de perturber l'analyse, un phénomène couramment appelé effet matrice (Hernandez et al., 2007).

La purification de l'extrait est réalisée sur la cartouche HLB (200 mg/ 6 mL) en cinq étapes représentées comme suit :

- 1) Le conditionnement de la cartouche par l'ajout de 6 mL de méthanol suivi par 6 mL d'acide citrique à 0,2 mol/L à un débit fixé à 1mL/min.
- 2) Le chargement des 5 mL de l'échantillon à un débit de 1 mL/min également.
- 3) Une série de lavage de cartouche est ensuite effectuée par 3 mL de l'eau grade HPLC suivi de 3 mL de l'acide citrique à 0,2 mol/L avec un débit égale à 1 mL/min.
- 4) Le séchage sous flux d'azote sous pression de 0,8 bar pendant 30 minutes. Aucune trace d'un quelconque liquide ne doit subsister dans la cartouche.
- 5) L'élution de l'extrait s'effectue avec 6 mL de méthanol avec un débit de 1 mL/min.

L'extrait résultant de l'opération est transvasé dans un tube tétine, placé au bain-marie à 40 °C dans l'évaporateur à effet vortex jusqu'à l'obtention du résidu sec sous flux d'azote à 0,8 Bar.

Dans une fiole en verre, le résidu sec est repris par environ 4 mL d'eau grade HPLC/CH<sub>3</sub>OH (97/3 ; V/V), 40 µL de HCl dilué 1/5 et 40 µL de la solution des étalons internes. Le temps de contact est de 30 à 45 minutes. Ensuite, la solution est filtrée à l'aide

d'une seringue munie d'accrodiscs équipés des filtres de fibre en verre à 0,2 µm. Finalement, l'échantillon est mis dans des vials ambrés de 2 mL.

#### **IV. Validation de l'extraction à haute température et haute pression**

L'extraction PLE a été validée suivant les recommandations de (M. Feinburg, 1986) pour une validation analytique de norme ISO 17025.

##### **IV.1. Critères d'une validation analytique**

###### **IV.1.1. Linéarité**

La linéarité d'une méthode de mesure ou d'une procédure d'analyse est, sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, d'obtenir des résultats de mesure directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance de l'échantillon analysé. Elle a été évaluée en analysant des sols dopés dans une gamme de concentration de 0,5 ng/g à 500 ng/g. La linéarité a été évaluée trois fois à trois jours différents.

###### **IV.1.2. Spécificité**

Une méthode est spécifique lorsqu'elle permet de distinguer des composés présentant des structures voisines. Elle doit limiter les interférences liées à la matrice de l'échantillon.

###### **IV.1.3. Limite de détection**

La limite de détection correspond à la quantité la plus faible d'analyte qui peut être détectée dans un échantillon, sans forcément pouvoir être quantifiée de façon exacte. L'évaluation du seuil de détection dépend essentiellement du rapport Signal/bruit de fond. La limite de détection (LOD) a été déterminée telle que la concentration de l'analyte produit un pic d'une hauteur égale à trois fois l'écart-type du bruit.

**LOD : Signal/Bruit=3**

###### **IV.1.4. Limite de quantification**

La limite de quantification (LOQ) correspond à la concentration pour laquelle la hauteur du pic de l'analyte est égale à dix fois l'écart-type du bruit, ceci sur la transition MRM la plus intense.

**LOQ : Signal/Bruit=10**

###### **IV.1.5. Fidélité**

La précision de la procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'essais d'un même échantillon homogène. La précision s'exprime par la mesure de la répétabilité et la reproductibilité. La moyenne, l'écart

type (**SD** : déviation standard) et le coefficient de variation (**CV, %**) pour les différentes concentrations sont exprimées ainsi :

$$\text{Moyenne } \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$$\text{Ecart type (SD)} = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\text{CV(\%)} = \frac{\text{Ecart type (SD)}}{\text{Moyenne } \bar{X}} \times 100$$

#### **IV.1.5.1. Répétabilité**

La répétabilité se rapporte à des essais de la même grandeur effectués dans des conditions aussi stables que possible, à de court intervalle de temps, dans un même laboratoire et par un même opérateur employant le même équipement. L'objectif est d'obtenir des mesures dans les conditions les plus similaires possibles. La répétabilité traduit la variation intra-journalière.

La répétabilité a été évaluée en calculant les coefficients de variation (CV, %) pour les différentes concentrations. Elle a été évaluée sur trois concentrations (basse : 1,5 ng/g ; moyenne : 50 ng/g et élevée : 500 ng/g) en effectuant 3 essais pour chaque concentration.

#### **IV.1.5.2. Reproductibilité**

C'est la mesure de la fidélité lorsqu'une ou plusieurs conditions opératoires changent à savoir des opérateurs différents et/ou des instruments différents et/ou des méthodes d'analyses différentes, et/ou des délais variables. L'objectif est d'obtenir des mesures reproductibles, dans des conditions à une ou plusieurs sources de variabilité sont venues interférer. La reproductibilité a été évaluée trois fois, par deux opérateurs sur une concentration égale à 50 ng/g.

#### **IV.1.6. Rendement d'extraction**

Les rendements d'extraction sont déterminés en comparant les résultats obtenus par l'analyse d'échantillons de sols dopés à différentes concentrations avec ceux obtenus en analysant des extraits de sol dopés après l'extraction aux mêmes concentrations :

$$\text{Rendement d'extraction R (\%)} = (S_{\text{dopé}}/S_{\text{réf}}) * 100$$

Avec :

$S_{\text{dopé}}$  = signal correspondant à l'échantillon de sol dopé avant l'extraction.

$S_{\text{réf}}$  = signal correspondant à l'extrait de sol dopé après l'extraction.

## Références bibliographiques

Blackwell, P. A., Lützhof, H. C. H., Ma, H. P., Halling-Sorensen, B., Boxall, A. B. A., Ka, P., 2004. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC–UV and fluorescence detection. *Talanta* 64, 1058.

Commission of the European Communities, Commission decision of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002/657/EC, Official Journal of the European Communities

Feinberg, M.; la validation des méthodes d'analyses une approche chimométrique de l'assurance qualité du labo, Paris 1986.

Filali-Meknassi, Y., Auriol, M., Adams, C. D., Surampalli, R. Y., 2007. Quantification of Steroids Sex Hormones Using Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Wat Env Res* 79, 687.

Gros, M., Petrovic, M., Barcelo, D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70, 678.

Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2013. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1292, 173-188

Hernández, F., Sancho, J.V., Ibáñez, M., Guerrero, C., 2007. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *Trends Anal Chem* 26, 466-485.

Jelic, A., Gros, M., Ginebreda, A., Cespedes-Sanchez, R., Ventura, F., Petrovic, M., Barcelo, D., 2011. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Wat res* 45, 1165-1176.

Kim, S. C., Carlson, K., 2005. LC–MS2 for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices. *Trends in Anal Chem* 24, 635.

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Env Sci Tech* 36, 1202-1211.

Labadie, P., Budzinski, H., 2005. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Anal and Bioanal Chem* 381, 1199.

Lillenberg, M., Yurchenko, S., Kipper, K., Herodes, K., Pihl, V., Sepp, K., Löhmus, R., Nei, L., 2009. Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216, 5949.

Liu, R., Zhou, J. L., Wilding, A., 2004. Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. *J Chromatogr A* 1038, 19.

Managaki, S., Murate, A., Takada, H., Tuyen, B.X., Chiem, N.H., 2007. Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta. *Env Sci Technol* 41, 8004-8010.

- Msagati, T. A. M., Nindi, M. M., 2004. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. *Talanta* 64, 87.
- Net, S., Rabodonirina, S., Ben Sghaier, R., Dumoulin, D., Chbib, C., Tlili, I., Ouddane B., 2015. Distribution of phthalates, pesticides and drug residues in dissolved, particulate and sedimentary phases in freshwater system. *Sci Tot Env* 521-522, 152-159.
- Runnqvist, H., Bak, S. A., Hansen, M., Styrislave, B., Halling-Sorensen, B., Björklund, E., 2010. Determination of pharmaceuticals in environmental and biological matrices using pressurised liquid extraction—Are we developing sound extraction methods. *J Chromatogr A* 1217, 2447.
- Schlussener, M. P., Spiteller, M., Bester, K., 2003. Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1003, 21.
- Seifrtová, M., Nováková, L., Lino, C., Pena, A., Solich, P., 2009. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Anal Chem Act* 649, 158-179.
- Shen, Q. H., Ji, X. L., Fu, S. J., Liu, Y. Y., Li, L., 2012. Preliminary studies on the pollution levels of antibiotic and antibiotic resistance. *Ecol envir Sci* 21, 1717-1723.
- Suna, L., Yong, W., Chu, X., Lina, J. M., 2009. Simultaneous determination of 15 steroidal oral contraceptives in water using solid-phase disk extraction followed by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216, 541.
- Togola, A., Budzinski, H., 2008. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *J chromatogr A* 1170, 150-158.
- Viens, G., Levesque, K., Chahwakilian, P., El Hasnaoui, A., Gaudillat, A., Nicol, G., Crouzier, C., 2007. Evolution comparée de la consommation de médicaments dans 5 pays européen entre 2000 et 2004 : analyse 7 classes pharmaco-thérapeutiques. *ESSEC*, 21p.
- Zuloaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., I. parraguirre, A., Vallejo, A., Olivares, M., Prieto, A., 2012. Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Anal Chim Acta* 736, 7-16.

**Chapitre III**

**Développement de la  
méthodologie pour l'analyse  
des composés en phase  
liquide**

Dans ce chapitre, nous décrivons l'optimisation d'une méthode d'analyse des résidus pharmaceutiques à usages humain et vétérinaire contenus dans les matrices aqueuses : eaux de surface, eaux souterraines, eaux potables, eaux des rivières...

Dans une première étape, nous avons mis au point une méthode instrumentale d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Les différents paramètres de la séparation (choix de la segmentation, le gradient d'élution et le débit de l'élution) ont été optimisés. La méthode a été optimisée pour 25 substances à savoir, 5 tétracyclines, 6 sulfonamides, 7 fluoroquinolones et 7 autres médicaments. Ces substances présentent des propriétés physico-chimiques différentes ce qui a pour conséquence la difficulté de la séparation.

Nous poursuivons l'étude par la détermination des limites de détection et de quantification de la méthode optimisée. Une méthode d'extraction par SPE a été mise au point. Cette procédure permet à la fois d'extraire et de concentrer des échantillons d'eaux environnementales. Elle a été optimisée pour les composés en évaluant dans chaque fois les rendements d'extraction et les limites de détection et de quantification. La linéarité a également été évaluée.

## **I. Optimisation méthodologique**

### **I.1. Séparation par chromatographie liquide : choix de la segmentation, du gradient et du débit d'élution**

Afin de séparer les substances étudiées, une colonne analytique C18 à phase inverse Hypersil GOLD (2,1 mm de diamètre, 50 mm de longueur et 1,9  $\mu\text{m}$  de taille des particules) a été utilisée (Lacey et al., 2008 ; Liu et al., 2011 ; Choi et al., 2007; Liu et al., 2009; Wei et al., 2011 ; Dinh et al., 2011 ; Abuin et al., 2006 et Ben et al., 2008).

La température de four de la colonne a été fixée à 40°C pour éviter le phénomène de dégradation des composés étudiés. L'acide formique est souvent employé comme additif pour favoriser l'ionisation et augmenter la sensibilité lors de l'analyse d'antibiotiques en mode ESI (Alda et al., 2004 ; Pailler et al., 2009 et Janzen et al., 2008).

Nous avons utilisé comme éluant (A) une solution aqueuse (eau grade, HPLC) d'acide formique 0,1% et d'acétate d'ammonium à 0,2 mol/L. L'acétate d'ammonium a pour rôle de protéger la colonne chromatographique et augmenter sa durée de vie. L'éluant (B), une solution méthanolique d'acide formique à 0,1% permettant une meilleure ionisation de la plupart des composés étudiés.

### I.1.1. Segmentation

La segmentation est l'action de découpage du temps d'analyse en un ou plusieurs segments. Afin d'obtenir une bonne séparation, trois différentes segmentations ont été testées pour les deux modes d'ionisation positive et négative. Les tests sont réalisés en triplicata pour chaque segmentation.

- **Première segmentation** : un seul segment toute la durée de la séparation de 0 à 25 min.

D'après les résultats, les intensités des réponses sont très faibles. La sensibilité de la méthode a diminué d'une façon très remarquable par rapport à la réponse obtenue lors de l'injection séquentielle manuelle et une absence de la répétabilité du temps de rétention pour la plupart des composés a été remarquée.

- **Deuxième segmentation** testée pour les deux modes, se divise en cinq segments :

Segment 1 : 0 - 5 minutes.

Segment 2 : 5,01 – 10 minutes.

Segment 3 : 10,01- 15 minutes.

Segment 4 : 15,01- 20 minutes.

Segment 5 : 20,01 – 25 minutes.

Une légère amélioration pour la plupart des produits a été détectée sauf pour la sulfanilamide et la sulfadiméthoxine, mais il n'y a toujours pas de répétabilité niveau du temps de rétention et des intensités des pics chromatographiques.

- **Troisième segmentation**, se divise en trois segments :

Segment 1 : 0 – 6 minutes.

Segment 2 : 6,01 – 9 minutes.

Segment 3 : 9,01 – 25 minutes.

Les intensités des pics sont nettement améliorées pour tous les composés appartenant aux différentes familles d'antibiotiques par rapport aux autres segmentations.

L'effet de la segmentation a été étudié en expérimentant trois différents modes de segmentations (Figures III.1-III.4).

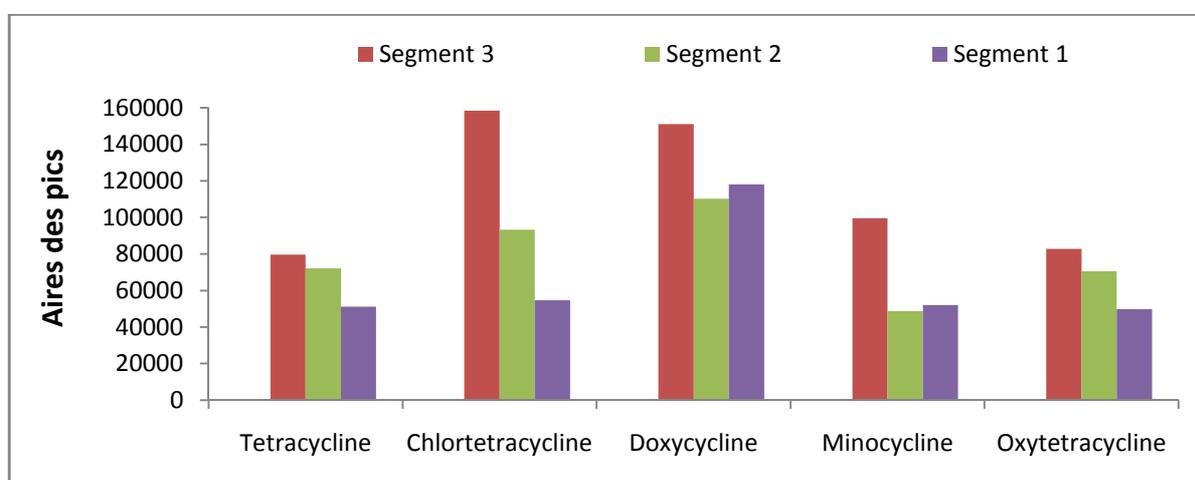
Pour les tétracyclines, la troisième segmentation permet une meilleure séparation. La chlorotétracycline présente des aires de 1,5 à 3 fois plus intenses avec la deuxième et la troisième segmentation. La tétracycline et l'oxytétracycline montrent une légère amélioration entre la deuxième et la troisième segmentation, tandis que pour le doxycycline montre que la

première segmentation une meilleure réponse que la deuxième cependant le troisième reste toujours la meilleure (Figure III.1).

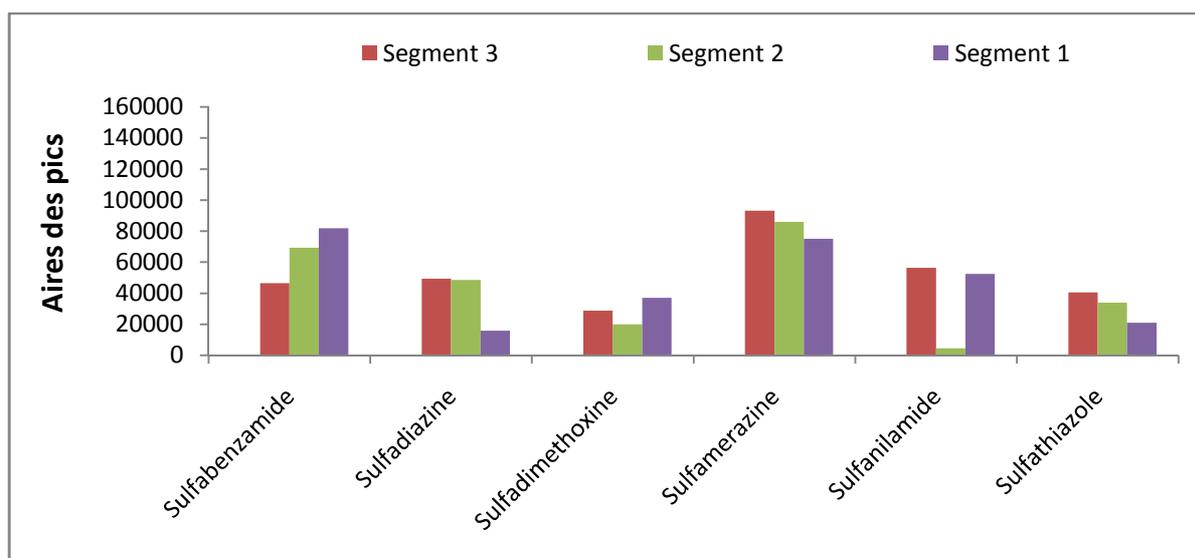
La plupart des sulfanilamides présente une amélioration très remarquable en passant de la segmentation 1 à 3, hormis le sulfabenzamide qui présente une meilleure intensité dans la première segmentation (Figure III.2).

Ainsi que Les 7 fluoroquinolones présentent une meilleure ionisation avec la troisième segmentation (Figure III.3).

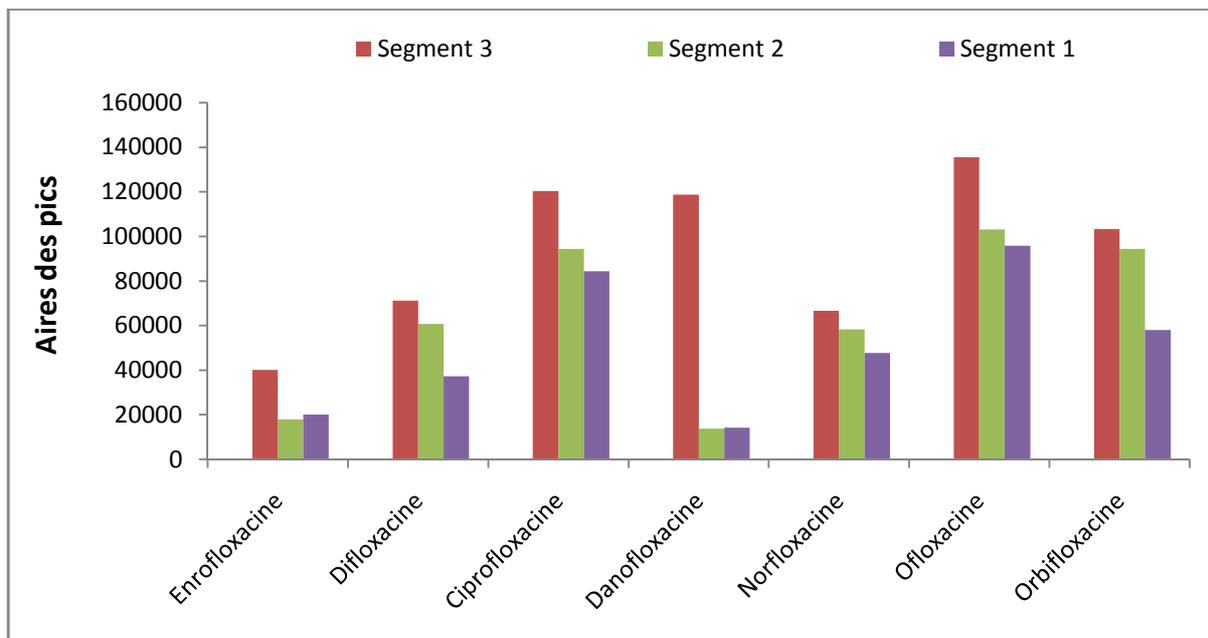
Etant donné que la plupart des composés (14 produits sur 25) présente un temps de rétention compris entre 6 et 9 minutes. Le choix d'un segment de courte durée a bien amélioré la séparation de ces derniers et a favorisé l'ionisation des différents produits cibles.



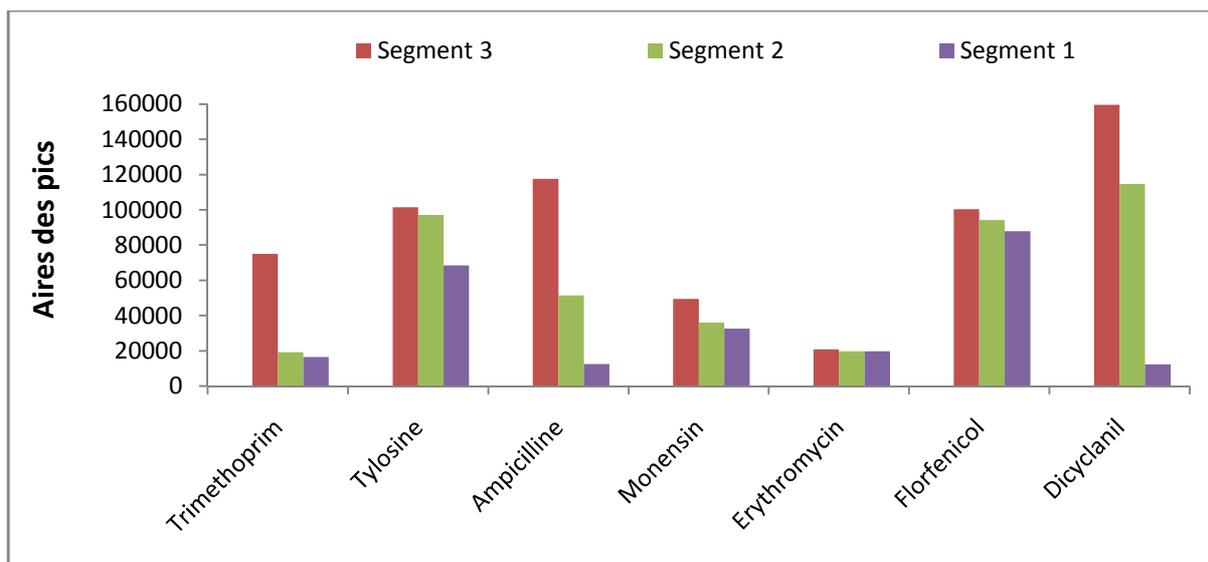
**Figure III. 1. Aires des pics des tétracyclines avec les différentes segmentations**



**Figure III. 2. Aires des pics des sulfonilamides avec les différentes segmentations**



**Figure III. 3. Aires des pics des fluoroquinolones avec les différentes segmentations**



**Figure III. 4. Aires des pics des autres médicaments avec les différentes segmentations**

Les intensités des pics sont nettement améliorées en utilisant la segmentation 3 (Figures III.1-III.4). Le meilleur compromis pour l'ensemble des substances étudié est l'utilisation de la troisième segmentation qui permet d'avoir une meilleure séparation.

### I.1.2. Gradient d'élution

Trois différents gradients d'élution ont été testés dans le but d'avoir la meilleure séparation. Deux éluants ont été utilisés (Tableau III.1).

**Tableau III. 1. Différents gradients d'élution testés**

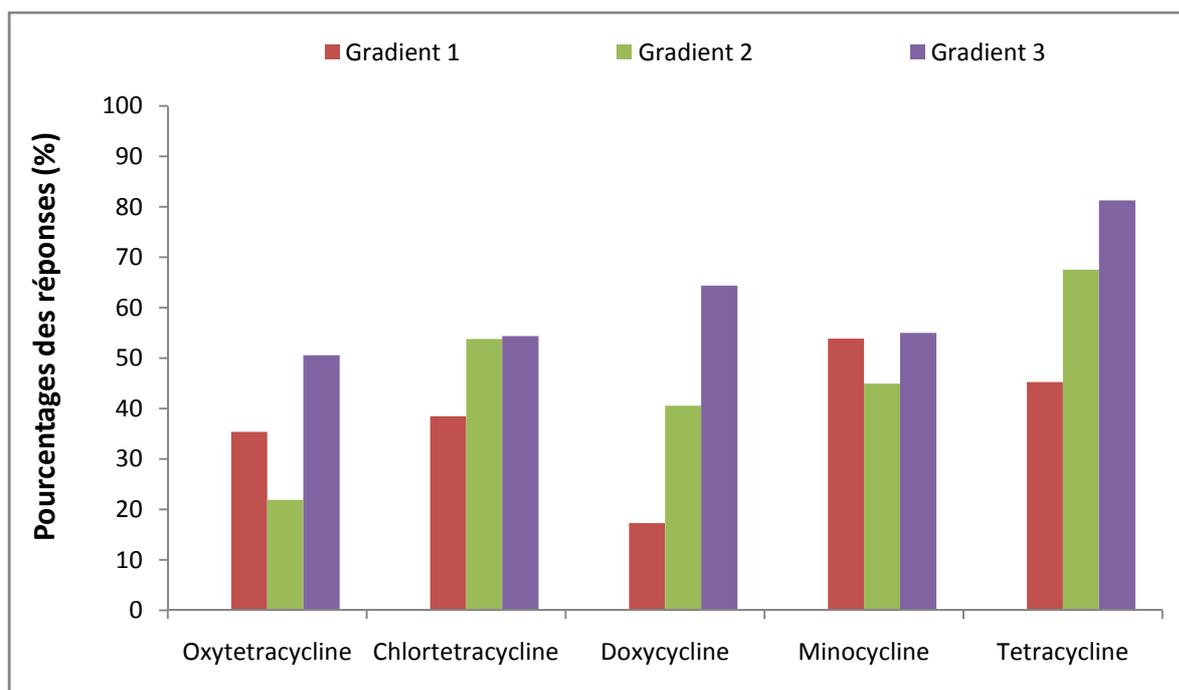
Temps (minutes)	Eluant A*	Eluant B*
Gradient d'élution 1		
0	50	50
20	0	100
23	0	100
23,1	50	50
25	50	50
Gradient d'élution 2		
0	50	50
20	0	100
23	0	100
23,1	50	50
25	50	50
Gradient d'élution 3		
0	95	5
5	50	50
20	50	50
20,1	95	5
25	95	5

Eluant A: une solution aqueuse d'acide formique à 0,1% et d'acétate d'ammonium à 0,2 mol/L.

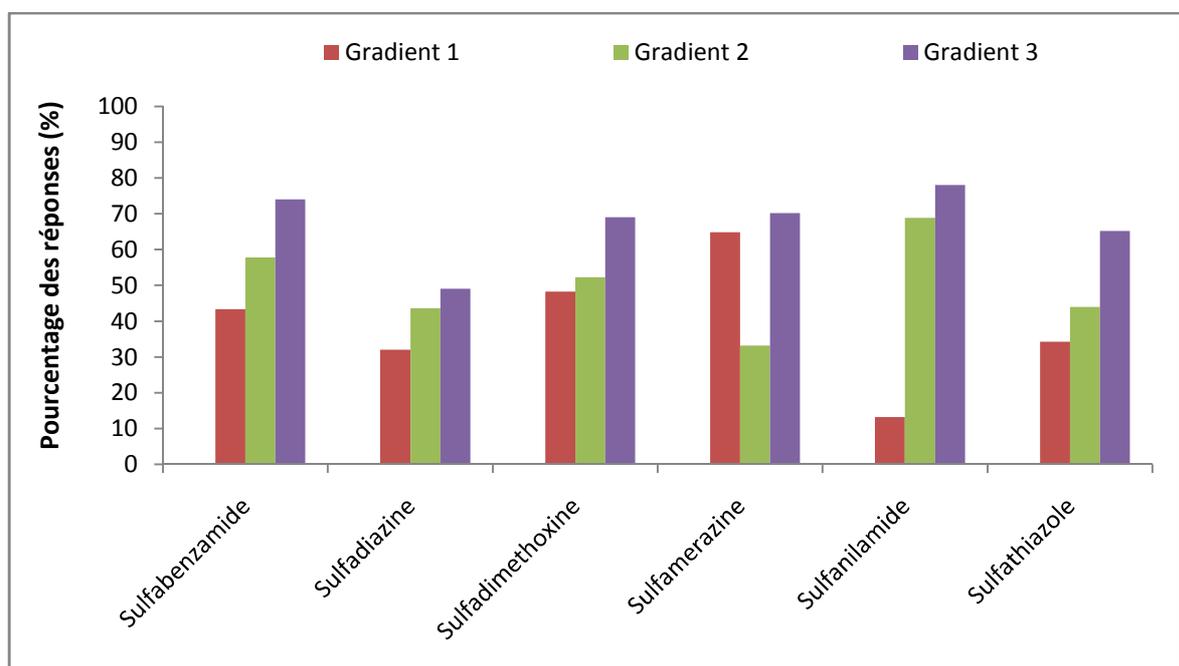
Eluant B : une solution méthanolique d'acide formique à 0,1%.

Le premier gradient d'élution donne des intensités des pics faibles compris entre 20 à 30% pour la majorité des tétracyclines et fluoroquinolones.

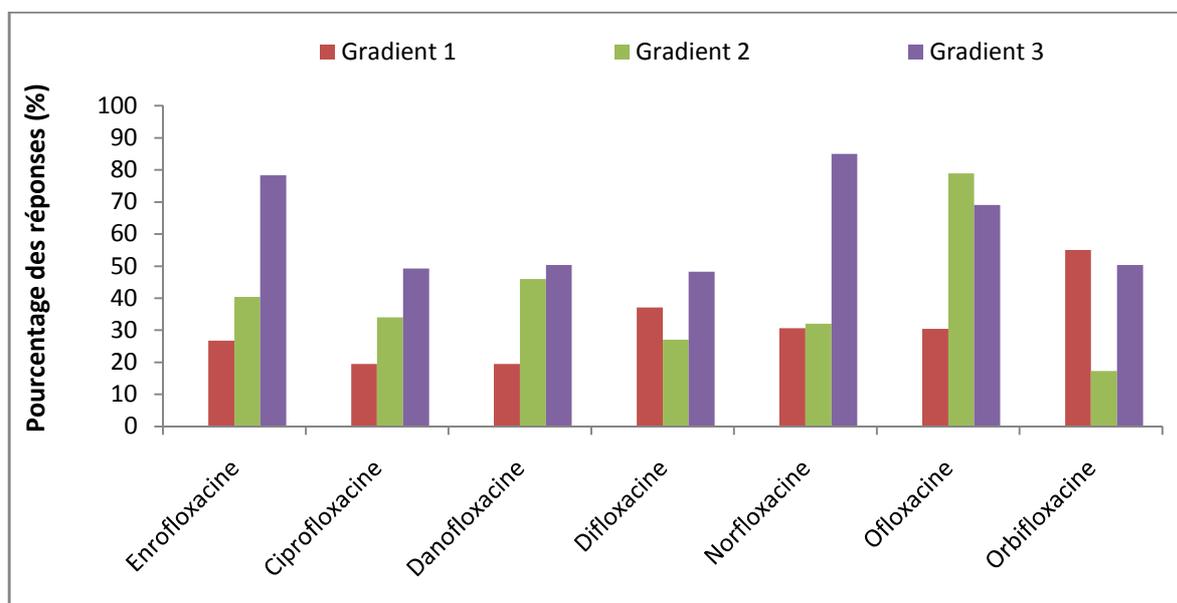
Le passage de l'éluant A à l'éluant B, entre 5 et 20 minutes a amélioré de façon très remarquable le pourcentage des réponses des substances appartenant aux différentes familles (de 40 à 70 %) (Figures III.5-III8).



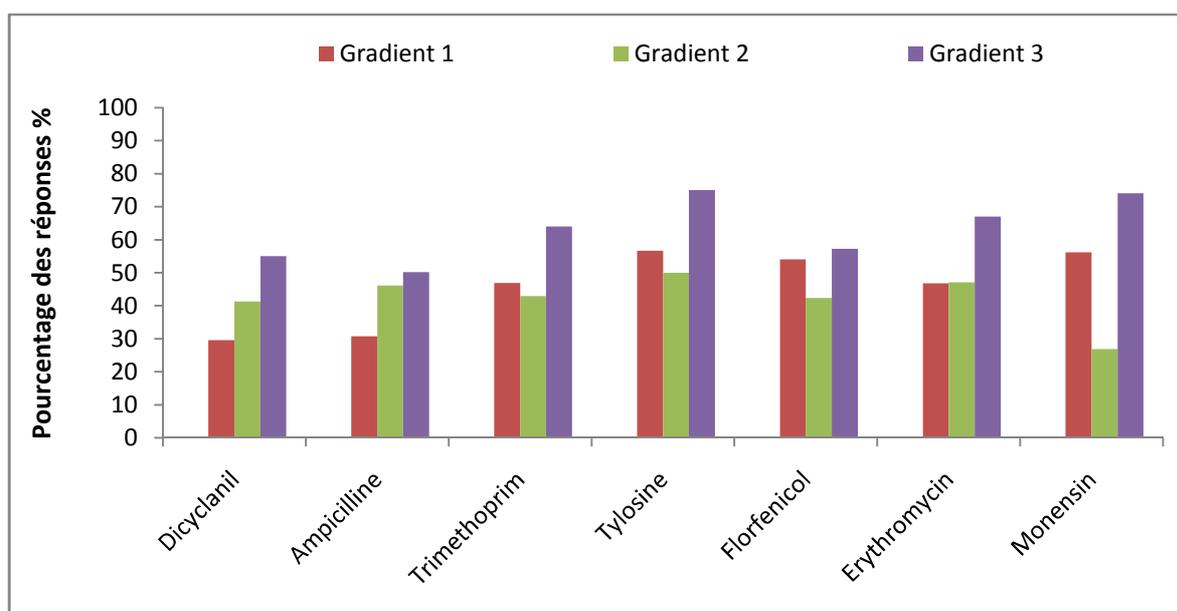
**Figure III. 5. Pourcentages des réponses des tétracyclines avec les différents gradients d'éluion**



**Figure III. 6. Pourcentages des réponses des sulfonilamides avec les différents gradients d'éluion**



**Figure III. 7. Pourcentages des réponses des fluoroquinolones avec les différents gradients d'élution**



**Figure III. 8. Pourcentages des réponses des autres médicaments avec les différents gradients d'élution**

La présence du méthanol étant indispensable pour une meilleure ionisation et une augmentation de la sensibilité, le troisième gradient d'élution est le meilleur compromis pour la détection des produits pharmaceutiques étudiés. Les pourcentages des réponses atteignent 81% pour la tétracycline, 85% pour le norfloxacin, 78% pour la sulfanilamide et 75% pour le tylosine.

### I.1.3. Débit d'élution

Trois valeurs ont été testées pour avoir le débit d'élution optimal (Figures III.9-III.12).

$D_1 = 150 \mu\text{L}/\text{min}$

$D_2 = 250 \mu\text{L}/\text{min}$

$D_3 = 350 \mu\text{L}/\text{min}$

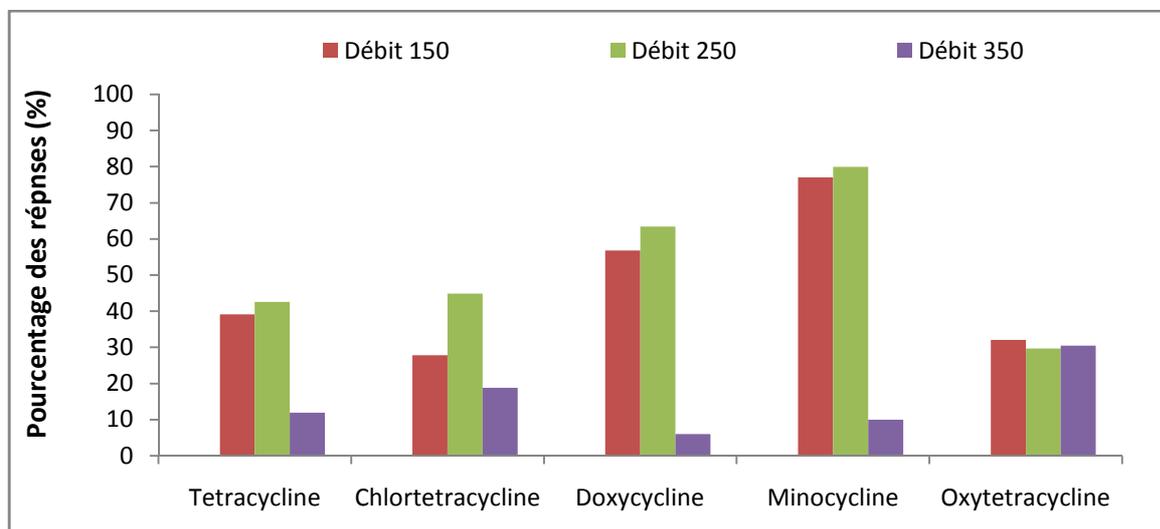


Figure III. 9. Pourcentages des réponses, des tétracyclines avec trois différents débits d'élution en ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )

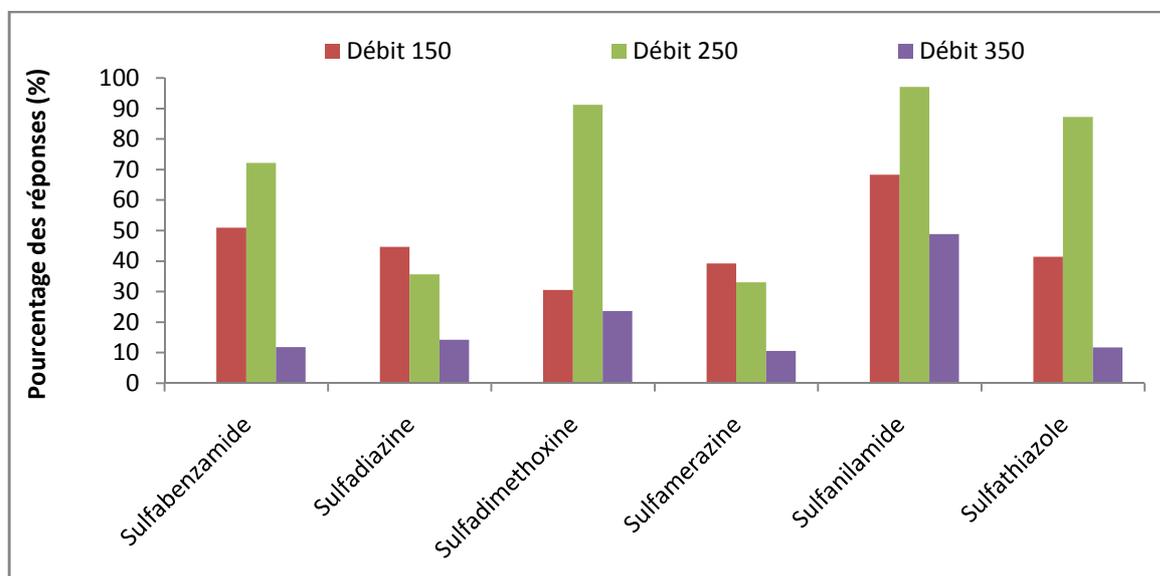
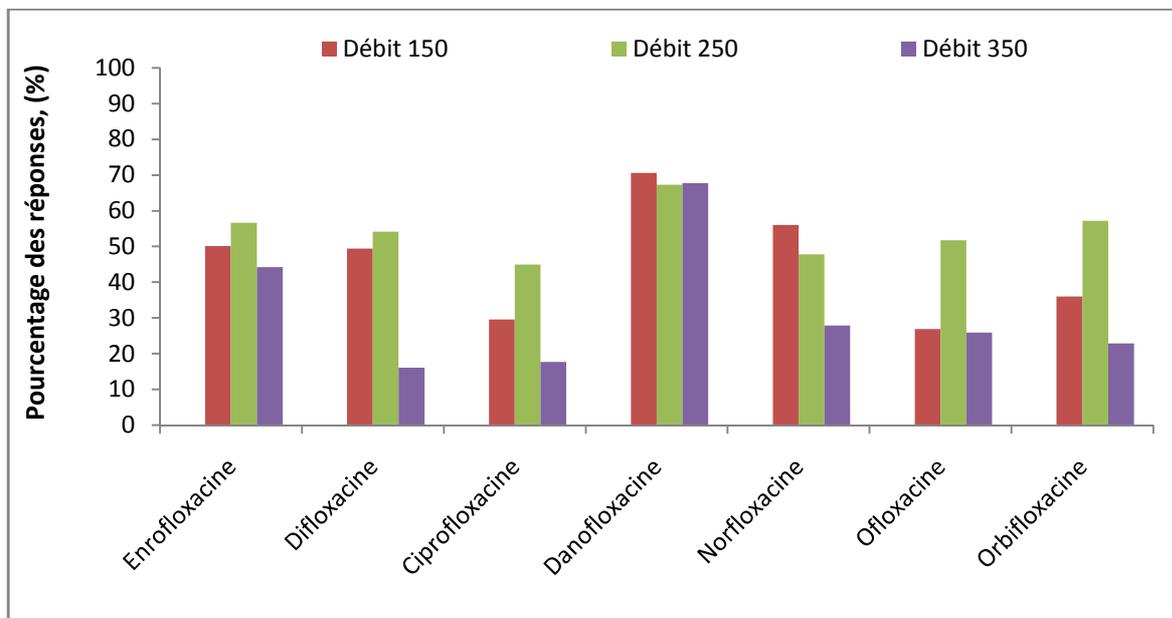
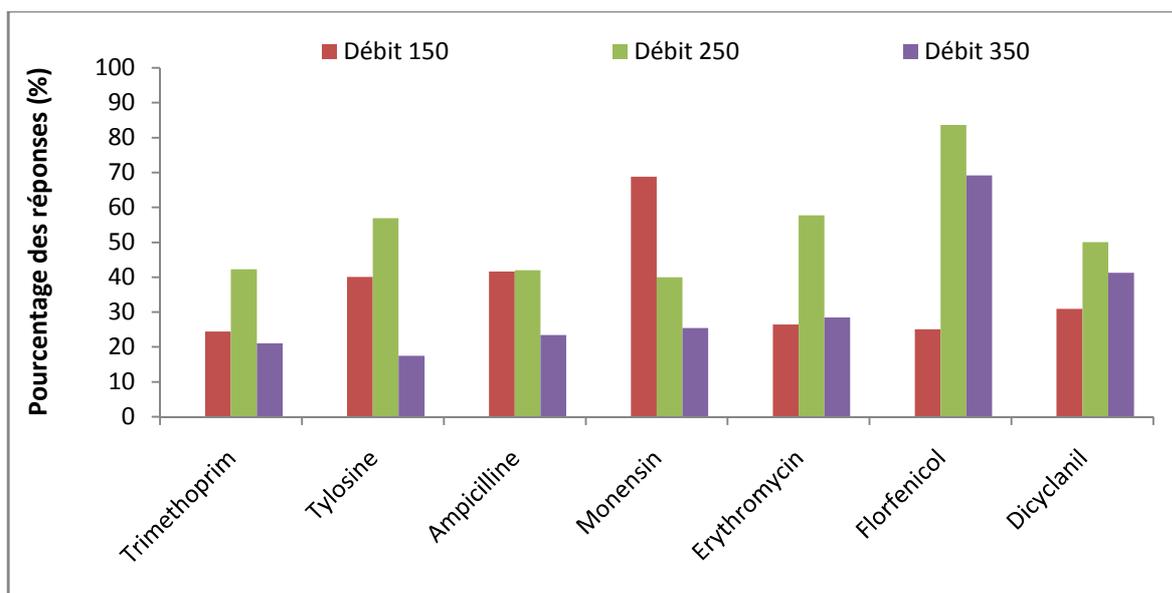


Figure III. 10. Pourcentages des réponses, des sulfonilamides avec trois différents débits d'élution en ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )



**Figure III. 11. Pourcentages des réponses, des fluoroquinolones avec trois différents débits d'élution en ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )**



**Figure III. 12. Pourcentages des réponses, des autres médicaments avec trois différents débits d'élution en ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )**

Un débit de 350  $\mu\text{L}/\text{min}$  entraîne une perte des composés dans l'appareil (visible à l'œil, des gouttelettes de liquide aux jointures des liaisons). Pour le débit le plus faible, les intensités des pics sont acceptables de 30 à 70 %. Le meilleur compromis est l'utilisation du débit intermédiaire de 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  (pourcentage des réponses entre 45 et 85%).

### I.1.4. Détection

Les résidus pharmaceutiques ont été identifiés et quantifiés par SPE-LC-MS/MS en ligne. Les analytes sont toujours identifiés par leurs caractéristiques chromatographiques et aussi par leurs transitions MRM (fragmentation spécifique). Les conditions opératoires MS/MS (Tableau III.2) et les paramètres qui concernent la caractérisation de la Tétracycline (Figure III.13), qui s'ionise en mode electrospray positif ESI+.

**Tableau III. 2. Paramètres analytiques des antibiotiques étudiés**

Composés	Mode d'ionisation	Ion Parent m/z	Ions fils m/z		Energie Collision (eV)		Tension Tube lentille (V)	Tension pulvérisation (V)	Température Vaporisation (°C)	Température Capillaire (°C)
Ampicilline	+	350,0	105,9	113,9	24	30	108,0	3000	394,9	202,9
Carbamazepine	+	236,9	193,8	191,8	19	25	107,6	3000	325,7	186,0
Chlortétracycline	+	479,1	462,0	443,8	21	16	95,0	3000	403,7	200,8
Ciprofloxacin	+	332,0	313,9	230,8	36	19	79,1	3000	399,1	227,8
Danofloxacin	+	358,0	339,7	313,9	23	17	84,0	3000	313,1	240,4
Dicyclanil	+	190,9	149,9	162,8	18	16	72,5	3000	198,8	242,1
Difloxacin	+	400,0	381,9	355,9	21	19	98,0	3500	394,9	205,2
Doxycycline	+	445,0	427,9	153,8	18	29	94,3	3000	279,3	233,3
Enrofloxacin	+	360,0	342,0	315,9	20	18	110,3	3500	400,6	199,5
Florfenicol	-	355,9	335,9	185,0	10	20	-113,8	4000	366,3	199,8
Gemfibrozil	-	294,1	121,1	120,0	19	47	-102,4	4000	364,9	198,5
Monensin	+	693,3	675,3	461,1	35	52	135,6	3000	366,2	274,7
Norfloxacin	+	320,0	301,9	275,9	20	16	86,0	4000	357,2	232,7
Ofloxacin	+	362,0	317,9	260,8	17	26	94,0	3500	366,6	266,0
Orbifloxacin	+	396,0	351,9	294,9	24	17	143,1	3500	404,9	210,0
Oxytétracycline	+	461,1	425,9	443,1	19	12	87,0	3000	252,5	265,8
Sulfabenzamide	+	276,9	155,8	108,0	13	22	71,0	3500	231,9	225,1
Sulfadiazine	+	250,9	155,8	108,0	15	22	90,6	5000	197,7	202,2
Sulfaméthoxazole	+	264,9	155,9	171,8	15	16	85,0	5000	352,6	229,7
Sulfadiméthoxazole	+	310,9	155,9	108,0	21	27	87,6	3500	395,5	228,3
Sulfamerazine	+	264,9	155,9	171,8	15	16	85,0	5000	352,6	229,7
Sulfaméthazine	+	253,9	155,7	92,0	16	26	85,0	5000	350,6	228,4
Sulfanilamide	+	172,9	155,8	108,0	7	15	67,3	3000	235,0	248,4
Sulfathiazole	+	255,9	155,9	108,0	14	24	116,0	4500	400,5	232,4
Tétracycline	+	445,1	409,9	427,0	18	12	72,0	4500	232,4	272,0
Triméthoprim	+	291,0	229,9	260,9	23	24	121,1	5000	352,1	329,7
Tylosine	+	916,6	173,7	772,3	35	26	149,0	4500	403,9	202,8

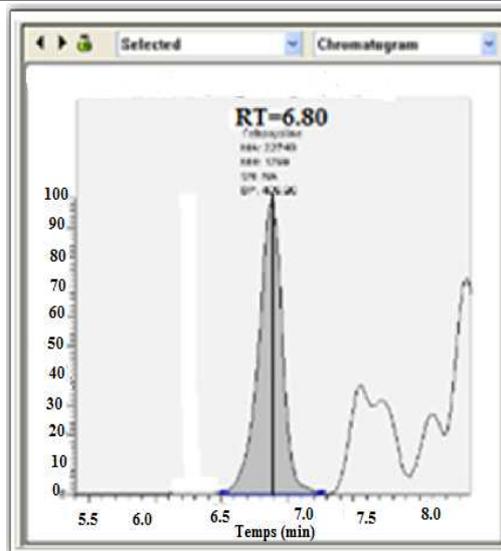
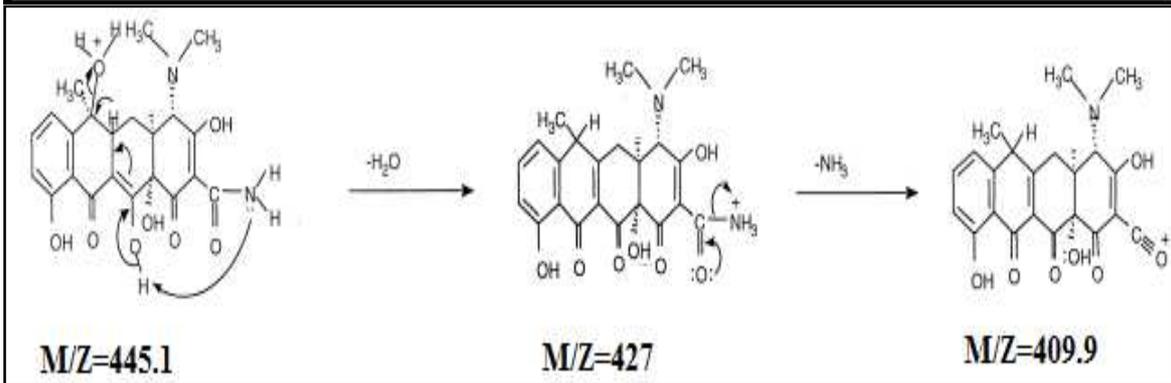
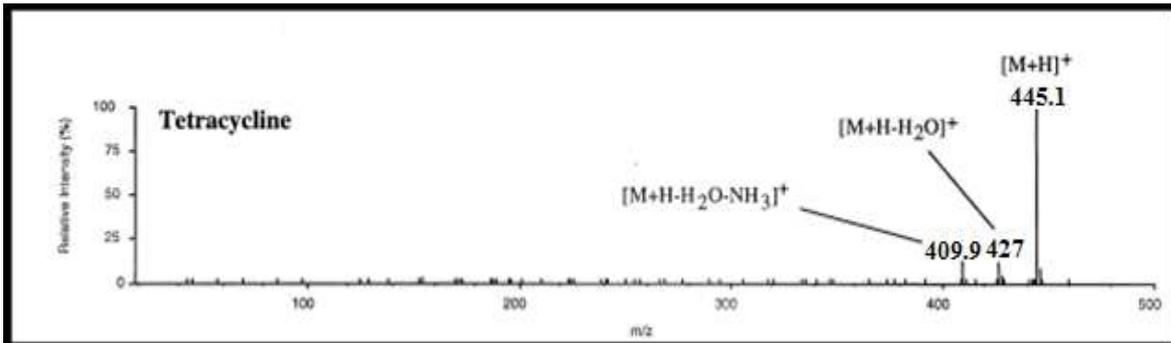
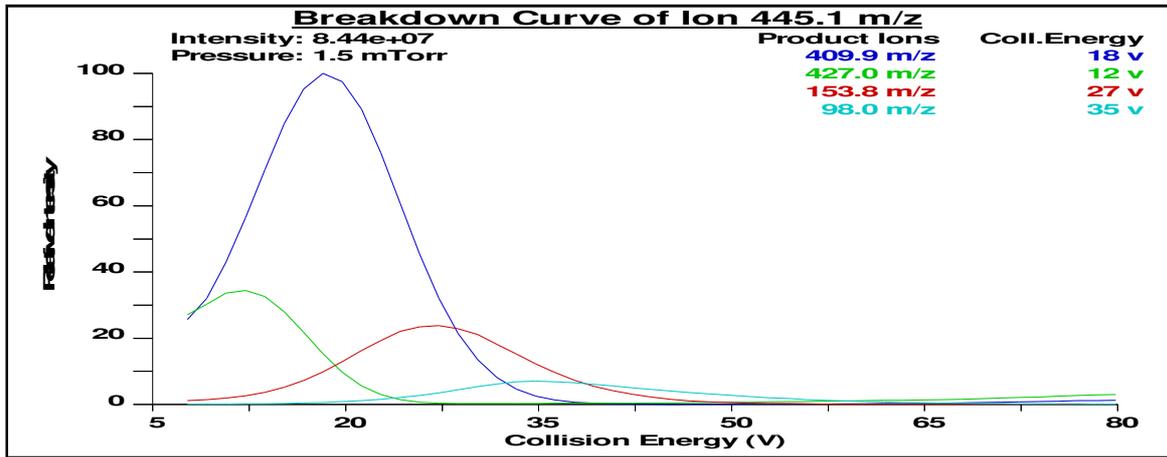


Figure III. 13. Paramètres de la détection de la Tétracycline

Les limites de détection (LOD) et les limites de quantification (LOQ) ont été déterminées pour un rapport signal/bruit égal à 3/10 (Tableau III.3).

Pour les tétracyclines, les fluoroquinolones, les sulfonilamides ou les autres médicaments, les résultats sont de même grandeur et voire meilleurs que ceux mentionnés dans la littérature.

En effet, des travaux antérieurs présentent des LOD entre 5 et 20 ng/L et des LOQ varient entre 7 et 40 ng/L pour l'analyse des différents antibiotiques à usage vétérinaire (Bialk-Bielinska et al., 2009 et Vasquez-Roig et al., 2010).

Il convient de noter que la majorité des valeurs sont habituellement obtenues lors d'analyse d'un nombre limité de famille de composés. Dans notre cas, en réalisant des compromis, une étude multi-familles a été réalisée ce qui est plus difficile.

**Tableau III. 3. Valeurs optimales de la détection**

Groupe thérapeutique	Composé	Temps de rétention (min)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
<b>Tétracyclines</b>	Chlortétracycline	8,72	0,06	0,2
	Tétracycline	6,08	0,06	0,2
	Doxycycline	9,86	0,06	0,2
	Minocycline	4,86	0,06	0,2
	Oxytétracycline	6,82	0,15	0,5
<b>Fluoroquinolones</b>	Difloxacin	7,10	0,06	0,2
	Enrofloxacin	6,73	0,06	0,2
	Norfloxacin	6,43	0,15	0,5
	Ofloxacin	6,19	0,15	0,5
	Orbifloxacin	6,91	0,15	0,5
	Ciprofloxacin	6,47	0,06	0,2
	Danofloxacin	6,65	0,06	0,2
<b>Sulfonilamides</b>	Sulfabenzamide	8,20	0,06	0,2
	Sulfadiazine	4,81	0,9	3
	Sulfadiméthoxine	8,76	0,06	0,2
	Sulfamérazine	5,66	0,06	0,2
	Sulfanilamide	2,78	0,06	0,2
	Sulfathiazole	5,28	0,06	0,2
<b>Autres médicaments</b>	Triméthoprim	5,77	0,06	0,2
	Florfenicol	6,96	0,36	1,2
	Monensin	19,33	0,15	0,5
	Tylosine	12,18	0,06	0,2
	Erythromycin	20,75	0,06	0,2
	Dicyclanil	4,36	0,15	0,5
	Ampicilline	11,37	0,15	0,5

La répétabilité des temps de rétention, en utilisant les conditions optimales de détection des substances étudiées, exprimée par le coefficient de variation est détaillé dans le

tableau III.4. Les valeurs de coefficient de variation (CV, %) varie entre 0,47% pour l'ampicilline et 6,37% pour l'orbifloxacine. Ces valeurs sont inférieurs à 10% donc la méthode optimisée est répétable.

**Tableau III.4. Répétabilité des temps de rétention des médicaments étudiés**

Composés	Temps de rétention (min)				
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moy	CV%
<b>Ampicilline</b>	11,24	11,29	11,37	11,3	<b>0,47</b>
<b>Chlortétracycline</b>	8,66	8,52	8,72	8,63	0,97
<b>Ciprofloxacine</b>	6,3	6,41	6,47	6,39	1,10
<b>Danofloxacine</b>	6,7	6,4	6,65	6,58	1,99
<b>Dicyclanil</b>	4,17	4,39	4,36	4,30	2,26
<b>Difloxacine</b>	7,2	6,99	7,1	7,09	1,20
<b>Doxycycline</b>	9,77	9,89	9,86	9,84	0,51
<b>Enrofloxacine</b>	6,54	6,66	6,73	6,64	1,18
<b>Florfenicol</b>	6,87	7	6,96	6,94	0,78
<b>Monensin</b>	19,25	19,32	19,33	19,3	0,18
<b>Norfloxacine</b>	6,64	6,39	6,43	6,48	1,69
<b>Ofloxacine</b>	6,01	6,32	6,19	6,17	2,05
<b>Orbifloxacine</b>	6,77	7,8	6,91	7,16	<b>6,37</b>
<b>Oxytétracycline</b>	6,99	6,68	6,82	6,83	1,85
<b>Sulfabenzamide</b>	8,39	8,22	8,2	8,27	1,030
<b>Sulfadiazine</b>	4,72	4,83	4,81	4,78	0,99
<b>Sulfadiméthoxine</b>	8,55	8,63	8,76	8,64	1,00
<b>Sulfamérazine</b>	5,95	5,71	5,66	5,77	2,19
<b>Sulfaméthazine</b>	7,77	7,14	7,03	7,31	4,45
<b>Sulfanilamide</b>	3,01	2,88	2,78	2,89	3,25
<b>Sulfathiazole</b>	4,9	4,95	5,08	4,97	1,52
<b>Tétracycline</b>	5,92	5,88	6,08	5,96	1,44
<b>Triméthoprim</b>	5,47	6,02	5,77	5,75	3,90
<b>Tylosine</b>	12,21	12,61	12,18	12,33	1,58
<b>Erythromycin</b>	15,19	15,38	15,24	15,27	0,52

## II. Préparation des échantillons

### II.1. Détermination des conditions optimales

Une méthode de préparation des échantillons en phase aqueuse, basée sur une extraction en phase solide (SPE) a été développée pour les composés étudiés. La procédure a été initialement développée en utilisant de l'eau grade HPLC dopée avec une solution de dopage contenant tous les composés à une concentration de 1 µg/L. Pour mettre au point cette méthode d'extraction, de concentration et de purification, plusieurs paramètres ont été optimisés :

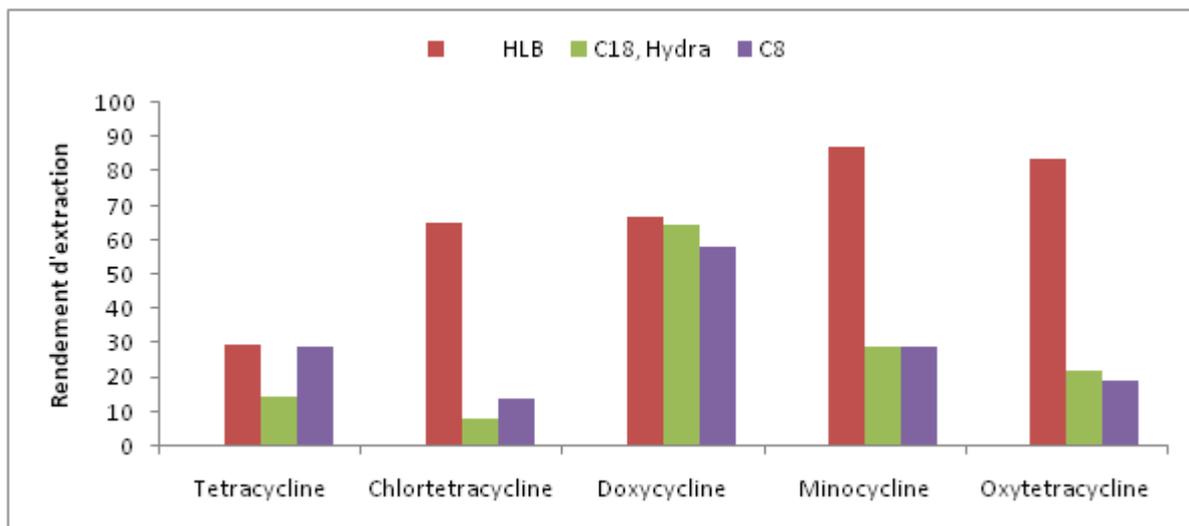
- ✓ Le choix de la cartouche SPE.
- ✓ L'ajustement de pH de l'extrait.
- ✓ Le choix de l'éluant.
- ✓ Le choix du volume de chargement.

### II.1.1. Choix de la cartouche SPE

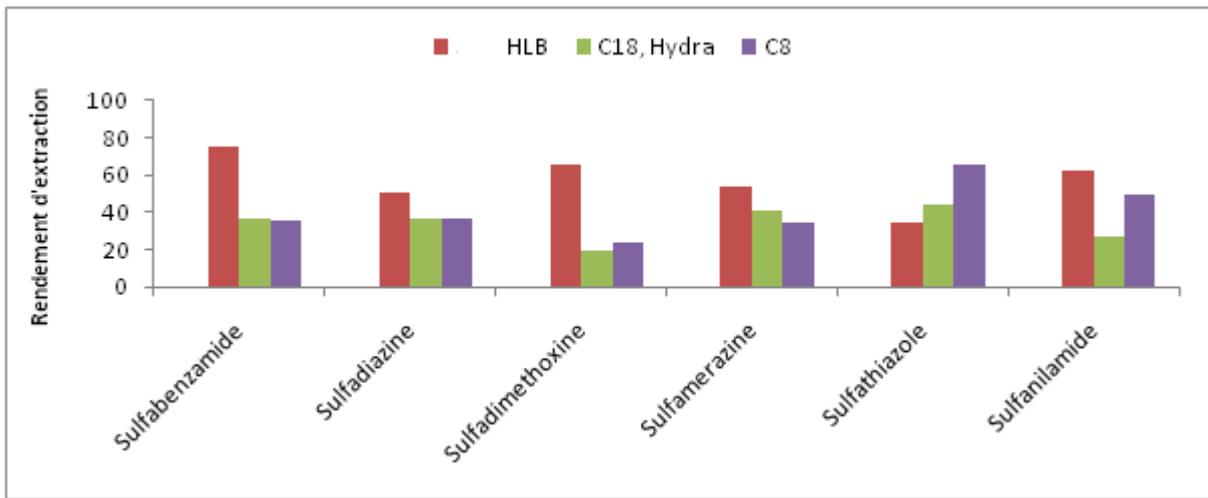
Dans un premier temps, le type de cartouche doit être choisi. Les principales cartouches mentionnées dans la littérature pour analyser les produits pharmaceutiques à usage humain et vétérinaires sont les cartouches polymères OASIS HLB (Pailler et al., 2009 ; Tong et al., 2009 and Sorensen et al., 2005) ou les cartouches C18 Hydra (Alda et al., 2003 ; Pharmaceuticals, 2006 et Gros et al., 2006) ou plus rarement des cartouches C8 (Pharmaceuticals, 2006).

Les cartouches C18, Hydra (300 mg/6 mL), C8 (400 mg/ 6 mL) et HLB OASIS (200 mg/6 mL) sont testées, avec un pH=7, un volume de chargement égal à 500 mL et 6 mL de solvant d'éluion qui est le méthanol.

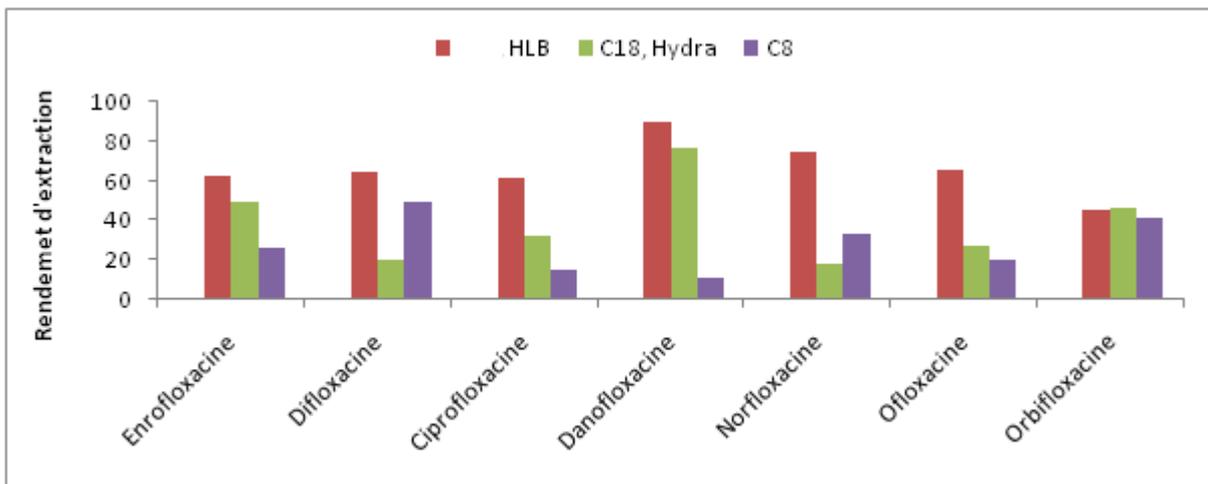
Dans le cadre de cette étude multi-familles portant sur des molécules de propriétés physico-chimiques très variées et après plusieurs essais, le choix s'est orienté vers l'utilisation de cartouches OASIS HLB (200 mg/ 6 mL), puisqu'elles présentent les rendements d'extraction les plus élevés (Figures III.14-III.17).



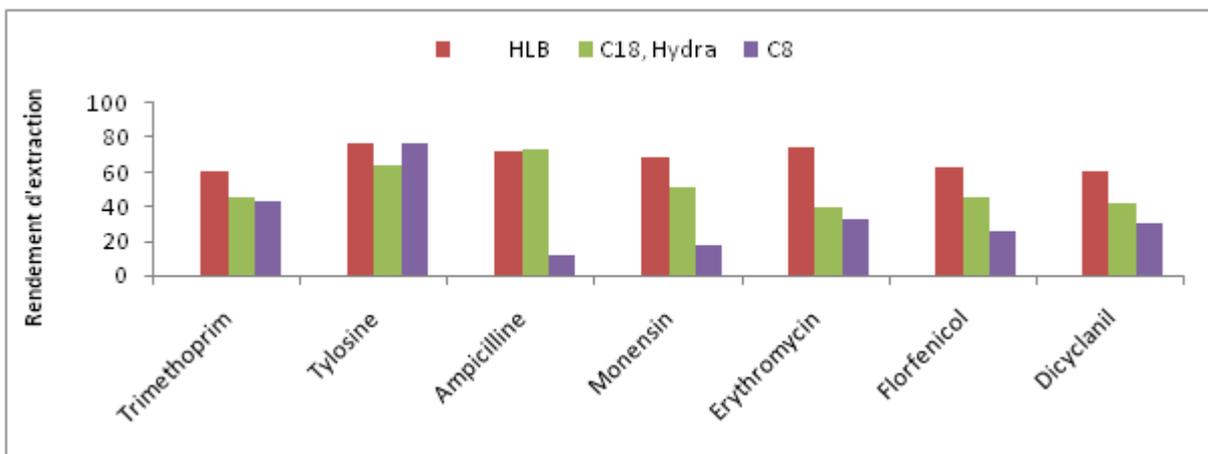
**Figure III. 14. Rendements d'extraction des tétracyclines, obtenus avec les trois cartouches : C8, C18 Hydra et OASIS HLB**



**Figure III. 15. Rendements d'extraction des sulfonilamides, obtenus avec les trois cartouches : C8, C18 Hydra et OASIS HLB**



**Figure III. 16. Rendements d'extraction des fluoroquinolones, obtenus avec les trois cartouches : C8, C18 Hydra et OASIS HLB**



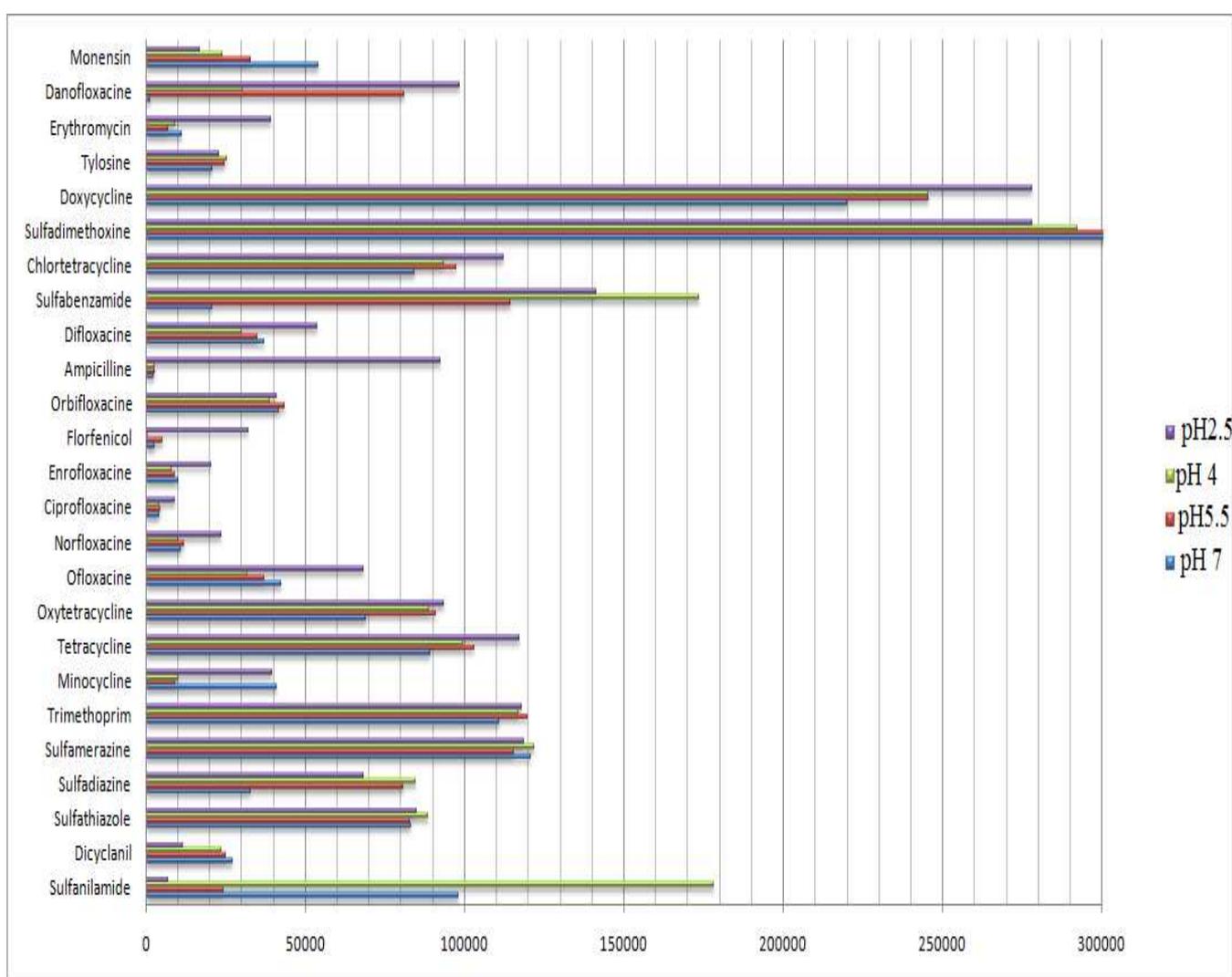
**Figure III. 17. Rendements d'extraction des autres médicaments, obtenus avec les trois cartouches : C8, C18 Hydra et OASIS HLB**

## II.1.2. Ajustement du pH

Dans la littérature, il a été mentionné que le rendement d'extraction des composés étudiés dépend fortement du pH. Une étude de l'effet du pH est primordiale.

Sur des cartouches HLB OASIS (200 mg/ 6 mL), et un volume de chargement égal à 500 mL en utilisant 6 mL de méthanol pour l'élution, le pH de l'échantillon doit être ajusté pour une rétention optimale de l'analyte, c'est-à-dire un pH pour lequel les composés à caractères acide ou basique soient non chargés. La rétention des substances neutres n'est généralement pas affectée par le pH.

Nous avons choisi de réaliser l'étude à différentes valeurs de pH : 2,5 ; 4 ; 5,5 et 7.



**Figure III. 18. Effet du pH de l'échantillon sur la sensibilité de la détection des antibiotiques étudiés.**

La détection de la plupart des composés a été améliorée sauf pour quelques produits tels l'orbifloxacine, minocycline et le triméthoprime pour lesquels la détection ne dépend pas du pH.

En moyenne, l'efficacité des fluoroquinolones passe de 100% pour pH 2,5 à 40% pour pH 7. Parmi les résidus étudiés, seuls le dicyclanil, le minocycline et le monensin ont montré une efficacité optimale à pH 7. Pour les tétracyclines et les fluoroquinolones, des réponses élevées avec une bonne répétabilité des aires des pics ont été obtenus à pH 2,5.

Pour les sulfonilamides, les meilleures réponses ont été obtenues avec une valeur de pH comprise entre 4 et 5,5. Tong et al., 2009 ont montré que les sulfonilamides sont peu extraits à pH=2 alors qu'ils le sont plus à pH supérieur ou égal à 4.

Le meilleur compromis pour l'extraction simultanée des différents produits pharmaceutiques étudiés qui appartiennent à différentes familles, est l'échantillon à pH=2,5.

Ceci est confirmé par Ben et al., (2013) qui ont indiqué qu'il est préférable de se positionner à un pH légèrement supérieur à 2 pour éviter la forme cationique qui aurait tendance à pénétrer à l'intérieur de la cartouche polymère (Barcelo et al., 2005; Togola et al., 2007 ; Batt et al., 2005 et Yang et al., 2005).

Cet ajustement a permis d'obtenir la meilleure détection pour la majorité des composés à l'exception du monensin, tylosine et de dicyclanil. Ce dernier a montré un rendement plus élevé à pH 7. Ce composé à caractère basique ( $pK_a = 4,58$ ) est protoné à pH égal à 2,5 et n'est que peu retenu par la cartouche à ce pH.

En effet, l'influence du pH sur la sensibilité de la détection dépend des propriétés amphotères de chaque composé.

Les fluoroquinolones contiennent de l'acide carboxylique avec un  $pK_a = 5$  et un ou plusieurs groupes fonctionnels d'amine avec  $pK_a = 8-9$ .

Par contre, les sulfonilamides ont des caractéristiques d'alcalin faible ou encore d'acide faible due respectivement à la présence d'un azote et du groupe sulfonamidique N- H (Tong et al., 2009).

Ce choix est cohérent avec la littérature puisque les procédures mettent en œuvre l'extraction des antibiotiques à usage humain et vétérinaire de toutes sortes de matrices aqueuses à un pH 2 -3 (Kasprzyk-Horden et al., 2007 et Miao et al., 2007).

### II.1.3. Choix de l'éluant

Après avoir fixé la valeur du pH de l'échantillon à 2,5, la nature de la cartouche à utiliser OASIS HLB (200 mg/ 6 mL), la composition de la solution d'élution a été optimisée. Plusieurs solutions de compositions variables ont été testées :

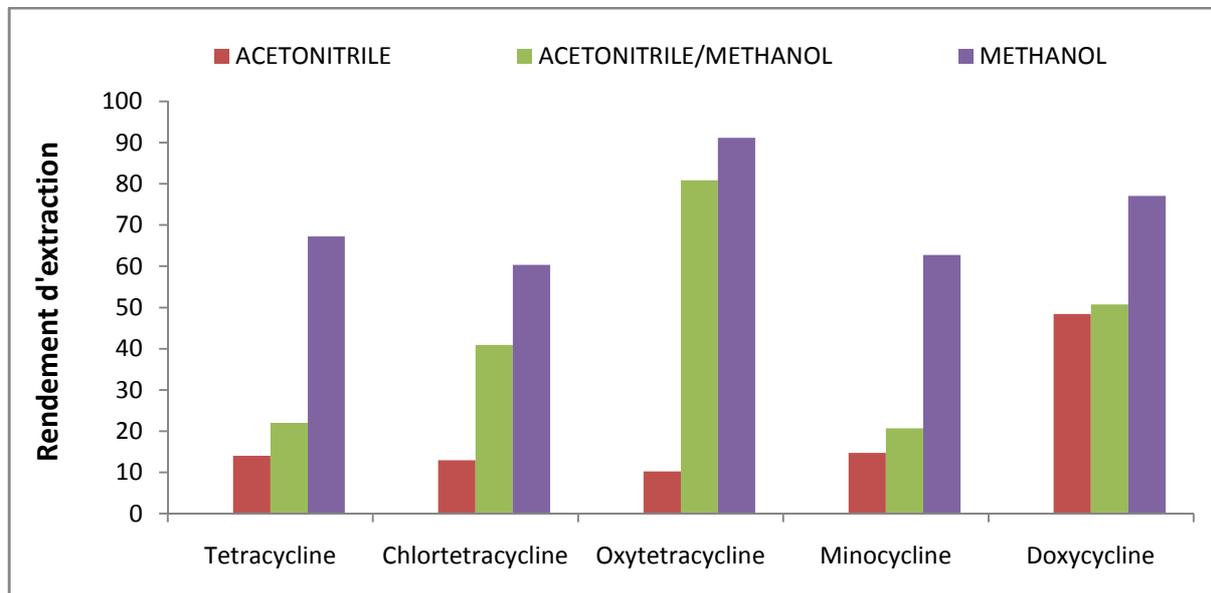
100% acétonitrile                      acétonitrile/méthanol (50/50 %)                      100 % méthanol

Les résultats ont montré que l'élution à l'aide d'une solution d'acétonitrile pure diminue fortement le rendement de l'extraction et affaiblit l'intensité des pics chromatographiques.

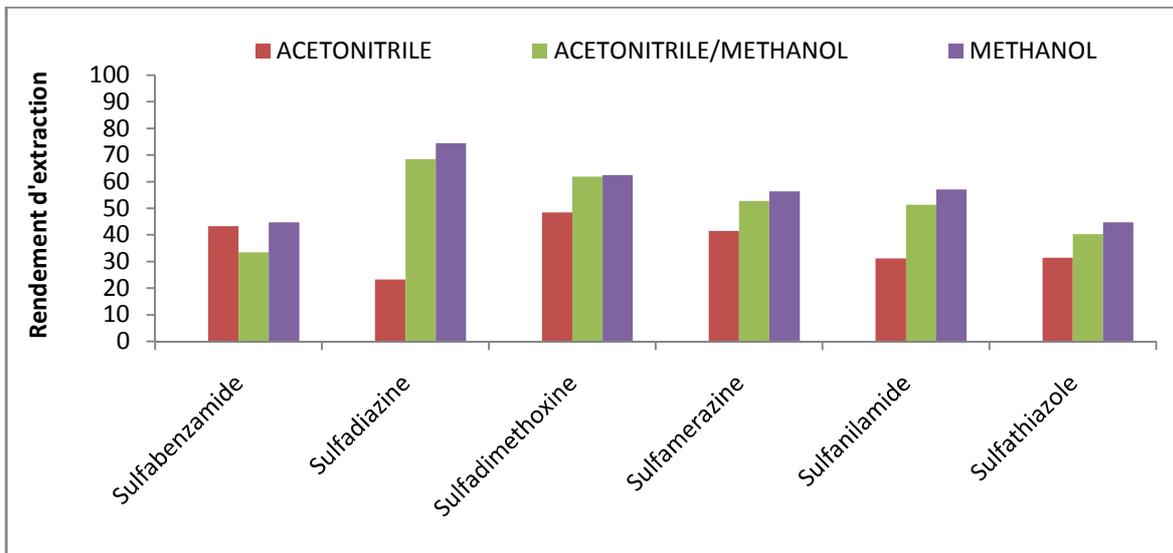
Nous avons remarqué qu'une solution contenant de l'acétonitrile et du méthanol (50/50 %) améliore le rendement qui passe de 15-25% à 35-45%.

Le choix du méthanol pur a permis un rendement de l'extraction qui passe en moyenne de 35-45% à 65-80% pour la plupart des produits étudiés.

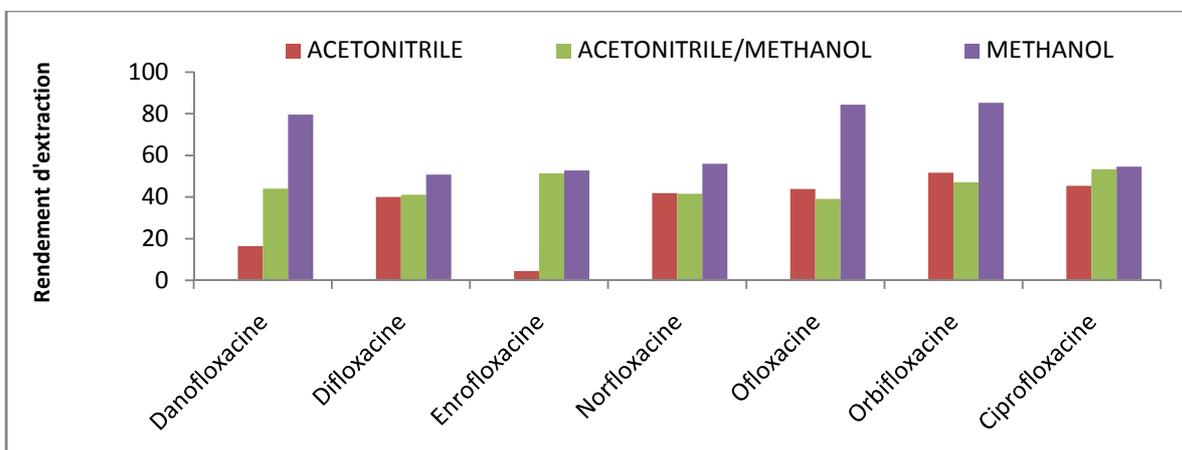
En effet, les résultats (Figures.III.19-III.22) ont montré que l'utilisation de méthanol comme solvant d'élution de la SPE est nécessaire pour permettre une bonne solubilité des composés cibles (Miao et al., 2004 ; Sponberg et al., 2008 ; Vieno et al., 2006 ; Hao et al., 2006 et Karthikeyan et al., 2006).



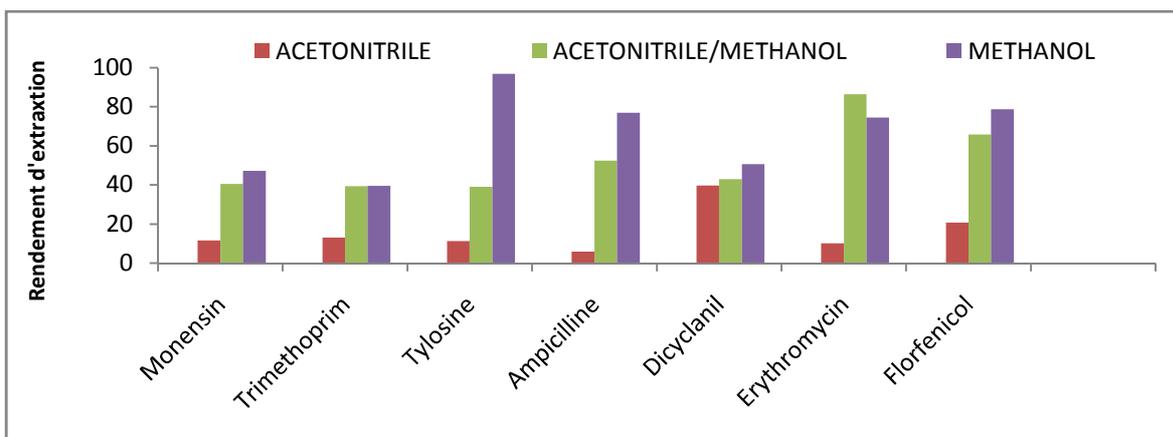
**Figure III. 19. Rendements d'extraction des tétracyclines, obtenus avec trois différentes solutions d'élution**



**Figure III. 20. Rendements d'extraction des sulfonamides, obtenus avec trois différentes solutions d'élution**



**Figure III. 21. Rendements d'extraction des fluoroquinolones, obtenus avec les trois différentes solutions d'élution**



**Figure III. 22. Rendements d'extraction des autres médicaments, obtenus avec les trois différentes solutions d'élution**

#### II.1.4. Choix du volume de chargement

Le dernier paramètre à optimiser de la SPE est le choix du volume de chargement. Pour cela, trois différents volumes de chargement ont été testés pour un débit de 1 mL/min.

**V1=300 mL**

**V2=500 mL**

**V3=750 mL**

Avec l'utilisation de cartouche HLB OASIS (200 mg/6 mL) ; pH=2,5 ; 6 mL de méthanol pour l'élution.

L'étape de chargement de l'échantillon est très importante pendant la SPE. L'échantillon passe sur l'adsorbant afin de retenir les composés. Le volume d'échantillon dépend du type de la matrice, un volume réduit est chargé pour les matrices plus complexes et de la capacité d'adsorption de la phase solide. Il doit permettre une concentration suffisante des antibiotiques, tout en permettant une extraction quantitative. Les volumes extraits sont généralement compris entre 100 et 1000 mL selon les matrices (Karthikeyan et al., 2006 ; Spondberg et al., 2008 et Vieno et al., 2006).

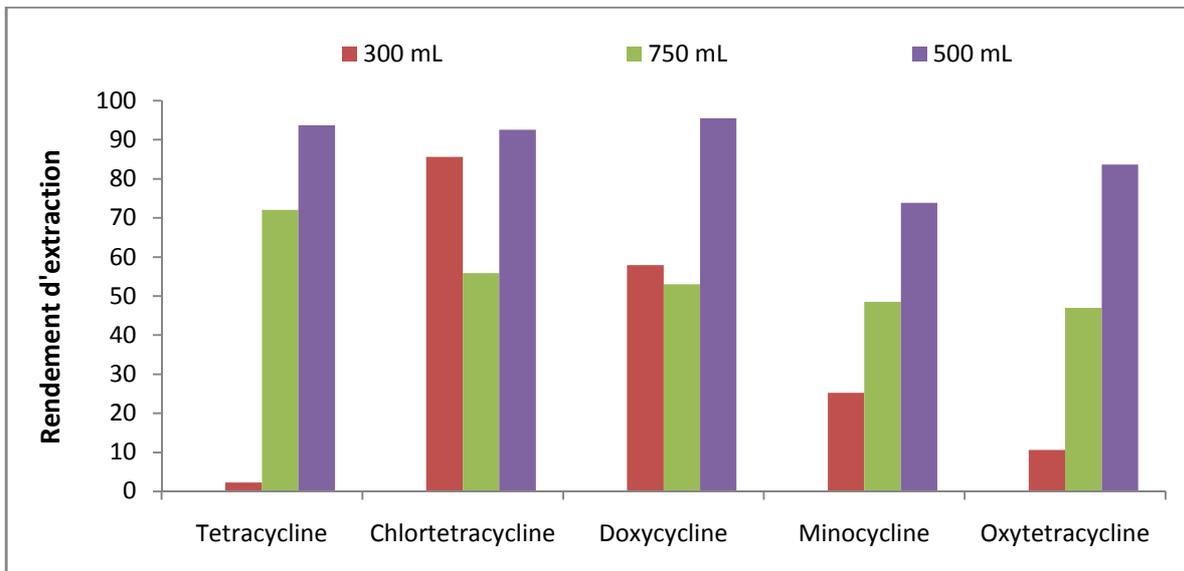
Pour les fluoroquinolones et les sulfonamides, les rendements d'extraction passent d'environ de 20 à 30% à plus que 60% en passant de V1 à V2, puis ils diminuent légèrement pour V3 (Figures III.24-III.25).

Ces résultats montrent qu'un volume supérieur à 500 mL entraîne la perte des solutés lors du chargement, un volume V=300 mL n'est pas suffisant pour la rétention de la totalité des solutés souhaités.

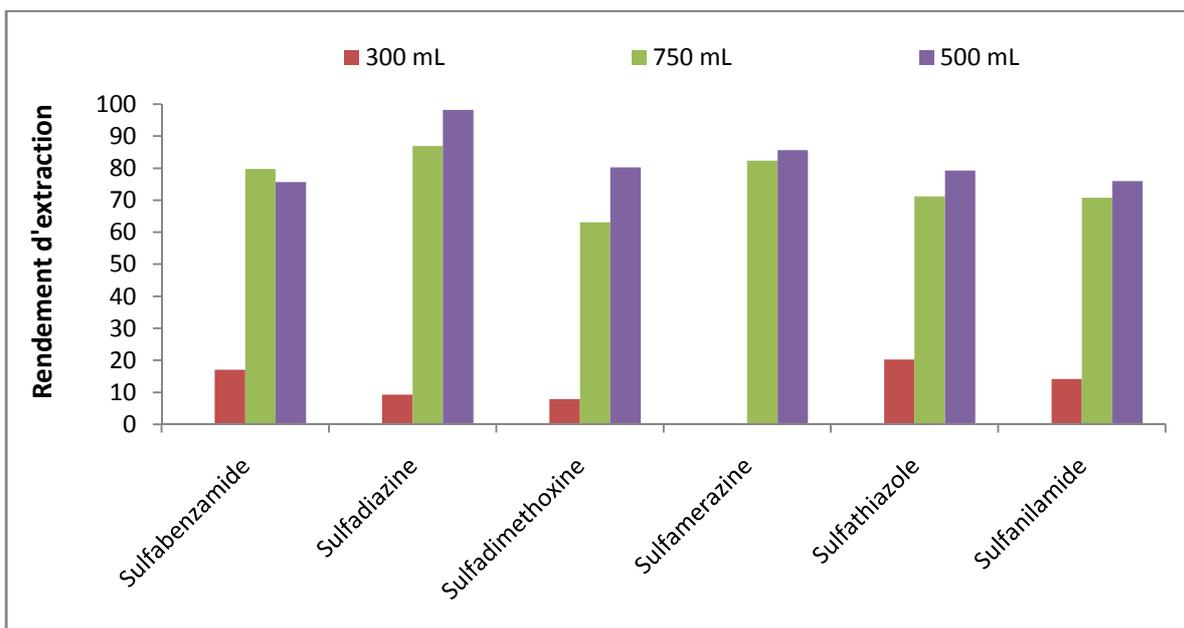
Pour les tétracyclines, l'utilisation d'un volume **V=500 mL** donne les rendements d'extraction les plus élevés (92% pour la tétracycline).

Pour le reste des médicaments, les deux volumes 500 et 750 mL, présentent presque les mêmes rendements d'extraction.

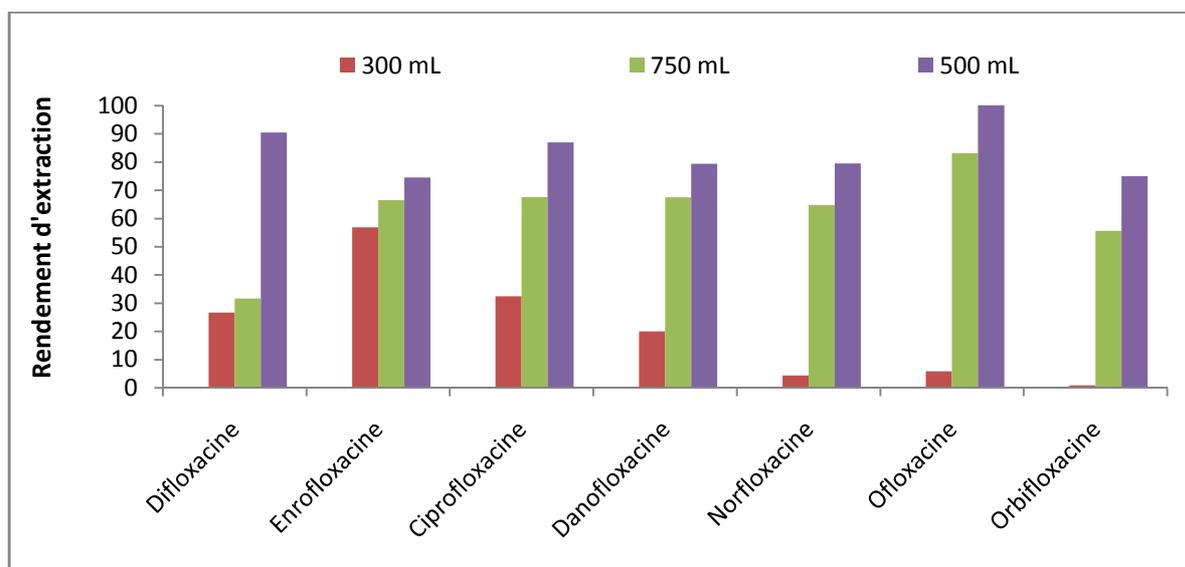
Le volume de **500 mL** assure le meilleur rendement d'extraction pour les composés étudiés.



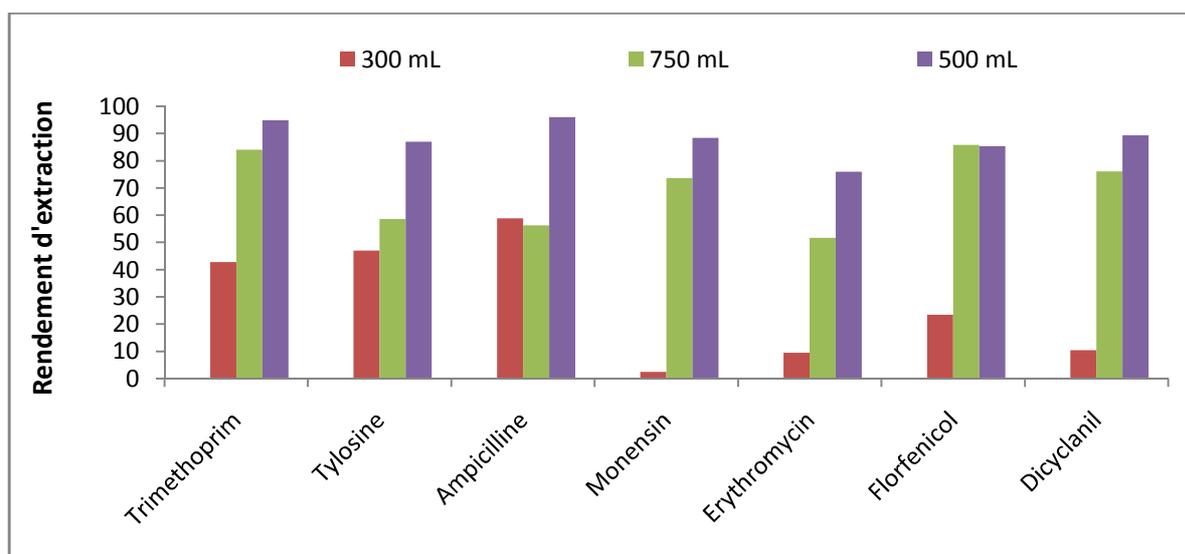
**Figure III. 23. Rendements d'extraction des tétracyclines avec trois différents volumes de chargement**



**Figure III. 24. Rendements d'extraction des sulfonilamides avec trois différents volumes de chargement**



**Figure III. 25. Rendements d'extraction des fluoroquinolones avec trois différents volumes de chargement**



**Figure III. 26. Rendements d'extraction des autres médicaments avec les trois différents volumes de chargement**

Une méthode simple rapide et répétable a été optimisée permettant à la fois d'extraire et de concentrer efficacement des traces d'antibiotiques, appartenant à plusieurs familles, contenus dans des matrices aqueuses.

Pour cela, une extraction a été effectuée en utilisant **une cartouche OASIS HLB (200 mg/ 6 mL)**, après avoir ajusté l'extrait final à **pH=2,5** et en utilisant du **méthanol pur** pour l'**élution** et un volume de chargement égal à **500 mL**.

Après avoir optimisé les différents paramètres, les conditions opératoires de la méthode d'extraction SPE utilisée est la suivante (Tableau III.5)

**Tableau III. 5. Conditions opératoires de la méthode SPE**

<b>Conditionnement</b>	6 mL de m éthanol 6 mL d'eau HPLC
<b>Chargement</b>	500 mL de l'échantillon pH= 2,5 Débit = 1 mL/ min
<b>Lavage</b>	6 mL d'eau HPLC Débit= 1 mL/min
<b>Séchage</b>	30 min sous flux d'azote Pression = 1 bar
<b>Elution</b>	6 mL de méthanol Débit= 1 mL/min

La répétabilité des rendements d'extraction (exprimé par le coefficient de variation), en utilisant les conditions optimales, sont présentés dans le Tableau (III.6). Cette méthode peut être adaptée à l'analyse de différents échantillons de la matrice liquide. Les valeurs de coefficient de variation (CV), sont comprises entre 0,5% pour le triméthoprime et 3,57% pour le minocycline, largement inférieures à 20%, donc la méthode SPE développée est bien répétable.

**Tableau III. 6. Répétabilité de la SPE**

Composés	Rendement d'extraction %				
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	CV%
<b>Chlortetracycline</b>	43	42	41	42	1,94
<b>Tétracycline</b>	90	90	91	90	0,52
<b>Doxycycline</b>	69	68	70	69	1,18
<b>Minocycline</b>	47	46	50	48	<b>3,57</b>
<b>Oxytétracycline</b>	50	51	51	51	0,93
<b>Difloxacin</b>	48	49	49	49	0,97
<b>Enrofloxacin</b>	49	49	48	49	0,97
<b>Norfloxacine</b>	50	51	52	51	1,60
<b>Ofloxacin</b>	48	47	48	48	0,99
<b>Orbifloxacin</b>	55	53	54	54	1,51
<b>Ciprofloxacine</b>	52	52	51	52	0,91
<b>Danofloxacin</b>	50	51	52	51	1,60
<b>Sulfabenzamide</b>	100	100	101	100	0,47
<b>Sulfadiazine</b>	82	82	83	82	0,57
<b>Sulfadiméthoxine</b>	75	76	76	76	0,62
<b>Sulfamérazine</b>	93	95	94	94	0,87
<b>Sulfanilamide</b>	58	58	59	58	0,81
<b>Sulfathiazole</b>	68	69	69	69	0,69
<b>Triméthoprime</b>	94	95	94	94	<b>0,50</b>
<b>Florfenicol</b>	73	72	72	72	0,65
<b>Monensine</b>	46	45	47	46	1,77
<b>Tylosine</b>	64	67	65	65	1,91
<b>Erythromycine</b>	41	43	42	42	1,94
<b>Dicyclanile</b>	73	76	75	75	1,67
<b>Ampicilline</b>	52	53	53	53	0,90

## II.2. Comparaison des résultats

Les rendements d'extraction ont été déterminés à partir d'une solution d'eau grade HPLC dopée à une concentration égale à 1 µg/L. Le Tableau III.7 présente une comparaison des valeurs des rendements d'extraction obtenus dans ce travail avec ceux obtenus dans la littérature.

**Tableau III.7. Rendements d'extraction à C= 1µg/L et comparaison à la littérature**

Composés	Rendement d'extraction R (%)	
	Ce travail	Référence
Chlortétracycline	43,9	----
Tétracycline	90,48	100 (250 ng/L) (Pamreddy et al., 2013)
Doxycycline	69,78	98,7 (250 ng/L) (Pamreddy et al., 2013)
Minocycline	47,15	----
Oxytétracycline	50,88	54,6 (250 ng/L) (Pamreddy et al., 2013)
Difloxacin	48,79	74 (Zhao et al., 2010)
Enrofloxacin	49,45	42 (Martinez-Carballo et al., 2007)
Norfloxacin	50,90	----
Ofloxacin	48,77	----
Orbifloxacin	55,76	----
Ciprofloxacin	52,75	48 (Hu et al., 2010)
Danofloxacin	50,79	----
Sulfabenzamide	100	----
Sulfadiazine	82,25	80 (2 µg/L) (Gomez et al., 2006)
Sulfadiméthoxine	75,57	67 (10 µg/L) (Ben et al., 2008)
Sulfamérazine	93,12	----
Sulfanilamide	58,89	----
Sulfathiazole	68,98	80 (2 µg/L) (Tong et al., 2009)
Triméthoprim	94,94	83 (50 ng/L) (Gros et al., 2006)
Florfenicol	73,75	----
Monensin	46,57	----
Tylosine	64,55	71,6 (1µg/L) (Gros et al., 2006)
Erythromycin	41,79	----
Dicyclanil	73,95	----
Ampicilline	52,58	----

## Références bibliographiques

- Abuin, S., Codony, R., Compano, R., Granados, M., Prat, M. D., 2006. Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography– mass spectrometry. *J chromatogr A* 1114, 73.
- Aga, D. S., O'Connor, S., Ensley, S., Payero, J. O., Snow, D., Tarkalason, D., 2005. Determination of the Persistence of Tetracycline Antibiotics and Their Degradates in Manure- Amended Soil Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Liquid Chromatography-mass spectrometry. *J chromatogr B* 145, 142.
- Ahrer, W., Scherwenk, E., Buchberger., W, 2001. Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *J chromatogr A* 910, 69.
- Alda, M. J. L. d., Diaz-Cruz, S., Petrovic, M., Barcelo, D., 2003. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *J chromatogr A* 1000, 503.
- Barcelo, D., Petrovic, M., Lopez de Alda, M. & Hernando, M. D. (2005). Recent advances in LC-MS/MS analysis of emerging contaminants in environmental samples. In 10th International Symposium New Achievements in Chromatography. Opatija, Croatia: IIQAB-CSIC, Departament of Environmental Chemistry, Barcelona, Spain.
- Batt, A. L. et Aga, D. S. (2005). Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination. *Anal Chem* 77, 2940-2947.
- Beausse, J. H., 2004. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends in anal Chem*23, 753.
- Ben, W., Quiang, Z., Adams, C., Zhang, H., Chen, L., 2008. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J chromatogr A* 1202, 173.
- Bialk-Bielinska, A., Kumirska, J., Palavinskas, R., Stepnowski, P. 2009. Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC-MS/MS. *Talanta* 80, 947.
- Blackwell, P. A., Lützhof, H. C. H., Ma, H. P., Halling-Sorensen, B., Boxall, A. B. A., Kay, P., 2004. Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detector. *J chromatogr A* 1045, 111.
- Blackwell, P. A., Lützhof, H. C. H., Ma, H. P., Halling-Sorensen, B., Boxall, A. B. A., Ka, P., 2007. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC–UV and fluorescence detection. *Talanta* 64, 1058.
- Diaz-Cruz, M. S., Barcelo, D., 2005. LC–MS2 trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. *Trends in anal Chem*24, 645.
- Dinh, Q. T., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Eurin, J., Chevreuil, M., Labadie, P., 2011. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. *Talanta* 85, 1238.
- Gomez, M. J., Petrovic, M., Fernandez-Alba, A. R., Barcelo, D., 2006. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *J Chromatogr A* 1114, 224-237.

- Gros, M., Petrovic, M., Barcelo, D. (2006). Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LCMS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and waste water. *Talanta* 70, 678-690.
- Grujic, S., Vasiljevic, T., Lausevic, M., 2009. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *J chromatogr A* 1216, 4989-4988.
- Hao, C., Lissemore, L., Nguyen, B., Kleywegt, S., Yang, P., Solomon, K., 2006. Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal. Chem* 384, 50.
- Hu, X., Luo, Y., Zhou, Q., 2010. Simultaneous analysis of selected typical antibiotics in manure by microwave-assisted extraction and LC-MS. *Chromatographia* 71, 217-223.
- Janzen, N., Sander, S., Terhardt, M., Peter, M., Sander, J., 2008. Fast and direct quantification of adrenal steroids by tandem mass spectrometry in serum and dried blood spot. *J chromatogr B* 861, 117.
- Karthikeyan, K. G., Meyer, M., 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Sci Tot Env* 361, 106.
- Kasprzyk-Hordén, B., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J., 2007. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1161, 132.
- Kim, S. C., Carison, K., 2007. Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 387, 1301.
- Lacey, C., McMahon, G., Bones, J., Barron, L., Morrissey, A., Tobin, J. M., 2008. An LC-MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Talanta* 75, 1089.
- Liu, R., Zhou, J. L., Wilding, A., 2004. Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. *J chromatogr A* 1038, 19.
- Liu, S., Ying, G. G., Zhao, J. L., Chen, F., Yang, B., Zhou, L. J., Lai, H. J., 2011. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J chromatogr A* 1218, 1367.
- Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., Gans, O., 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Env Poll* 148, 570-579.
- Miao, X. S., Bishay, F., Chen, M., Metcalfe, C. D., 2004. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Env Sci Technol* 38, 3533.
- Paillet, J. Y., Krein, A., Pfister, L., Hoffmann, L., Guignard, C., 2009. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Sci Tot Env* 407, 4736.
- Sorensen, L. K., Elbaek, T. H., 2005. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J chromatogr B* 820, 183.
- Sponberg, A. L., Ritter, J. D., 2008. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. *Sci Total Env* 397, 148.

- Togola, A. et Budzinski, H. 2007. Analytical development for analysis of pharmaceutical in water samples by SPE and GC-MS. *Anal Bioanal Chem* 388, 627-635.
- Tong, L., Li, P., Wang, Y., Zhu, K., 2009. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* 74, 1090.
- Vasquez-Roig, P., Segarra, R., Blasco, C., Andreu, V., Pico, Y, 2010. Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J chromatogr A* 1217, 2471.
- Vieno, N. M., Tuhkanen, T., Kronberg, L, 2006. Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1134, 101.
- Wei, R., Ge, F., Huang, S., Chen, M., Wang, R., 2011. Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere* 82, 1408.
- Yang, S., Cha, J. et Carlson, K. (2005). Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1097, 40-53.
- Zhao, L., Dong, Y.H., Wang, H., 2010. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Sci Tot Env* 408, 1069–1075.

# **Chapitre IV**

## **Développement de la méthodologie pour l'analyse des médicaments en phase solide**

Dans ce chapitre, nous présentons le développement méthodologique pour les analyses des produits pharmaceutiques présents à l'état de trace dans cinq types de sols. Une méthode d'extraction simultanée des 28 résidus de médicaments à usages humain et vétérinaire contenu dans le sol a été optimisée. L'extraction a été effectuée par extraction liquide à haute pression PLE (Pressurized Liquid Extraction).

En effet, les produits médicamenteux sont présents à l'état de trace et sont souvent « fortement liés » aux sols par l'effet de vieillissement. Pour les extraire simultanément avec une bonne efficacité, plusieurs paramètres doivent être optimisés.

L'ensemble de la procédure de quantification a été étudiée et optimisée. Cette procédure comprend l'extraction PLE, l'étape d'évaporation, une étape de purification et pré-concentration par l'extraction sur phase solide ou SPE (Extraction en Phase Solide).

Les extraits purifiés ont été analysés qualitativement et quantitativement par SPE-LC-MS/MS optimisée.

Les conditions optimales d'extraction simultanée de ces 28 résidus de médicaments ont été déterminées et validées. La linéarité ( $R^2$ ), les limites de détection et de quantification méthodologiques (MLOD) et (MLOQ), les rendements d'extraction (R%), ainsi que la répétabilité et la reproductibilité sont présentés ci-après.

## **I. Développement de la méthode analytique utilisée**

Comme indiqué dans la partie bibliographique, plusieurs techniques d'extraction sont couramment utilisées pour le cas de matrices solides. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients. Les techniques conventionnelles pour l'extraction des composés organiques sont basées soit sur le mélange du solide avec un solvant organique soit sur l'extraction Soxhlet qui est encore considérée comme la méthode de référence.

Dernièrement, des techniques telles que la PLE (Armenta et al., 2008 ; Duran-Alvarez et al., 2009 ; Aga et al., 2005 et Alda et al., 2003) ont été mises en place. Cette technique est une méthode d'extraction efficace et très utilisée (chapitre II, paragraphe III.2.2) pour les matrices solides incluant les sols.

### **I.1. Extraction par PLE**

Avec l'extraction par PLE, de nombreux paramètres peuvent influencer le rendement d'extraction.

Les principaux paramètres sont la température, la pression, le temps statique, le nombre de cycles, et la nature de solvant d'extraction. D'après les expériences préliminaires de laboratoire et les données de la littérature, c'est la nature du solvant d'extraction qui a un effet marquant sur l'efficacité de l'extraction.

Par conséquent, les paramètres tels que la température, la pression, le temps statique et le nombre de cycles ont été choisis avec les valeurs préalablement fixées selon les données obtenues par la compilation des données de la littérature. Avec ces valeurs fixées, l'influence de la nature de solvant d'extraction a été optimisée expérimentalement.

### **I.1.1. Choix des paramètres**

Des études antérieures ont été consacrées à l'extraction d'antibiotiques présents dans le sol par PLE (Garcia-Galan et al., 2013). Cependant, il n'y a pas encore de méthode d'extraction pour extraire simultanément ces molécules par PLE à partir des sols.

- Plusieurs travaux effectués sur diverses molécules de médicaments incluant des antibiotiques montrent qu'une bonne efficacité d'extraction est souvent obtenue à une température relativement basse comprise entre 60 et 90°C. En effet, certains micropolluants sont instables thermiquement et en conséquence, ils peuvent être dégradés au cours d'extraction accompagnée de chauffage élevé (Hansen et al., 2009 et Capdeville et al., 2010). Cependant, à une basse température, les solvants pénètrent moins bien dans les particules de sols. Plus la température augmente, plus la viscosité du solvant diminue ce qui favorise sa pénétration dans la matrice et solubilise mieux les composés. **La température est fixée à 80°C.**

- Pour l'extraction à température élevée, la pression doit être assez élevée (supérieure à 100 bars) afin de maintenir le solvant dans l'état liquide.

Des pressions comprises entre 100 et 140 bars sont fréquemment rapportées dans la littérature (Schlusener et al., 2003 et Capdeville et al., 2010). **La pression est maintenue à 120 bars.**

- Les temps statiques les plus couramment utilisés sont compris entre 5 et 10 minutes (Garcia-Galan et al., 2013 ; Pamreddy et al., 2013 et Lillenberg et al., 2009). Certaines matrices retiennent dans leurs pores les substances à extraire. L'augmentation du temps statique permet aux composés de mieux se diffuser dans le solvant d'extraction. **Le temps statique (Ts) a été fixé à 10 minutes.**

- Enfin, les auteurs préconisent le plus souvent la réalisation de 2 ou 3 cycles (Schlusener et al., 2003 et Lillenberg et al., 2009) afin de multiplier le nombre de passage de

solvant à travers l'échantillon et d'augmenter le taux de récupération. **Le nombre de cycles (Nc) a été fixé à 2.**

Dans la recherche de l'optimisation des conditions d'extraction simultanée de l'ensemble de 28 produits médicamenteux. Les paramètres sont choisis et leurs valeurs expérimentales ont été fixés (Tableau IV.1).

**Tableau IV. 1. Paramètres expérimentaux fixés pour la PLE**

<b>T (°C)</b>	<b>P (bars)</b>	<b>Ts (min)</b>	<b>Nc</b>
80	120	10	2

Pour l'optimisation du choix du solvant, cinq sols différents de la Région Hauts-de-France, possédant des compositions variées, ont été testés (Tableau IV.2).

**Tableau IV. 2. Composition des 5 sols étudiés**

<b>Nom</b>	<b>Texture du sol</b>	<b>Argile (%)</b>	<b>Limon (%)</b>	<b>Sable (%)</b>
<b>Sol 1</b> Lievin	Limoneux	<b>21,3</b>	51,5	27,2
<b>Sol 2</b> Airon- Saint_Vaast	Limoneux-sableux	<b>9,5</b>	21,5	69
<b>Sol 3</b> Dompière-Sur-Helpe	Limoneux argileux	<b>31</b>	50,8	18,2
<b>Sol4</b> Bailleur (Steenwerck)	Limoneux argileux	<b>28,7</b>	46,8	24,5
<b>Sol 5</b> Marcq-En-Ostervent	Limoneux	<b>26,1</b>	41	32,9

### **I.1.2. Choix du solvant d'extraction**

Etant donné la diversité des propriétés physico-chimiques des composés, faire des choix de compromis pour mieux extraire simultanément l'ensemble des 28 résidus de médicament est une tâche délicate.

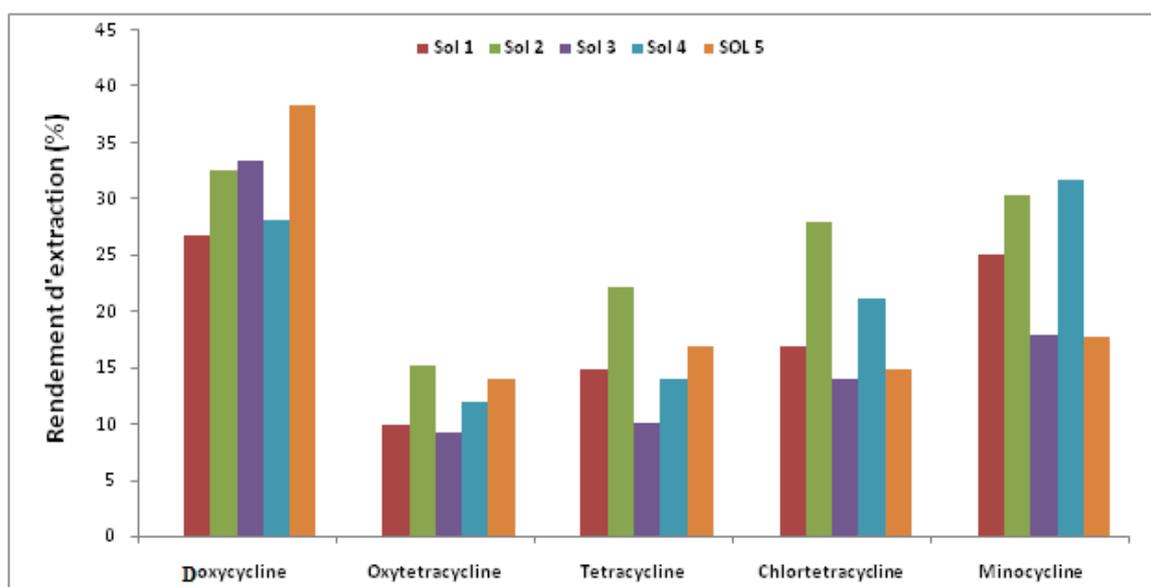
Pour évaluer les rendements d'extraction par la PLE, les concentrations des 28 médicaments ont été calculées à la fois pour les échantillons de sols non dopés par les molécules d'intérêt (dopés seulement par les étalons internes [EI] pour des calculs précis) et les échantillons des sols dopés (dopés avec les 28 médicaments et [EI]).

Le méthanol, l'acétone, le mélange d'acétone/méthanol (50 :50), ou encore le mélange de méthanol/acétonitrile, solvant seul ou en solutions aqueuses sont les plus couramment

utilisés pour extraire des médicaments des matrices solides (Schlusener et al., 2003 ; Diaz-Cruz et al., 2007 et Carabias-Martinez et al., 2006).

En premier lieu, le potentiel d'utilisation de l'acétonitrile et du méthanol comme solvants d'extraction des 28 médicaments ont été étudiés. Les résultats (Figures IV.1-IV.4) montrent que **l'acétonitrile** seul n'est pas adapté à l'extraction simultanée des différentes familles d'antibiotiques. La nature de sols influence le rendement d'extraction. Pour les mêmes conditions expérimentales, les rendements d'extraction varient d'un sol à l'autre.

Globalement, les rendements d'extraction obtenus sont inférieurs à 50% pour la majorité des substances cibles. La carbamazépine et le triméthoprime montrent des bons rendements pour les cinq types de sols. Le rendement inférieur à 30% a été observé pour la plupart des tétracyclines et fluoroquinolones.



**Figure IV. 1. Rendements d'extraction des tétracyclines par l'acétonitrile**

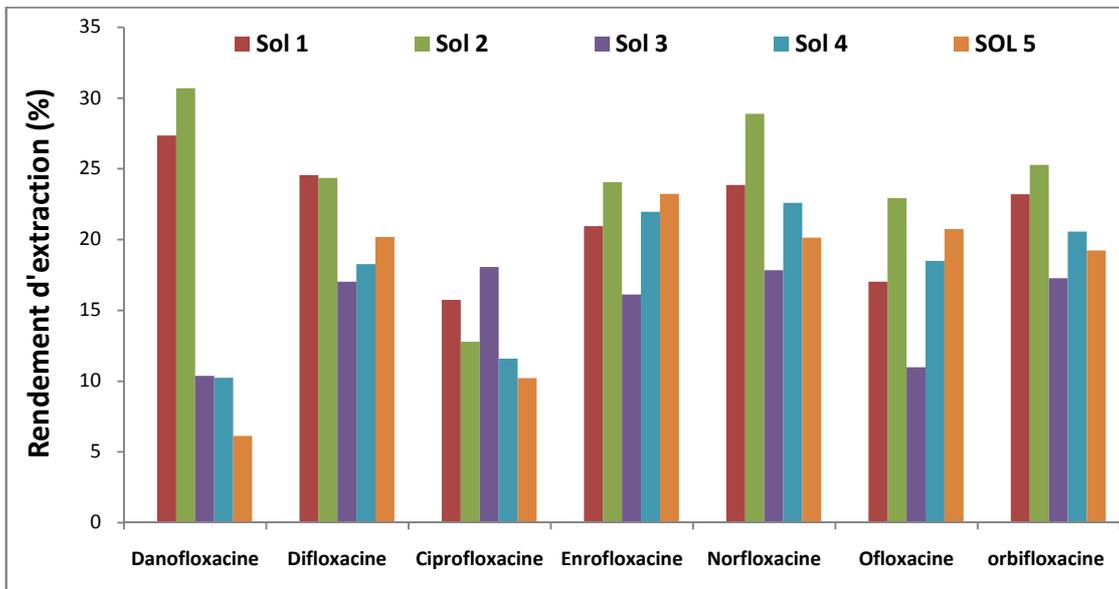


Figure IV.2. Rendements d'extraction des Fluoroquinolones par l'acétonitrile

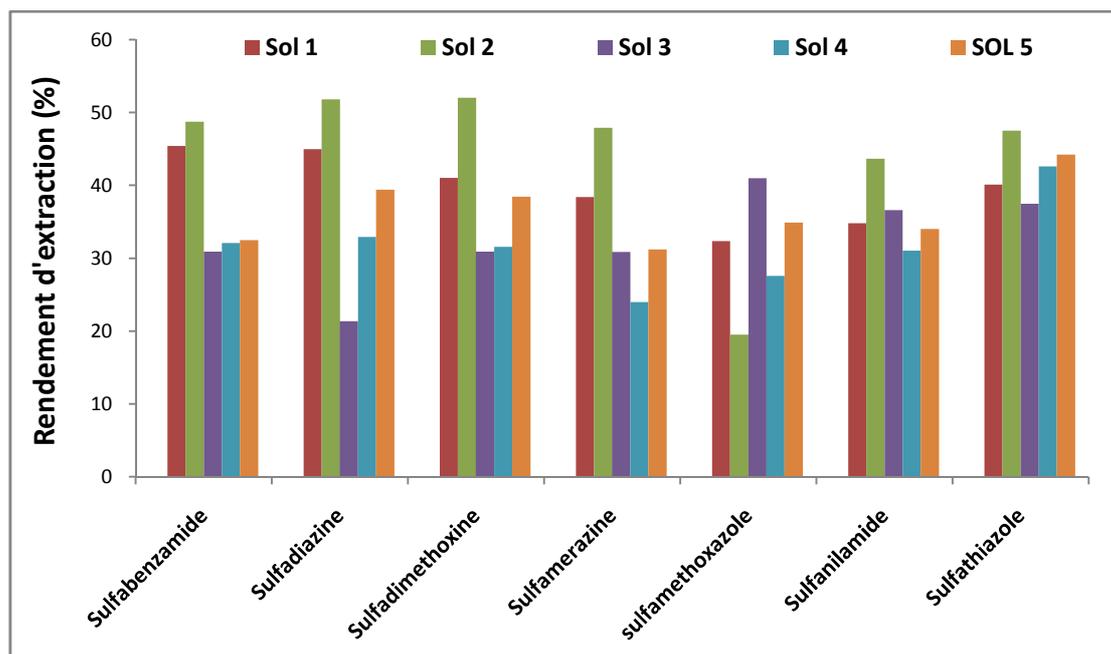
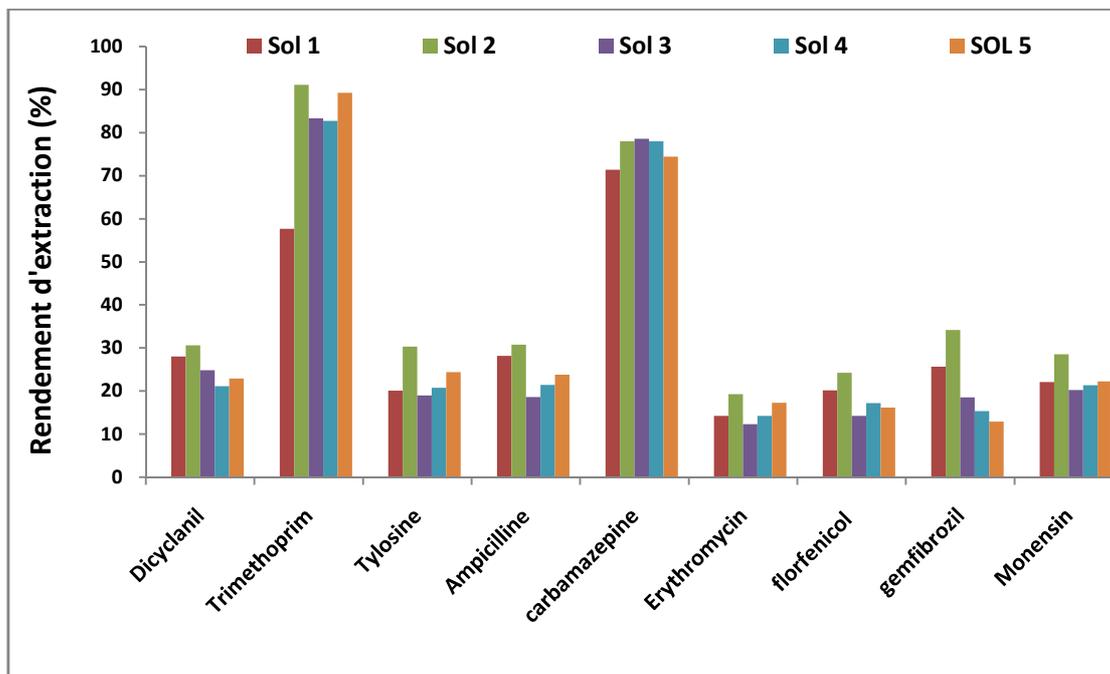


Figure IV. 3. Rendements d'extraction des sulfonilamides par l'acétonitrile



**Figure IV. 4. Rendements d'extraction des autres médicaments par l'acétonitrile**

Les résultats sur l'efficacité du **méthanol** se manifestent par une nette amélioration du rendement d'extraction (Figures IV.5 – IV.8). Le méthanol semble un bon solvant pour extraire des sulfonilamides. Les rendements d'extraction sont moyennement compris entre 60 et 85%. Il semble aussi efficace pour extraire le dicyclanil, le triméthoprime, l'ampicilline, carbamazépine, flofenicol et gemfibrozil (Figure VI.8). Cependant, pour le monensin, le rendement d'extraction est très faible voire nul ; il n'a pas été détecté à la suite de l'extraction dans le cas des différents sols utilisés.

Pour les fluoroquinolones et les tétracyclines, les rendements ont été améliorés en changeant le solvant d'extraction de l'acétonitrile au méthanol (Figures IV.1. IV.2. IV.5. VI.6). Cependant, cette amélioration n'est pas satisfaisante car les rendements obtenus restent encore faibles inférieurs à 55%.

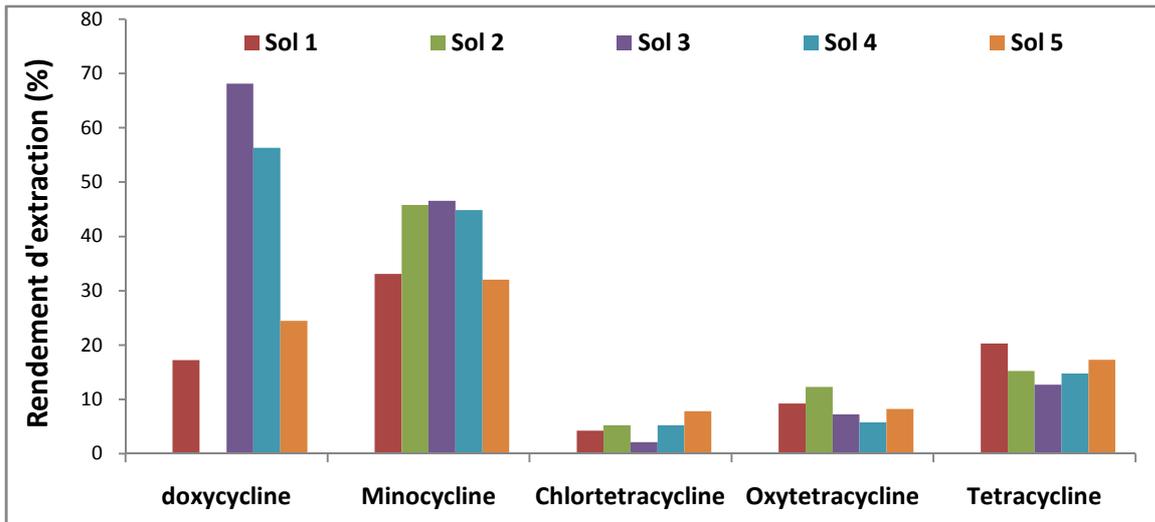


Figure IV. 5. Rendements d'extraction des tétracyclines par le méthanol

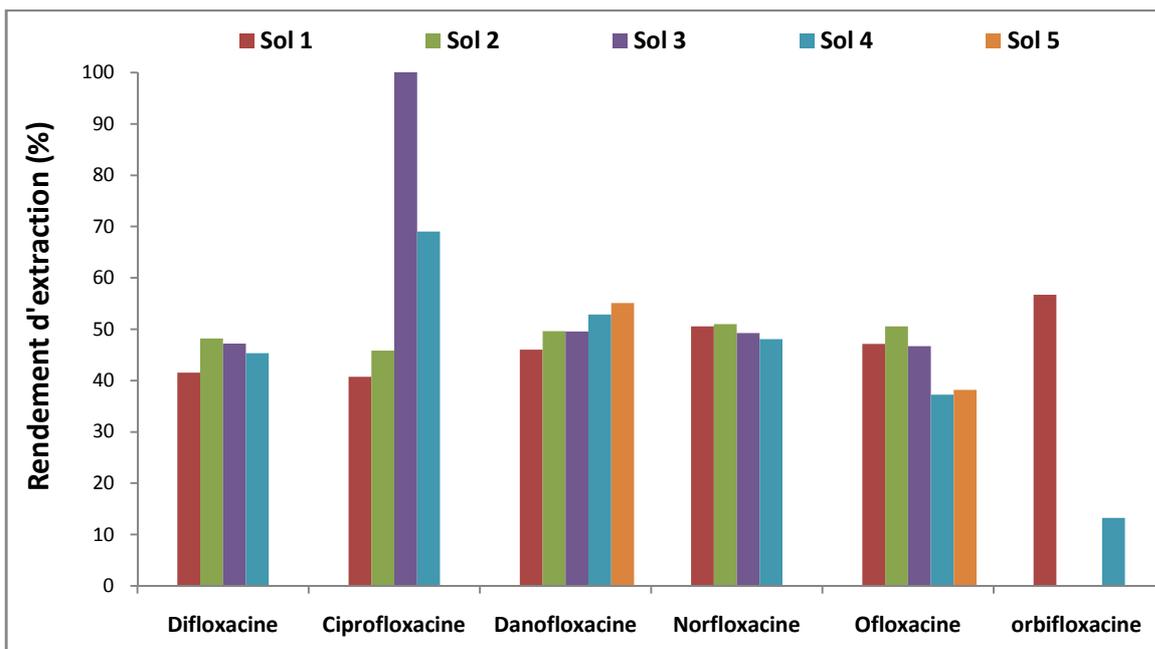


Figure IV.6. Rendements d'extraction des fluoroquinolones par le méthanol

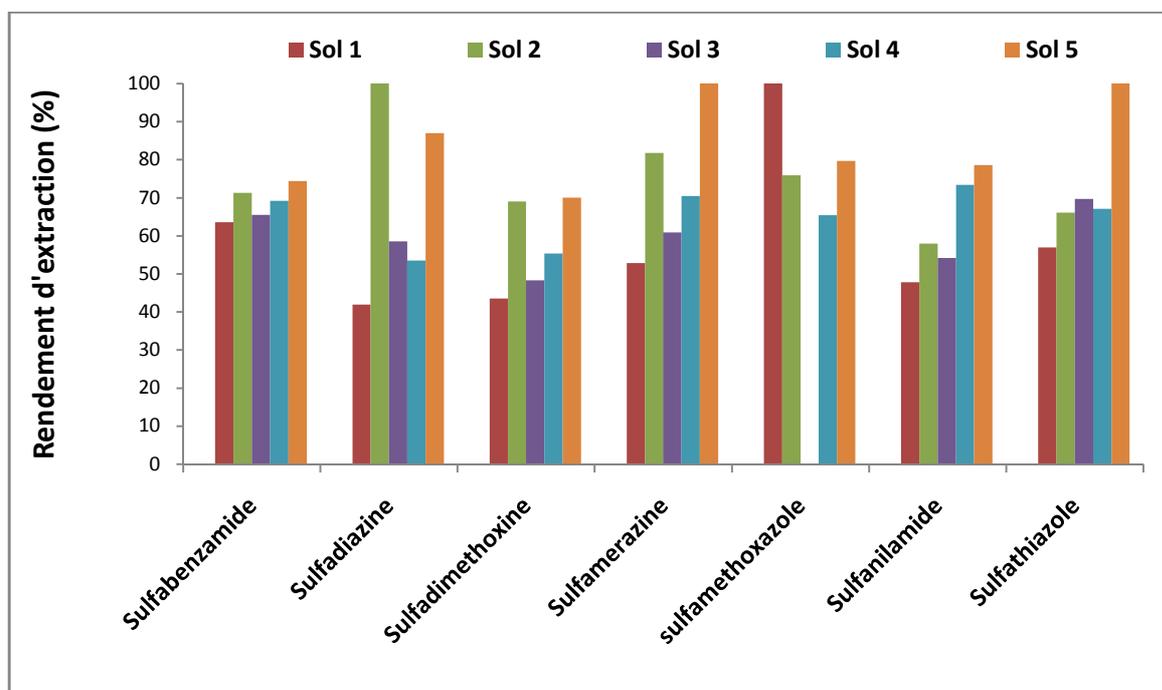


Figure IV. 7. Rendements d'extraction des sulfonilamides par le méthanol

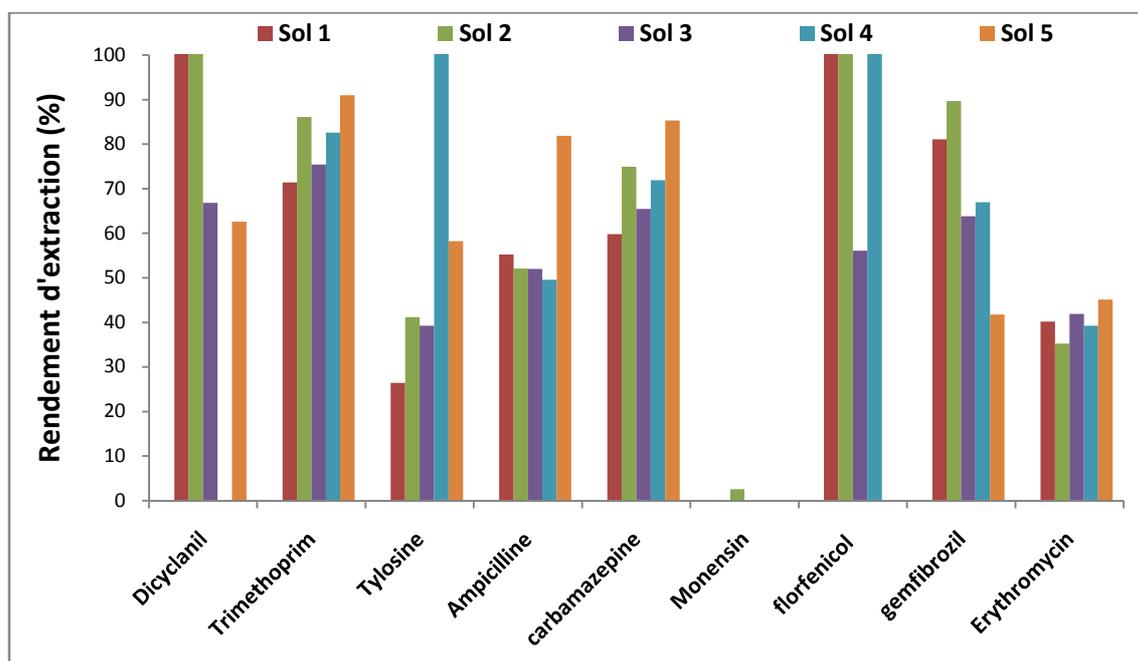


Figure IV.8. Rendements d'extraction des autres médicaments par le méthanol

Les tests d'exaction avec le solvant pur aussi bien avec l'acétonitrile que le méthanol, n'ont pas fourni des rendements globaux satisfaisants. Afin de favoriser l'extraction simultanée de ces 28 produits pharmaceutiques à partir des sols, d'autres études expérimentales ont été menées. Des mélanges de solvants plus complexes ont été utilisés.

Dans la littérature, plusieurs études ont rapporté que l'extraction avec les solvants à base d'acide citrique peut améliorer le rendement. Il a été mis en évidence que les tétracyclines et les fluoroquinolones forment de complexes stables avec les groupes hydroxy à la surface des particules du sol où peuvent se produire des réactions hydrophobes ou encore des échanges cationiques (O'connor et al., 2007 et Schlusener et al., 2006).

Afin de minimiser ces interactions, nous avons envisagé d'ajouter un agent complexant au solvant d'extraction (Schlusener et al., 2006). L'utilisation de l'EDTA ne peut pas être envisagée car il précipite généralement dans l'extracteur PLE (O'connor et al., 2007). Pour ces raisons, l'acide citrique a été utilisé en mélange avec les solvants pour l'optimisation des conditions d'extraction. Les fluoroquinolones, en accord avec la littérature, sont bien extraites avec de l'acétonitrile (O'connor et al., 2007). Nos résultats montrent que l'extraction des tétracyclines semble être plus efficace avec des solvants à base de méthanol confirmant les résultats de la littérature (O'connor et al., 2007 et Lillenberg et al., 2009). Comme notre objectif est de l'extraction simultanée, le choix reste sur l'utilisation du mélange (l'acétonitrile/méthanol/acide citrique) à différentes valeurs de pH.

Les pH compris entre 4 et 5 sont couramment utilisés pour extraire les fluoroquinolones du sol (Duran-Alvarez et al., 2009 ; Blackwell et al., 2004 et Kim et al., 2009). Cependant, une bonne efficacité d'extraction des tétracyclines à pH environ 3 a été rapportée (Karci et al., 2009).

Jacoben et al., (2004) ont montré qu'une forte concentration en acide citrique ( $\geq 0,2$  M dans la partie aqueuse du mélange 50/50 méthanol/solution aqueuse d'acide citrique) ne permet pas d'améliorer les rendements d'extraction (O'connor et al., 2007). Nous avons choisi d'introduire 0,2 M d'acide citrique dans la fraction aqueuse de chacun des mélanges. De la soude a été ajoutée pour ajuster le pH aux valeurs souhaitées selon la méthode décrite par Vasquez-Roig et al., (2010).

Nous avons choisi de tester trois différentes compositions de mélanges sur un volume total de 500 mL sur 20 g de sol :

M1 : 25/25/50 méthanol/acétonitrile/0,2 M acide citrique ajusté à pH 3

M2 : 40/40/20 méthanol/acétonitrile/0,2 M acide citrique ajusté à pH 4,5

M3 : 50/50 méthanol/ acétonitrile (acide citrique solide)

Les résultats (Figures IV.9-IV.11) montrent que les tétracyclines sont mieux extraites avec le mélange (M1) 25/25/50 (méthanol/acétonitrile/0,2 M acide citrique) ajusté à pH 3 avec des rendements d'extraction compris entre 48 et 81%. Avec le mélange (M2) 40/40/20

méthanol/acétonitrile/ 0,2 M acide citrique à pH 4,5, de bons rendements sont obtenus pour extraire les fluoroquinolones avec des rendements d'extraction variant de 26 à 84%. Pour le mélange M3 (Mélange 50/50 méthanol/acétonitrile contenant de l'acide citrique solide), le rendement n'est pas satisfaisant (Figure IV.11). L'eau est nécessaire pour extraire les fluoroquinolones et les tétracyclines.

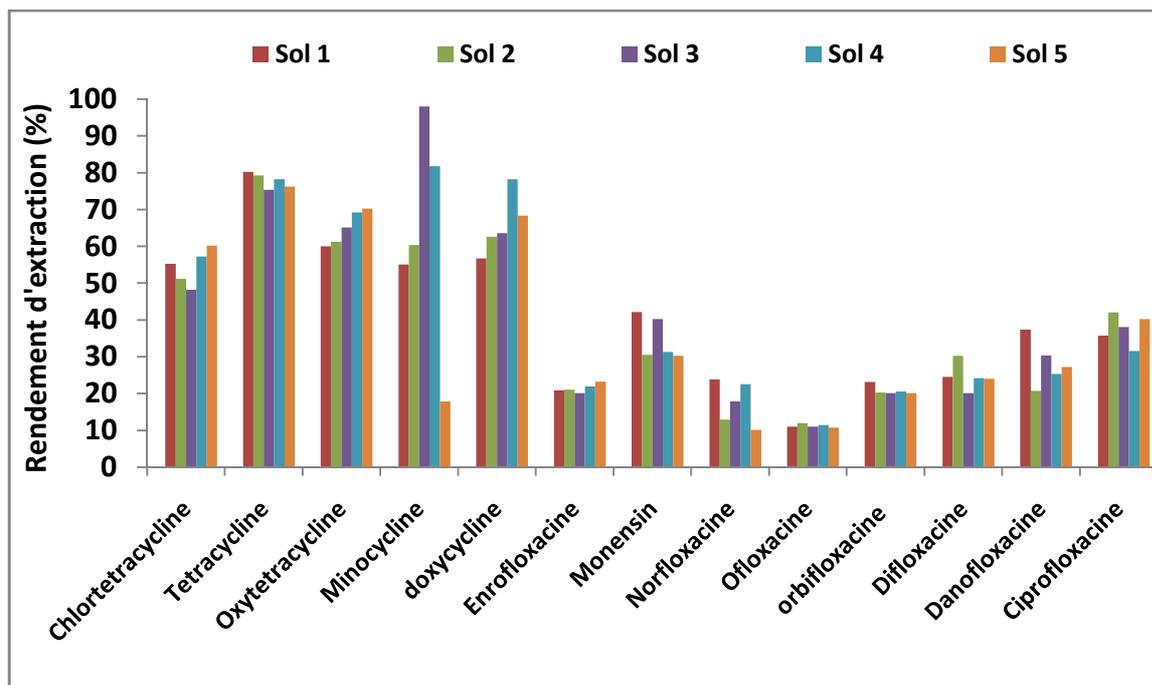
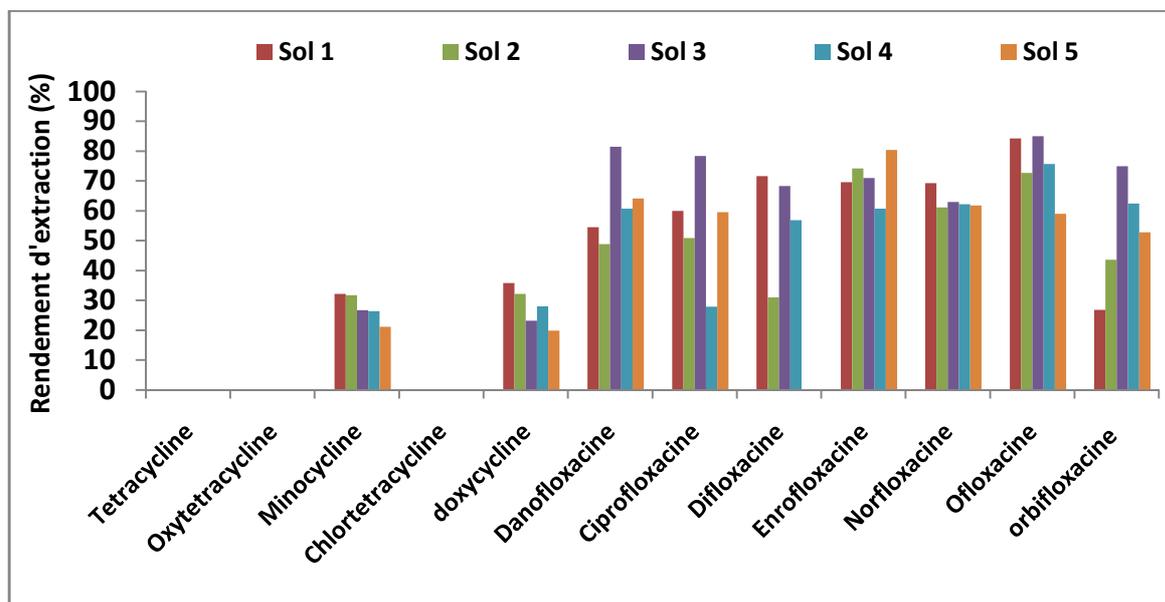
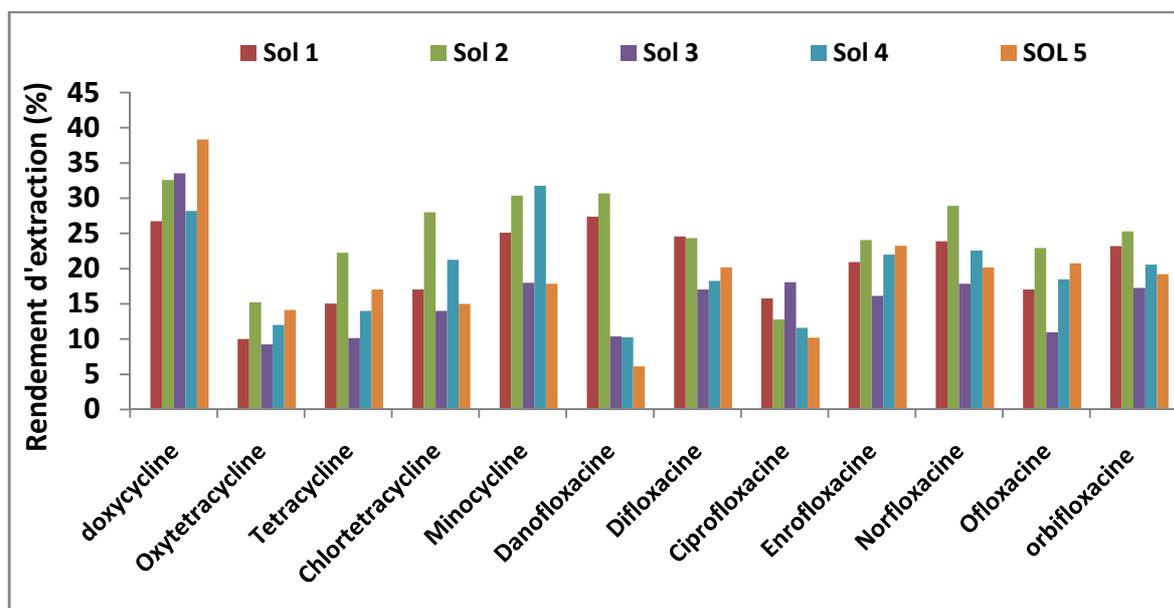


Figure IV.9. Rendements d'extraction des tétracyclines et fluoroquinolones avec le mélange M1 de solvants



**Figure IV. 10. Rendements d'extraction des tétracyclines et fluoroquinolones avec le mélange M2 de solvants**



**Figure IV. 11. Rendements d'extraction des tétracyclines et des fluoroquinolones avec le mélange M3 de solvants**

En se basant sur les résultats des différentes études expérimentales, nous avons retenu deux différents mélanges de solvants pour extraire les tétracyclines et les fluoroquinolones et un solvant pour extraire le reste de molécules sélectionnées parmi les 28. Les différents mélanges de solvants d'extraction adaptés pour chaque groupe ont été choisis (Tableau IV.3).

**Tableau IV. 3. Différents solvants d'extraction retenus**

Famille	Solvant d'extraction
Sulfonilamides	100% Méthanol
Tétracyclines	25/25/50 Méthanol/ Acétonitrile/0,2M Acide citrique pH=3
Fluoroquinolones	40/40/20 Méthanol/ Acétonitrile/ 0,2M Acide citrique pH=4,5
Autres médicaments	100% Méthanol

## I.2. Evaporation

L'extraction PLE de chaque échantillon a duré une trentaine de minute, et chaque extrait a un volume d'environ 20 mL. L'extrait est ensuite transféré dans un erlenmeyer puis additionné de 100 µl de keeper. Deux procédés d'évaporation ont été élaborés lors de l'optimisation de la méthodologie.

### Chemin d'évaporation A:

Le contenu de l'erlenmeyer est évaporé partiellement à l'aide d'un évaporateur rotatif : la température du bain marie est fixée à 60 °C et la pression à 350 mbars jusqu'à l'obtention d'environ 5 mL d'extrait. Nous procédons ensuite à l'évaporation à sec sous flux d'azote sous 0,8 bar. Enfin le résidu est repris avec 6 mL de mélange H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH dont le rapport est 97:3 avec un temps de contact de 60 minutes (Hansen et al., 2009).

### Chemin d'évaporation B:

Le contenu est placé dans un évaporateur à effet vortex jusqu'à évaporation à sec sous flux d'azote de 0,8 bar. La température du bain marie est maintenue à 40 °C. Une fois, l'extrait est évaporé à sec, il a été repris dans 6 mL de mélange H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH [90 :10] avec un temps de contact de 30 à 45 minutes (Garcia-Galan et al., 2013).

Les résultats de ces expériences (Figure IV.12) permettent de conclure que dans la globalité, **la procédure A** conduit à de meilleurs rendements. Cette procédure a été retenue. Le rendement d'extraction compris entre 50 et 100% a été obtenu pour la majorité des molécules.

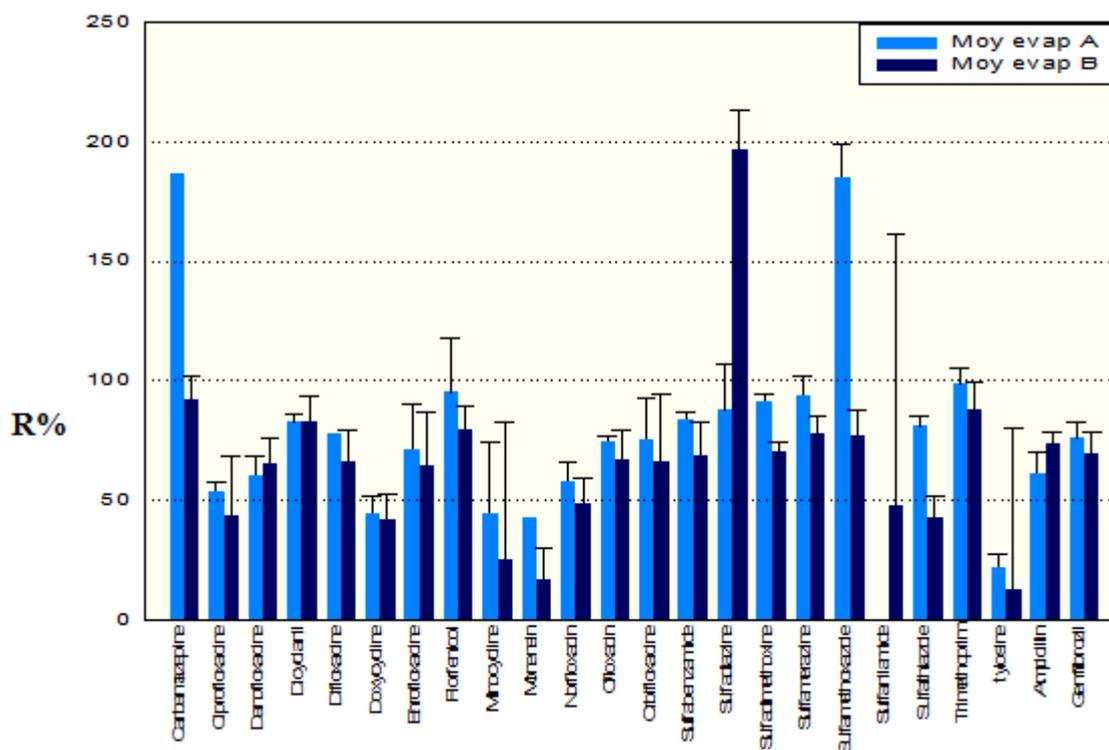


Figure IV. 1. Rendement d'extraction des différents résidus par évaporation

### I.3. Purification

La purification de l'extrait a été effectuée sur cartouche HLB OASIS (200 mg/ 6 mL). Le tableau IV.4 présente les paramètres retenus.

**Tableau IV. 4 Conditions opératoires fixées pour la purification**

<b>Conditionnement</b>	6 mL de l'acide citrique 6 mL d'eau HPLC
<b>Chargement</b>	6 mL de l'extrait pH= 2,5 Débit = 1 mL/ min
<b>Lavage</b>	3 mL d'eau HPLC 3 mL acide citrique Débit= 1 mL/min
<b>Séchage</b>	30 min sous flux d'azote Pression = 0,8 bar
<b>Elution</b>	6 mL de méthanol Débit= 1 mL/min

## II. Validation de la méthode

Le protocole d'extraction basé sur la PLE suivi par la purification/préconcentration SPE a été validé pour l'ensemble des 28 produits pharmaceutiques sélectionnés. La linéarité ( $R^2$ ), la répétabilité, la reproductibilité, le rendement d'extraction (R%) ainsi que les limites de détection et quantification méthodologiques (MLOD et MLOQ) sont les paramètres à évaluer (Seifrtová et al., 2009 ; Jacobsen et al., 2004 et Pamreddy et al., 2013). Pour valider l'ensemble de ce protocole de quantification de ces molécules, nous nous sommes intéressés à plusieurs paramètres :

- ❖ Linéarité : la gamme de linéarité effectuée tous les jours avec les concentrations variant de 0,5 ng/g (C1) à 200 ng/g (C9) (avec 0,5 ; 1 ; 5 ; 10; 50; 75 ; 100 et 150 ng/g).
- ❖ Limites de détection et de quantification de la méthode (MLOD et MLOQ)
- ❖ Répétabilité : nous avons procédé à l'analyse quotidienne en triplicata de 3 échantillons à différentes concentrations [C2= 1 ng/g, C5= 50 ng/g et C8= 150 ng/g].  
Elle est exprimée par le coefficient de variation (CV, %). Une méthode est dite répétable si les valeurs de coefficient de variation sont inférieures à 20%.
- ❖ Reproductibilité : nous avons procédé à l'analyse par deux différents opérateurs en triplicata de 3 échantillons de concentration égale à C5= 50 ng/g.  
Elle est exprimée par le coefficient de variation (CV, %). Une méthode est reproductible si les valeurs de coefficient de variation sont inférieures à 20%.

- ❖ Rendement d'extraction : nous avons procédé à l'analyse en triplicata de 3 échantillons à différentes concentrations [C2= 1 ng/g, C5= 50 ng/g et C8= 150 ng/g].

Les résultats de la validation de la méthode PLE sont satisfaisants (Tableau. IV.5). Pour toutes les substances, **la linéarité** de la méthode, exprimé par le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) est de valeur supérieure à 0,99. A titre d'exemple, la valeur de  $R^2$  varie respectivement de 0,990 pour l'érythromycine à 1 pour la carbamazépine pour une gamme de linéarité variant de 1 ng/g à 150 ng/g.

Comme le coefficient de variation (CV, %) est inférieur à 10 % pour l'ensemble des substances étudiées, la méthode d'extraction PLE est bien **répétable**.

**Tableau IV. 5. Linéarité (R<sup>2</sup>), rendement d'extraction R (%) et coefficient de variation CV (%)**

Famille	Composé	R <sup>2</sup>	R (%)			CV (%)		
			1*	50	150	1	50	150*
Sulfonilamides	Sulfadiazine	0,995	55	59	67	3,6	3,2	2,1
	Sulfabenzamide	0,990	45	51	56	2,9	4,2	3,1
	Sulfadiméthoxine	1,000	40	47	55	3,9	3,6	4,1
	Sulfamerazine	0,995	51	66	79	6,4	2,7	3,5
	Sulfaméthoxazole	0,999	41	47	53	5,3	3,5	3,6
	Sulfanilamide	0,992	58	61	67	3,2	5,4	2,2
	Sulfathiazole	0,999	49	55	62	4,2	2,8	5,6
Tétracyclines	Chlortétracycline	0,999	39	48	54	4,8	3,9	4,0
	Tétracycline	0,999	48	55	62	2,4	2,6	5,7
	Oxytétracycline	0,997	43	50	56	3,9	3,1	3,8
	Minocycline	0,991	ND	37	43	ND	4,5	3,9
	Doxycycline	0,999	65	71	81	3,0	3,0	4,0
Fuoroquinolones	Enrofloxacin	0,999	60	66	72	2,7	3,1	4,7
	Norfloxacin	0,998	51	57	64	6,8	4,6	3,4
	Ofloxacin	0,997	69	74	81	3,0	2,9	4,0
	Orbifloxacin	0,999	40	47	59	3,9	3,6	3,5
	Difloxacin	1,000	51	55	64	6,5	5,8	3,8
	Danofloxacin	0,995	47	55	62	3,9	2,6	5,3
	Ciprofloxacin	0,995	48	55	63	3,9	3,9	2,7
Autres médicaments	Dicyclanil	0,995	35	50	63	4,4	3,1	3,0
	Triméthoprim	1,000	87	90	97	3,0	1,7	1,7
	Tylosine	0,998	46	57	66	4,6	2,9	3,3
	Ampicilline	0,999	49	66	74	4,2	4,2	2,9
	Carbamazépine	1,000	46	51	61	3,6	6,4	5,4
	Monensin	0,999	ND	64	100	ND	4,4	1,6
	Florfénicol	1,000	44	51	65	4,9	6,8	3,3
	Gemfibrozil	0,999	59	70	87	3,5	2,2	1,9
	Erythromycin	0,990	ND	37	51	ND	4,9	6,8

\*Exprimé en ng/g

ND : non défini

Les limites de détection et quantification méthodologiques **MLOD** et **MLOQ** sont satisfaisantes avec des valeurs variant respectivement 0,06 à 0,9 ng/g et de 0,2 à 3 ng/g (Tableau IV.6).

**Tableau IV. 6. Limite de détection méthodologique (MLOD), limite de quantification méthodologique (MLOQ) et coefficient de variation CV (%)**

Famille		CV	MLOQ	MLOD
Sulfonilamides	Sulfadiazine	1,8	3	0,9
	Sulfabenzamide	1,5	0,2	0,06
	Sulfadiméthoxine	1,4	0,2	0,06
	Sulfamerazine	1,9	0,2	0,06
	Sulfaméthoxazole	1,4	0,2	0,06
	Sulfanilamide	1,9	0,2	0,06
	Sulfathiazole	1,6	0,2	0,06
Tétracyclines	Chlortétracycline	1,4	0,2	0,06
	Tétracycline	1,7	0,2	0,06
	Oxytétracycline	1,6	0,5	0,15
	Minocycline	1,1	0,2	0,06
	Doxycycline	2,2	0,2	0,06
Fluoroquinolones	Enrofloxacin	2,0	0,2	0,06
	Norfloxacin	1,7	0,5	0,15
	Ofloxacin	2,2	0,5	0,15
	Orbifloxacin	1,4	0,5	0,15
	Difloxacin	1,7	0,2	0,06
	Danofloxacin	1,7	0,2	0,06
	Ciprofloxacin	1,7	0,2	0,06
Autres médicaments	Dicyclanil	1,6	0,5	0,15
	Triméthoprim	2,7	0,2	0,06
	Tylosine	1,8	0,2	0,06
	Ampicilline	2,0	0,5	0,15
	Carbamazépine	1,5	0,2	0,06
	Monensin	2,0	0,5	0,15
	Florfenicol	1,6	0,5	0,15
	Gemfibrozil	2,1	0,5	0,15
	Erythromycine	1,2	3	0,9

Comme le coefficient de variation (CV), pour le calcul de la reproductibilité, est inférieur à 10% pour l'ensemble des substances étudiées variant de 1,1% pour la minocycline à 2,7 pour le triméthoprim, la méthode est reproductible (Tableau IV.6).

Les sulfonilamides ont des rendements d'extraction qui varient entre 40 et 79%.

Pour les tétracyclines et les fluoroquinolones, les rendements obtenus étaient respectivement 39-81% et de 47 à 81%.

Pour les 9 autres molécules, les rendements varient de 35% à 100%. Pour toutes les molécules, les rendements d'extraction varient fortement en fonction de la concentration du dopage. Plus la concentration est élevée, plus le rendement d'extraction est élevé (Tableau IV.5).

A titre d'exemple pour le gemfibrozil, le rendement d'extraction est de 59 % pour un dopage à 1 ng/g et passe, respectivement, à 70 et 87% pour des dopages de 50 et 150 ng/g. De manière globale, la moyenne du rendement d'extraction pour chaque famille d'antibiotiques est présentée dans le Tableau IV.7.

**Tableau IV. 7. Différents solvants d'extraction et moyenne des rendements d'extraction pour différentes familles d'antibiotiques à trois concentrations de dopage dans les sols**

Composé	Solvant d'extraction	Concentration (ng/g)		
		1*	50*	150*
		Rendement R (%)		
Sulfonilamides	100% Méthanol	48	55	63
Tétracyclines	25/25/50 Méthanol/acétonitrile/0,2 M acide citrique, pH=3	39	52	59
Fluoroquinolones	40/40/20 Méthanol/ acétonitrile/ 0,2 M acide citrique, pH=4,5	52	58	66
Autres médicaments	100% Méthanol	41	60	74
Somme des 28 médicaments		45	57	67

\*exprimé par ng/g

Les moyennes de rendements d'extraction des différentes familles d'antibiotiques varient de 39 à 52 ; de 52 à 60 et de 59 à 74% pour des concentrations de dopage allant respectivement de 1 à 150 ng/g. Les moyennes des rendements d'extraction pour les 28 médicaments sont de 45, 57 et 67% correspondent respectivement à la concentration de dopage de 1 ng/g, 50 ng/g et 150 ng/g.

Ces résultats ont été comparés à ceux issus de la littérature. Pour les sulfonilamides, cette méthode a permis d'obtenir des rendements d'extraction comparables à ceux mentionnés par Garcia-Calan et al., (2013) en utilisant la même technique d'extraction (PLE) (Tableau IV.8).

**Tableau IV. 8. Comparaison des rendements d'extraction des sulfonamides avec les données de la littérature**

Dopage dans le sol à 50 ng/g	Rendement (%)		
	Sulfamérazine	Sulfabenzamide	Sulfathiazole
Ce travail	66	51	55
Garcia-Calan et al. (2013)	62	77	50

Pour les tétracyclines, nous avons trouvé des valeurs comparables à celles de Pamreddy et al., (2012) (Tableau IV.9). Ces derniers ont effectué une PLE sur des boues collectées des cinq différentes stations d'épuration en Espagne en utilisant comme solvant d'extraction un mélange de méthanol/ 0,2 M d'acide citrique à pH=3 (V/V, 50/50).

**Tableau IV. 9. Comparaison des rendements d'extraction des tétracyclines avec les données de la littérature**

	Rendement (%)			
	Oxytétracycline	Tétracycline	Chlortétracycline	Doxycycline
Dopage à 150 ng/g (Ce travail)	56	62	54	81
Dopage à 500 ng/g (Pamdelly et al.(2012))	94	100	98	98

Pour les fluoroquinolones, Golet et al., (2002) ont rapporté des rendements d'extraction par la méthode PLE variant entre 50 et 70% pour une concentration de dopage de 200 ng/g. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec notre protocole expérimental. D'autres travaux ont rapporté des résultats de rendements d'extraction supérieurs à ceux obtenus dans cette étude. Ceci pourrait s'expliquer par la nature de sols différents.

En effet, nous attendons des résultats de rendement d'extraction différents pour des sols limoneux ou sableux ou encore des boues des stations d'épuration. Ces types de matrices solides engendrent probablement moins d'interaction entre les composés à extraire et la matrice (Jacobsen et al., 2004 et Kumar et al., 2005). Les sols utilisés dans ce travail contiennent des pourcentages très importants d'argile variant de 9,5 à 31%.

Les études antérieures se sont souvent focalisées sur une ou deux familles d'antibiotiques. Ceci rend l'optimisation plus aisée. Dans ce travail, l'étude a été focalisée sur l'optimisation d'une méthode qui permet d'extraire simultanément 28 médicaments regroupant plus de 4 familles d'antibiotiques. Les rendements d'extraction dépendent fortement de la nature des sols.

Cette méthode d'optimisation validée a permis de détecter et de quantifier simultanément l'ensemble des 28 médicaments présents dans les sols à l'état de traces.

Dans tous les cas, sauf pour l'érythromycine et le sulfathiazole, la limite des teneurs de détection est inférieure à 1 ng/g. L'érythromycine et le sulfathiazole peuvent être quantifiés à partir de 3 ng/g (Tableau IV.5). Ces valeurs de MLOD et MLOQ sont comparables ou inférieures à celles rapportées dans la littérature. Pamdelly et al., (2013) ont mentionné des valeurs de MLOD élevées pour les tétracyclines allant de 3,2 ng/g pour l'oxytétracycline jusqu'à 13 ng/g pour la tétracycline alors que les valeurs que nous avons obtenues sont de 0,2 ng/g pour l'ensemble des tétracyclines étudiées. Garcia-Calan et al., (2013) ont rapporté des valeurs MLOD variant respectivement de 0,34 ng/g, 0,24 ng/g et 0,28 ng/g pour la sulfadiazine, la sulfadiméthoxine et la sulfaméthoxazole. Pour les fluoroquinolones, les valeurs de MLOQ obtenues par la méthode développée par Lillenberg et al., (2009) sont de 0,8 ng/g pour l'ofloxacine et 1,8 ng/g pour la ciprofloxacine. Dans le cas de ce travail, pour les fluoroquinolones, nous avons atteint des valeurs beaucoup plus faibles comprises entre 0,2 ng/g et 0,5 ng/g.

La répétabilité, la reproductibilité (exprimées par les valeurs des deux coefficients de variation), la limite de détection méthodologique (MLOD) et la limite de quantification méthodologique (MLOQ) prouvent une bonne performance de la méthode d'extraction PLE optimisée.

## Références bibliographiques

- Aga, D. S., O'Connor, S., Ensley, S., Payero, J. O., Snow, D., Tarkalason, D., 2005. Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in Manure-Amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Agr and Food Chem* 53, 7165.
- Alda, M. J. L. d., Diaz-Cruz, S., Petrovic, M., Barcelo, D., 2003. Liquid chromatography (tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *J of ChromatogrA* 1000: 503.
- Armenta, S., Garrigues, S., Guardia, M. d. I., 2008. Green Analytical Chemistry. *Trends in Anal Chem* 27, 497.
- Blackwell, P. A., Lützhof, H. C. H., Ma, H. P., Halling-Sorensen, B., Boxall, A. B. A., Kay, P., 2004. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. *Talanta* 64, 1058.
- Capdeville, M. J., Pardon, P., Budzinski, H., 2010. Methodology development (ASE, SPE, LC/MS/MS) and application for the analysis of antibiotics in liquid and solid pig manure. 20<sup>th</sup> SETAC. Seville, Spain.
- Carabias-Martinez, R., Rodriguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., 2006. Determination of endocrine-disrupting compounds in cereals by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry Study of background contamination. *J Chromatogr A* 1137, 207.
- Diaz-Cruz, M. S., Barcelo, D., 2007. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. *Trends in Anal Chem* 26, 637.
- Durán-Alvarez, J. C., Becerril-Bravo, E., Castro, V. S., Jiménez, B., Gibson, R., 2009. The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 78, 1159.
- Ferrer, I., Furlong, E. T., 2002. Accelerated solvent extraction followed by on-line solid-phase extraction coupled to ion trap LC/MS/MS for analysis of benzalkonium chlorides in sediment samples. *Anal Chem* 74, 1275.
- Garcia-Galan, M. J., Diaz-Cruz, S., Barcelo, D.; 2013. Multiresidue trace analysis of sulfanilamide antibiotics and their metabolites in soils and sewage sludge by pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-electrospray-quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1275, 32-40.
- 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. *Anal Chem* 74, 5455-5462.
- Hansen, M., Björklund, E., Krogh, K. A., Halling-Sorensen, B., 2009. Analytical strategies for assessing ionophores in the environment. *Trends in Anal Chem* 28, 521.
- Jacobsen, A. M., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, F., Hansen, S. H., 2004. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1038, 157.
- Karci, A., Balcioglu, I. A., 2009. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Sci Tot Env* 407, 4652.
- Kim, S. C., Carlson, K., 2005. LC-MS2 for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices. *Trends in Anal Chem* 24, 635.
- Kumar, K., Gupta, S. C., Chander, Y., Singh, A. K., 2005. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy* 87, 1.

- Lillenberg, M., Yurchenko, S., Kipper, K., Herodes, K., Pihl, V., Sepp, K., Lõhmus, R., Nei, L., 2009. Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216, 5949.
- O'Connor, S., Aga, D. S., 2007. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification. *Trends in Anal Chem* 26, 456.
- Pamreddy, A., Hidalgo, M., Haval, J., Salvado., V., 2013. Determination of antibiotics (tetracyclines and sulfonilamides) in biosolids by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J chromatogr A* 1298, 68-75.
- Schlusener, M. P., Bester, K., 2006. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Env Pol* 143, 565.
- Schlusener, M. P., Spiteller, M., Bester, K., 2003. Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1003, 21.
- Seifrtová, M., Nováková, L., Lino, C., Pena, A., Solich, P., 2009. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analy Chem Acta* 649, 158.
- Vazquez-Roig, P., Segarra, R., Blasco, C., Andreu, V., Pico, Y., 2010. Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217, 2471.

# **Chapitre V**

## **Application**

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats de la méthodologie analytique validée appliquée à des eaux potables et des eaux usées ainsi qu'à des matrices solides contaminées par des résidus médicamenteux.

La procédure permettant l'analyse de composés en phase liquide a été appliquée à onze échantillons d'eaux potables et usées [six échantillons provenant du nord de la France et cinq provenant du nord de la Tunisie].

La quantification a été réalisée par étalonnage interne. Pour la matrice solide, la méthode basée sur l'extraction PLE a permis d'analyser six échantillons solides, provenant de la matière en suspension des mêmes échantillons recueillis du nord de la France.

## **I. Analyse des échantillons d'eau potable et d'eau usée**

La méthode développée au chapitre III, a été appliquée pour l'analyse d'échantillons d'eaux de surface.

### **I.1. Description des différents sites d'échantillonnage**

#### **I.1.1. En Tunisie**

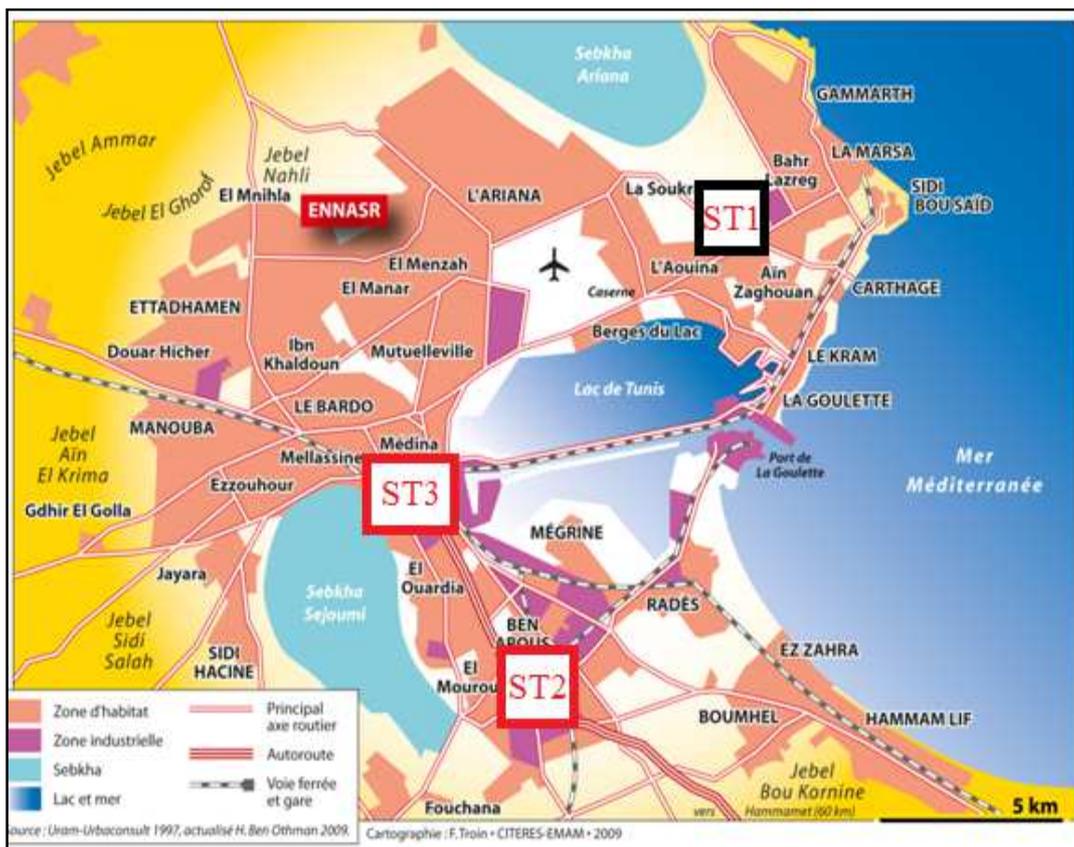
La campagne d'échantillonnage a été effectuée au début du printemps 2014 du 03/03/2014 au 25/03/2014. Tous les échantillons ont été prélevés pendant 10 jours successifs.

Ces échantillons ont été prélevés dans le grand Tunis (Figure V.1) présente la localisation des sites d'échantillonnage. Ces zones présentent des activités à la fois industrielles et agricoles.

(i) La première station d'épuration est Chotrana1 (ST1) située (Chotrana 1 Ariana). Le traitement biologique de l'étang aéré est combiné à des techniques de digestion. C'est la plus grande station d'épuration de la capitale Tunis. La station reçoit des effluents principalement domestiques.

(ii) La deuxième STEP est située dans la Médina Jadida-Ben Arous (ST2). Elle a été opérationnelle à partir de 1982 et le volume d'eau à traiter prévu est de 37500 m<sup>3</sup> / jour soit 9 million m<sup>3</sup>/an. Cependant, elle n'était pas opérationnelle au cours de la campagne d'échantillonnage. Les échantillons sont ceux de l'entrée. Ben Arous est la plus grande ville industrielle de Tunis et en particulier d'industrie pharmaceutique. De ce fait, la station d'épuration de Ben Arous reçoit principalement les effluents industriels y compris les effluents de l'industrie pharmaceutique.

(iii) Le centre hospitalier de Bab Saadoun (ST3) qui regroupe 6 différents hôpitaux. Il est le plus grand centre de soins de santé en Tunisie.



**Figure V. 1. Localisation des sites d'échantillonnage en Tunisie**

ST1 : Station d'épuration de Chotrana 1  
 ST2: Station d'épuration de Ben Arous  
 ST3 : Centre hospitalier de Bab Saadoun  
 (Uram-Urbaconsult 1997, H. Ben Othmen 2009)

### I.1.2. En France

Les quatre sites français d'échantillonnage choisis pour ce travail sont situés dans le Haut de France (Figure.V.2). Même si ces zones présentent des activités industrielles et agricoles lourdes, aucune donnée n'était auparavant disponible pour les niveaux de contamination par les résidus médicamenteux.

(i) La lagune aérée Fresnoy (S1) reçoit les effluents urbains, (ruissellement agricole activités d'élevage). Cette lagune présente un système aéré, entouré principalement par des champs d'agriculture où l'épandage de fumier a été pratiqué de façon permanente.

(ii) La rivière Canche à Fillièvres (S2), c'est une rivière de longueur 88 km recevant de nombreux effluents et diverses émissions industrielles et urbaines.

(iii) La station d'épuration d'Arras (S3), est située à Saint-Laurent Blangy et reçoit des eaux usées domestiques.

(iiii) La rivière de Cojeul (S4), reçoit des effluents urbains, des effluents d'élevage (bovins), et du ruissellement agricole.



Figure V. 2. Localisation des sites d'échantillonnage en France

- S1 : Lagune aérée de Fresnoy
- S2 : Rivière de la Canche
- S3 : STEP d'Arras
- S4 : Rivière de Cojeul

## **II. Contamination des matrices liquides par les antibiotiques**

Tous les échantillons d'eaux ont été collectés dans des flacons ambrés. Dès l'arrivée au laboratoire, les échantillons d'eaux ont été directement filtrés en utilisant préalablement des filtres en microfibrilles de verre calcinés (0,7  $\mu\text{m}$  Whatman) puis conservés à  $-5^{\circ}\text{C}$ .

Les onze échantillons d'eaux de surface de France et de Tunisie ont été analysés selon la méthode décrite dans le chapitre III. Chaque échantillon analysé est de 1500 mL. Les étalons internes ont été introduits à une concentration de 1  $\mu\text{g/L}$ .

Les résultats obtenus (Tableaux V.1-V.2) prouvent que la méthode mise au point est suffisamment sélective et sensible pour permettre l'analyse d'ultra-traces des différents composés ciblés dans les eaux de surface.

## II.1. Analyse globale des résultats d'analyse des échantillons prélevés en Tunisie

**Tableau V. 1. Concentrations des composés cibles dans différents échantillons d'eaux prélevées en Tunisie**

Concentration des résidus étudiés (ng/L), n <sub>≥</sub> 3					
Composés	Entrée STEP Chotrana	Sortie STEP Chotrana	STEP Ben Arous Entée/sortie	Puits du centre hospitalier	Robinet du centre hospitalier
Chlortétracycline	38,1±12,7	6,3±1,4	39,3±9,0	<0,2	1,3±0,2
Doxycycline	4,5±1,2	<0,2	3,1±1,1	8,7±2,0	<0,2
Minocycline	11,2±1,3	8,3±0,8	39,8±9,5	5,6±0,4	<0,2
Oxytétracycline	<LOQ	<0,5	<0,5	4,5±1,3	1,1±0,0
Tétracycline	9,6±0,8	10,1±4,1	<0,2	5,2±2,0	2,9±0,7
<b>TQs</b>	<b>63,5±16,0</b>	<b>24,8±6,3</b>	<b>82,2±19,6</b>	<b>24±5,7</b>	<b>5,3±0,9</b>
Ciprofloxacine	<0,2	<0,2	5,7±1,6	<0,2	1,0±0,0
Danofloxacine	27,7±3,4	17,4±0,4	11,2±3,4	12,2±0,7	4,3±1,6
Difloxacine	5,6±3,2	<0,2	3,1±0,8	7,3±1,2	<0,2
Enrofloxacine	9,2±0,1	<0,2	5,6±1,2	<0,2	1,1±0,3
Norfloxacine	<0,5	<0,5	6,6±2,8	<0,5	<0,5
Ofloxacine	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Orbifloxacine	5,5±0,0	2,9±0,3	3,3±0,4	5,1±1,0	<0,5
<b>FQs</b>	<b>48±6,7</b>	<b>20,3±0,7</b>	<b>35,5±10,2</b>	<b>24,6±2,9</b>	<b>6,4±1,9</b>
Sulfabenzamide	1,7±0,0	<0,2	2,6±1,0	<0,2	1,8±0,5
Sulfadiméthoxine	14,2±1,2	10,6±1,4	2,4±0,9	3,4±1,4	1,0±0,2
Sulfadiazine	16,1±0,8	7,8±1,1	<0,2	<0,2	<0,2
Sulfaméthoxine	2,2±0,4	1,4±0,5	3,3±1,0	3,3±0,9	1,8±0,1
Sulfamerazine	4,5±0,2	1,2±0,7	2,4±0,7	4,3±2,0	1,7±0,1
Sulfanilamide	<0,2	<0,2	1,6±0,4	<0,2	0,9±0,3
Sulfathiazole	1,9±0,0	2,0±0,4	2,4±0,1	3,7±0,7	1,7±1,1
<b>SNs</b>	<b>40,6±2,6</b>	<b>23±4,1</b>	<b>14,7±4,1</b>	<b>14,7±5,0</b>	<b>8,9±2,3</b>
Ampicilline	1,5±0,5	<0,5	1,2±0,5	0,5±0,0	<0,5
Carbamazépine	29,1±5,7	22,1±8,1	40,8±8,7	12,4±2,5	3,0±0,8
Dicyclanil	5,3±1,6	<0,5	6,2±0,8	<0,5	<0,5
Erythromycin	<0,2	<0,2	1,5±0,1	6,2±4,9	<0,2
Florfénicol	7,6±1,9	6,1±28	3,0±1,7	3,7±1,3	<1,2
Gemfibrozil	17,9±3,4	11,4±4,7	3,5±4,1	4,0±0,8	6,8±1,9
Monensin	10,0±4,2	5,3±1,4	1,4±0,1	1,5±0,2	<0,5
Triméthoprim	14,5±4,2	26,4±3,8	8,6±2,7	16,7±2,1	6,4±0,9
Tylosin	1,8±0,3	<0,2	1,1±0,1	1,2±0,1	<0,2
Autres médicaments	<b>87,7±21,8</b>	<b>71,3±20,8</b>	<b>67,3±18,8</b>	<b>46,2±11,9</b>	<b>16,2±3,6</b>
<b>28 produits</b>	<b>239,8±47</b>	<b>139,4±31,9</b>	<b>199,7±52,7</b>	<b>109,5±25,5</b>	<b>36,8±8,7</b>

Dans les différents échantillons, la concentration des résidus médicamenteux est variable (Tableau. V.1). Les valeurs des concentrations les plus élevées ont été trouvées à l'entrée de **la station d'épuration de Chotrana** suivie par l'effluent de **la station d'épuration de Ben Arous** avec respectivement  $239,8 \pm 47,1$  et  $199,7 \pm 52,7$  ng / L.

Pour de nombreux pays européens (Espagne, France, Allemagne et Belgique), Verlicchi et al. (2010) ont rapporté des niveaux plus élevés pour les fluoroquinolones telle que la ciprofloxacine et l'ofloxacine dont la concentration varie respectivement entre 1 ng / L jusqu'à 100 µg / L et d'environ 0,5 ng / L à plus de 10 µg / L.

Parmi les 28 médicaments, la chlortétracycline ( $85 \pm 23,3$  ng/L), le minocycline ( $64,9 \pm 12$  ng/L), le danofloxacine ( $72,8 \pm 9,5$  ng/L), la carbamazépine ( $107,4 \pm 25,8$  ng/L) et le gemfibrozil ( $43,6 \pm 14,9$  ng/L) ont été les plus quantifiés avec des concentrations élevées (Tableau V.1).

L'ofloxacine a été détecté à une concentration inférieure à La valeur de la limite de quantification (LOQ) pour tous les échantillons, alors que le norfloxacine a été seulement détecté dans l'effluent de la **STEP de Ben Arous** à une valeur de  $6,6 \pm 2,8$  ng / L.

La concentration individuelle détectée varie fortement en fonction de l'origine de l'échantillon.

Le dicyclanil n'a été détecté que dans les eaux usées non traitées (Tableau V.1).

Parmi les 28 résidus de médicaments sélectionnés :

- 15 médicaments ont été détectés dans **l'eau potable du robinet** au voisinage du centre hospitalier de Bab Saadoun.
- 18 médicaments dans **le puits du voisinage** du centre hospitalier de Bab Saadoun.
- 24 médicaments à **l'entrée de la STEP de Ben Arous.**
- 25 médicaments à **la sortie de la STEP de Chotrana.**
- 22 médicaments à **l'entrée de STEP de Chotrana.**

Les niveaux de concentration détectés sont en bon accord avec ceux trouvés dans la littérature (Tahrani et al., 2015-2016).

Des niveaux élevés de résidus de médicaments ont été détectés dans les effluents en amont des STEP, atteignant respectivement  $239,8 \pm 47,1$  et  $199,7 \pm 52,7$  ng/L pour Chotrana et Ben Arous. Le traitement de ces deux stations d'épuration se sont avérés inefficaces pour traiter ce type des micropolluants, comme a montré plusieurs recherches (Tahrani et al., 2015 et Tahrani et al., 2016).

**La station de Ben Arous** était non opérationnelle, au moment de l'échantillonnage, ceci explique les niveaux de concentration trouvés à l'entrée et à la sortie de la station.

Pour **la station d'épuration de Chotrana**, nous observons un rabattement moyen de 61, 58, 43 et 34% pour les familles des tétracyclines, les fluoroquinolones, les sulfonilamides et autres antibiotiques. Le rendement de rabattement élevé détecté pour la STEP de Chotrana I (48%) pourrait être attribué au système de traitement qui utilise deux étangs aérés pour la digestion (étang de digestion aéré) (Tahrani et al., 2015).

Des concentrations similaires à celles présentées ici ont été rapportés par plusieurs programmes de surveillance menées dans différents pays où ils ont analysé les eaux usées urbaines (Chang et al., 2010 et Peng et al., 2011).

Dans **l'eau potable de robinet** et celui du **puits au voisinage du centre hospitalier de Bab Saadoun**, sont comme prévu, les concentrations trouvées sont beaucoup plus faibles que ceux détectés dans les eaux usées, puisque l'origine des résidus médicamenteux n'étant pas la même.

Dans une large mesure, les résidus médicamenteux sélectionnés sont présents à un niveau quantifiable dans l'eau de robinet et l'eau de puits recueillies auprès du centre hospitalier de Tunis.

## **II.2. Analyse globale des résultats d'analyse des échantillons prélevés en France**

Toutes les substances étudiées ont été détectées dans tous les échantillons analysés (sauf la sulfabenzamide qui a été seulement détectée dans 4 échantillons) avec des concentrations variables (Tableau V.2).

La concentration totale la plus élevée a été déterminée à la sortie de la **STEP d'Arras** avec  $590,7 \pm 184,1$  ng/L.

L'entrée de la **lagune de Fresnoy** présente aussi une concentration totale remarquable avec  $470,9 \pm 136,4$  ng/L. Ceci peut être dû au fait que les composés choisis sont largement utilisés pour les activités d'élevage. En effet, la **lagune de Fresnoy** reçoit principalement les ruissellements des zones agricoles où il y a la pratique de l'épandage de fumier.

**Tableau V. 2. Concentrations des composés cibles dans différents échantillons d'eaux prélevées en France**

<b>Concentration (ng/L), n ≥3</b>						
<b>Composés</b>	<b>Rivière Canche</b>	<b>Rivière Cojeul</b>	<b>Entrée STEP d'Arras</b>	<b>Sortie STEP d'Arras</b>	<b>Entrée de lagune Fresnoy</b>	<b>Sortie de lagune Fresnoy</b>
<b>Chlortétracycline</b>	3,4±4,3	2,5±2,5	6,7±3,6	8,6±2,8	14,4±1,5	17±3,5
<b>Oxytétracycline</b>	0,6±0,1	0,9±0,1	0,8±0,3	0,8±0,4	0,6±0,3	0,6±0,4
<b>Tétracycline</b>	13±1,8	8,5±1,8	19±3	0±0	11,9±2,7	6,7±2,9
<b>Doxycycline</b>	3,6±3,4	4,9±1,4	7,4±0,8	7,9±1,3	9,7±4	12,6±4,2
<b>TCs</b>	<b>20,6±9,6</b>	<b>16,8±5,8</b>	<b>33,9±7,1</b>	<b>17,3±4,5</b>	<b>36,6±8,5</b>	<b>23,4±11</b>
<b>Danofloxacin</b>	55,6±9,8	71,0±0,5	50,0±13,3	55,9±11,2	36,0±9,1	43,4±10,4
<b>Difloxacin</b>	27,7±2,2	30,5±2,1	19,6±11,5	32,8±2,7	21,5±10,2	24,5±1,5
<b>Enrofloxacin</b>	32,4±0,3	32,6±6,7	24,2±13,4	31,7±3,3	20,2±10,6	23,0±3,8
<b>Ciprofloxacin</b>	6,6±1,0	6,4±0,9	4,4±1,8	4,8±1,5	3,7±0,3	5,1±4,1
<b>Norfloxacin</b>	7,7±1,1	7,1±0,4	6,1±2,9	6,7±0,5	4,9±1,2	4,2±1,1
<b>Ofloxacin</b>	6,9±0,5	6,6±0,4	7,5±2,6	6,7±0,8	5,1±0,4	4,4±1,1
<b>Orbifloxacin</b>	25,0±3,6	27,7±6,3	23,1±7,0	30,4±7,2	22,3±7,2	23,9±2,9
<b>FQs</b>	<b>161,9±18,5</b>	<b>181,9±17,3</b>	<b>117,8±58,6</b>	<b>169,0±27,2</b>	<b>113,7±0,9</b>	<b>128,5±20,5</b>
<b>Sulfabenzamide</b>	0,4±0,6	0	0,9±0,0	0	1,6±2,0	0,3±0,2
<b>Sulfadiazine</b>	20,2±20,6	15,0±6,9	19,7±9,2	21,5±5,8	27,2±10,3	9,5±3,1
<b>Sulfadiméthoxazole</b>	17,5±1,6	16,8±3,9	20,8±2,3	20,7±4,7	22,4±2,1	18,9±3,3
<b>Sulfaméthazole</b>	9,5±5,9	9,2±3,8	13,0±7,1	12,6±5,1	17,6±6,0	11,8±5,5
<b>Sulfaméthazine</b>	11,7±0,9	11,1±1,4	15,5±2,6	11,9±2,0	11,6±1,2	12,5±1,5
<b>Sulfanilamide</b>	4,5±3,3	2,4±3,0	2,5±2,9	2,4±3,5	0,4±0,3	2,5±3,7
<b>Sulfathiazole</b>	8,1±8,5	7,6±7,2	13,0±11,2	12,0±10,2	15,6±9,1	10,8±6,8
<b>SNs</b>	<b>71,9±41,4</b>	<b>62,1±26,2</b>	<b>85,4±35,3</b>	<b>81,1±31,1</b>	<b>96,4±3,1</b>	<b>66,3±24,1</b>
<b>Carbamazépine</b>	16,5±1,2	17,2±2,7	27,4±2,4	24,7±4,2	23,9±4,2	29,4±7,3
<b>Monrnsin</b>	13,0±9,5	14,2±10,8	8,8±2,5	14,0±11,1	11,9±2,8	14,9±10,6
<b>Triméthoprim</b>	22,7±3,4	21,9±4,7	25,8±3,0	28,7±5,1	24,2±2,0	23,5±5,4
<b>Dicyclanil</b>	23,2±5,7	22,1±2,7	31,7±6,1	29,3±7,4	26,2±10,0	30,3±4,9
<b>Ampicilline</b>	0,8±0,2	0,7±0,4	0,3±0,3	0,5±0,4	4,7±3,7	6,0±1,8
<b>Gemfibrozil</b>	155,2±58,7	166,5±72,4	98,4±33,8	187,4±87,0	84,3±23,1	135,8±50,6
<b>Tylosin</b>	8,1±2,3	9,5±2,4	9,2±1,0	10,2±2,4	4,3±7,1	8,9±2,2
<b>Totale</b>	<b>473,0±156,1</b>	<b>534,4±150,9</b>	<b>466,9±149,2</b>	<b>590,7±184,1</b>	<b>470,9±136,4</b>	<b>506,0±147,9</b>

La station d'Arras reçoit principalement les effluents urbains. Les fluoroquinolones sont les antibiotiques les plus détectés dans ces divers échantillons avec une concentration totale de 181,9± 17,3 ng/L dans la rivière Cojeul et de 169,0± 27,2 ng/L dans la sortie de la STEP d'Arras. Les tétracyclines sont les moins présents dans les différents échantillons

analysés avec des concentrations de  $16.8 \pm 5.8$  ng/L dans **la rivière Cojeul** et  $36,6 \pm 8,5$  ng/L à **la sortie de la STEP d'Arras**.

Le gemfibrozil est l'espèce dominante avec des concentrations respectivement de  $187,4 \pm 87,0$  et  $135,8 \pm 50,6$  ng / L dans **les effluents de la STEP Arras et la lagune de Fresnoy**. Ces concentrations sont similaires à celles rapportées par Gros et al., (2013).

Le rabattement des 26 médicaments sélectionnés à la **STEP d'Arras et la lagune de Fresnoy** sont faibles. En moyenne, la concentration a été réduite de 40% pour les tetracyclines qui sont éliminés par le système de traitement de la **station d'épuration d'Arras** alors que le rabattement est négligeable dans la lagune **aérée de Fresnoy**.

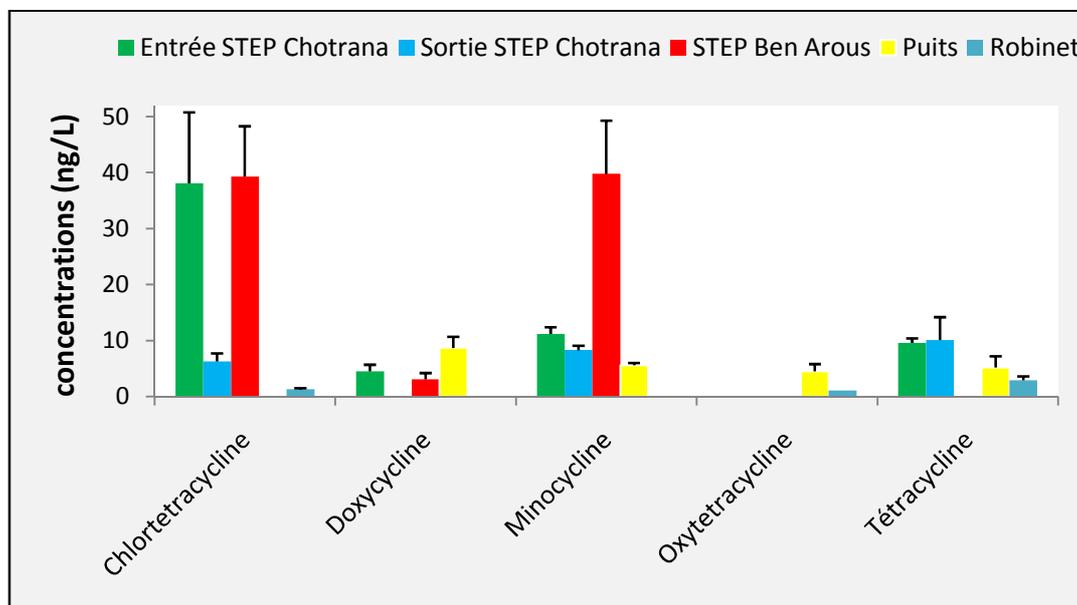
Les produits pharmaceutiques dont le rabattement par des procédés de traitement est faible, peuvent se retrouver dans les eaux de surface (Metcalfé et al., 2003). Les concentrations individuelles des médicaments sélectionnés varient en fonction du traitement de la STEP.

Le gemfibrozil et la danofloxacin ont été détectés à des niveaux élevés dans les **deux rivières**. Les travaux ont rapporté que le gemfibrozil a été détecté avec une concentration croissante dans des conditions d'écoulement élevés et sa dissipation a été jugée lente (Tamtam et al., 2008 et Writer et al., 2013).

## II.3. Traces de tétracyclines

### II.3.1 En Tunisie

Parmi les 5 tétracyclines, la chlortétracycline et la minocycline ont été retrouvés avec des concentrations dominantes aussi bien dans les deux STEP de Chotrana et Ben Arous (Figure. V.3).



**Figure V. 3. Concentrations des tétracyclines dans les différents échantillons d’eaux prélevées en Tunisie**

La chlortétracycline a été détectée avec des concentrations significatives environ 40 ng / L dans les entrées des deux STEP de Chotrana et Ben Arous. La minocycline a été détectée à une concentration supérieure à 40 ng / L à l’entrée de la STEP de Ben Arous, mais sa concentration est 3 fois inférieure à l’entrée de la station de Chotrana.

Pour le doxycycline, l’oxytétracycline et la tétracycline, la concentration moyenne détectée dans le puits au voisinage du centre hospitalier ne dépasse pas 10 ng/L. La concentration de l’oxytétracycline, une était inférieure à la limite de détection (LOQ). La concentration de la doxycycline est inférieure à la LOD à la sortie de STEP de Chotrana, ce qui indique un rabattement élevé de concentration de ce produit.

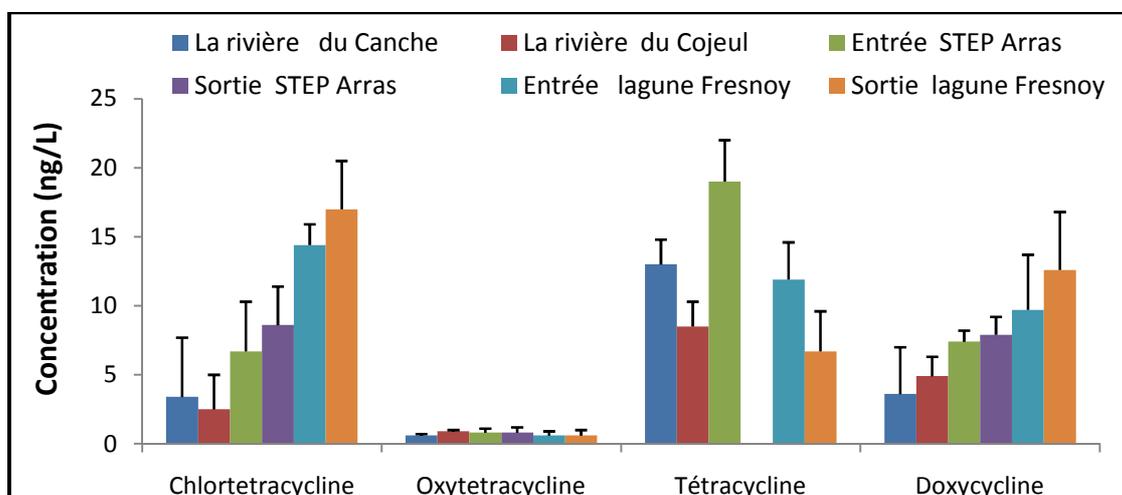
Le rabattement des concentrations entre l’entrée et la sortie des stations d’épuration est dû probablement à une dégradation des résidus médicamenteux.

La tétracycline a été détectée dans dans tous les échantillons, sauf à la STEP de Ben Arous.

La plupart des produits est détecté à différentes concentrations dans au moins 3 échantillons mis à part l’oxytétracycline.

## II. 3.2 En France

Les tétracyclines ont été détectées dans l'ensemble des 6 sites étudiés à l'exception de la tétracycline qui a été détectée dans 5 sites (Figure V.4).



**Figure V. 4. Concentrations des tétracyclines dans les différents échantillons d'eaux prélevés en France**

La chlortétracycline présente les concentrations les plus significatives avec  $17 \pm 3,5$  ng/L à la sortie de la lagune aérée de Fresnoy.

Les concentrations de la doxycycline et de la chlortétracycline à la sortie des STEP sont supérieures à celles de l'entrée. Un phénomène bio-chimique se produit probablement entre l'entrée et la sortie des STEP et vient s'ajouter au transfert des résidus médicamenteux. A titre d'exemple, la tétracycline peut se transformer en épitétracycline, épioxytétracycline et d'autres produits (Skraskova et al., 2013).

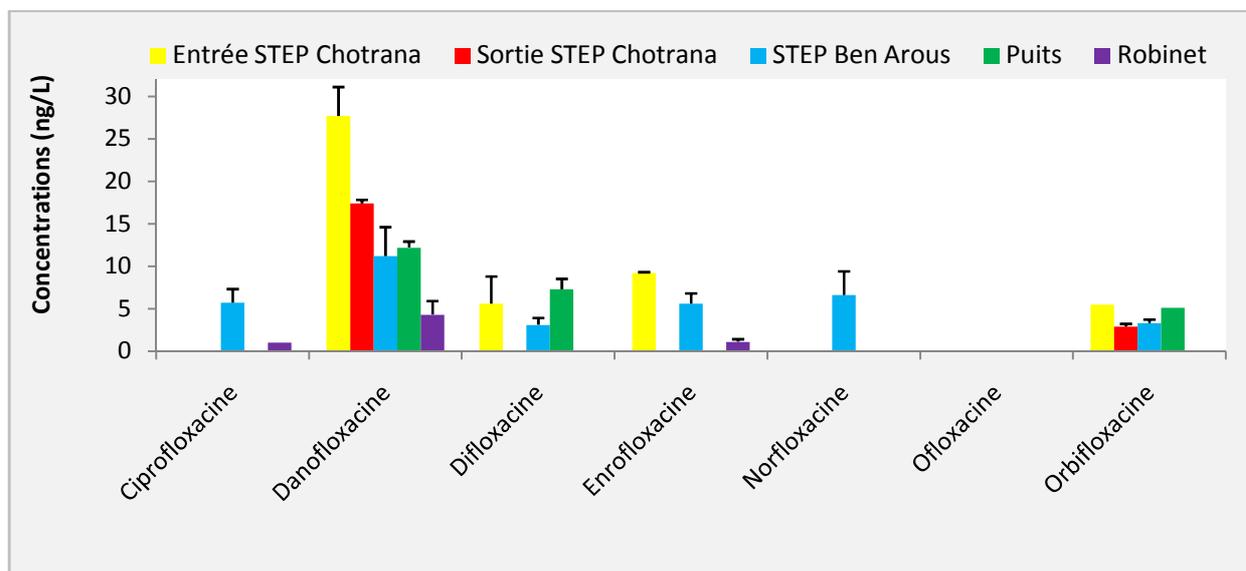
L'oxytétracycline a été détectée à des faibles valeurs. Deux hypothèses sont possibles : utilisation réduite dans les régions de prélèvement ou encore une dégradation des résidus dans l'environnement.

La tétracycline était l'antibiotique vétérinaire le plus détecté dans l'environnement naturel : les deux rivières avec respectivement  $13 \pm 1,8$  et  $8,5 \pm 1,8$  ng/L dans la Canche et le Cojeul. En outre, les deux rivières sont entourées par des zones agricoles pratiquant l'épandage de fumier qui pourrait être une source permanente de contamination.

Le taux de rabattement de la concentration de la tétracycline par le système de traitement de la STEP d'Arras est de 100%, tandis que le taux de celui du système de lagunage de Fresnoy est de 56%. Les concentrations des tétracyclines sont similaires à celles rapportées dans le milieu aquatique de Jiangnan Plain en Chine centrale (Tong et al., 2014).

## II.4. Traces de fluoroquinolones

### II.4.1 En Tunisie



**Figure V. 5. Concentrations des fluoroquinolones dans les différents échantillons d’eaux prélevés en Tunisie**

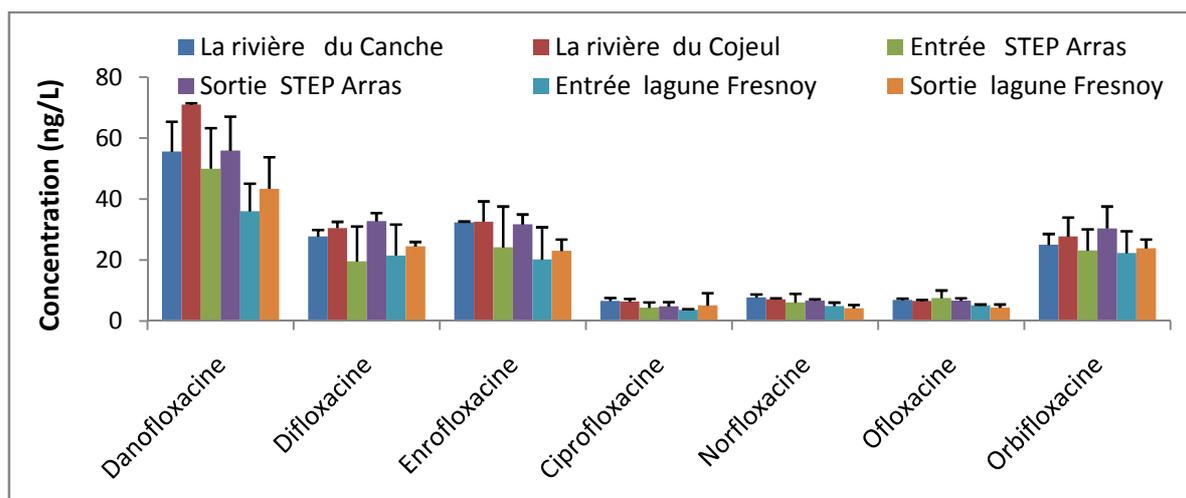
Les fluoroquinolones sont utilisés comme médicaments vétérinaires à des fins thérapeutiques. Cependant, leur concentration élevée peut causer des problèmes pour l’homme et l’environnement en raison de leur développement cancérigène et leur potentiel de résistance aux antibiotiques chez les animaux (Tong et al., 2009). Tous les composés (à l’exception de l’ofloxacin) sont détectés à l’entrée de la station d’épuration de Ben Arous variant de 3,1 ng / L pour la difloxacin jusqu’à 11,2 ng / L pour le danofloxacin.

Le difloxacin et l’enrofloxacin détectés à l’entrée, ne sont plus détectés à la sortie de STEP de Chotrana (Figure. V.5), sont peut être dégradés lors du traitement à la station (He et al., 2014). Il a été constaté qu’ils peuvent être partiellement fixés par sorption ou encore par photo-dégradation (Halling-Sorensen et al., 1998).

La concentration la plus élevée a été trouvée pour le danofloxacin avec une concentration de 4,3 ng / L dans l’eau potable de robinet du centre hospitalier et de 27,7 ng / L en entrée de la STEP de Chotrana. Le taux de rabattement par le système de traitement de la STEP de Chotrana est de 63%. Le danofloxacin a été détecté dans les 5 échantillons étudiés.

L’orbifloxacin a été détecté dans 4 échantillons à différentes concentrations, son rabattement est de 52%. Finalement, l’ofloxacin présente des concentrations inférieures à 0,5 ng/L (LOD) dans l’ensemble des 5 sites étudiés.

## II.4.2 En France



**Figure V. 6. Concentrations des fluoroquinolones dans les différents échantillons d’eaux prélevés en France**

Toutes les fluoroquinolones ont été détectées dans tous les échantillons analysés. Le danofloxacine a été détecté avec des concentrations les plus élevées qui atteignent  $71 \pm 0,5$  ng / L dans la rivière de la Canche.

Pour le danofloxacine, la difloxacine, l’enrofloxacine et l’orbifloxacine, les concentrations à la sortie de la station d’épuration d’Arras sont plus élevées que celle à l’entrée (même phénomène que les tétracyclines).

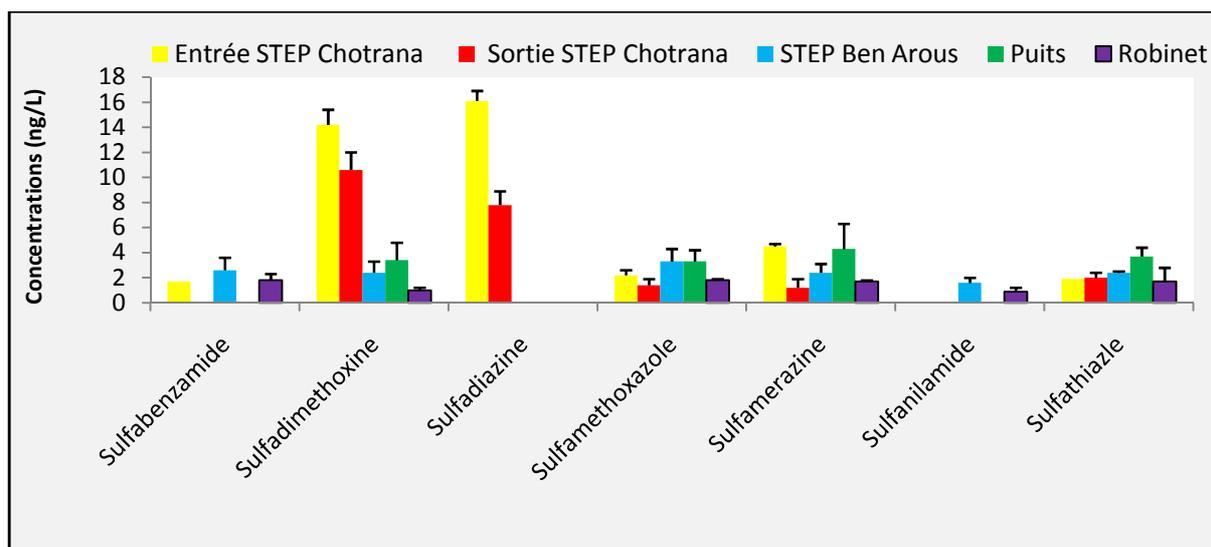
De fortes concentrations de fluoroquinolones ont été trouvées dans les rivières Cojeul et Canche. Ces valeurs élevées peuvent être expliquées par le fait que les fluoroquinolones sont persistantes et non-dégradables dans l’environnement aquatique tels que les rivières et les cours d’eau (Ke et al., 2014).

En raison de leur stabilité et leur utilisation médicale importante, les fluoroquinolones ont été classés par l’Organisation Mondiale de la Santé comme des antibiotiques "résistants" (Collin et al., 2009). Ils sont détectés à une concentration élevée dans le milieu aquatique.

Adachi et al. (2013) ont signalé des concentrations de fluoroquinolones de 570 ng / L dans le milieu aquatique à Osaka (Japon). Les concentrations de l’ofloxacine, du ciprofloxacin, du danofloxacine et du norfloxacin trouvées dans les rivières Canche et Cojeul sont similaires à celles rapportées dans les rivières espagnoles (Gros et al., 2013). La concentration de l’ofloxacine est dans la même gamme que celle de la Seine, France <LOQ - 55 ng / L (Tamtam et al., 2008) et de l’eau de surface urbaine (0,3 à 990 ng / L) à Beijing (Chine) (Li et al., 2015).

## II.5. Traces de sulfonilamides

### II.5.1 En Tunisie



**Figure V. 7. Concentrations des sulfonilamides dans les différents échantillons d’eaux prélevés en Tunisie**

La concentration de l’ensemble des sulfonilamides sont inférieures à la concentration des tétracyclines et des fluoroquinolones.

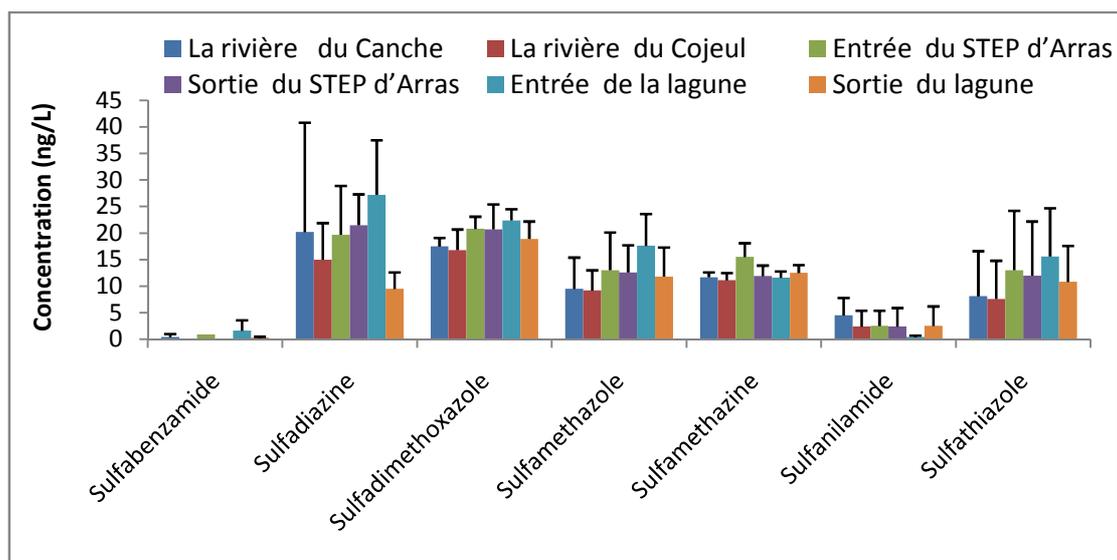
Les sulfanilamides ont été détectées non seulement dans les stations d’épuration, mais aussi dans le robinet et l’eau de puits (Figure. V.7). Leur présence pourrait être nocive pour la santé humaine et la nécessité de renforcer le traitement de l’eau potable (Sukul et al., 2006).

La sulfadiméthoxine et la sulfadiazine sont dominants à l’effluent et l’affluent de la station d’épuration de Chotrana. Le sulfadiméthoxine est détecté dans tous les échantillons avec des concentrations élevées allant de 1 ng / L dans l’eau potable de robinet du centre hospitalier à 14,2 ng / L à l’entrée de la station de Chotrana.

Quatre composés ont été détectés dans les 5 sites étudiés à savoir le sulfathiazole, le sulfamerazine, le sulfaméthoxazole et la sulfadiméthoxine. Cette présence massive peut être due à leur large utilisation en médecine humaine pour le traitement des infections bactériennes (Seifrtova et al., 2009 et Tarhani et al., 2015).

La majorité des concentrations des sulfonilamides a été rabattue par le système de traitement de la station d’épuration Chotrana avec un taux de rabattement de 100% pour le sulfabenzamide, 70% pour le sulfamerazine et 50% pour la sulfadiazine. Les taux de rabattement les plus élevés par rapport aux différentes familles d’antibiotiques étudiées ont été observés pour les sulfonilamides. La même constatation a été rapportée dans la littérature (Xu et al. 2007., Ben Mansour et al., 2012 et Gros et al., 2010).

## II.5.2 En France



**Figure V. 8. Concentrations des sulfonilamides dans les différents échantillons prélevés en France**

De faibles concentrations des sulfonilamides ont été trouvées dans les 6 échantillons étudiés mis à part le sulfabenzamide (Figure V.8).

En outre, à l'exception de la station d'épuration d'Arras, les autres sites sont situés dans des zones agricoles alors que les sulfonilamides sont principalement des antibiotiques à usage humain pour le traitement des infections bactériennes.

Parmi les sulfonilamides étudiés, le sulfadimethoxazole présente les concentrations les plus significatives, en raison de sa large utilisation dans le traitement des infections bactériennes chez l'homme.

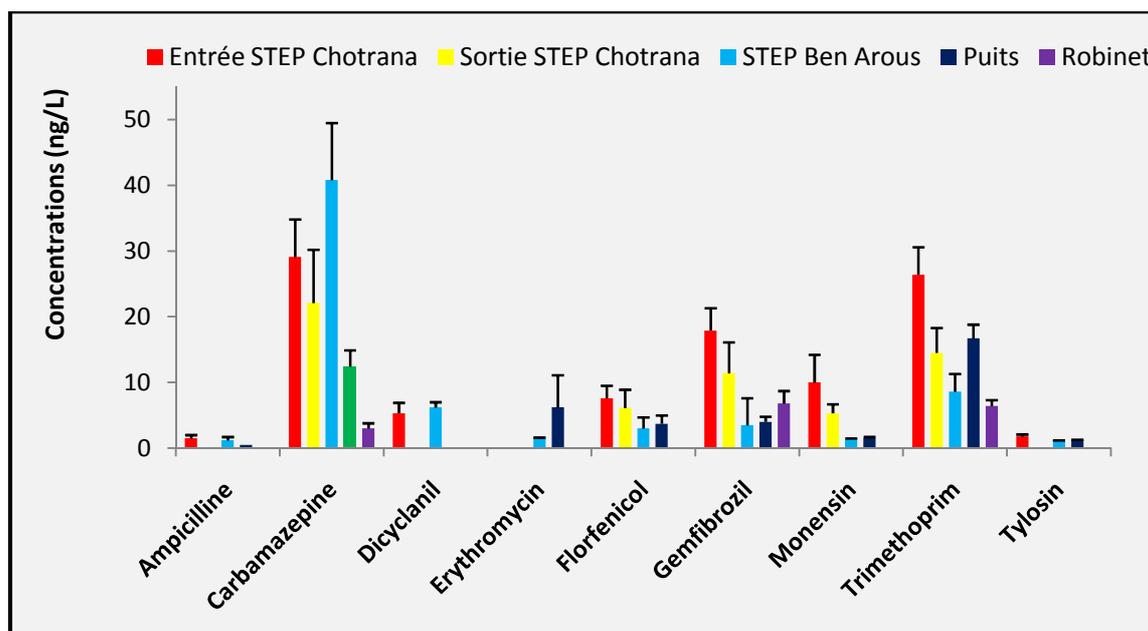
Le taux de son rabattement au niveau de la station d'épuration d'Arras est de 0%, probablement à cause de sa persistance et ne dépasse pas 20% dans le système de lagunage de Fresnoy.

La concentration du sulfamethazole dans les deux rivières est inférieure 12 ng / L, qui est inférieure à celle rapportée dans la rivière des Perles en Chine (1080 ng / L), du Mékong au Vietnam (19153 ng / L) et les états unis (120 ng / L) (Kolpin et al., 2002; Managaki et al., 2007 et Yang et al., 2011).

Certains composés vétérinaires tels que le sulfathiazole, le sulfaméthazine ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leur présence dans l'environnement naturel. Ils ont également été détectés dans différentes sortes d'eaux, principalement dans les eaux de surface et les eaux usées (Seifrtová et al., 2009).

## II.6. Traces d'autres médicaments

### II.6.1 En Tunisie



**Figure V. 9. Concentrations des autres médicaments dans les différents échantillons prélevés en Tunisie**

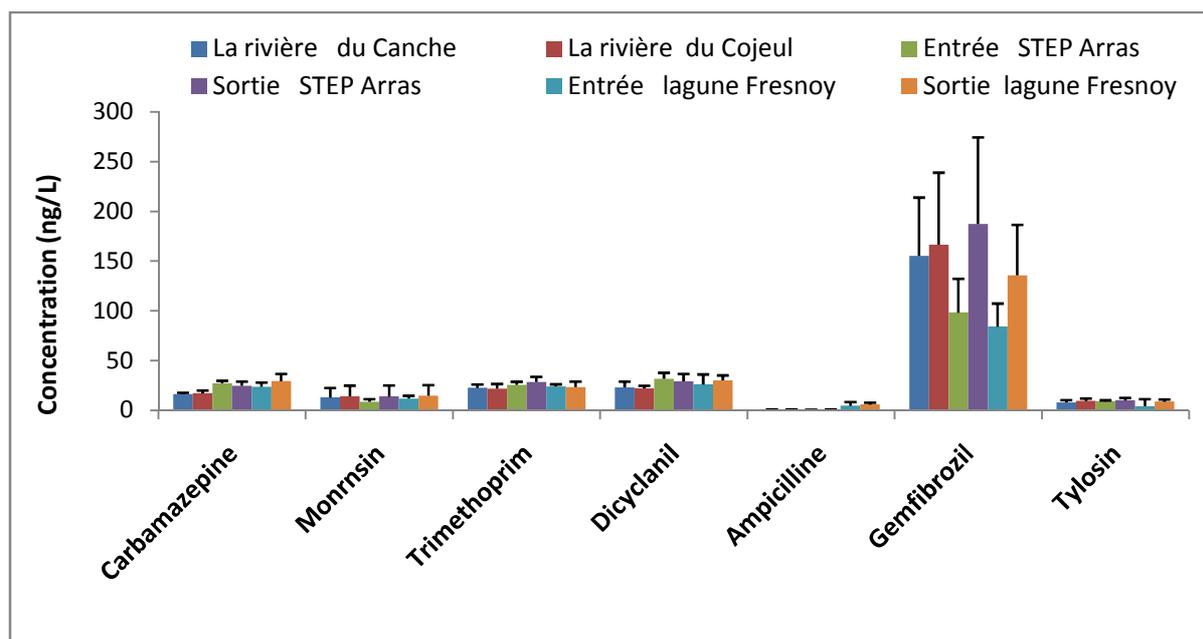
Parmi les neuf médicaments, la carbamazépine, le triméthoprim et le gemfibrozil ont été détectés dans les cinq échantillons étudiés avec des concentrations très significatives (Figure V.9).

La carbamazépine a été détectée à une valeur égale à 40,8 ng / L à l'entrée de STEP de Ben Arous. La carbamazépine est utilisée comme un médicament anti-convulsion principalement pour le traitement de l'épilepsie. Il est l'un des composés les plus fréquemment détectés dans les eaux de surface (Garcia et al., 2009 ; Radjenovic et al., 2007; Drewers et al., 2007; Boxall et al., 2004 et Cary et al., 2013).

Le dicyclanil, le tylosin et l'ampicilline ont complètement disparu à la sortie de la STEP de Chotrana. Leur concentration détectée à la sortie est inférieure à la limite de détection (LOD), en raison de leur faible concentration à l'entrée de la STEP (5,3, 1,8 et 1,5 ng / L) (Gros et al., 2007., Tarhani et al., 2015 et Ben Mansour et al., 2012).

Le rabattement de la concentration du triméthoprim est de 45% à la STEP de Chotrana (26,4 ng / L à l'entrée) et (14,5 ng / L à la sortie)

## II.6.2 En France



**Figure V.10. Concentrations des autres médicaments dans les différents échantillons d'eaux prélevés en France**

Tous les résidus pharmaceutiques sont détectés dans les 6 échantillons étudiés à l'exception de l'ampicilline (Figure.V.10).

Le gemfibrozil présente la concentration la plus élevée avec  $187,4 \pm 87,0$  ng/L à la sortie de la station d'épuration d'Arras. Sa persistance dans le milieu naturel est confirmée par les concentrations détectées dans les deux rivières avec  $155,2 \pm 58,7$  ng/L dans la rivière Canche et  $166,5 \pm 72,4$  ng/L dans la rivière Cojeul.

Une concentration importante de la carbamazépine est détectée aussi dans tous les échantillons. Les concentrations de la carbamazépine dans les rivières Canche et Cojeul sont légèrement inférieures à celles détectées à la sortie de la station d'épuration ou de la lagune (Tableau.V.2). Cela pourrait être dû au fait que la carbamazépine est très résistante à la dégradation dans le milieu naturel (Andreozzi et al., 2003).

### III. Traces des antibiotiques dans des matrices solides

Les résidus médicamenteux retenus sur les filtres sont quantifiés, ce qui donne une idée sur la contamination totale des eaux par les médicaments. Les résidus médicamenteux (retenus lors de la filtration) sont extraits par PLE

Les extractions ont été effectuées sur un filtre préalablement coupé en petits morceaux, et séché qui contient cette matière en suspension. Chaque échantillon de filtre a été dopé avec des standards internes. Après un repos de 7 à 8 heures à la température ambiante, chaque échantillon a été extrait avec la méthode analytique déjà optimisée et validée dans le chapitre IV. Les résultats sont exposés dans la Figure V.11 et le Tableau V.3.

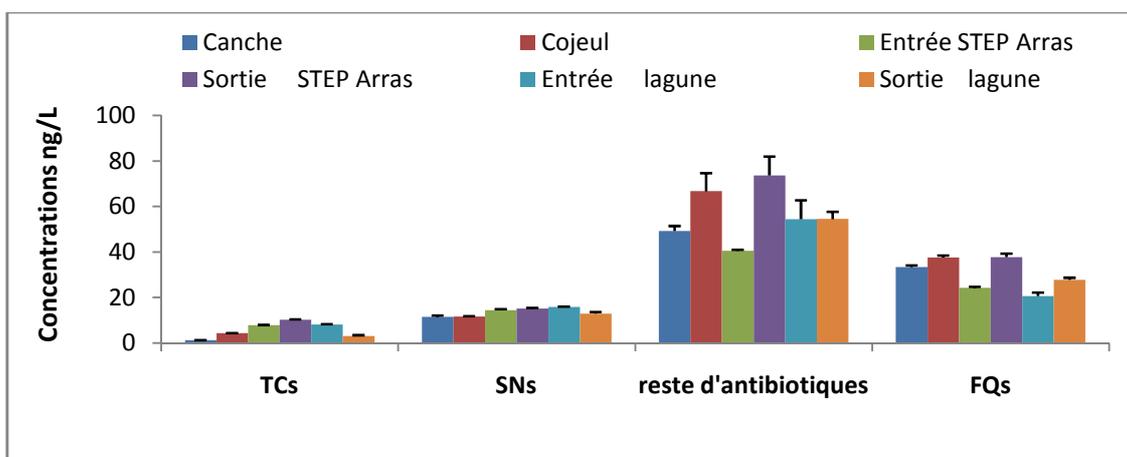


Figure V. 11. Concentrations des médicaments dans les échantillons solides étudiés

L'ensemble des médicaments, marqueurs de pollution, étudiés ont été détectés dans les 6 échantillons analysés.

Tableau V. 3. Concentrations individuelles des composés cibles dans différents échantillons solides étudiés

Composés	Rivière Canche	Rivière Cojeul	Entrée STEP d'Arras	Sortie STEP d'Arras	Entrée Lagune Fresnoy	Sortie Lagune Fresnoy
<b>Ampicilline</b>	0,15±0,05	0,10±0,02	1,2±0,08	<LOQ	1,3±0,05	<LOQ
<b>Carbamazépine</b>	3,44±0,02	3,8±0,03	5,7±0,02	5,6±0,1	5,5±0,1	4,0±0,2
<b>Chlortétracycline</b>	0,29±0,01	1,4±0,02	1,6±0	2,3±0,05	2,7±0,1	1,5±0,03
<b>Ciprofloxacine</b>	1,21±0,02	1,4±0,01	1,7±0,02	1,3±0,09	1,4±0,01	1,8±0,05
<b>Danofloxacine</b>	12,02±0,07	14,2±0,5	9,8±0,1	13,4±0,02	7,5±0,3	7,8±0,8
<b>Dicyclanil</b>	4,23±0,04	4,2±0	5,4±0,04	5,0±0,09	4,2±0,04	5,2±1,5
<b>Difloxacine</b>	5,56±0,2	5,9±0,04	2,5±0,02	6,9±0,06	3,1±0,3	5,1±0,9

Composés	Rivière Canche	Rivière Cojeul	Entrée STEP d'Arras	Sortie STEP d'Arras	Entrée Lagune Fresnoy	Sortie Lagune Fresnoy
<b>Doxycycline</b>	0,74±0,01	1,2±0	1,5±0,02	1,8±0,01	2,9±0,2	0,7±0
<b>Enrofloxacin</b>	6,45±0,2	7,2±0,2	3,2±0,03	6,7±1,2	2,8±0,08	4,1±0,07
<b>Florfénicol</b>	5,09±0,1	5,4±0,5	7,0±0,2	6,0±1,0	9,6±0,1	5,6±1,1
<b>Gemfibrozil</b>	36,96±1,8	42,4±7,1	14,4±0,1	49,7±5,4	15,5±2,8	27,5±3,7
<b>Monensin</b>	3,80±0,04	3,7±0,05	2,1±0	4,7±0,5	3,0±0,08	4,2±0,3
<b>Norfloxacin</b>	1,41±0,04	1,5±0,07	1,3±0,1	1,2±0,1	1,3±0,03	3,1±0,4
<b>Ofloxacin</b>	1,39±0,03	1,2±0,02	1,3±0,01	1,3±0	0,9±0,09	0,9±0,03
<b>Orbifloxacin</b>	5,41±0,06	6,2±0,0	4,5±0,1	6,9±0,1	3,6±0,0	5,0±1,6
<b>Oxytétracycline</b>	0,17±0,01	0,1±0,0	0,1±0,02	0,1±0,0	<LOQ	0,1±0,0
<b>Sulfabenzamide</b>	0,01±0,0	<LOQ	0,1±0,01	<LOQ	<LOQ	1,0±0,01
<b>Sulfadiazine</b>	2,41±0,04	2,7±0,07	3,6±0,1	4,1±0	4,2±0,2	2,5±0,1
<b>Sulfadiméthoxine</b>	3,68±0,04	3,9±0,04	4,5±0,1	4,8±0,1	4,6±0,3	4,1±0,9
<b>Sulfamerazine</b>	1,21±0,03	1,4±0,01	1,7±0,1	2,0±0,07	2,8±0,1	1,7±0,05
<b>Sulfaméthazine</b>	2,47±0,05	2,3±0,04	3,1±0,09	2,8±0,03	2,2±0,1	2,3±0,6
<b>Sulfanilamide</b>	1,13±0,4	0,1±0,02	0,1±0,02	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<b>Sulfathiazole</b>	0,63±0,01	1,2±0,05	1,4±0,04	1,5±0,01	2,0±0,03	1,3±0,07
<b>Tétracycline</b>	<LOQ	1,6±0,03	4,6±0,1	<LOQ	2,6±0,03	1,5±0,2
<b>Triméthoprim</b>	4,93±0,09	5,0±0,2	5,9±0,1	6,4±1,2	4,6±0,1	5,3±0,2
<b>Tylosine</b>	1,87±0,01	2,1±0,01	<LOQ	2,3±0,1	<LOQ	2,0±0,09
<b>TCs</b>	<b>1,2±0,03</b>	<b>4,3±0,05</b>	<b>7,8±0,14</b>	<b>10,3±0,06</b>	<b>8,2±0,33</b>	<b>3,1±0,23</b>
<b>SNs</b>	<b>11,54±,57</b>	<b>11,6±0,23</b>	<b>15,4±0,46</b>	<b>15,2±0,21</b>	<b>15,8±0,73</b>	<b>12,9±1,73</b>
<b>FQs</b>	<b>33,45±0,6</b>	<b>37,6±0,8</b>	<b>24,3±0,4</b>	<b>37,7±1,6</b>	<b>20,6±0,9</b>	<b>27,8±2,3</b>
<b>Total</b>	<b>95,4±3,4</b>	<b>120,2±9,0</b>	<b>87,0±1,5</b>	<b>136,8±10,2</b>	<b>88,3±5,1</b>	<b>98,3±12,9</b>

Les tétracyclines présentent la concentration la plus faible allant de  $1,2 \pm 0,03$  ng/g dans la rivière de la Canche à  $10,3 \pm 0,06$  ng/g à la sortie de la station d'épuration d'Arras. Les concentrations des résidus détectés dans la phase dissoute sont beaucoup plus élevées que celles de la phase stationnaire (> 80%) de la contamination totale.

Le gemfibrozil est le résidu le plus détecté avec  $36,96 \pm 1,8$  ng/g dans l'échantillon provenant de la rivière de la canche

Les fluoroquinolones présentent des concentrations très significatives dans les deux rivières la Canche et le Cojeul avec respectivement  $33,45 \pm 0,6$  ng/L et  $37,6 \pm 0,8$  ng/L.

Deux méthodologies ont été appliquées pour analyser des traces de médicaments dans des échantillons environnementaux. Nous remarquons qu'aucun échantillon analysé n'est exempt de contaminant. Les polluants retrouvés appartiennent aux différentes familles de médicaments (les sulfonamides, les tétracyclines, les fluoroquinolones et autres antibiotiques). Ces micropolluants sont détectés à des concentrations variables selon la localisation de l'échantillon analysé (entrée ou sortie de STEP, zone agricole, eau souterraine, eau potable...). La présence des résidus pharmaceutiques dans l'environnement à des concentrations élevées peut avoir divers types de répercussions nuisibles et significatives sur l'environnement et les écosystèmes en particulier.

Certains effets (toxicité, perturbation endocrinienne, cancérogénicité et mutagénicité) peuvent poser de graves problèmes comme :

- La féminisation de poissons males ou de coquillage et la perturbation de la sexualité ou la reproduction de certaines espèces.
- Des impacts possibles sur les plantes ou champignons.
- Le risque d'antibiorésistance et l'apparition de bactéries très résistantes.
- Le risque de perte d'efficacité de certains médicaments soit en raison d'une accoutumance de l'organisme, soit en raison d'une résistance/accoutumance des bactéries ou parasites.

## Références bibliographiques

- Adachi, F., Yamamoto, A., Takakura, K-I., Kawahara, R., 2013. Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment. *Sci Tot Env* 444, 508-514.
- Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50, 1319-1330.
- Ben Mansour, H., Mosrati, R., Barillier, D., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., 2012. Bioremediation of industrial pharmaceutical drugs. *Drug and chem tox* 35.
- Boxall, A., Fogg, L., Blackwell, P., Kay, P., Pemberton, E., Croxford, A., 2004. Veterinary medicines in the environment. *Rev Env Contam Toxicol* 180, 1-91.
- Cary, L., Casanova, J., Gaaloul, N., Gurrot, G., 2013. Combining born isotopes and carbamazepine to trace sewage in salinized groundwater: a case of study in Cap Bon, Tunisia. *Appl Geochem* 34:126-139.
- Chang, X.S, Meyer, M.T., Liu, X.Y., Zhao, Q., Chen, H., Chen, J.A., Qiu, Z.Q., Yang, L., Cao, J., Shu, W.Q., 2010. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. *Env Pol* 158, 1444.
- Drewers, J. E., 2007. Removal of pharmaceutical residues during wastewater treatment. *Anal Chem* 50, 427-449.
- Garcia-Ac, A., Segura, P., Viglino, L., Furtos, A., Gagnon, C., Prevost, M., Sauv., S., 2009. On-line solid phase extraction of large-volume injections copled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water. *J chromatogr A* 1216, 8518-8527.
- Gros, M., Ginebreda, A., Barceló, D., 2010. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ Inter* 36,15-26.
- Gros, M., Petrovic, M., Barcelo, D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70, 678-690.
- Gros, M., Petrovic, M., Barceló, D., 2007. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (NE Spain). *Env Tox Chem* 26,1553-1562.
- Halling-sorensen, B., Nielson, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holton, L., Jorgensen, S., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment: a review. *Chemosphere* 36, 357-393.
- He, K., Soares, A. D., Adejumo, H., Diarmid, M., Squibb, K., Blaney, L., 2014. Detection of a wide variety of human and veterinary fluoroquinolone antibiotics in municipal wastewater and wastewater-impacted surface water. *J Pharma Biomedical Anal*, 18 November.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance *Env Sci Technol* 36, 1202-1211.
- Li, W.H., Gao, L.H., Shi, Y.L., Liu, J.M., Cai, Y.Q., 2015. Occurrence, distribution and risks of antibiotics in urban surface water in Beijing, China. *Env Sci Process Impacts* 17, 1611-1619.
- Managaki, S., Murate, A., Takada, H., Tuyen, B. X., Chiem, N. H., 2007. Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta. *Env Sci Technol* 41, 8004-8010.
- Mansour, D., Fourcade, F., Soutrel, I., Hauchard, D., Bellakhal, N., Amrane, A., 2015. Mineralization of synthetic and industrial pharmaceutical effluent containing trimethoprim

- by combining electro-fenton and activated sludge treatment. *J. of the Taiwan institute of Chem Eng* 53,58-67.
- Metcalf, C.D., Koenig, B.G., Bennie, D.T., Servos, M., Ternes, T.A., Hirsch, R., 2003. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Env Toxicol Chem* 22, 2872-2880.
- Peng, X. Z., K. Zhang, C. M. Tang, Q. X. Huang, Y.Y. Yu, J. L. Cui, 2011. Distribution pattern, behavior, and fate of antibacterials in urban aquatic environments in South China. *J Env Monit* 13, 446.
- Radjenovic, J., Petrovic, M., Barcelo, D., 2007. Advanced mass spectrometric methods applied to the study of fate and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment. *Trends Anal Chem* 26, 1132-1144.
- Seifrtová, M., Nováková, L., Lino, C., Pena, A., Solich, P., 2009. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Anal Chim Act* 649, 158-179.
- Skraskova, K., Santos, L., Satinsky, D., Pena, A. M., Conceic, M., Montenegro, A., Solich, A., Novakova, L., 2013. Fast and sensitive UHPLC methods with fluorescence and tandem mass spectrometry detection for the determination of tetracycline antibiotics in surface waters. *J chromatogr B* 927, 201-207.
- Sukul, P., Spiteller, M (2006) Sulfonilamides in the environment as veterinary drugs. *Rev of environ cont tox* 187, 67.
- Tahrani, L., Van-Locho, J., Ben Mansour, H., Reynolds, T., 2016. Occurrence of Antibiotics in Pharmaceutical Industrial Wastewater, Wastewater Treatment Plant and Sea Waters in Tunisia. *J Wat Health* 14:208-13.
- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Dinh, Q. T., Clément, M., Chevreuil, M., 2008. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Sci Tot Env* 393, 84-95.
- Tarhani, L., Soufi, L., Mehri, I., Najjari, A., Hassan, A., Van-Locho, J., Reynolds, T., Cherif, A., Ben Mansour, H., 2015. Isolation and characterization of antibiotic-resistant bacteria from pharmaceutical industrial wastewaters. *Microb path* 89, 54-61.
- Tong, L., Li, P., Wang, Y., Zhu, K., 2009. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* 74, 1090-1097.
- Tong, L., Yanxin, X., Hui Liu, W., Li, H., 2014. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment of Jiangnan Plain, central China. *Sci Tot Env* 494-498, 180-187.
- Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barcelo, D, 2010. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: an overview of micropollutants and sustainable treatment options. *J Hydrol* 389, 416.
- Writer, J., Ferrer, I., Barber, L.B., Thurman, M., 2013. Widespread occurrence of neuro-active pharmaceuticals and meTableauolites in 24 Minnesota rivers and wastewaters. *Sci Tot Env* 461-462,519-527.
- Xu. W., Zhang, G., Li, X., Zou, S., Li, P., Hu, Z., Li, J, 2007. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South of China. *Wat Res* 41, 4526-4534.
- Yang, J.F., Ying, G.G., Zhao, J.L., Tao, R., Su, H.C., Liu, Y.S., 2011. Spatial and seasonal distribution of selected antibiotics in surface waters of the Pearl Rivers, China. *J Env Sci Health Part B*, 46, 272-28.

# Conclusion générale

L'objectif de notre étude était la mise en place des méthodes destinées à l'analyse des résidus pharmaceutiques à usage humain et vétérinaire susceptibles d'être présents dans l'environnement, en phases aqueuse et solide. Les contrôles de pollution nécessitent la mise au point de méthodes robustes et suffisamment rapides. C'est pourquoi nous avons développé des méthodes multi-familles pour la détection et la quantification de ces composés, sélectionnés parmi les plus pertinents à détecter et à doser.

Nous avons réalisé une série de campagne d'échantillonnage en Tunisie comme en France, pour étudier le niveau de contamination par les résidus pharmaceutiques à usages humain et vétérinaire, des différents sites.

Nous avons développé une procédure pour les matrices aqueuses en commençant par une optimisation de la méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (choix de segmentation, gradient d'élution et débit d'élution). Puis nous avons mis en place l'étape de préparation d'échantillon par SPE. Plusieurs paramètres ont été testés : le choix de la cartouche, le pH auquel l'échantillon doit être fixé, choix du volume de chargement de l'échantillon, la nature de l'éluant. Après avoir évalué les rendements d'extraction dans les différents cas, notre choix s'est porté sur la cartouche OASIS HLB (200 mg/6 mL), fréquemment utilisée, un pH d'échantillon fixé à 2,5, 500 mL comme volume de chargement et le méthanol comme éluant. Les limites de quantification méthodologiques sont comprises entre 0,2 et 1,5 ng/L (excepté pour la sulfadiazine, moins détectable, avec une limite de quantification de 3 ng/L). Cette procédure a ensuite été validée en conditions environnementales lors de l'analyse d'échantillons d'eaux de surface (eaux des rivières, eaux des stations d'épuration, eau des systèmes de lagunage, eau de robinet et eau de puits). Il a été mis en évidence la présence, à des faibles concentrations, de la majorité d'antibiotiques (sulfonamides et macrolides, tétracyclines et fluoroquinolones) ainsi que le reste des antibiotiques comme la carbamazépine et du gemfibrozil, utilisés dans cette étude comme marqueurs de pollution.

Parallèlement, nous avons mis en place une méthode d'analyse de la matrice solide. Une méthode d'extraction (PLE) a été évaluée et validée. Le principal paramètre étudié était le choix du solvant d'extraction qui est le facteur le plus influencant sur le rendement d'extraction. Le solvant 25/25/50 méthanol/acétonitrile/0,2 M acide citrique ajusté à pH 3 permet d'extraire les tétracyclines et le mélange 40/40/20 méthanol/acétonitrile/0,2 M acide citrique ajusté à pH 4,5 semble le plus adapté pour extraire les fluoroquinolones et le méthanol a finalement été retenu pour le reste de médicaments. A l'issue de cette extraction,

comme les extraits obtenus sont relativement chargés, une étape de purification s'est avérée nécessaire.

De plus, la technique PLE est rapide et permettra d'éventuelles vastes campagnes d'analyses. Les études précédentes concernant l'analyse de contaminants dans les sols se sont concentrées uniquement sur une ou maximum deux familles d'antibiotiques alors que notre travail a permis d'étudier simultanément 28 médicaments.

Dans une perspective de développement durable, il est souhaitable de maîtriser la gestion du risque, en limitant le plus possible des rejets des substances médicamenteuses dans l'environnement.

Afin de réduire les risques de la pollution de nos sources d'eau potable, de la faune et de la flore, il est indispensable de développer des méthodes pour l'élimination des résidus pharmaceutiques des milieux aquatiques, en utilisant des substances naturelles telles que l'argile (brute ou modifiée).

La quantité de résidus médicamenteux pourrait être réduite dans l'environnement, à court terme, par un usage plus raisonnable des antibiotiques notamment dans certaines filières animales et à long terme, dans le but d'encourager les industriels à produire des médicaments plus « biodégradables » ou rapidement dégradables.

Comme les tétracyclines et les fluoroquinolones interagissent fortement avec l'argile contenue dans le sol, il serait intéressant, dans une étude future, de se focaliser sur l'influence des paramètres du sol (les teneurs en argile et en matière organique, la capacité d'échange cationique CEC), sur les rendements d'extraction des résidus pharmaceutiques des matrices solides.

Il serait intéressant d'étudier l'influence des paramètres PLE sur le rendement d'extraction des résidus pharmaceutiques des matrices solides en utilisant l'approche des plans d'expérience.

# Annexes

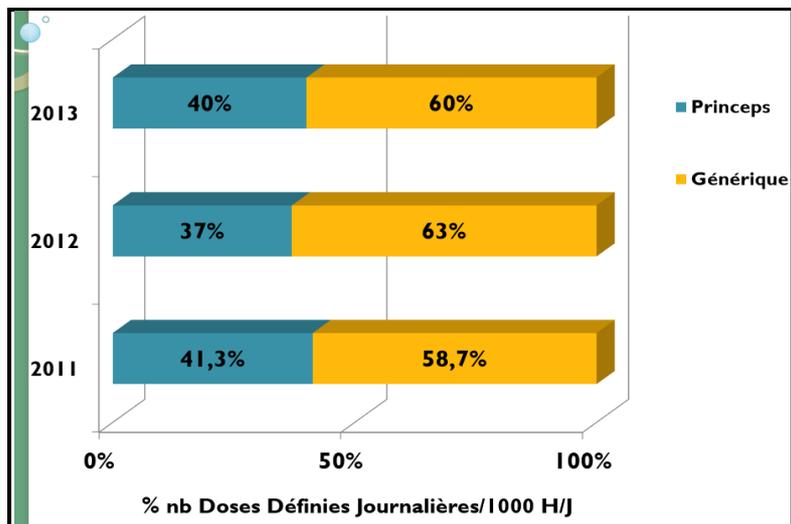
<b>Classe thérapeutique</b>	<b>Nom</b>	<b>Utilisations</b>
<b>Analgésiques et anti-inflammatoires</b>	Acétylsalicylique	-traitement des inflammations -traitement de la fièvre -traitement des maladies rhumatismales
	Diclofenac	
	Naproxène	
	Ibuprofène	
<b>Antiépileptiques</b>	Paroxétine	-diminution de l'activité -blocage des canaux sodiques -augmentation de l'effet inhibiteur du neurotransmetteur GABA
	Venlafaxine	
	Fluoxétine	
	Carbamazépine	
	Diazépam	
<b>β-bloquants</b>	Propranolol	-hypertension -insuffisance coronaire -insuffisance cardiaque
	Métoprolol	
	Aténolol	
<b>Hypolipémiants</b>	Acide clofibrigue	-diminution de la concentration du cholestérol -traitement des maladies cardiovasculaires
	Gemfibrozil	
	Fénofibrate	
<b>Hormones et contraceptifs</b>	17α-éthynylestradiol <sup>2</sup>	-agent contraceptif
	Progestérone	-régulateur hormonal
	Estriol	
	Testostérone	
<b>Antibiotiques</b>	Tétracycline	-traitement des infections bactériennes
	Norfloxacine	-traitement des infections urinaires
	Sulfanilamide	-traitement bactérien
	Erythromycine	-traitement des infections des voies respiratoires

**Annexe 1. Classifications des composés pharmaceutiques détectés dans l'environnement**

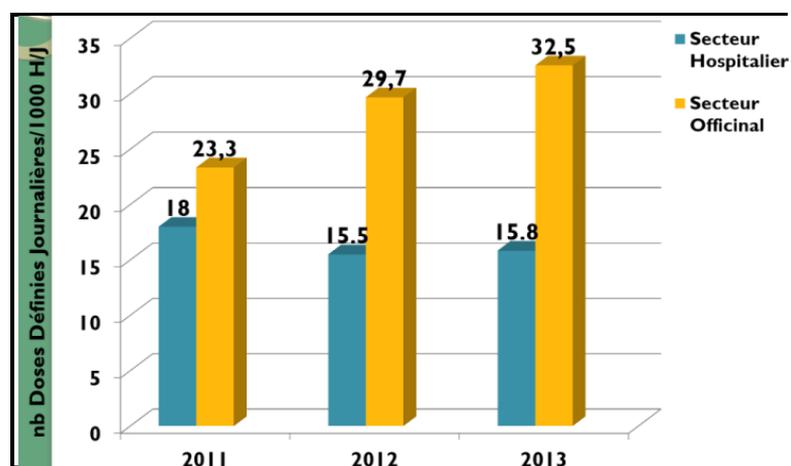
## Annexe 2. Consommation des médicaments prescrits en détail en France (2007)

Molécule	Classe/usage thérapeutique	Tonnage total (kg)	Sources des données	Molécule	Classe/usage thérapeutique	Tonnage total (kg)	Sources des données
Paracétamol	Antipyrétique	3303077	AFSSAPS	Diclofenac	AINS	9896	AFSSAPS
Metformine	Antidiabétique	716859	AFSSAPS/Alliance	Cefpodoxime	antibiotique	9283	AFSSAPS/Alliance
Troxerutine	circulation sanguine	444339	AFSSAPS	Metoprolol	antihypertenseur	8786	AFSSAPS
Aspirine	Analésique	396212	AFSSAPS	Omeprazole	anti-ulcéreux	8045	AFSSAPS
Diosmine	circulation sanguine	373544	AFSSAPS	Atorvastatine	hypolipémiant	7924	AFSSAPS/Alliance
Amoxicilline	Antibiotique	333223	AFSSAPS	Nicardipine	antihypertenseur	7800	AFSSAPS
Ibuprofène	AINS	240024	AFSSAPS	Simvastatine	hypolipémiant	6943	AFSSAPS
Carbocisteine	fluidifiant bronchique	232308	AFSSAPS	Fosfomycine	antibiotique	6774	AFSSAPS
Valproate de sodium	anti-convulsivant	112162	AFSSAPS	Hydroxyzine	anti-histaminique	6638	AFSSAPS
Acétylcysteine	fluidifiant bronchique	96759	AFSSAPS	Doxycycline	antibiotique	6243	AFSSAPS
Fenofibrate	Hypolipémiant	85670	AFSSAPS	Sertraline	antidépresseur	6224	AFSSAPS
Allopurinol	Antigoutteux	54247	AFSSAPS	Oxazepam	anxiolytique	6195	AFSSAPS
Dextropropoxyphène	Analésique	51963	AFSSAPS	Domperidone	anti-émétique	5861	AFSSAPS/Alliance
Buflomedil	anti-ischémique	50958	AFSSAPS	Paroxetine	antidépresseur	5515	AFSSAPS/Alliance
Natidofuryl	anti-ischémique	45523	AFSSAPS	Cyamemazine	neuroleptique	5441	AFSSAPS
Benfluorex	Hypolipémiant	40730	AFSSAPS	Pantoprazole	anti-ulcéreux	5287	AFSSAPS
Pristinamycine	Antibiotique	39855	AFSSAPS	Piperacilline	antibiotique	4476	AFSSAPS
Naproxène	AINS	37332	AFSSAPS	Ofloxacine	antibiotique	4137	AFSSAPS
Metronidazole	anti-parasitaire	36545	AFSSAPS	Azithromycine	antibiotique	4073	AFSSAPS/Alliance
Carbamazépine	anti-épileptique	33514	AFSSAPS	Phenobarbital	anti-convulsivant	3915	AFSSAPS
Heptaminol	anti-hypotenseur	28423	AFSSAPS	Prénisone	glucocorticoïde	3743	AFSSAPS
Tramadol	Analésique	25897	AFSSAPS	Fluoxétine	antidépresseur	3740	AFSSAPS
Levodopa	anti-parkinsonien	24996	AFSSAPS	Citalopram	antidépresseur	3487	AFSSAPS
Amiodarone	Antiarythmique	24318	AFSSAPS	Roxithromycine	antibiotique	3404	AFSSAPS
Trimebutine	troubles digestifs	23550	AFSSAPS	Triméthoprim	antibiotique	3346	AFSSAPS/Alliance
Acide clavulanique	inhibiteur d'enzyme	22699	AFSSAPS	Zolpidem	hypnotique	3344	AFSSAPS
Ketoprofène	AINS	21697	AFSSAPS	Bromazepam	anxiolytique	2604	AFSSAPS
Furosemide	Diurétique	21288	AFSSAPS	Miansérine	antidépresseur	2424	AFSSAPS
Bézaflibrate	Hypolipémiant	20852	AFSSAPS	Rifampicine	antibiotique	2383	AFSSAPS
Aténolol	Antihypertenseur	18337	AFSSAPS	Méthyprednisolone	glucocorticoïde	2218	AFSSAPS
Amphotéricine B	Antifongique	18179	AFSSAPS	Pramazepam	anxiolytique	2166	AFSSAPS
Sulfaméthoxazole	Antibiotique	16730	AFSSAPS/Alliance	Tianeptine	antidépresseur	2152	AFSSAPS
Trimétazidine	anti-ischémique	16480	AFSSAPS	Bisoprolol	antihypertenseur	2113	AFSSAPS
Clarithromycine	Antibiotique	15105	AFSSAPS/Alliance	Clorzépat	anxiolytique	2109	AFSSAPS
Ceftriaxone	Antibiotique	13603	AFSSAPS	Amlodipine	antihypertenseur	2013	AFSSAPS/Alliance
Josamycine	Antibiotique	12802	AFSSAPS	Piroxicam	AINS	2008	AFSSAPS
Propranolol	Antihypertenseur	12487	AFSSAPS/Alliance	Zopiclone	hypnotique	1948	AFSSAPS
Ciprofloxacine	Antibiotique	12186	AFSSAPS	Ceftazidime	antibiotique	1832	AFSSAPS
Ratidime	anti-acide	11656	AFSSAPS	Levomépromazine	neuroleptique	1699	AFSSAPS/Alliance
Pravastatine	Hypolipémiant	10969	AFSSAPS	Prednisone	glucocorticoïde	1550	AFSSAPS

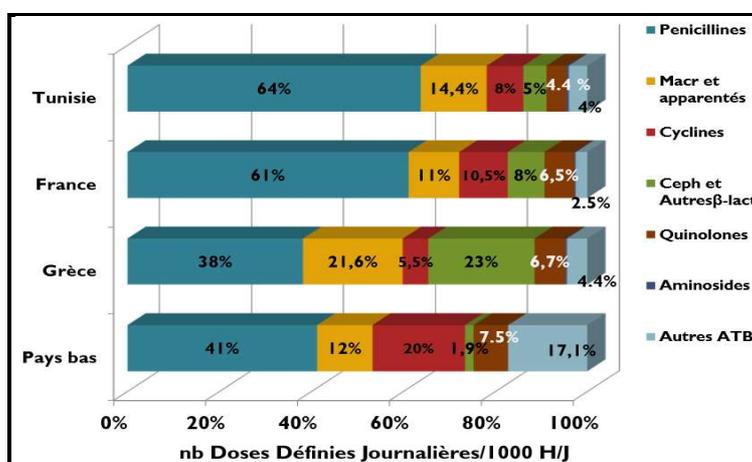
(Besse et Garric ; 2007)



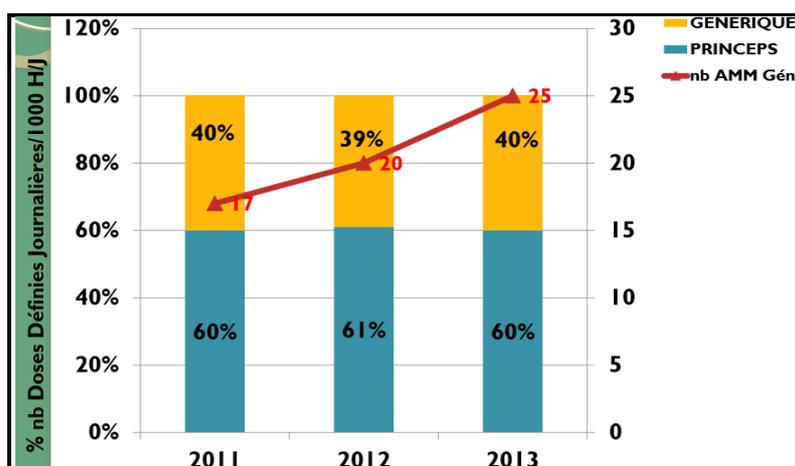
**Annexe 3. Evaluation de la consommation globale des antibiotiques (princeps/générique)**  
(Ministère de la santé)



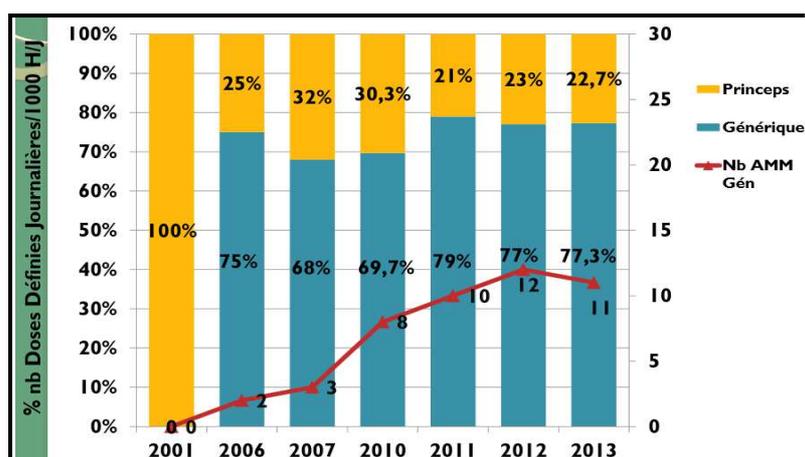
**Annexe 4. Evaluation de la consommation globale des antibiotiques (Secteur officinal/secteur hospitalier)**



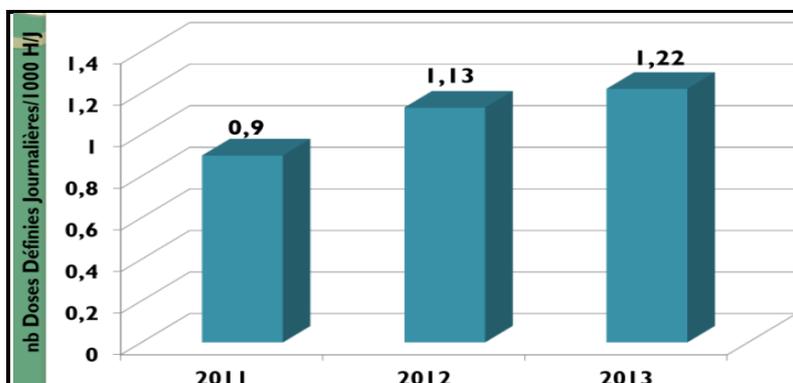
**Annexe 5. Comparaison de la consommation par classe par rapport à d'autres pays en 2013**



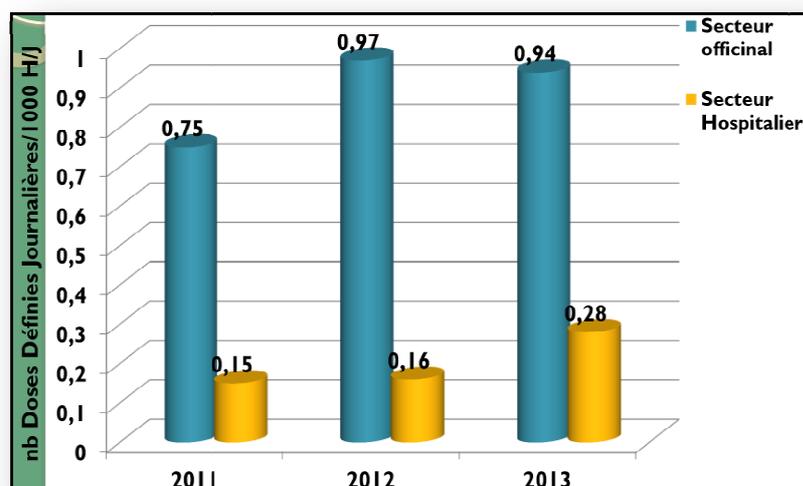
Annexe 6. Evaluation de la consommation de l'association Amoxicilline + Acide clavulanique (Princeps/Générique)



Annexe 7. Evaluation de la consommation de la Lévofoxacine (Princeps/Générique) depuis son introduction (ministère de la santé)



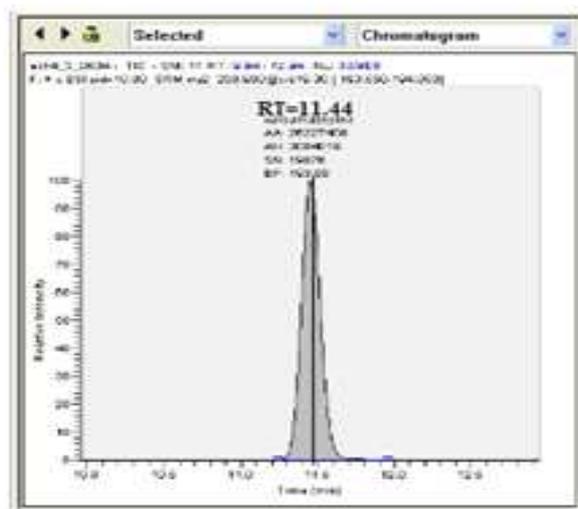
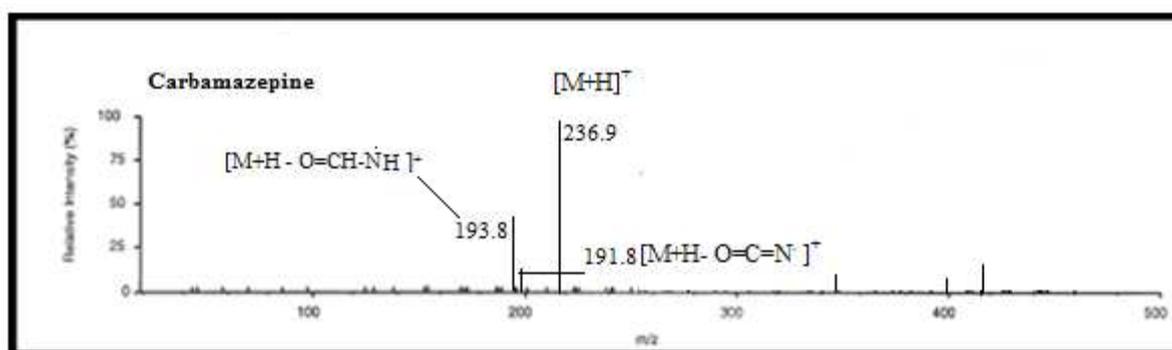
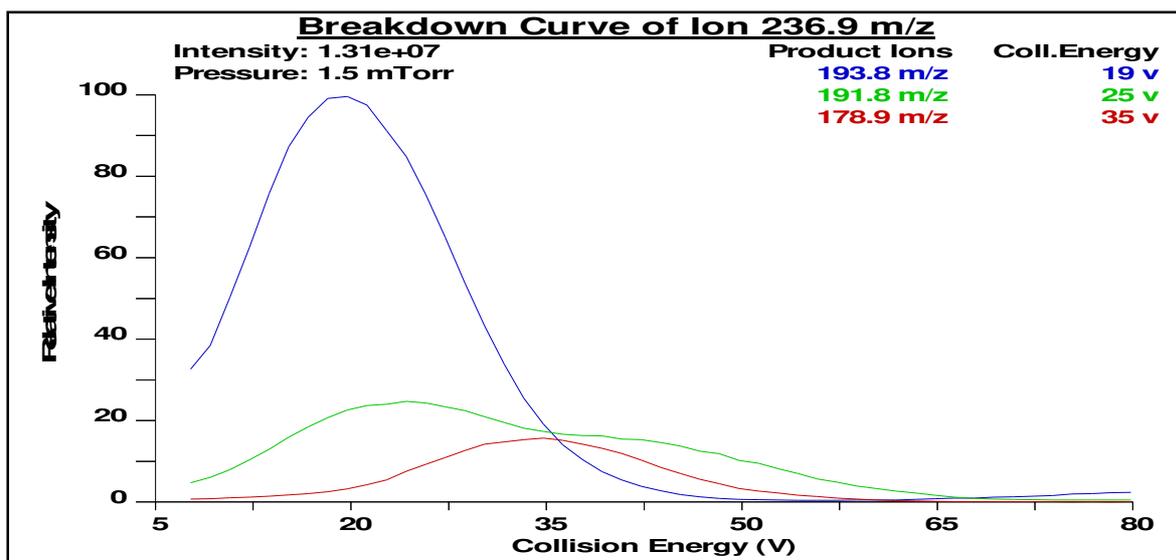
Annexe 8. Evaluation de la consommation de la Ciprofloxacine



### Annexe 9. Evaluation de la consommation de la Ciprofloxacine (Secteur officiel/secteur hospitalier)

### Annexe. 10. Différentes cartouches d'extraction et leur utilisation

Type de cartouche	Utilisation	Référence
Sorbant à base de silice	-extraction des substances apolaires -extraction des substances peu polaires	Vulliet et al., 2008 ; Filali-Meknassi et al., 2007
Bond Elut	-extraction des analgésiques -extraction des B-bloquants	Matejicek et al., 2013
Lichrolut EN	-extraction des produits de contraste à base d'iode	Garcia-Galon et al., 2010 ; Pailler et al., 2009
ENV+	-extraction des macrolides -extraction des pénicillines	Matejicek et al., 2013
Chromabond EASY	-extraction des analgésiques -extraction des sulfonilamides -extraction des hormones	Pailler et al., 2009
HLB-MCX	-extraction des composés neutres -extraction des composés basiques	Alda et al., 2003 ; Kostopoulou et Nikolou., 2008
MIPs	-extraction d'une seule famille cible	Pavlovic et al., 2007
STRATA-X	-extraction des composés basiques -extraction des composés acides -extraction des composés neutres	Bones et al., 2006a; Hilton et Thomas, 2003
OASIS HLB	-extraction des sulfonilamides -extraction des tétracyclines -extraction des fluoroquinolones -extraction des macrolides -rétention des médicaments acides tout en favorisant les médicaments basiques ou neutres	Marchese et al., 2003; Weigel et al., 2004



**Annexe 11. Paramètres de détection de la carbamazépine**