

# Contamination du réseau hydrographique de la Seine par les antibiotiques, depuis les têtes de bassin jusqu'à l'axe fluvial

Tuc Quoc Dinh<sup>1</sup>, Gwenaëlle Lavison<sup>2\*</sup>, Pierre Labadie<sup>3</sup>, Patrick Candido<sup>2</sup>,  
Violaine Augustin<sup>2</sup>, Fabrice Alliot<sup>1</sup>, Elodie Moreau-Guigon<sup>1</sup>, Martine Blanchard<sup>1</sup>, Marc  
Chevreuil<sup>1</sup>

<sup>1</sup> : EPHE, Laboratoire Hydrologie Environnement, UMR Sisyphe, UPMC Tour 46/56 4<sup>ème</sup> ét., 4 place Jussieu 75005 Paris

<sup>2</sup> : Eau de Paris, Direction Recherche et développement et Qualité de l'Eau, 144 Av Paul Vaillant Couturier, 75014 Paris

<sup>3</sup> : UMR Sisyphe / CNRS, UPMC Tour 46/56 4<sup>ème</sup> ét., 4 place Jussieu 75005 Paris

\*contact : gwenaelle.lavison@eaudeparis.fr, marc.chevreuil@upmc.fr

## 1 Cadre général de l'étude

### 1.1 Contexte

Le milieu scientifique s'est beaucoup intéressé aux pollutions des milieux aquatiques provenant des rejets de produits chimiques industriels et agricoles. Les effets de ces pollutions sur les écosystèmes, sur la santé humaine et animale ont été évalués et des réglementations ont pu être décidées et mises en œuvre. Néanmoins, d'autres sources de pollutions des milieux aquatiques sont apparues ces dernières années. Ainsi les produits phytosanitaires, les perturbateurs endocriniens, qui sont des contaminants agissant sur le système hormonal, ainsi que des résidus médicamenteux ont été identifiés comme potentiellement toxiques.

La France est un des premiers consommateurs de médicaments en Europe. Ceux-ci sont consommés de façon quotidienne sur tout le territoire en des quantités variables et sont donc rejetés dans le milieu naturel de façon continue. Les stations d'épurations qui permettent de retraiter les eaux usées et d'éliminer une partie importante de polluants ne sont pas conçues pour répondre à ce type de contamination et ont des efficacités plus ou moins importante. D'ailleurs des résidus médicamenteux ont été retrouvés dans diverses eaux de surface à travers la France, l'Europe, le monde. Les médicaments sont des substances actives sur les organismes vivants, humains ou animaux. Leur présence dans l'environnement pose la question de leurs potentielles actions sur des organismes non cibles. Ces molécules ont une toxicité humaine à des teneurs plus ou moins fortes qui est décrite lors de l'acceptation des dossiers d'autorisation de mise sur le marché. Elles sont classées en fonction de leurs actions curatives ou préventives : analgésiques, anti-épileptiques, hypolipémiants, anti-hypertenseurs, antibiotiques... Cette dernière classe de médicament fait plus particulièrement l'objet d'études de par les effets produits sur les souches bactériennes. En effet, celles-ci peuvent développer une résistance à un ou plusieurs antibiotiques de par leurs mécanismes d'adaptation et de mutation. Ces bactéries deviennent alors insensibles à un traitement utilisant les antibiotiques pour lesquels elles ont acquis une résistance et peuvent se disséminer dans divers milieux. Ce phénomène d'apparition et de propagation de souches antibiorésistantes relève alors non seulement de problématiques de santé publique

avec comme objectif une meilleure gestion ou utilisation de ces molécules, mais il relève aussi des problématiques environnementales, écologiques lorsque ces bactéries se disséminent dans l'environnement.

C'est dans ce contexte et le cadre du PIREN Seine, qu'Eau de Paris et le laboratoire EPHE/CNRS-UMR 7619, ainsi que d'autres partenaires ont abordé les thématiques de la présence d'antibiotiques, de l'étude de souches antibiorésistantes et des rapports qui lient ces deux phénomènes dans le milieu environnemental.

## 1.2 Description du projet de recherche *Eau de Paris* et de sa méthodologie

Le thème antibiotique a été initié en 2007 et poursuivi en 2008 et en 2009 dans le cadre du programme du Piren Seine. Pour Eau de Paris, cette étude se décompose en cinq grandes phases réparties entre les deux départements R&D Biologie et Chimie : mise en place de la méthodologie analytique, détermination des niveaux de concentration en antibiotiques dans le milieu, identification des bactéries résistantes aux antibiotiques les plus présents, caractérisation moléculaire de la résistance à certains antibiotiques (Quinolones, Tétracyclines, bêta-lactames), effet des concentrations observées sur la diffusion la résistance.

La méthodologie mise en place par le département R&D-chimie afin de répondre aux objectifs fixés plus haut est décrite dans les paragraphes suivants. Le suivi des antibiotiques d'usage humain ou mixte (humain et vétérinaire) a été réalisé par une méthode d'extraction sur phase solide en différé avec un chromatographe en phase liquide couplé à un spectromètre de masse en tandem. La liste des antibiotiques sélectionnés a été réalisée en fonction d'études bibliographiques. Le tableau ci-dessous permet de les lister :

**Tableau 1 : Antibiotiques faisant partie de notre méthode analytique et regroupés en famille**

Sulfamides	Sufachlorpyridazine
	Sulfamérazine
	Sulfaméthoxazole
Macrolides	Erythromycine
	Spiramicine
	Roxithromycine
Pyrimidines	Triméthoprim
Bétalactamines	Abamectine
	Ampicilline
	Amoxicilline
Tétracyclines	Oxytétracycline
	Chlortétracycline
	Tétracycline
Quinolones	Acide oxolinique
	Ciprofloxacine
	Norfloxacine
	Ofloxacine

L'établissement d'une telle liste d'antibiotiques peut être réalisé selon diverses stratégies. Ainsi, en fonction des données accessibles, il est possible de tenir compte de la toxicité de ces molécules, de la fréquence et des quantités prescrites, vendues. Cependant, la majorité de ces données restent difficiles d'accès et elles nécessitent des compétences pharmaceutiques et médicales certaines. C'est pourquoi nous nous sommes basés sur une étude bibliographique raisonnée.

Une fois la liste établie et corrélée dans la majorité des cas avec les antibiotiques étudiés par le département R&D Biologie, la méthode analytique a été développée afin d'être utilisée sur des séries d'échantillons dont la liste et les résultats se trouvent dans la partie 3 de ce rapport.

## 2 Méthode d'analyse développée au département R&D Eau de Paris

Dans la liste des composés citée dans le paragraphe précédent, il existe une réelle diversité des structures chimiques des composés à étudier et par conséquent, de leurs propriétés physico-chimiques (tels que le pKa et le degré d'hydrophobie estimé via les logP), comme présenté dans le tableau 2 :

**Tableau 2 : Masse molaire, pKa et coefficient de partage octanol-eau des antibiotiques faisant partie de notre méthode analytique et regroupés en famille**

Type	Molécule	Mw (g/Mol)	pKa	logP syres
Sulfamides	Sufachlorpyridazine	285	5 - 7.5	0,31
	Sulfamérazine	264	7.1 -2.3	0,21
	Sulfaméthoxazole	253	5,6	0,48
Macrolides	Erythromycine	734	8,8	2,48
	Spiramicine	843	7,9	/
	Roxithromycine	837		2,75
Pyrimidines	Triméthoprim	290	7,2	0,73
Bétalactamines	Ampicilline	365	2.4 - 7.4	0,97
	Amoxicilline	403	2.7 - 7.3	1,45
Tétracyclines	Oxytétracycline	515		-3,6
	Chlortétracycline	497	3.3 - 7.3 - 9.1	-3,6
	Tétracycline	481	3.3 - 7.7 - 9.5	-3,7
Quinolones	Acide oxolinique	261		1,7
	Ciprofloxacine	331		0
	Norfloxacine	319		-0,31
	Ofloxacine	361	5.7 - 7.9	-0,2

Les masses moléculaires sont comprises entre 253 g/mol et 834 g/mol, une grande partie des molécules ayant une masse moléculaire entre 300 et 500 g/mol. Ces masses moléculaires sont compatibles avec une détection par spectrométrie de masse.

Concernant les propriétés acido-basiques, lorsque les données sont disponibles, les antibiotiques étudiés sont des acides ou des bases faibles dont les pKa varient entre 2,4 et 9,5. Certaines molécules possèdent plusieurs pKa. Ces données sont prises en compte lors de l'ajustement du pH pour l'extraction. Les coefficients de partage octano-eau sont une données important tant pour la séparation que pour l'extraction. Ici encore, une grande disparité est constatée : les tétracyclines sont parmi les molécules les plus hydrophyles (LogKow de l'ordre de -3,6) alors que les macrolides ont un caractère plus hydrophobe (LogKow de l'ordre de 2,5).

Cette situation analytique peut se résoudre de deux façons. La première solution consiste à mettre au point plusieurs techniques analytiques chacune groupant des analytes sélectionnés en fonction de leurs caractéristiques physico-chimique proches par exemple. Cette méthodologie a pour avantage de mettre au point des méthodes d'analyse bien adaptées aux divers composés, néanmoins elle présente l'inconvénient de réaliser plusieurs extractions et plusieurs injections sur des appareils identiques ou différents. Ceci a un coût en terme de consommables, de temps d'analyse et en volume d'échantillons nécessaire.

La deuxième solution réside dans une approche multirésidus consistant à étudier l'ensemble des molécules, en acceptant de faire des compromis quant aux résultats de l'étude des paramètres analytiques. Ainsi, lors du choix d'un support d'extraction sur phase solide, celui-ci doit présenter les meilleures caractéristiques pour

l'ensemble des composés soit un rendement d'extraction le plus élevé possible pour la gamme la plus large des composés et le moins faible. Cette méthodologie permet de ne réaliser qu'une analyse, ce qui réduit les coûts et le temps d'analyse ainsi que le volume nécessaires en échantillon. Cependant, certains composés auront des rendements d'extraction moins importants que si une méthode leur était dédiée.

Ces deux méthodologies présentent des avantages et inconvénients. Dans la configuration de cette étude, notre choix s'est porté sur la mise au point d'une méthode multirésidus afin de limiter les coûts et temps d'analyse ainsi que les volumes d'échantillons nécessaires. La méthode analytique consistera donc en une extraction sur phase solide, en ligne ou en différé suivie d'une séparation par chromatographie en phase liquide et d'une détection par spectrométrie de masse en tandem. Lors de la phase de mise au point, chacune des étapes décrites précédemment a été étudiée, optimisée ; ces études sont décrites dans les paragraphes suivants.

## 2.1 Traitement de l'échantillon – Extraction sur phase solide

Le traitement de l'échantillon est de loin l'étape la plus longue et l'une des principales sources d'erreurs d'un protocole d'analyse de trace. Cependant, cette étape d'extraction et de concentration est indispensable afin d'atteindre les niveaux de performances requis, notamment en terme de sensibilité. La méthode doit répondre à certains critères comme la fiabilité et la rapidité ; elle doit donc comporter peu de manipulations afin de limiter les pertes et la contamination de l'échantillon.

Une étape de filtration ou de centrifugation peut être nécessaire pour les matrices les plus chargées afin d'éliminer une partie des matières en suspension pouvant obturer les cartouches d'extraction. De plus, afin d'éviter l'adsorption sur le verre de molécules telles que les tétracyclines, nous procédons à l'ajout d'un agent complexant (EDTA à 0,1 g/L) dans l'échantillon avant extraction.

Le principe de l'extraction sur phase solide ne sera pas développé dans ce rapport. Le choix d'un support SPE est une étape clef dans l'élaboration du procédé d'extraction, ce choix est évidemment orienté suivant le type de matrice à analyser et la nature des analytes à extraire. Une très grande diversité de phases est disponible auprès de nombreux fournisseurs. Dans le cadre du développement d'une méthode d'extraction de molécules antibiotiques à de faibles concentrations dans des eaux plus ou moins chargées, nous avons testé quatre adsorbants différents : Oasis HLB (Waters), Lichrolut EN (Merck), Chromabond Easy (Macherey-Nagel), Bond Elut C18 (Varian). Deux de ces phases stationnaires sont des particules de silices greffées par des groupements octadécyles, Lichrolut EN et Bond Elut C18. Les deux autres sont des phases polymériques à base de polystyrène-divinylbenzène pour la Chromabond Easy et à base de divinylbenzène et N-vinylpyrrolidone pour l'Oasis HLB.

Différents pH d'extraction (pH 4, 7 et 8,5) et solvants d'élution (mélange méthanol – dichlorométhane (50:50, v/v), du méthanol pur, de l'acétonitrile pur) ont été testés sur une matrice Eau désionisée dopée à 100 ng/L des différents composés. Il ressort que le support Oasis HLB est le plus versatile : il permet l'extraction du plus grand nombre de molécules.

Le mélange méthanol-dichlorométhane est trop apolaire pour bien solubiliser les composés dont l'hydrophobie est peu marquée. L'acétonitrile et le méthanol produisent de meilleurs résultats, l'acétonitrile étant plus approprié à la gamme des composés étudiés ; il peut cependant être remplacé par le méthanol en cas de pénurie.

Globalement, les rendements d'extraction obtenus à pH=8.5 sont plus importants que ceux obtenus à pH=4 pour la majorité des composés. Cependant, des valeurs de rendements d'extraction trop faibles à pH=8.5 pour certaines molécules, nous poussent à maintenir une deuxième extraction sur phase solide à pH acide. Par ailleurs, des extractions réalisées à pH neutre nous donnaient des valeurs de rendement inférieures ou similaires à celles obtenus à pH acide ou basique, c'est pourquoi cette solution intermédiaire n'est pas satisfaisante car pas suffisamment performante. Le tableau ci-après détaille la méthode d'extraction utilisée (dispositif SPE *Rapid Trace*) :

Extraction en différencé acide	Extraction en différencé basique
Ajout d'EDTA à l'échantillon à hauteur de 0.1g/L	Ajout d'EDTA à l'échantillon à hauteur de 0.1g/L
Basification de l'échantillon à pH=8.5-9 par ajout ammoniac	Basification de l'échantillon à pH=8.5-9 par ajout ammoniac
Lavage de la cartouche par : -5 mL acétonitrile -5 mL de méthanol -5 mL d'eau à pH=8.5-9	Lavage de la cartouche par : -5 mL acétonitrile -5 mL de méthanol -5 mL d'eau à pH=8.5-9
Extraction de 200 mL sur cartouche oasis HLB, 3cc  Séchage de la cartouche avant reprise	Extraction de 200 mL sur cartouche oasis HLB, 3cc  Séchage de la cartouche avant reprise
Elution par 2.5mL d'acétonitrile	Elution par 2.5mL d'acétonitrile
Evaporation sous flux d'azote	Evaporation sous flux d'azote
Reprise par 150µL avec un mélange eau:acétonitrile (95/5) facteur de concentration : 1333  Ajout du mélange d'étalons internes à cette étape, concentrations finales des étalons internes 200µg/L	Reprise par 150µL avec un mélange eau:acétonitrile (95/5) facteur de concentration : 1333  Ajout du mélange d'étalons internes à cette étape, concentrations finales des étalons internes 200µg/L

## 2.2 Chromatographie en phase liquide (*Alliance Waters*)

Lors de la mise au point de la méthode plusieurs colonnes chromatographiques ont été testées. Le choix du type de phase stationnaire dépend des caractéristiques physico-chimiques des analytes (acidité, hydrophobie, groupement réactionnels). Trois phases stationnaires de type C18 ont été testées : une Symmetry C18 (50x2.1mm, 3.5µm), une Sunfire (150x2.1mm, 3.5µm) et une Polaris (100x2mm, 3µm). Ces phases stationnaires se comportent selon un mécanisme de séparation de partage à polarité de phase inversée. Néanmoins, elles présentent des différences structurales qui peuvent influencer de façon plus ou moins importante sur la séparation. La colonne Symmetry que nous avons testée présentait des performances inférieures à celles obtenues avec la colonne Polaris : de longues traînées et des dédoublements de pics ont été observés sur certains analytes. C'est pourquoi cette colonne, dont la chimie des greffons ne semble pas la plus adaptée à nos besoins, n'a pas été retenue. Les colonnes Polaris et Sunfire ne présentent pas ces traînées de pic, les greffons plus polaires sont mieux adaptés à notre type d'analytes. La séparation est plus homogène sur la colonne Polaris, que nous avons donc sélectionnée.

La composition de la phase mobile est cruciale pour la séparation mais également pour la détection. Le détecteur étant un spectromètre de masse, il est nécessaire de pouvoir vaporiser et ioniser de façon efficace la phase mobile et les analytes. Certains additifs de la phase mobile (acides, bases, tampons) permettent une meilleure ionisation des analytes et facilitent ainsi leur détection. Il est donc important de faire varier la composition de la phase mobile.

Nous avons testé deux principaux additifs l'acide formique à divers pourcentages et le formiate

d'ammonium à divers pourcentages également. Ces additifs ont été ajoutés à la phase mobile qui est constituée d'eau et d'acétonitrile.

Le pourcentage donnant la meilleure réponse en masse est 0.01% d'acide formique et ce pour la majorité des composés. Les expériences réalisées avec la phase mobile pure (eau et acétonitrile sans aucun additif) présentaient des résultats moins performants au niveau de la détection qu'avec 0.01% d'acide formique. Les expériences menées avec le formiate d'ammonium étaient également moins performantes qu'avec l'acide formique. C'est pourquoi nous utilisons une phase mobile constituée d'eau et d'acétonitrile contenant chacun 0.01% d'acide formique.

L'acétonitrile a également été remplacé par du méthanol afin d'étudier si des changements bénéfiques à la séparation intervenaient. Nous avons observé quelques inversions dans l'ordre d'élution des composés, des performances séparatives similaires, des temps de rétention et une pression en tête de colonne plus élevés. Il est donc possible de remplacer l'acétonitrile par du méthanol en cas de besoin, moyennant un recalage du spectromètre de masse vis-à-vis de la rétention des diverses molécules.

### 2.3 La spectrométrie de masse (*Q micro*)

La première étape lors du développement d'une nouvelle méthode analytique utilisant un spectromètre de masse consiste à déterminer et optimiser les paramètres du détecteur. Ces paramètres sont :

- les ions parents issus des composés à analyser (M) , généralement des adduits de type  $[M+H]^+$  en mode positif ou des adduits  $[M-H]^-$  en mode négatif,
- les ions fils stables et majoritaires,
- la tension du capillaire,
- la tension de cône, l'énergie de collision,
- la température de la source et de désolvation,
- et enfin les débits des gaz.

En réalisant une infusion de chacun des composés à analyser, il est possible de faire varier ces paramètres et de déterminer pour quelles valeurs de ces paramètres la réponse est la plus intense.

Nous travaillons actuellement avec spectromètre de masse qui est un triple quadripôle, le quatre micro (Waters) dont la source d'ionisation utilisée est l'ESI. Les paramètres tels que la température de la source, la température de désolvation, la tension du capillaire et les débits des gaz ont été optimisés en fonction de l'ensemble des molécules. En effet, ces paramètres ne peuvent varier au cours d'une même analyse. Ils doivent donc être adaptés aux plus grand nombre de molécules étudiées. Après une étude de ces paramètres sur nos composés, il s'est avéré qu'une tension de capillaire de 3.5kV, une température de la source de 120°C et une température de désolvation de 350°C étaient les plus appropriées. En effet, une tension de capillaire plus faible ou plus élevée entraîne une diminution de l'intensité du signal et une moins bonne ionisation des composés dans la majorité des cas. Le tableau 3 récapitule les paramètres du spectromètre de masse optimisés selon les molécules.

De plus, afin de limiter l'influence des effets de matrice pour exhalter ou diminuer la réponse du spectromètre de masse, nous avons utilisé des étalons interne deutériés qui sont ajoutés à l'extrait après évaporation. Lorsque l'ensemble des paramètres analytiques étudiés dans les paragraphes précédents a été mis au point, la linéarité et les limites de détection et de quantification peuvent être déterminées. Dans notre méthode, le domaine de linéarité est compris entre 3 et 500 ng/L et les limites de quantification que nous avons choisies sont résumées dans le tableau 4.

**Tableau 3 : paramètres d'ionisation optimisés du spectromètre de masse.**

Classe	molécule	Ion père (m/z)	Ion fils (m/z)	tension de cône	Energie de collision
Sulfamides	Sufachlorpyridazine	284,6	155,7	20	27
	Sulfamérazine	264,6	155,7	15	17
	Sulfaméthoxazole	253,8	155,7	12	12
	Erythromycine	734,2	157,8	23	25
	Spiramicine	421,9	100,8	15	13
	Roxithromycine	836,7	157,8	30	30
Pyrimidines	Triméthoprime	290,7	229,8	37	20
Bétalactamines	Abamectine	895,8	327,3	7	50
	Ampicilline	397,5	348,6	20	15
	Amoxicilline	381,8	332,8	20	18
Tétracyclines	Oxytétracycline	460,5	425,8	20	13
	Chlortétracycline	478,4	443,6	23	17
	Tétracycline	460,5	425,8	20	13
Quinolones	Acide oxolinique	261,7	243,7	20	15
	Ciprofloxacine	331,5	287,6	32	15
	Norfloxacine	319,7	275,8	27	15
	Ofloxacine	361,6	317,7	28	12

**Tableau 4 : tableau récapitulatif des limites de quantification choisies pour les antibiotiques étudiés.**

Classe	Molécule	LoQ (ng/L)
Sulfamides	Sufachlorpyridazine	23
	Sulfamérazine	4
	Sulfaméthoxazole	8
Macrolides	Erythromycine	5
	Spiramicine	56
	Roxithromycine	5
Glycopeptides	Vancomycine	9
Pyrimidines	Triméthoprime	3
Bétalactamines	Ampicilline	11
	Amoxicilline	23
Tétracyclines	Oxytétracycline	7
	Chlortétracycline	11
	Tétracycline	11
Quinolones	Acide oxolinique	6
	Ciprofloxacine	11
	Norfloxacine	11
	Ofloxacine	11

### 3 Méthode d'analyse développée à l'UMR 7619 Sisyphe

#### 3.1 Choix des molécules

Pour ces travaux, nous avons choisi 23 molécules de 9 familles qui comprennent les 16 molécules initialement analysées par notre équipe au sein du PIREN-Seine (Tamtam, 2008). Le choix de ces molécules a été effectué en fonction des quantités utilisées, de leurs propriétés physico-chimiques, de leurs fréquence de détection dans l'environnement, ainsi que de leur persistance dans l'environnement.

Ces molécules sont pour la plupart d'entre elles communes aux emplois en médecine humaine et en médecine vétérinaire, cependant quelques unes sont plus spécifiques de l'un ou l'autre, et certaines sont réservées à des usages en hôpitaux. Cette particularité des emplois peut permettre de caractériser la nature d'apports domestiques ou hospitaliers.

Le tableau 5 indique les 23 antibiotiques choisis pour cette étude, ainsi que leurs propriétés physico-chimiques et leurs usages.

Antibiotiques		Propriétés physico-chimiques				Usages		
		Log K <sub>ow</sub>	Hydro-solubilité (g/L)	K <sub>oc</sub> (L/kg)	pKa	Hospitalier	Domestique	Vétérinaire
Macrolines	Tylosine	3,50 <sup>1</sup>	5	550 - 7990 <sup>1</sup>	3,3 - 7,5			x
	Erythromycine	3,06	2		8,8	x	x	x
Tetracyclines	Chlorotétracycline	-0,62	0,6		3,3 - 7,3 - 9,1	x	x	x
	Tétracycline	-1,19	0,23		3,3 - 7,7 - 9,5	x	x	x
Beta-lactamines	Amoxiciline	0,87	3,43		3,4 - 6,7 - 9,4	x	x	x
	Céfotaxime	-	50		2,1	x		
Diaminopyrimidine	Triméthoprime	0,91	0,4		6,8 - 3,2	x	x	x
	Ormétoprime	-			nd	x	x	
Sulfamides	Sulfadimidine	0,89	-	60,0 - 208,3 <sup>1</sup>	2,3 - 7,1	x	x	
	Sulfaméthoxazole	0,89	-		5,6	x	x	x
Quinolones	Acide oxolinique	0,68	-	1190 - 4510 <sup>1</sup>	6,4	x	x	x
	Acide nalidixique	1,41			8,6	x	x	x
	Fluméquine	1,70	-		6,8	x	x	x
	Acide pipemidique	-	-		5,4 - 8,2	x	x	
Fluoroquinolone	Enrofloxacin	1,10	-	16510 - 99980 <sup>2</sup>	5,8 - 7,4			x
	Enoxacin	-	-		6,0 - 8,5	x	x	x
	Loméfloxacine	-	-		5,0 - 6,2 - 9,0	x	x	x
	Sarafloxacine	-	-		5,6 - 8,2			x
	Norfloxacine	-1,03	-		6,2 - 8,3	x	x	
	Ciprofloxacine	0,40	-	61000 <sup>1</sup>	6,2 - 8,5	x		
	Ofloxacine	0,35	-	44100 <sup>2</sup>	5,7 - 7,9	x	x	
Imidazolés	Ornidazole	-	-		nd	x	x	
Glycopeptides	Vancomycine	-0,31	-		2,2 - 7,78 - 12	x		

**Tableau 5 : propriétés physico-chimiques et usage des 23 antibiotiques retenus**

Ces composés ont été fournis par Sigma-Aldrich et VWR (pureté > 95 %). Les étalons, obtenus sous forme de poudre, sont dissous dans le méthanol pour obtenir une solution à 1 mg/mL ; dans le cas de l'amoxiciline, l'amoxiciline-d4 et la vancomycine, les solutions sont préparées dans l'eau ultra-pure (MQ). Ces solutions mères sont conservées à -18 °C dans des flacons ambrés.

Un mélange étalon contenant tous les composés à une concentration de 10 µg/mL est ensuite préparé par dilution des solutions mères. Cette solution de travail est conservée à 4°C pendant une période maximale d'un mois.



## 3.2 Préparation des échantillons

Les volumes prélevés sont de 20 mL pour les échantillons d'effluent de STEP et de 500 mL pour les échantillons d'eau de surface. Ils sont filtrés successivement sur deux filtres : fibre de verre 0,7 µm (GF/F, Whatman) puis nylon 0,2 µm (Millipore). Les échantillons sont conservés à 4°C s'ils sont analysés dans un délai maximal d'une semaine, sinon ils sont conservés à -18°C pour pouvoir être analysés ultérieurement (< 2 mois). Un test de conservation a en effet montré que les 23 antibiotiques dosés sont stables dans les échantillons d'eaux de rivière filtrés à 0,2 µm pendant au moins une semaine. Les filtres sont conservés pour analyse ultérieure de la phase particulaire (perspectives de travail 2010).

Après filtration, les échantillons d'effluents hospitaliers et d'effluents domestiques à forte charge solide sont dilués avec de l'eau MQ (30 et 10 fois, respectivement), avant analyse par SPE-LC-MS/MS. Ceci permet de minimiser les effets matriciels (suppression de signal), tout en permettant de conserver des limites de détection acceptables.

Les échantillons de sédiment de surface (0-2 cm) sont homogénéisés, puis tamisés sur un tamis de 1 mm et conservés à -18°C avant analyse.

### 3.2.1 Préconcentration en ligne couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Les échantillons sont analysés avec un système de préconcentration en ligne (Online-SPE) Agilent, associé à un chromatographe en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS) 6410B Agilent.

### 3.2.2 Préconcentration en ligne

Le système online SPE est équipé d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur, d'un passeur automatique d'échantillons, ainsi que d'unités de 6 valves automatiques qui permettent de passer l'échantillon sur une cartouche d'extraction, puis d'éluer les analytes en les transférant directement sur la colonne analytique permettant leur séparation avant leur détection par MS/MS. Ce système permet d'injecter la totalité de l'échantillon dans le système.

Lors du développement méthodologique réalisé en 2009, nous avons optimisé les paramètres suivants : pH des échantillons (basique, neutre et acide), volume injecté (900, 1800 et 2700 µL), type de cartouche, phase mobile (solvant et pH), ainsi que le débit de chargement (0,5, 1, 1,5 et 2 mL/min). Les conditions opératoires retenues sont les suivantes : cartouche C<sub>18</sub>, volume d'injection fixé à 1800 µL, débit de chargement de 1 mL/min, gradient d'élution eau MQ/méthanol (acidifiés avec 0,1 %). Les échantillons sont analysés en 2 fois : une première fois en milieu acide (échantillons et solvants acidifié avec 0.1% acide formique) pour les fluoroquinolones et une seconde fois à pH neutre pour l'amoxiciline et l'érythromycine une seule fois en milieu neutre (échantillons et solvants). Pour les autres molécules les rendements récupération varient peu entre ces deux conditions. Les conditions utilisées pour le conditionnement des cartouches C<sub>18</sub> sont similaires pour les deux analyses.

### 3.2.3 Analyse par HPLC-MS/MS

#### • Séparation par Chromatographie liquide

Le système HPLC est constitué d'un module de séparation d'une pompe binaire (600 bar), d'un dégazeur à vide et d'un passeur automatique d'échantillons. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne (Zorbax Eclipse Plus, 150 mm x 2,1 mm, 3,5 µm). Les phases mobiles sont : (A) eau MQ + 5% méthanol + 0,1% acide formique, (B) acétonitrile + 0,1% acide formique. La colonne est thermostatée à 35 °C et le gradient de solvants utilisés est décrit dans le tableau 6.

**Tableau 6. Gradient HPLC**

Temps (min)	Débit (mL/min)	Solvants	
		A (%)	B (%)
0	0,5	95	5
2	0,5	75	25
4	0,5	65	35
7	0,5	25	65
7,1	0,5	0	100
10	0,5	0	100
10,5	0,5	95	5
12,5	0,5	95	5

- **Détection par spectrométrie de masse en tandem**

La détection des composés est réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle (6410 QQQ, Agilent), avec un mode d'ionisation électrospray (ESI). Les données MS/MS sont acquises en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) en mode positif (ESI+). Le gaz de nébulisation est l'azote (11 L/h), tandis que l'argon est utilisé comme gaz de collision. La température de la source est de 350°C. L'optimisation des paramètres MS/MS (fragmenteur (Frag) et l'énergie de collision (CE)) est effectuée à l'aide du logiciel *Agilent Optimizer* (tableau 7).

**Tableau 7 : Paramètres MS/MS**

Antibiotiques		[M+H] <sup>+</sup>	Prod ion 1 (quantifier)	Frag (V)	CE (V)	Prod ion 2 (qualifier)	Frag (V)	CE (V)
Macrolines	Tylosine	916,5	174,1	185	40	772,5	185	28
	Erythromycine	734,5	158,1	175	28	116,1	175	48
Tétracyclines	Chlorotétracycline	479,1	444,1	140	28	462,1	140	12
	Tétracycline	445,2	410,2	165	16	154,1	165	24
Beta-lactamines	Amoxiciline	366,1	114,0	100	17	208,1	100	9
	Amoxiciline-d4	370,1	114,0	85	16	212,0	85	4
	Céfotaxime	456,1	396,0	120	4	125,0	120	60
Diaminopyrimidines	Triméthoprim	291,2	123,1	145	24	261,1	145	24
	Ormétoprim	275,2	123,1	145	21	259,2	145	25
Sulfamides	Sulfadimidine	279,1	186,1	120	12	124,0	120	24
	Sulfaméthoxazole	254,1	92,0	110	24	156,0	110	10
	Sulfaméthoxazole-d4	258,1	96,1	100	24	160,0	100	12
Quinolones	Acide oxolinique	262,1	243,7	110	12	216,0	110	28
	Acide nalidixique	233,1	215,1	87	8	187,1	87	24
Fluoroquinolones	Fluméquine	262,1	244,1	115	16	202,1	115	32
	Acide pipemidique	304,1	286,2	105	12	215,1	105	36
	Enrofloxacin	360,2	316,2	140	16	342,2	140	16
	Enoxacin	321,1	303,1	125	16	232,1	125	36
	Loméfloxacine	352,2	265,1	140	20	308,1	140	12
	Sarafloxacin	386,1	342,2	145	16	368,1	145	20
	Norfloxacin	320,1	276,2	135	12	233,1	135	24
	Norfloxacin-d4	325,2	281,1	135	12	237,1	135	16
	Ciprofloxacine	332,1	314,2	135	16	231,1	135	40
	Ofloxacine	362,2	318,2	140	16	261,1	140	24
Imidazolés	Ornidazole	220,0	128,1	97	12	82,1	97	28
Glycopeptides	Vancomycine	725,0	144,1	135	8	100,1	135	40

- **Quantification**

L'un des problèmes de la spectrométrie de masse est la suppression de signal communément observée en mode ESI. Plusieurs solutions sont proposées pour compenser ce problème (Gomez *et al.*, 2007, Batt *et al.*, 2008, Petrovic *et al.*, 2006, Hernando *et al.*, 2006), telles que la dilution des extraits, l'ajout de nouvelles procédures de purification des échantillons ou l'utilisation d'étalons internes. Nous avons retenu cette dernière solution puisque nous avons utilisé des étalons deutérés pour quantifier nos analytes par étalonnage interne.

Actuellement, il n'existe pas d'étalon interne marqué au deutérium pour chacune des 23 molécules retenues. Aussi, nous avons utilisé les trois étalons internes deutérés suivants : sulfaméthoxazole-d4, amoxiciline-d4 et norfloxacine-d4 pour la quantification des 23 antibiotiques. Le tableau 8 indique l'étalon interne utilisé pour chaque analyte.

**Tableau 8 : Etalons internes utilisés pour la quantification des analytes**

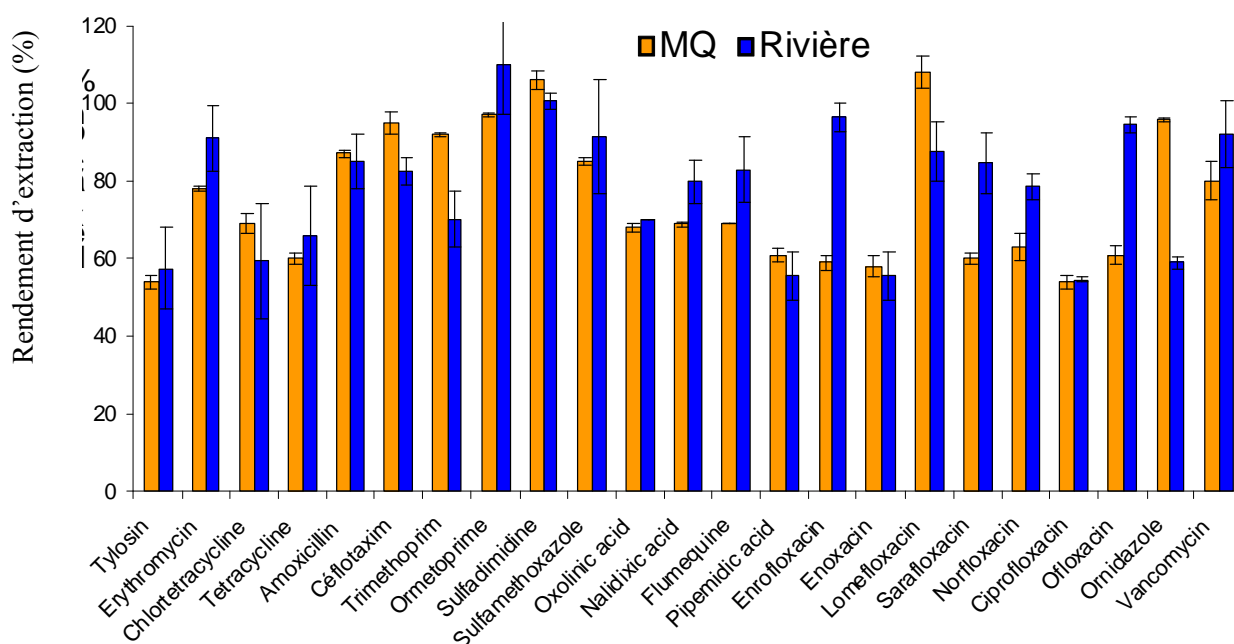
	<b>Antibiotiques</b>	<b>Standards internes</b>
<b>Macrolides</b>	Tylosine	Norfloxacine-d4
	Erythromycine	Amoxiciline-d4
<b>Tetracyclines</b>	Chlortetracycline	Sulfaméthoxazole-d4
	Tetracycline	Sulfaméthoxazole-d4
<b>Beta-lactams</b>	Amoxiciline	Amoxiciline-d4
	Cefotaxime	Amoxiciline-d4
<b>Diaminopyrimidines</b>	Trimethoprime	Amoxiciline-d4
	Ormetoprime	Amoxiciline-d4
<b>Sulfamides</b>	Sulfadimidine	Sulfaméthoxazole-d4
	Sulfaméthoxazole	Sulfaméthoxazole-d4
<b>Quinolones</b>	Acide oxolinique	Norfloxacine-d4
	Acide nalidixic	Norfloxacine-d4
<b>Fluoroquinolonne</b>	Flumequine	Norfloxacine-d4
	Acide pipemidique	Norfloxacine-d4
	Enrofloxacine	Norfloxacine-d4
	Enoxacine	Norfloxacine-d4
	Lomefloxacine	Norfloxacine-d4
	Sarafloxacine	Norfloxacine-d4
	Norfloxacine	Norfloxacine-d4
	Ciprofloxacine	Norfloxacine-d4
Ofloxacine	Norfloxacine-d4	
<b>Imidazoles</b>	Ornidazole	Sulfaméthoxazole-d4
<b>Glycopeptides</b>	Vancomycine	Sulfaméthoxazole-d4

On notera que La méthode d'analyse des échantillons solides est décrite dans un autre rapport d'activité PIREN-Seine (Dinh et al, 2010).

### 3.3 Résultats

#### 3.3.1 Rendement extraction on-line SPE

Les rendements de récupération des 23 molécules ont été déterminés avec de l'eau MQ et de l'eau de rivière dopées à des concentrations de 200 ng/l et analysés avec des paramètres optimisés pour le protocole on-line SPE /LC-MS/MS (figure 1).



**Figure 1 : Rendements de récupération des 23 antibiotiques dans des échantillons d'eau MQ et d'eau de rivière dopés à 200 ng/L (analyse on-line SPE/LC-MS/MS).**

Le rendement d'extraction est supérieur à 65 % pour la plupart des analytes. En outre, l'influence de la présence de carbone organique dissous (~ 5 mg/L) est négligeable car on n'observe pas de différence de rendement d'extraction importante entre des échantillons d'eau MQ et d'eau rivière dopés avec des antibiotiques.

#### 3.3.2 Quantification par étalonnage interne

La quantification des analytes a été validée pour un échantillon eau rivière dopé avec les 23 antibiotiques et avec les 3 étalons internes. Les résultats ont montré que nous pouvons utiliser le même standard interne pour quantifier les antibiotiques d'une même famille, ou les antibiotiques d'autre famille s'ils ont les mêmes réponses malgré les suppression-signal de MS/MS. Les limites de détection des 23 molécules varient entre 1,1 ng/L et 15,3 ng/L (Tableau 9).

Programme PIREN-Seine : Analyse d'antibiotiques dans les eaux

	Antibiotiques	Milieu SPE	Standards internes	Concentration nominale (ng/L)	Concentration déterminée expérimentalement (ng/L)	LDD* (ng/L)
<b>Macrolides</b>	Tylosine	Acide	Norfloxacine-d4	200	200 \ 12	0,6
	Erythromycine	Neutre	Amoxiciline-d4	200	218 \ 14	0,8
<b>Tetracyclines</b>	Chlortetracycline	Acide	Sulfaméthoxazole-d4	200	220 \ 16	9,8
	Tetracycline	Neutre	Sulfaméthoxazole-d4	200	196 \ 2	1,8
<b>Beta-lactames</b>	Amoxiciline	Neutre	Amoxiciline-d4	200	194 \ 6	15,0
	Cefotaxime	Neutre	Amoxiciline-d4	200	188 \ 16	3,7
<b>Diaminopyrimidines</b>	Trimethoprime	Neutre	Amoxiciline-d4	200	206 \ 6	1,5
	Ormetoprime	Neutre	Amoxiciline-d4	200	208 \ 4	1,9
<b>Sulfamides</b>	Sulfadimidine	Acide	Sulfaméthoxazole-d4	200	194 \ 2	1,4
	Sulfaméthoxazole	Acide	Sulfaméthoxazole-d4	200	204 \ 4	3,1
<b>Quinolones</b>	Acide oxolinique	Acide	Norfloxacine-d4	200	196 \ 14	1,7
	Acide nalidixic	Acide	Norfloxacine-d4	200	192 \ 10	3,3
<b>Fluoroquinolones</b>	Flumequine	Acide	Norfloxacine-d4	200	194 \ 14	2,1
	Acide pipémidique	Acide	Norfloxacine-d4	200	218 \ 4	15,0
	Enrofloxacin	Acide	Norfloxacine-d4	200	168 \ 2	3,3
	Enoxacin	Acide	Norfloxacine-d4	200	208 \ 8	4,6
	Lomefloxacin	Acide	Norfloxacine-d4	200	164 \ 2	3,3
	Sarafloxacin	Acide	Norfloxacine-d4	200	224 \ 18	1,1
	Norfloxacine	Acide	Norfloxacine-d4	200	186 \ 8	5,0
	Ciprofloxacine	Acide	Norfloxacine-d4	200	218 \ 2	4,3
Ofloxacin	Acide	Norfloxacine-d4	200	164 \ 2	2,5	
<b>Imidazoles</b>	Ornidazole	Neutre	Sulfaméthoxazole-d4	200	200 \ 12	4,3
<b>Glycopeptides</b>	Vancomycine	Neutre	Sulfaméthoxazole-d4	200	216 \ 10	5,0

*Tableau 9 Quantification des analytes par étalonnage interne ; LDD = limite de détection (S/B=3), déterminée dans des échantillons d'eau de rivière dopés à 20 ng/L*

## 4 Résultats obtenus sur le continuum de l'Orge et de la Seine en 2008 et 2009 (Eau de Paris)

Une fois la méthode développée en offline, des échantillons réels ont été étudiés afin de mesurer les quantités d'antibiotiques présents en divers points d'un continuum sur l'Orge mais également sur la Seine en amont, dans, et en aval de Paris.

### 4.1 Résultats obtenus sur les échantillons issus de rus forestiers

Des échantillons issus de ruisseaux forestiers ont été prélevés afin de servir d'échantillons blancs réels. En effet, leur localisation protégée leur assure des contaminations agricoles ou urbaines que l'on peut supposer quasi-nulle. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle ces échantillons doivent présenter des teneurs en antibiotiques inexistantes ou faibles. Quatre échantillons ont été testés à ce jour et sont décrits dans les paragraphes suivants :

Echantillons d'Octobre : 16/10/2007 prélevés par Julien Passerat

Station 1 : source de l'Oise dans le bois de Chimay

Station 7 sur foret domaniale de St Michel

Station 8 ru de la foret d'Hirson

Station 61 ru de la pâture Par

Les analyses ont été réalisées en SPE offline-LC-MS/MS comme décrit précédemment, les échantillons n'étaient pas filtrés préalablement. Les niveaux de contamination de ces eaux étaient en dessous des seuils de détection et de quantification des antibiotiques étudiés. Il semble donc que ces cours d'eau ne soient pas contaminés par des rejets contenant des antibiotiques. Ces échantillons environnementaux peuvent nous servir de blanc matrice pour de futures études.

## 4.2 Résultats obtenus sur les échantillons issus du bassin de l'Orge

Deux campagnes de prélèvement le long de la Prédecelle ont été menées, l'une à l'automne 2007 et l'autre au printemps 2008. Ces deux campagnes comprennent des prélèvements d'échantillons en sortie et/ou en entrée de la STEP de Briis-sous-Forges, mais également en amont et en aval du rejet de la STEP dans le Prédecelle. L'ensemble de ces échantillons est décrit dans les paragraphes suivants :

### Echantillons de Septembre 2007 :

Orge Viry Châtillon 25/09 à 10h10

Aval étang Vaugrigneuse 24/09/07

Step de Briis sous Forge Rejet 11h10 24/09

Epinay sur Yvette 25/09

Amont Limours 24/09

Aval Step Briis 24/09

Aval Limours 24/09

Orge Villemoisson 25/09

### Echantillons de Mars : 21/03/2008 prélevés par Violaine Augustin et Joëlle Eurin, temps de pluie

Rejet STEP Briis sous Forges

Amont STEP Briis sous Forges, rivière

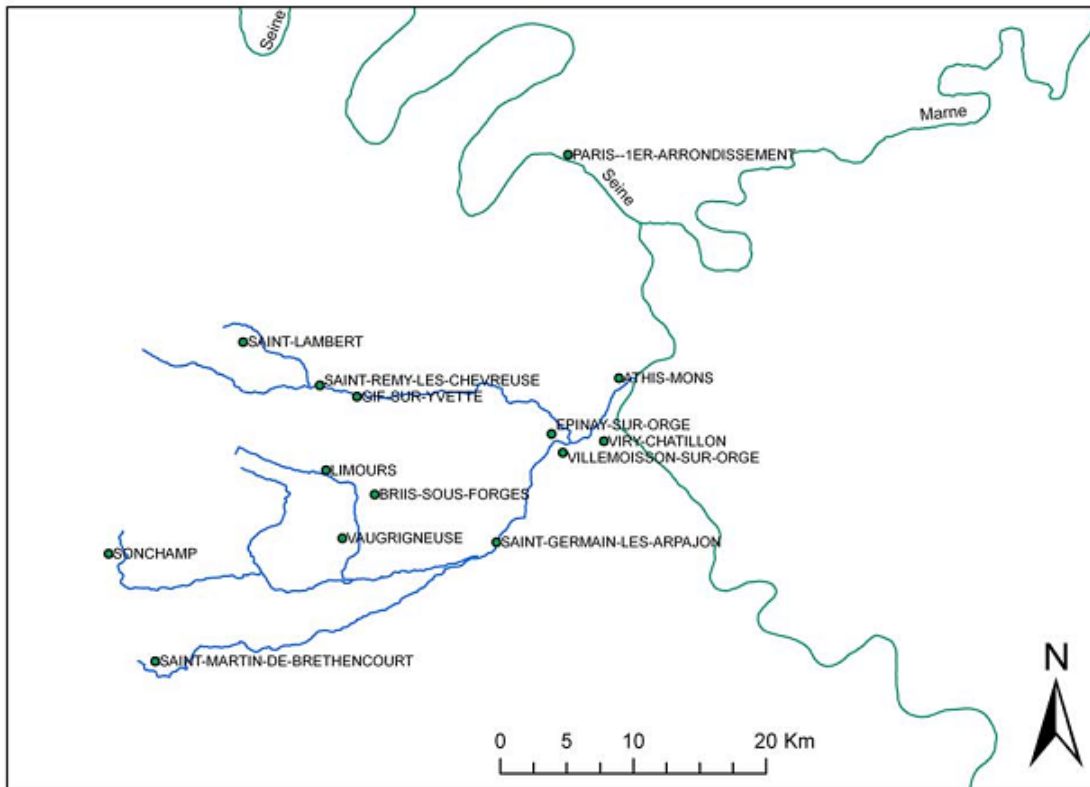
Aval n°1 STEP Briis sous Forges, rivière

Entrée STEP Briis sous Forges

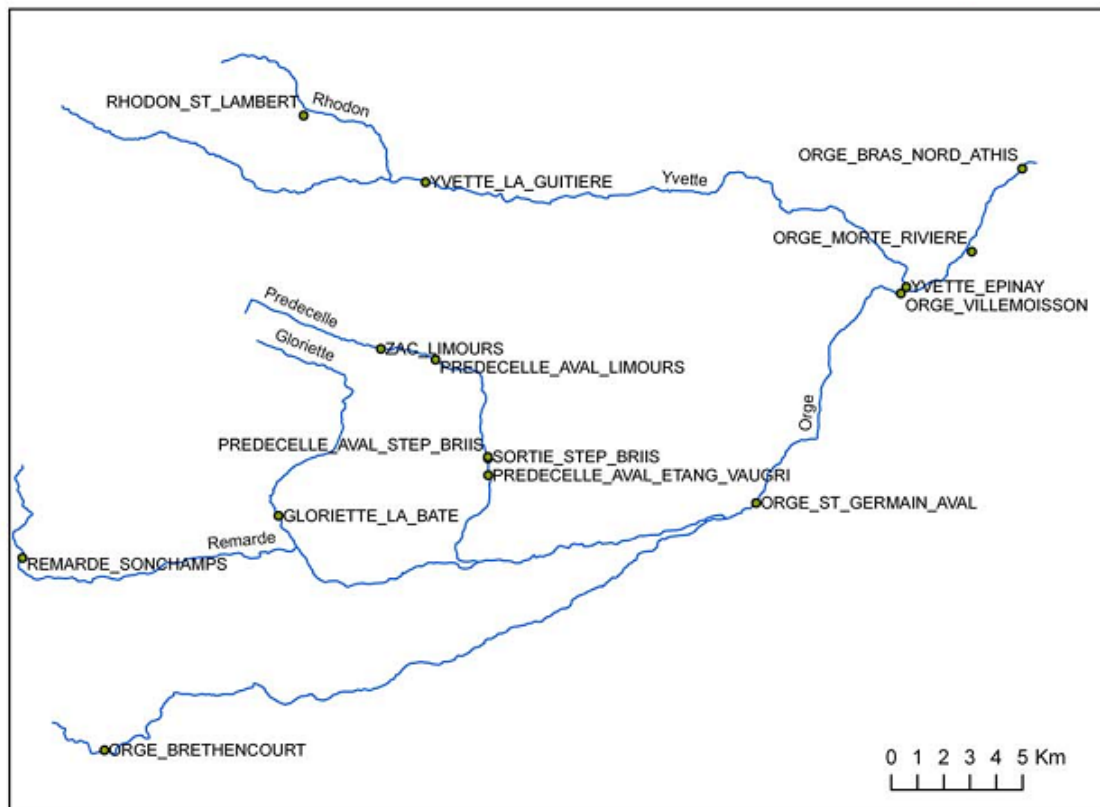
Aval n°2 STEP Briis sous Forges, le long de la Prédecelle

Aval n°3 STEP Briis sous Forges amont étang Vaugrigneuse

Les cartes des points de prélèvements (figure 2 et 3) permettent de situer où l'échantillonnage a été effectué. Briis sous Forges sera ensuite souvent nommé BssF dans différentes figures afin de rendre les légendes plus lisibles.



*Figure 2 : Carte représentant une vue d'ensemble des principaux cours d'eau (en bleu) du bassin versant de l'Orge.*



*Figure 3 : carte représentant les principaux cours d'eau et certains des lieux de prélèvement du bassin versant de l'Orge.*

Ces échantillons ont été analysés selon le protocole Eau de Paris. Il est à noter que nous n'avons pas effectué de filtration préalable à l'analyse de ces échantillons exception faite pour les échantillons issus de l'entrée de la STEP. Ces filtrations étaient nécessaires de par la nature même de ces échantillons et peuvent conduire à des sous-estimations faibles des concentrations des composés retrouvés en entrée de STEP. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 10.

Molécule	LoQ (ng/L)	Rejet step Briis sous Forge	Aval Step Briis	Aval étang Vaugrigneuse	Amont Limours	Aval Limours	Epinay sur Orge	Orge Villemoisson	Orge Viry Châtillon
Sufachlorpyridazine	23	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfamérazine	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfaméthoxazole	8	d	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Erythromycine	5	122,9	44,9	52,7	nd	nd	nd	nd	nd
Spiramicine	56	d	137,9	94,3	nd	nd	nd	nd	nd
Roxithromycine	5	13,5	d	d	nd	nd	nd	nd	nd
Vancomycine	9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Triméthoprime	3	8,3	d	d	nd	nd	d	d	d
Ampicilline	11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amoxicilline	23	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Oxytétracycline	7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Chlortétracycline	11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tétracycline	11	d	12,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acide oxolinique	6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ciprofloxacine	11	11	28	nd	d	nd	nd	nd	nd
Norfloxacine	11	17,9	31,6	d	d	d	d	d	d
Ofloxacine	11	44,6	44,7	12,5	nd	nd	d	nd	nd

*nd : non détecté. D : détecté mais non quantifiable*

**Tableau 10 : tableau récapitulatif des niveaux de contamination des échantillons prélevés lors d'une campagne effectuée en Septembre 2007 sur le bassin versant de l'Orge (en ng/L).**

Les résultats exprimés dans le précédent sont intéressants de par les valeurs retrouvées dans l'environnement qui sont de l'ordre de la dizaine de ng/L à la cinquantaine de ng/L. De plus, un peu plus de la moitié des antibiotiques étudiés ont été retrouvés dans les divers échantillons. Par ailleurs, les pics de concentration de ces composés sont bien liés à une activité humaine puisqu'on les retrouve principalement dans les eaux rejetées par la station d'épuration dans la rivière et en aval proche du point de rejet. Un effet de dilution important, de biodégradation ou de photodégradation interviennent ensuite, ce qui explique que ces antibiotiques soient détectés mais que leur concentration ne puisse être qu'estimée.



Molécule	LoQ (ng/L)	Amont STEP Briis sous Forges, rivière	Entrée STEP Briis sous Forges	Rejet STEP Briis sous Forges	Aval n°1 STEP Briis sous Forges, rivière	Aval n°2 STEP Briis sous Forges, le long de la Prédecelle	Aval n°3 STEP Briis sous Forges amont étang Vaugrigneuse
Sufachlorpyridazine	23	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfamérazine	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfaméthoxazole	8	nd	nd	d	nd	nd	nd
Erythromycine	5	nd	d	23,1	d	nd	nd
Spiramicine	56	57,5	nd	164,9	72,3	nd	nd
Roxithromycine	5	nd	d	d	nd	nd	nd
Vancomycine	9	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Triméthoprime	3	d	3,9	25	6,4	4,9	d
Ampicilline	11	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amoxicilline	23	nd	d	nd	nd	nd	Nd
Oxytétracycline	7	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Chlortétracycline	11	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tétracycline	11	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acide oxolinique	6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ciprofloxacine	11	d	17,6	19,8	d	d	d
Norfloxacine	11	d	33,4	21,9	d	d	d
Ofloxacine	11	d	49,2	27,2	d	d	d

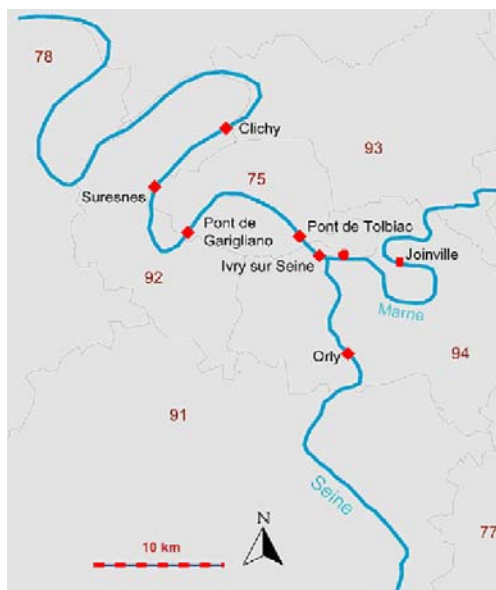
nd : non détecté. D : détecté mais non quantifiable

**Tableau 11 : tableau récapitulatif des niveaux de contamination des échantillons prélevés lors d'une campagne effectuée en mars 2008 sur le bassin versant de l'Orge (ng/L).**

L'analyse qui peut être faite des résultats issus du tableau 11 est similaire à celle faite pour le tableau 10. On retrouve une présence des antibiotiques dans l'environnement liée à une activité humaine puisque les concentrations les plus importantes se situent en entrée et rejet de STEP pour diminuer très vite par effet de dilution et/ou dégradation. Il est à noter que cette campagne de prélèvement a eu lieu sous une forte pluie, d'où un effet de lessivage puis de dilution marqué.

### 4.3 Résultats obtenus sur les échantillons de Seine

Des prélèvements sur la Seine et en Marne ont été effectués entre les mois de Septembre 2008 et Mai 2009 à raison d'un prélèvement par semaine pendant le premier mois puis à une fréquence d'un prélèvement par mois. Ces prélèvements ont eu lieu en amont de la ville de Paris jusqu'en aval de la ville. La figure 4 schématise sur une carte les points de prélèvements en Seine. Les 100 prélèvements effectués ont été analysés selon le processus analytique décrit dans les paragraphes précédents.



**Figure 4 : Carte représentant une vue d'ensemble des principaux points de prélèvements le long de la Seine.**

Les résultats globaux de cette campagne sont comparables à ceux observés en Orge en terme de molécule présente et le plus souvent en terme de niveau de contamination.

Parmi les sulfamides, la Sufachlorpyridazine et la Sulfamérazine n'ont été détectées dans aucun de nos échantillons. Seul le sulfaméthoxazole est quantifié (min : 8 ng/L max 36 ng/L) principalement entre Décembre 08 et mai 2009. Parmi les macrolides, l'érythromycine n'est quantifié que sur 6 prélèvements (Joinville en Mai 2009 ; Ponts de Tobiac, du Garigliano et de Suresnes en Avril et Mai 2009 - min : 10 ng/L max 152 ng/L). La spiramicine est détectée sur 20 points, principalement en Février et mai 2009 (min : 57 ng/L max 354 ng/L). On note un bruit de fond de Roxythromycine tous le long de l'année et sur la majeure partie des sites de prélèvement ; ce bruit de fond est de l'ordre de 5 à 15 ng/L. Cet antibiotique est très ponctuellement quantifié à des teneurs plus forte mais inférieures à 50 ng/L. La pollution en triméthoprime est comparable au cas de la Roxythromycine qui est présent dans la majorité des prélèvements, entre sa limite de détection (3 ng/L) et environ 10 ng/L.

Les bêtalactamines et la vancomycine n'ont été quantifiées dans aucun de nos échantillons. Ceci est certainement liée à une très forte instabilité de ces molécules dans nos échantillons (on retrouve le même phénomène sur les échantillons du bassin versant de l'orge).

Parmi les tétracyclines, la chlortétracycline n'est quantifiée dans aucun de nos échantillons ; la tétracycline est quantifiée une unique fois à 12ng/L soit extrêmement près de sa limite de quantification (11ng/L) ; l'oxytétracycline est quantifiée ponctuellement essentiellement en janvier et février 2009 ou en mai 2009 , à des teneurs toujours faibles (> 25 ng/L). Pour les mois d'hiver, les résultats sont probablement liés aux traitements.

Enfin parmi les quinolones, la ciprofloxacine, la norfloxacine et l'ofloxacine ne sont généralement pas quantifiée sauf ponctuellement et à des teneurs maximales de 35ng/L. L'acide oxolinique est quantifié plus régulièrement (12 points) et à des quantités notables pouvant atteindre 215 ng/L.

Le tableau 12 présente les résultats, par point de prélèvement et par date, des antibiotiques détectés le plus régulièrement. Le tableau 13 présente les résultats en flux au niveau du pont de Tolbiac.

**Tableau 12 : tableau récapitulatif des principaux niveaux de contamination des échantillons prélevés lors d'une campagne effectuée en Marne et en Seine entre Septembre 2008 et Mai 2009**

Date prélèvement	Site	Sulfamethoxazole (ng/L)	Spiramycin (ng/L)	Roxythromycin (ng/L)	Triméthoprim (ng/L)
23/09/08	Joinville			5	5
01/10/08	Joinville				3
18/11/08	Joinville				
16/12/08	Joinville				3
03/02/09	Joinville	17	81	10	5
17/03/09	Joinville	9			7
22/04/09	Joinville	10			6
12/05/09	Joinville	25		24	5
23/09/08	Orly			5	5
18/11/08	Orly				3
16/12/08	Orly	11			3
03/02/09	Orly	10	83	5	4
17/03/09	Orly	10			9
22/04/09	Orly			6	5
12/05/09	Orly	16		<5	3
23/09/08	Ivry			5	5
01/10/08	Ivry				3
18/11/08	Ivry				3
16/12/08	Ivry				3
03/02/09	Ivry	14		7	8
17/03/09	Ivry	11			9
22/04/09	Ivry	8		7	11
12/05/09	Ivry			6	9
24/09/08	tolbiac		234	5	5
01/10/08	tolbiac				5
19/11/08	Tolbiac				
17/12/08	Tolbiac				3
07/01/09	Tolbiac	29		16	8
04/02/09	Tolbiac	17	126	10	9
18/03/09	Tolbiac				
22/04/09	Tolbiac	19		7	15
13/05/09	Tolbiac	29		9	10
24/09/08	Garigliano		185	5	5
19/11/08	Garigliano				
07/01/09	Garigliano	21		13	8
04/02/09	Garigliano	14	160	8	8
18/03/09	Garigliano				
22/04/09	Garigliano	20	57	45	12
13/05/09	Garigliano	28	354	14	13

Programme PIREN-Seine : Analyse d'antibiotiques dans les eaux

24/09/08	Suresnes			5	6
19/11/08	Suresnes			6	
17/12/08	Suresnes				3
07/01/09	Suresnes	34		21	13
04/02/09	Suresnes	14		8	9
18/03/09	Suresnes				
22/04/09	Suresnes	16		10	12
13/05/09	Suresnes	36	133	8	9
24/09/08	Clichy			5	6
19/11/08	Clichy				
17/12/08	Clichy				3
07/01/09	Clichy	30		19	13
04/02/09	Clichy	15	200	12	9
18/03/09	Clichy				
22/04/09	Clichy	19		12	9

**Tableau 13 : flux de contamination au niveau du pont de Tolbiac**

Date prélèvement	débit journalier Austerlitz (m <sup>3</sup> /s)	Sulfaméthoxazole (µg/s)	Spiramycine (µg/s)	Roxythromycine (µg/s)	Triméthoprime (µg/s)
24/09/08	223		52 182		1 115
01/10/08	180				900
19/11/08	192				
17/12/08	393				1 179
07/01/09	173	5 017		2 768	1 384
04/02/09	307	5 219	38 682	3 070	2 763
18/03/09	297				
22/04/09	185	3 515		1 295	2 775
13/05/09	205	5 945	26 240	1 845	2 050

Pour la Spiramicine, et dans une moindre mesure la Roxithromycine, on observe plus de prélèvements positifs dans Paris (Tolbiac et Garigliano) qu'en amont ou en aval. Cependant, le peu de points positifs ne permet pas de formuler d'hypothèses expliquant ce résultat. Pour ces deux molécules, sur la période de prélèvement, on observe une variation des flux non directement lié à la saison.

Pour le Triméthoprime, les concentrations en Seine et en Marne sont sensiblement constantes. Le flux augmente en fin d'hiver.

La contamination en Sulfaméthoxazole est plus importante en Marne qu'en Seine en amont de Paris, tout en restant faible car inférieure à 25 ng/L. Par contre, une augmentation de la contamination en cette substance est observée au niveau de Paris et en aval alors qu'aucun apport n'a lieu dans cette zone. Cette constatation est pondérée par les flux observés, comme le montre le tableau suivant 8 au niveau du pont de Tolbiac. On observe un effet saisonnier pour l'année étudiée car la contamination n'est notable qu'à partir de Décembre 2008 ou Janvier 2009. A partir de ces dates, jusqu'en Mai, il semble y avoir un apport constant de l'amont de Paris et peu de dégradation dans le milieu sur la zone observée.

## 5 Résultats obtenus sur les bassins versant élémentaires et à l'exutoire de l'Orge (UMR 7619 Sisyphe)

### 5.1 Sites d'étude et prélèvement

Afin de mieux caractériser la part respective des apports liés à la médecine hospitalière et à la médecine de ville, nous avons choisi d'étudier l'impact des rejets d'assainissement urbain sur deux bassins versants élémentaires de la zone amont du bassin de l'Orge, la Charmoise et la Prédecelle.

Ces deux petits cours d'eau se différencient l'un de l'autre, d'une part au niveau des habitats et des infrastructures sanitaires et d'autre part à celui des filières d'épuration d'eaux usées présente sur leurs bassins. Sur le bassin de la Prédecelle une nouvelle station d'épuration pour le syndicat de l'assainissement des communes de Limours a été mise en eau en 2009. Cette dernière comporte une filière d'affinage des rejets par phyto-remédiation.

Le bassin versant de la Charmoise se différencie de l'autre par la présence d'une structure hospitalière dont le rejet est asservi à une mesure de débit. Par ailleurs, on peut utiliser la vancomycine, comme traceur de ce rejet, car cette molécule est a priori uniquement employée dans les hôpitaux. Les eaux usées domestiques peuvent également être prélevées avant mélange des rejets en entrée de STEP. Le devenir et le comportement en rivière des molécules rejetées par la STEP de Fontenay-les-Bris a été étudiés dans la Charmoise. L'évolution de la contamination et la répartition des molécules entre les phases soluble et particulaire seront par la suite aussi étudiées dans les rejets et en rivière, dans la colonne d'eau, ainsi que l'accumulation dans les sédiments en trois stations situées en amont du rejet et en deux points en aval immédiat et éloigné.

Les points d'échantillonnage sur le site du bassin de la Charmoise sont représentés dans la figure 4.

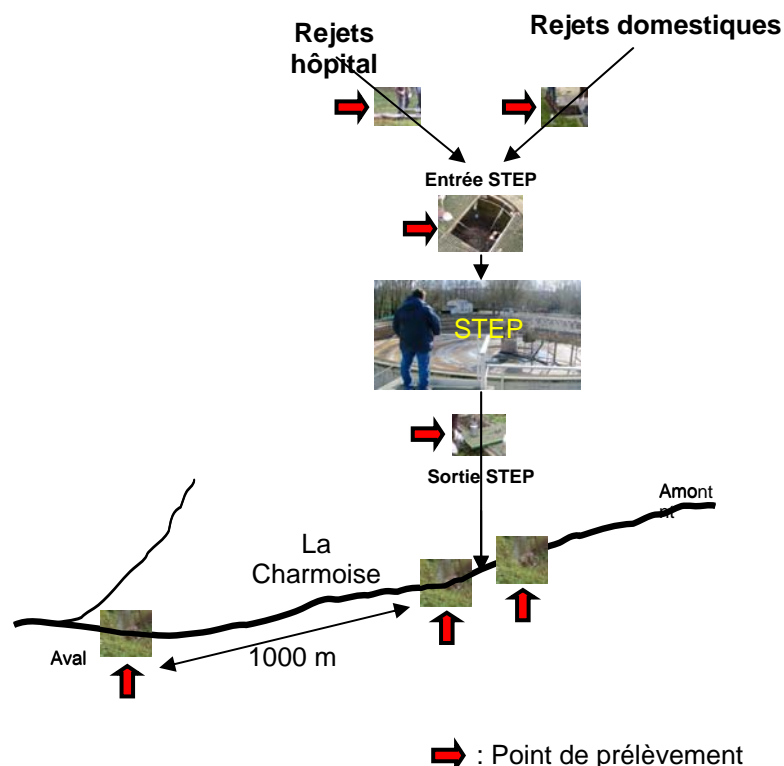


Figure 4 : Points de prélèvement du site de la Charmoise

Pour le site de la Prédecelle, les échantillons ont été prélevés en entrée et en sortie de STEP, ainsi que dans la rivière, en amont, à l'aval immédiat et éloigné (800 m) du rejet de la STEP.

Pour comparer les profils de contamination entre les affluents direct ou indirects et la Seine, ainsi que les variations de niveau de contamination suivant les conditions hydrologique, des campagnes ont également été effectuées de Février à Juillet en 2009 en différents points du réseau hydrographique de la Seine de l'amont à l'aval : 27 Mai 2009 à Marnay et à Paris (Jussieu), à l'exutoire de l'Orge à Viry-Châtillon (trois campagnes : 12 Février, 28 Mai et 1 Juillet 2009), sur la Prédecelle et la Charmoise (10 Juin 2009). Les points de prélèvement sont représentés sur la figure 5

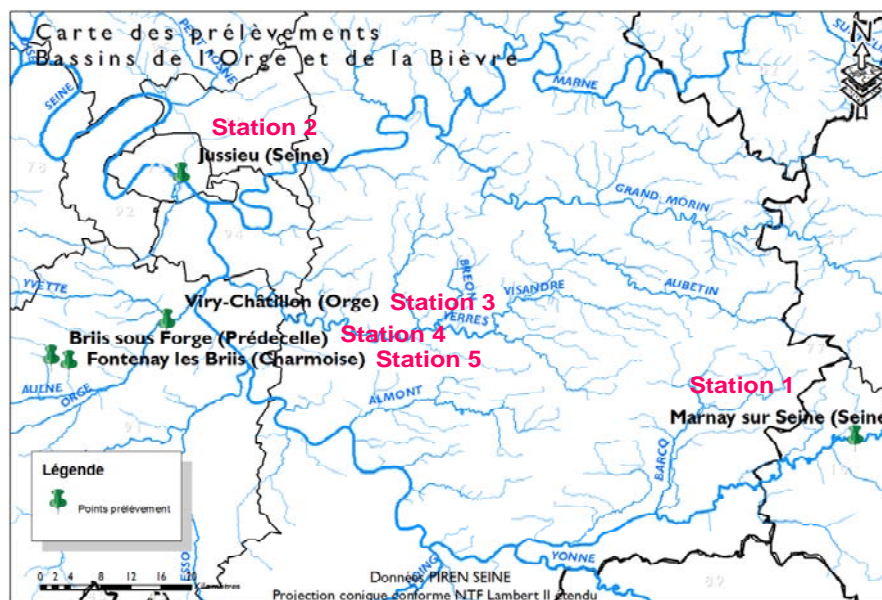


Figure 5 : Localisation des points de prélèvements 2009 en Seine et sur les affluents directs et indirects

## 5.2 Résultats sur le site de la Charmoise

### 5.2.1 Concentration en antibiotiques dans les effluents de la commune de Fontenay-les-Briis

Les échantillons des différents effluents de la commune de Fontenay-Les-Briis ont été prélevés le 09 décembre 2009. Les concentrations en antibiotiques mesurées dans la phase dissoute de ces effluents sont représentées dans le tableau 14.

Nous avons retrouvé 11 des 23 des antibiotiques recherchés dans l'effluent de l'hôpital et 6 dans les rejets domestiques. Ces 6 antibiotiques sont également présents dans le rejet de l'hôpital. De même, les 11 antibiotiques détectés dans l'effluent de l'hôpital sont également retrouvés dans l'effluent d'entrée de la STEP.

Nous n'avons pas trouvé d'antibiotiques utilisés uniquement en médecine vétérinaire comme la tylosine, l'enrofloxacin et la sarafloxacin. Ces antibiotiques sont utilisés en faible quantité pour le traitement des animaux de compagnie, ils ne représenteraient que moins de 1% de la consommation en antibiotiques vétérinaires.

**Tableau 14 : Concentration en antibiotiques dans les eaux usées prélevées le 09/12/2009 sur la commune de Fontenay-Les-Briis (phase dissoute, ng/L)**

	<b>Antibiotiques</b>	<b>Effluents hôpital</b>	<b>Effluents domestique</b>	<b>Entrée STEP</b>	<b>Sortie STEP</b>
<b>Macrolines</b>	Tylosine	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Erythromycine	1870,6 ± 44,7	5,2 ± 1,1	1440,4 ± 301,6	497,5 ± 35,2
<b>Tetracyclines</b>	Chlorotétracycline	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Tétracycline	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
<b>Beta-lactamines</b>	Amoxiciline	151,1 ± 47,3	< LDD	20,2 ± 4,8	17,3 ± 2,1
	Céfotaxime	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
<b>Diaminopyrimidines</b>	Triméthoprime	649,6 ± 33,3	1,9 ± 0,2	295,5 ± 72,2	490,6 ± 31,1
	Ormétoprime	14,3 ± 4,8	4,5 ± 0,3	15,0 ± 1,1	32,0 ± 1,9
<b>Sulfamides</b>	Sulfadimidine	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Sulfaméthoxazole	1298,2 ± 149,5	< LDD	1014,9 ± 94,7	4084,0 ± 92,8
<b>Quinolones</b>	Acide oxolinique	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Acide nalidixique	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
<b>Fluoroquinolones</b>	Fluméquine	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Acide pipemidique	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Enrofloxacin	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Enoxacine	1425,0 ± 13,0	606,0 ± 35,0	842,0 ± 90,0	32,0 ± 9,0
	Loméfloxacine	1120,3 ± 90,2	< LDD	59,1 ± 4,4	8,6 ± 0,5
	Sarafloxacin	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Norfloxacin	10898,6 ± 51,6	49,2 ± 8,3	6658,1 ± 146,2	217,2 ± 8,3
	Ciprofloxacine	11104,9 ± 37,3	< LDD	6729,6 ± 328,1	1100,5 ± 96,2
Ofloxacin	13001,5 ± 527,1	79,3 ± 7,6	8115,3 ± 180,2	17085,6 ± 79,3	
<b>Imidazolés</b>	Ornidazole	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
<b>Glycopeptides</b>	Vancomycine	2203,5 ± 150,3	< LDD	1784,2 ± 115,6	1297,1 ± 29,4

Les antibiotiques utilisés en association comme la norfloxacine, l'énoxacine et l'érythromicine sont retrouvés dans les 2 effluents. Certaines molécules comme la ciprofloxacine, la sulfaméthoxazole, la loméfloxacine et l'amoxiciline ne sont pas trouvées dans les rejets domestiques mais retrouvées dans les rejets de l'hôpital. A noter que la vancomycine, qui est strictement réservée au milieu hospitalier, est uniquement retrouvée dans les rejets de l'hôpital, ce qui semble confirmer que cet antibiotique peut être utilisé comme traceur spécifique des rejets hospitaliers. Les concentrations des antibiotiques retrouvés dans l'effluent de l'hôpital varient de quelques µg/L (loméfloxacine, vancomycine) à quelques dizaines de µg/L (ciprofloxacine, norfloxacine...). La valeur maximale est de 13 µg/L (ofloxacin, sulfaméthoxazole). Ces concentrations sont en bon accord avec celles présentées dans des études effectuées en Allemagne (3-87 µg/L) (Hartmann *et al.*, 1998 ; Hartmann *et al.*, 1999) et au Vietnam (Duong *et al.*, 2008) ; ces travaux mettaient également en évidence le fait que les concentrations observées dans les effluents hospitaliers étaient environ 100 fois supérieures à celles observées dans des effluents domestiques.

Selon les résultats de cette première campagne, les antibiotiques comme la vancomycine, la ciprofloxacine, la sulfaméthoxazole, la loméfloxacine et l'amoxiciline proviendraient essentiellement de l'hôpital ; les contributions relatives des différentes sources pourront être calculées après exploitation des mesures de débit. Les autres antibiotiques n'ont pas été retrouvés dans les effluents. On peut avancer plusieurs hypothèses pour expliquer cette observation : soit ces composés sont peu ou pas utilisés dans le secteur étudié, soit ils sont métabolisés *in vivo* (métabolisme de phase I ou II), soit ils sont adsorbés sur la phase particulaire (dosages non réalisés à ce jour).

### **5.2.2 Abatement des concentrations dans la STEP (phase dissoute)**

En observant les concentrations des antibiotiques en entrée et en sortie de la STEP de Fontenay-Les-Briis (figure 5), on observe que les concentrations de plusieurs antibiotiques diminuent de 15% (Amoxiciline) à 97 % (Norfloxacin). Par contre, ce n'est pas les cas pour certaines molécules dont les concentrations augmentent en sortie de STEP : triméthoprim (166%), orméthoprim (213%), sulfaméthoxazole (402%) et ofloxacin (210 %). Ces résultats sont en bon accord avec la littérature, sauf pour les fluoroquinolones dont l'abattement moyen est d'environ 80 % (Lindberg *et al.*, 2005). L'abattement n'est que de 3% pour le triméthoprim (Lindberg *et al.*, 2005), voire quasiment nul selon d'autres (Paxeus, 2004, Gobel *et al.*, 2005a, Lindberg *et al.*, 2006).

L'augmentation des concentrations de certaines molécules (sulfaméthoxazole, ofloxacin) peut peut-être s'expliquer par un possible phénomène de déconjugaison de métabolites de phase II), menant à la formation du composé parent (Gobel *et al.*, 2004, Lindberg *et al.*, 2006). On peut également envisager une désorption des particules pendant les traitements, mais c'est moins probable car la charge matière organique particulaire est relativement élevée. De plus l'efficacité de l'épuration dans les différentes STEP dépend des filières de traitement mises en oeuvre. La STEP Fontenay-Les-Bris est peut-être moins efficace que d'autres, car elle ne comporte qu'un bassin combiné à boues biologiques.

Ces résultats, issus d'une campagne préliminaire, devront être confirmés avec la réalisation de nouvelles campagnes en 2010.

### **5.2.3 Concentration en antibiotiques dans les eaux et sédiments de la Charmoise**

Les concentrations en antibiotiques dans les eaux en amont et en aval de rejet sont représentées dans le tableau 15. En amont du rejet nous n'avons retrouvé que 2 antibiotiques : l'orméthoprim et l'ofloxacin avec de faibles concentrations comprises entre 1,0 et 2,4 ng/L. Les faibles concentrations observées en amont peuvent provenir d'apports diffus, suite à de précédents épandages de boues urbaines en amont de cette STEP, ou bien à des hameaux non ou mal raccordés à des installations d'assainissement.

On a aussi observé une augmentation significative des concentrations immédiatement en aval du rejet, ce qui confirme l'impact des rejets de l'assainissement sur le niveau de contamination d'un petit cours d'eau. Nous avons retrouvé au total 9 des 23 antibiotiques en aval de la STEP. Les plus faibles concentrations sont de l'ordre de quelques ng/L pour l'amoxiciline, l'orméthoprim et la norfloxacin. Pour les autres composés décelés, les concentrations sont de l'ordre de quelques centaines ng/L (triméthoprim, ciprofloxacine, ofloxacin et vancomycine), avec une valeur maximale de 1435 ng/L pour le sulfaméthoxazole.



**Tableau 15 : Concentration en antibiotiques dans les eaux de la Charmoise prélevées le 09/12/2009 en amont et en aval du rejet de la STEP de Fontenay-les-Briis (phase dissoute, (ng/L))**

	<b>Antibiotiques</b>	<b>Amont rejet</b>	<b>Aval rejet</b>
<b>Macrolines</b>	Tylosine	< LDD	< LDD
	Erythromycine	< LDD	131,8 ± 2,9
<b>Tetracyclines</b>	Chlorotétracycline	< LDD	< LDD
	Tétracycline	< LDD	< LDD
<b>Beta-lactamines</b>	Amoxiciline	< LDD	9,3 ± 1,6
	Céfotaxime	< LDD	< LDD
<b>Diaminopyrimidines</b>	Triméthoprim	< LDD	253,5 ± 35,2
	Ormétoprim	1,0 ± 0,1	2 ± 0,6
<b>Sulfamides</b>	Sulfadimidine	< LDD	< LDD
	Sulfaméthoxazole	< LDD	1434,7 ± 41,3
<b>Quinolones</b>	Acide oxolinique	< LDD	< LDD
	Acide nalidixique	< LDD	< LDD
<b>Fluoroquinolone</b>	Fluméquine	< LDD	< LDD
	Acide pipemidique	< LDD	< LDD
	Enrofloxacin	< LDD	< LDD
	Enoxacin	< LDD	< LDD
	Loméfloxacine	< LDD	< LDD
	Sarafloxacin	< LDD	< LDD
	Norfloxacin	< LDD	17,3 ± 1,9
	Ciprofloxacine	< LDD	135 ± 13
	Ofloxacine	2,4 ± 0,3	231,2 ± 4,1
<b>Imidazolés</b>	Ornidazole	< LDD	< LDD
<b>Glycopeptides</b>	Vancomycine	< LDD	451,1 ± 12,3

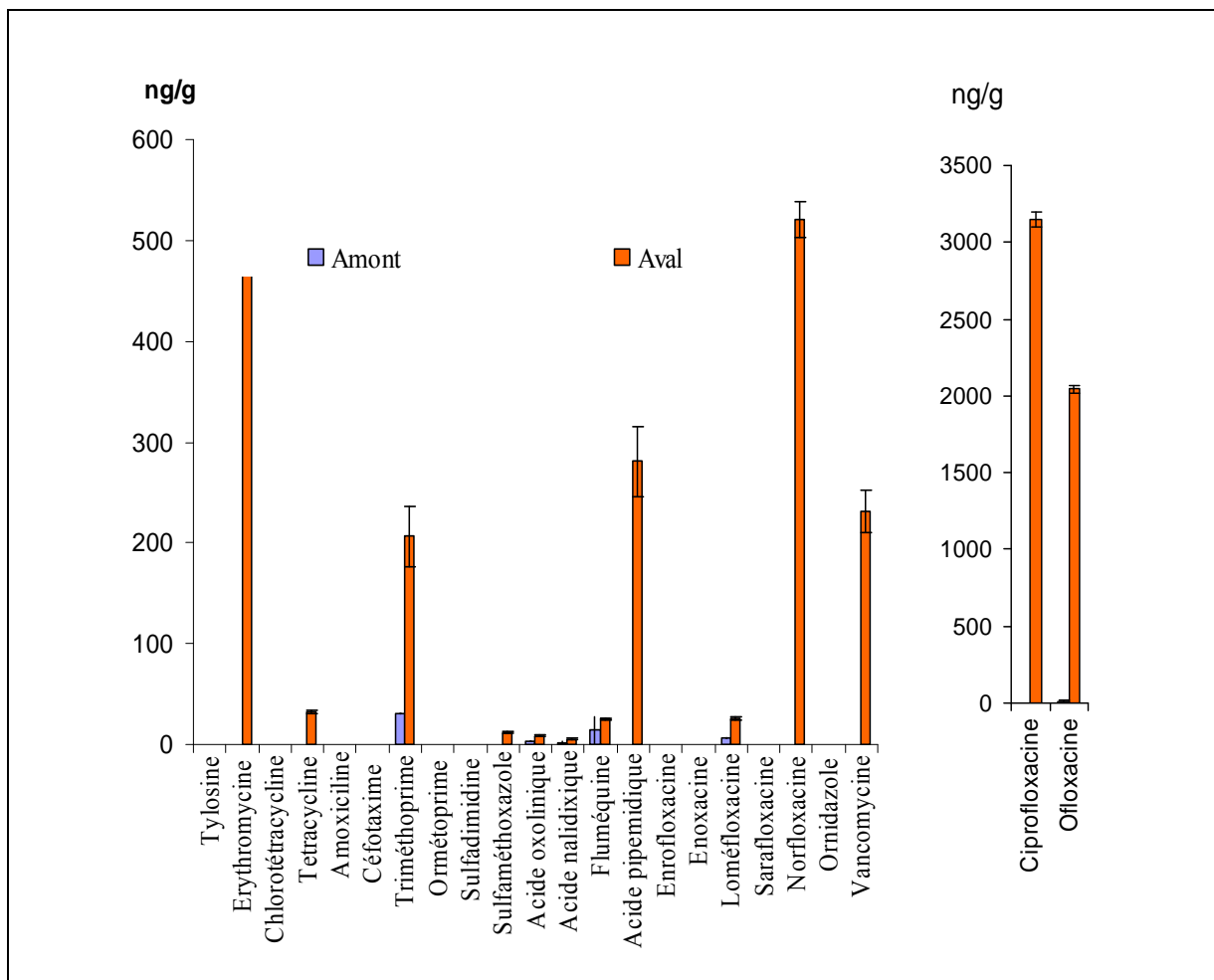
#### 5.2.4 Concentration des antibiotiques dans les sédiments de la Charmoise

Nous avons retrouvé 13 antibiotiques dans les sédiments en aval du rejet de la STEP de Fontenay-les-Briis, contre 6 sont en amont (figure 6). Ces antibiotiques retrouvés dans les sédiments du site amont peuvent provenir de rejets d'eaux domestiques dans le cours d'eau ou de transferts à partir de sols agricoles contaminés suite à des épandages de boues urbaines.

Globalement, on retrouve dans les sédiments toutes les molécules détectées dans la colonne d'eau à l'exception de la tétracycline, de la fluméquine, de l'acide nalidixique et de la loméfloxacin. Les teneurs des antibiotiques dans les sédiments en amont varient entre quelques ng/g et quelques dizaines de ng/g. Des teneurs plus élevées sont observées à l'aval du rejet, jusqu'à 3152 ng/g pour la ciprofloxacine.

Les différences de teneur des différents antibiotiques dans les sédiments en aval du rejet peuvent s'expliquer par les différences de concentration observées dans la colonne d'eau et par leurs différences de propriétés physico-chimiques, notamment le  $K_{OW}$  (coefficient de partage octanol/eau) et le  $K_{OC}$  (coefficient de partage carbone organique/eau), ainsi que par leur différence de persistance dans l'environnement.

Le  $K_{OW}$  et le  $K_{OC}$  sont deux paramètres importants qui permettent de quantifier la tendance à l'adsorption des substances. Plus leur valeur est élevée, plus la molécule aura tendance à s'absorber (Tolls, 2001). Cependant, les teneurs de ciprofloxacine (3152 ng/g) et d'ofloxacine (2043 ng/g) sont 8 et 5 fois plus fortes que celles de l'érythromycine (487,9 ng/g), alors que son  $\text{Log } K_{OW}$  (3,06) soit supérieur à celui des deux autres molécules (0,4 et -0,39). Le seul  $K_{OW}$  ne permet donc pas d'expliquer totalement les différences de teneurs observées. Ces différences d'abondance relative des différentes molécules dans les matrices liquides et solides pourront peut-être être expliquées par la poursuite des travaux sur le cours d'eau et l'acquisition de nouvelles données sur la colonne d'eau.



**Figure 6 : Teneur des antibiotiques dans les sédiments de la Charmoise prélevés le 09/12/2009 en amont et en aval du rejet de STEP (ng/g, poids sec)**

### 5.3 Contamination des eaux à l'exutoire de l'Orge suivant les conditions hydrologiques

L'objectif de cette étude est de comparer l'évolution de la contamination en antibiotiques des eaux de l'Orge en différentes conditions de débit : hautes, moyennes et basses eaux. Les dates de prélèvement se situent en hiver (12/02/2009), au printemps (28/05/2009) et en été (01/07/2009). Pour les trois périodes de prélèvement nous avons détecté 6 molécules : le sulfaméthoxazole, le triméthoprime, l'érythromycine, la fluméquine, l'acide oxolinique et l'orméthoprime à des concentrations pouvant atteindre environ 230 ng/L pour le sulfaméthoxazole mais ne dépassant pas 15 ng/L pour les 5 autres antibiotiques (figure 7).

Les concentrations des ces antibiotiques dans les eaux semblent être en partie dépendante du débit du cours d'eau et du facteur de dilution qui en résulte. Les concentrations paraissent, en effet, être inversement proportionnelles au débit. Dans le cas de la fluméquine, la concentration observée étant proche de la limite de quantification, il est difficile de spécifier une tendance évolutive.

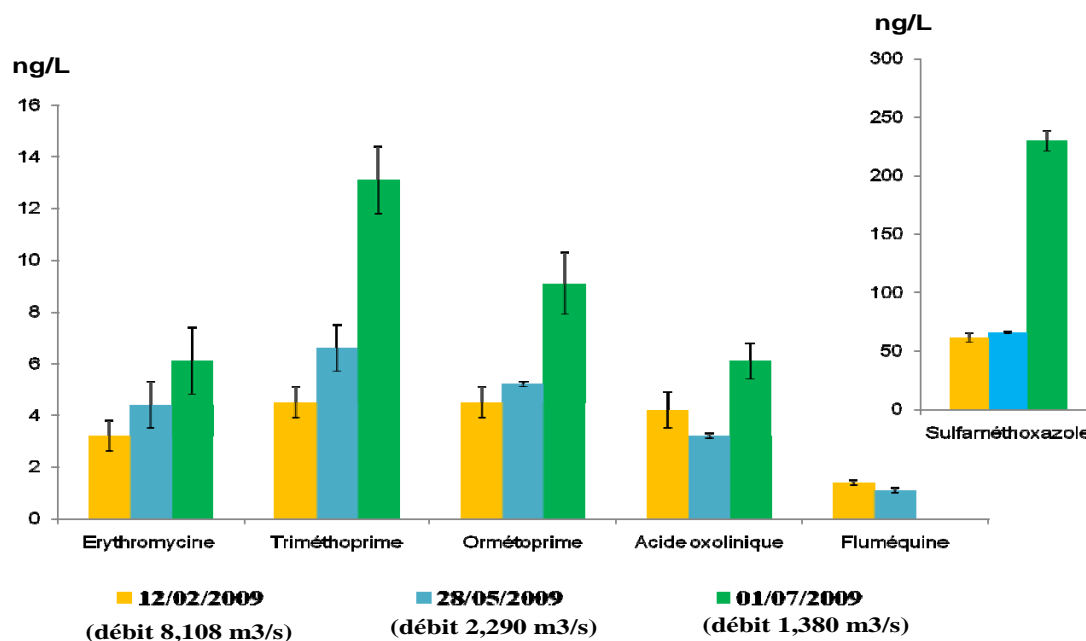


Figure 7 : Variations des concentrations des antibiotiques dans les eaux d'exutoire de l'Orge suivant les conditions hydrologiques (phase dissoute, ng/L)

### 5.4 Contamination par les antibiotiques de la Seine et des ses affluents

Les résultats des dosages réalisés sur la Seine (amont et Paris centre), l'Orge, la Prédecelle et la Charmoise sont présentés dans le tableau 16..

Les principales conclusions sont les suivantes :

- Des antibiotiques ont été détectés dans tous les échantillons mais le profil moléculaire est différent selon chaque cours d'eau.

- Les concentrations observées sont plus élevées dans les bassins versants élémentaires périurbains, probablement en raison de la plus forte pression anthropique exercée sur ces cours d'eau à faible débit et de la proximité du point de mesure par rapport à un rejet identifié.
- Le sulfaméthoxazole est la molécule la plus ubiquiste et peut ainsi être considéré comme un traceur de rejets urbains (peut-être de manière analogue à la caféine)..
- Les concentrations observées dans la Charmoise sont, pour la plupart des antibiotiques, plus élevées que celles observées dans la Prédecelle, probablement en raison d'usages d'antibiotiques en milieu hospitalier qui se superposent à ceux de la médecine de ville. Ainsi, la vancomycine est uniquement décelée dans la Charmoise, ce qui suggère qu'elle puisse être utilisée comme traceur de rejets hospitaliers.

**Tableau 16. Concentration en antibiotiques dans la Seine et ses affluents (phase dissoute, ng/L)**

		<b>Station 1</b>	<b>Station 2</b>	<b>Station 3</b>	<b>Station 4</b>	<b>Station 5</b>
		Marnay (27/05/2009)	Jussieu (27/05/2009)	Viry-Chatillon (28/05/2009)	Briis (10/06/2009)	Fontenay (10/06/2009)
<b>Antibiotiques</b>		Seine	Seine	Orge	Prédecelle	Charmoise
<b>Macrolines</b>	Tylosine	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Erythromycine	< LDD	4,0 ± 0,3	4,4 ± 0,9	4,2 ± 0,8	26 ± 8,0
<b>Tetracyclines</b>	Chlorotétracycline	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Tetracycline	< LDD	< LDD	< LDD	7,4 ± 0,3	< LDD
<b>Beta-lactamines</b>	Amoxiciline	< LDD	68,4 ± 6,2	< LDD	< LDD	< LDD
	Céfotaxime	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
<b>Diaminopyrimidines</b>	Triméthoprime	< LDD	2,6	6,6 ± 0,9	8,0 ± 0,3	60,4 ± 3,2
	Ormétoprime	< LDD	< LDD	3,2 ± 0,1	< LDD	2 ± 0,5
<b>Sulfamides</b>	Sulfadimidine	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Sulfaméthoxazole	3,6 ± 0,6	8,2 ± 1,1	65,5 ± 0,8	24,6 ± 1,2	10,9 ± 2,1
<b>Quinolones</b>	Acide oxolinique	< LDD	< LDD	3,2 ± 0,1	< LDD	< LDD
	Acide nalidixique	< LDD	3,2 ± 0,1	< LDD	< LDD	< LDD
<b>Fluoroquinolones</b>	Fluméquine	< LDD	2,6 ± 0,5	1,1 ± 0,1	< LDD	< LDD
	Acide pipemidique	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Enrofloxacin	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Enoxacin	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Loméfloxacine	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Sarafloxacine	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Norfloxacine	< LDD	< LDD	< LDD	74,7 ± 6,1	26,9 ± 4,1
	Ciprofloxacine	< LDD	10,2 ± 0,2	< LDD	< LDD	239 ± 8,2
	Ofloxacine	2,3 ± 0,9	18,2 ± 1,2	< LDD	64,7 ± 2,9	70,5 ± 4,3
<b>Imidazolés</b>	Ornidazole	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
<b>Glycopeptides</b>	Vancomycine	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	45,4 ± 2,6

## 6 Conclusion et perspectives

Dans le cadre de ce projet, Eau de Paris et le laboratoire EPHE/CNRS-UMR 7619 Sisyphé ont développé deux méthodes analytiques des résidus antibiotiques en phase dissoute dans les eaux. Ces protocoles ont permis de déterminer les concentrations des composés cibles lors des divers prélèvements réalisés, en STEP (entrée et sortie) et sur des eaux de surface (Bassin de l'Orge, en Marne et en Seine). Des antibiotiques modèles tels que la vancomycine à usage uniquement hospitalier et ceux de la famille des fluoroquinolones et des sulfamides, aux usages très fréquents et aux propriétés physico-chimiques différentes, ont été suivis sur l'ensemble de ces prélèvements.

Les résultats de ces campagnes de prélèvements ont montré la présence de résidus médicamenteux dans la

plupart des compartiments environnementaux testés, exception faite des ruisseaux forestiers, c'est à dire de milieu non exposés aux antibiotiques. Les valeurs déterminées dépendent énormément du type de prélèvement. Ainsi, les valeurs observées en entrée ou sortie de STEP sont de l'ordre de quelques dizaines de ng/L alors qu'on observe plutôt des niveaux de l'ordre du µg/L dans les eaux usées des hôpitaux. Ces concentrations sont plus importantes que celles retrouvées dans les eaux de surface. En effet, un important effet de dilution intervient entre le rejet d'une STEP et les prélèvements effectués en rivière. Ainsi, les eaux de surface présentent des concentrations en antibiotiques de l'ordre du ng/L à la centaine de ng/L.

Par ailleurs, ces molécules peuvent être dégradées dans l'environnement, produisant de nouvelles molécules dont la structure, les concentrations et la toxicité sont peu connues. Il est également fréquent qu'une fraction des antibiotiques soit excrétée sous forme de métabolites qui restent à quantifier dans l'environnement. Ainsi, l'absence d'évolution ou parfois l'augmentation des concentrations entre l'entrée et la sortie des STEP est probablement due à une sous estimation de la présence des molécules mères d'antibiotiques dans les effluents entrant, car elles peuvent tout au moins en partie s'y trouver à l'état conjugué. Un processus de dé-conjugaison au sein de la filière d'épuration, pourrait expliquer la faiblesse apparente des rendements d'épuration.

Il s'agit maintenant dans le cadre des partenariats établis au sein du thème antibiotique du programme PIREN-Seine de corréliser les concentrations trouvées dans ces différents milieux à un possible déclenchement d'un mécanisme d'antibiorésistance chez des bactéries non-ciblées par les antibiotiques. Par ailleurs, la présence de faibles, voir très faibles, doses de ces résidus antibiotiques dans les eaux soulève à nouveau le problème de l'évaluation de la toxicité à long terme de ces composés sur les organismes qui peuplent les compartiments environnementaux testés, mais également sur l'homme.

## Remerciements

Nous tenons à remercier la Direction des services techniques de l'hôpital de Bligny et les services municipaux de la commune Fontenay-les-Briis pour leur contribution à la réalisation des campagnes d'échantillonnage.

## Références

- Babić.B, Horvat. A.J.M., Mutavdžić Pavlović.D, Kaštelan-Macan.M, (2007). Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, (11), 1043-1061.
- Batt.A.L, Mitch S. Kostich, and James M. Lazorchak (2008). Analysis of Ecologically Relevant Pharmaceuticals in Wastewater and Surface Water Using Selective Solid-Phase Extraction and UPLC MS/MS, *Anal. Chem.* 80, 5021–5030.
- Dinh T., Moreau-Guigon E, Tournebize J., Labadie P., Alliot F, Chevreuril M. (2010) Contamination en antibiotiques des sols agricoles par les déchets de l'assainissement urbain : évaluation des transferts potentiels vers le réseau hydrographique par le drainage agricole et les processus de ruissellement, Rapport d'activité 2009 PIREN-Seine.
- Duong.H.A, Ngoc Ha Pham, Hoang Tung Nguyen, Thi Thuong Hoang, Hung Viet Pham, Van Ca Pham, Michael Berg, Walter Giger, Alfredo C. Alder. Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. (2008). *Chemosphere* 72, 968–973.
- Eeckhaut.A.V, Katrien Lanckmans<sup>1</sup>, Sophie Sarre, Ilse Smolders, Yvette Michotte, (2009). Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B*, 877, 2198–2207.

- Göbe. A, McArdell CS, Suter MJ, Giger W (2004). Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 76 (16): 4756-64.
- Göbel.A, Angela Thomsen, Christa S. McArdell, Alfredo C. Alder, Walter Giger, Nicole Theiß, Dirk Löffler, Thomas A. Ternes. (2005). Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge. *Journal of Chromatography A*, 1085, (2), 179-189.
- Gómez.M.J, Mira Petrović, Amadeo R. Fernández-Alba, Damià Barceló (2006). Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1114, (2), 224-233.
- Hartmann.A, A.C. Alder, T. Koller and R.M. Widmer (1998). Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater, *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 377–382.
- Lindberg. R.H., U. Olofsson, P. Rendahl, M.I. Johansson, M. Tysklind and B.A.V. Andersson (2006). Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge, *Environ. Sci. Technol.* 40,1042–1048.
- Lindberg.R.H, Patrik Wennberg, Magnus I. Johansson, Mats Tysklind, and Barbro A. V. Andersson (2005). Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in sweden. *Environ. Sci. Technol.*, 39 (10), 3421–3429.
- Paxeus.N. (2004), Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine,  $\beta$ -blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment, *Water Sci. Technol.* 50, (5), 253–260.
- Petrovic.M, Meritxell Gros, Damia Barcelo (2006). Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1124, 68-81.
- Tamtam, F. (2008). Sources et devenir des antibiotiques dans le bassin versant de la Seine. Rapport de thèse, pp 197.
- Tamtam. F, Mercier. F, Le Bot. B, Eurin.J, Dinh. T, Clément. M, Chevreuril.M (2008). Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of The Total Environment*, 393, (1), 84-95.
- Tolls, J. (2001). Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A Review. *Environmental Science & Technology* 35 (17) : 3397-3406.
- Nowara. A.J, J. Burhene and Spitteller, (1997), Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals, *J. Agric. Food Chem.* 45, 1459–1463.