

Analyses d'antibiotiques dans les eaux par SPE en différé ou en ligne couplée à l'HPLC/MS-MS. Etude d'échantillons issus du site pilote bassin de l'Orge.

Violaine Augustin¹, Gwenaëlle Lavison^{1*}, Joëlle Eurin²

¹ CRECEP, 144 Av Paul Vaillant Couturier, 75014 Paris

² UMR 7619 Sisyphe, UPMC, 4 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05

* gwenaelle.lavison@crecep.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 donc dans ce contexte que le PIREN avec le CRECEP et 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 et de sa méthodologie

Le thème antibiotique a été initié en 2007 et poursuivi en 2008 dans le cadre du programme du Piren Seine . Dans ce programme, nous proposons de déterminer dans le milieu hydrique :

- s'il y a une relation qualitative entre la présence de bactéries résistantes à un antibiotique et la présence de cet antibiotique dans les eaux,
- si la présence d'antibiotiques dans les eaux peut être un indicateur des résistances bactériennes sélectionnées,
- s'il est possible de caractériser par des moyens moléculaires l'origine génétique de la présence des bactéries résistantes.

Ces études se décomposent en cinq grandes phases réparties entre les deux départements R&D du CRECEP 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 collaboration existante entre les deux départements du CRECEP, R&D-chimie et R&D-biologie, permet une meilleure exploitation des résultats ainsi qu'une meilleure compréhension des phénomènes étudiés.

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 a été réalisé par une méthode d'extraction sur phase solide en ligne et/ou 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 :

Figure 1 : Tableau des antibiotiques faisant partie de notre méthode analytique et regroupés en famille.

Antibiotiques	Sulfamides	Sufachloropyridazine
		Sulfamerazine
		Sulfamethoxazole
	Macrolides	Erythromycine
		Neomycine
		Spiramycine
		Roxithromycine
	Glycopeptides	Vancomycine
	Pyrimidines	Trimethoprim
	Bétalactamides	Abamectine
		Ampicilline
		Amoxicilline
	Tétracycline	Chlorotétracycline
		Oxytétracycline
		Tétracycline
	Fluoroquinolones	Oxolinic acid
		Ciprofloxacin
		Norfloxacin
		Ofloxacin

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 Développement de la méthode d'analyse

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). 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.

2.1.1 Principe

L'extraction sur phase solide (Solid Phase Extraction, SPE) a été développée comme méthode alternative à l'extraction liquide-liquide. Elle est fondée sur la distribution des solutés entre une phase solide, l'adsorbant, et une phase liquide, l'échantillon ou le solvant d'extraction. Cette technique repose sur un processus chromatographique dans lequel l'adsorbant est la phase stationnaire et l'échantillon, ou le solvant, d'extraction constitue la phase mobile. Les solutés sont retenus sur la phase stationnaire et la matrice de l'échantillon est éliminée ; les solutés sont élués avec un faible volume de solvant d'extraction de forte force éluante. Cette technique est devenue la méthode de choix pour l'analyse de composés de polarité variable et à l'état de traces.

Une procédure d'extraction sur phase solide se déroule en quatre étapes, comme illustré sur la figure suivante :

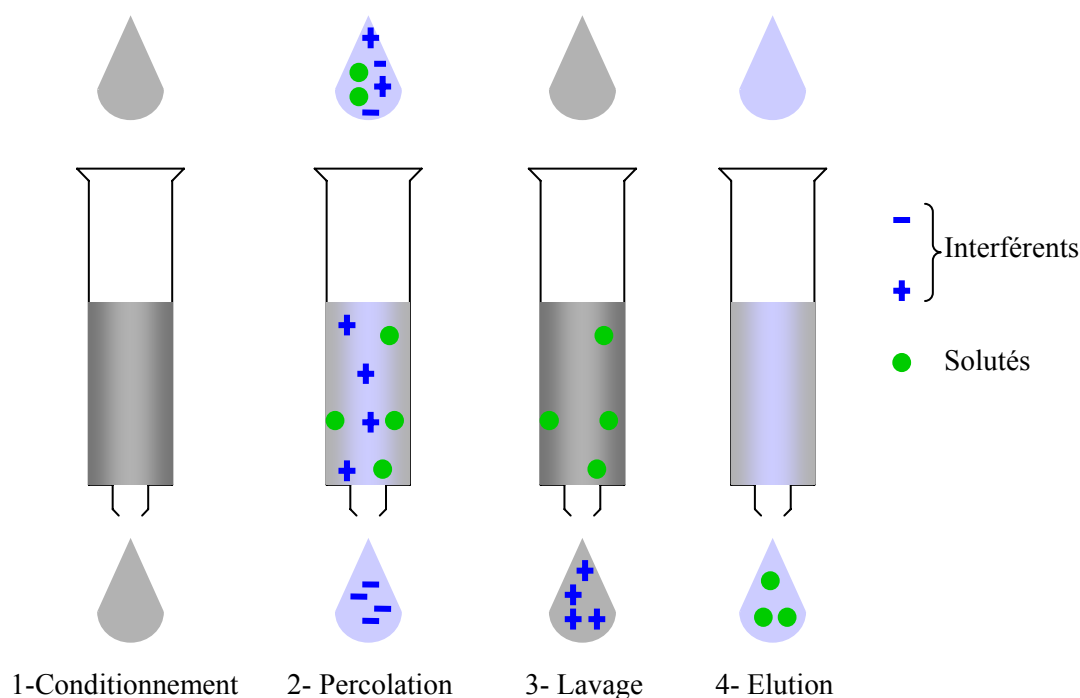


Figure 2 : Schéma descriptif des différentes étapes pouvant être mises en œuvre lors d'une extraction sur phase solide.

La première étape est le conditionnement du support d'extraction contenu dans la cartouche. Cette première étape permet de mouiller le support en solvantant les groupements fonctionnels présents à la surface de l'adsorbant. Plusieurs solvants peuvent être percolés successivement. De manière générale, un support hydrophobe est tout d'abord mouillé par un solvant organique et, suivant la nature de l'échantillon, un autre solvant peut être percolé de manière à ce qu'il soit solvato au final par un solvant de polarité similaire à celle de la matrice de l'échantillon.

Lors de la seconde étape, l'échantillon est percolé sur le support. Idéalement, les interférents présents dans l'échantillon, mais n'ayant aucune affinité pour le support, ne sont pas retenus et sont donc éliminés. En revanche, les molécules cibles et éventuellement quelques molécules présentant une forte affinité pour le support sont fixés sur l'adsorbant. Selon la nature de l'échantillon, des composés à analyser, la masse d'adsorbant de la cartouche et le facteur d'enrichissement recherché, le volume d'échantillon percolé peut varier de quelques millilitres jusqu'au litre.

La troisième étape, le lavage, est une étape facultative qui permet d'éliminer les interférents faiblement retenus par le support. De ce fait, le solvant choisi aura une force éluante relativement faible afin d'éluer les interférents tout en gardant fixés les solutés cibles.

Enfin, la dernière étape consiste en l'élution des composés d'intérêt en percolant un solvant spécifiquement choisi pour rompre les interactions mises en jeu entre les analytes cibles et le support solide en évitant, dans la mesure du possible, d'éluer les interférents fortement retenus sur le support.

2.1.2 Choix du support d'extraction

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.

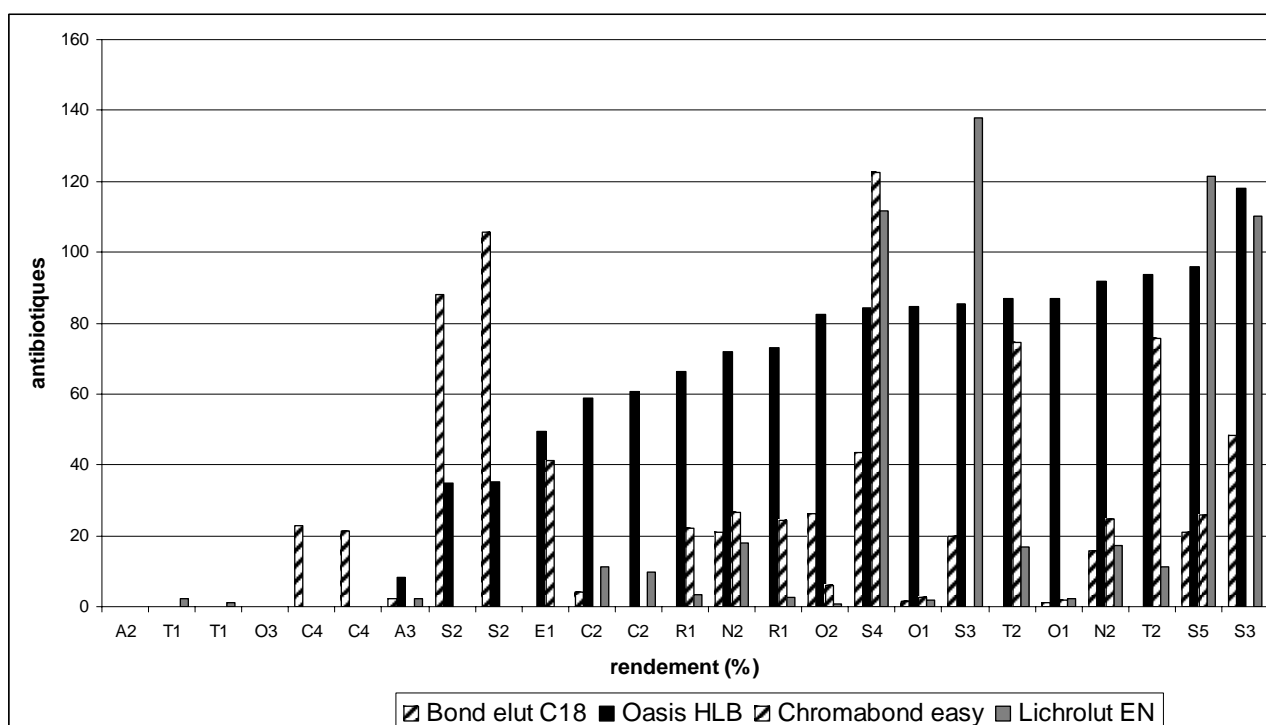


Figure 3 : Rendement d'extraction sur phase solide en différé, étude de 4 adsorbant. Extraction à pH=7, élution par de l'acétonitrile.

La Figure 3 met bien en évidence la plus grande versatilité du support Oasis HLB dans l'analyse des antibiotiques sélectionnés. En effet, les autres supports, bien que donnant dans le cas de quelques molécules de meilleurs rendements, ne présentent pas des résultats aussi performants que ceux fournis par les cartouches d'oasis HLB. C'est donc ce type d'adsorbant qui sera utilisé par la suite pour réaliser les extractions sur phase solide offline (en différé).

2.1.3 Choix du solvant d'élution

Le choix de l'éluant se réalise en fonction de la polarité du support, de sa composition ainsi que de la polarité des analytes adsorbés que l'on souhaite désorber. Dans notre cas, il s'agit de trouver l'éluant le plus fort vis-à-vis de nos composés et de l'adsorbant : oasis HLB. Des tests ont été menés avec trois éluants différents, un mélange méthanol – dichlorométhane (50:50, v/v), du méthanol pur, de l'acétonitrile pur. Les rendements des extractions réalisées offline (en différé) sont représentés sur la figure 4.

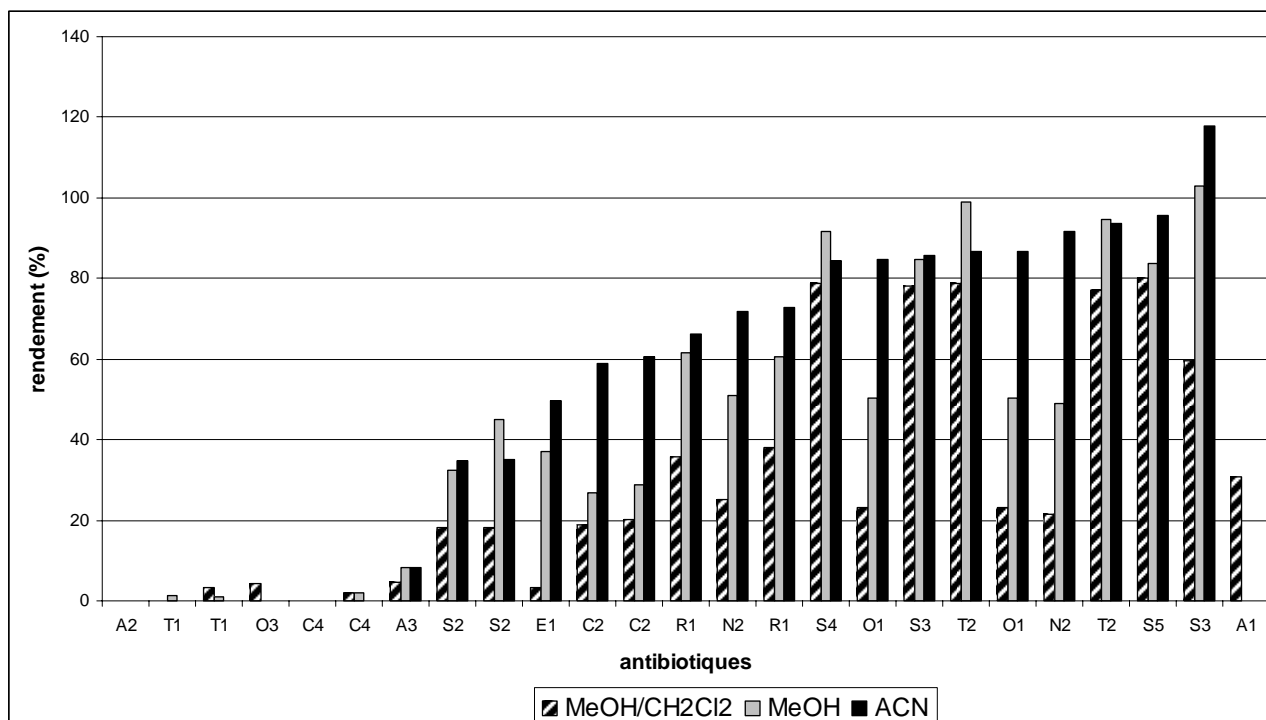


Figure 4 : Rendements d'extraction obtenus à pH=7 sur Oasis HLB avec trois éluants différents, méthanol-dichlorométhane (MeOH-CH₂Cl₂, méthanol (MeOH), acétonitrile (ACN).

D'après la figure 4, le mélange méthanol-dichlorométhane donne les rendements les plus faibles des trois éluants testés. Ce mélange 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.

2.1.4 Choix du pH d'extraction et autres paramètres

Le pH de l'échantillon va influencer de façon importante sur les molécules recherchées. En effet, ces dernières présentent des caractéristiques acido-basiques décrites par leurs valeurs de pKa. Ainsi une molécule acide se présentera sous forme chargée lorsque l'échantillon sera suffisamment basique (pH > pKa) et sous forme neutre lorsque le pH de l'échantillon sera suffisamment acide (pH < pKa). Le raisonnement est similaire pour une molécule basique et se complique lorsque plusieurs pKa sont en jeu. Des tests ont été menés avec des échantillons dont le pH a été acidifié jusqu'à atteindre 4 et avec un échantillon basifié jusqu'à atteindre 8.5. Les rendements des extractions réalisées offline (en différé) sont représentés sur la figure 5.

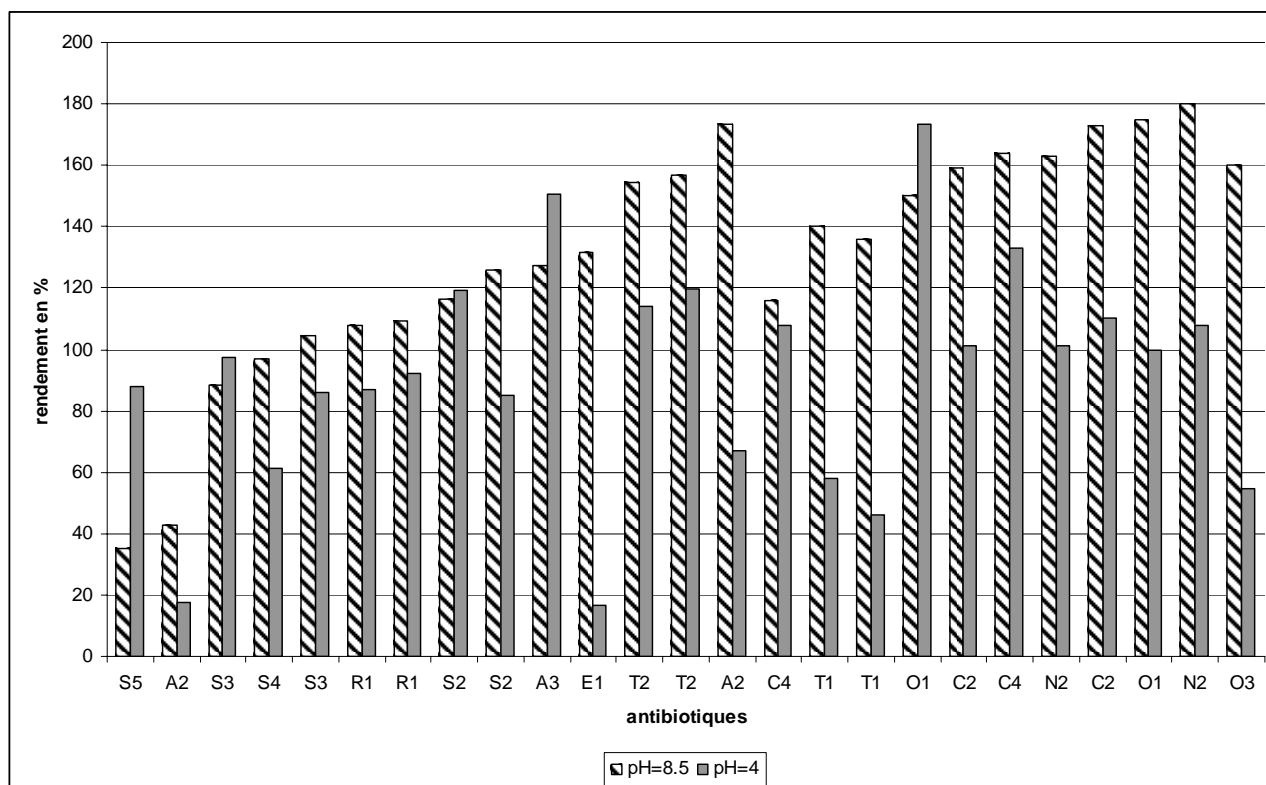


Figure 5 : Rendements d'extraction obtenus à 2 pH, pH=8.5 et pH=4 sur Oasis HLB, élution par de l'acétonitrile.

Les rendements d'extraction obtenus à pH=8.5 sont plus importants que ceux obtenus à pH=4 pour la majorité des composés. Nous devrions donc choisir le pH de l'échantillon égal à 8.5. 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.

2.2 Chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse

2.2.1 Principes

La chromatographie est la technique séparative la plus utilisée en chimie analytique. Cette technique consiste à séparer les constituants d'un mélange selon les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire, l'autre mobile. Sous l'influence de deux effets antagonistes, effets d'entraînement exercé par la phase mobile et effets de rétention exercé par la phase stationnaire, les constituants du mélange se déplacent à des vitesses différentes le long de la phase stationnaire, ils sont donc séparés et dirigés vers un système de détection. Les appareils de chromatographie sont appelés chromatographes, et le graphe se rapportant à l'intensité du signal détecté en fonction du temps est appelée chromatogramme. Les chromatogrammes sont composés d'un ou plusieurs pics.

Ces pics sont caractérisés par : le temps de rétention, déterminé au sommet du pic, l'aire et la hauteur du pic, qui permettent la quantification des solutés. Quatre grandeurs adimensionnelles caractérisent une séparation. Pour information, il s'agit du facteur de rétention, k' , de l'efficacité ou nombre de plateaux théoriques, N , de la sélectivité, α , et de la résolution entre deux pics, R_s .

La chromatographie en phase liquide (Liquid Chromatography, LC) est caractérisée par l'usage d'une phase mobile liquide, constituée d'un solvant ou d'un mélange de plusieurs solvants, d'une colonne remplie de

particules de phase stationnaire. Ces particules sont des sphères micro-poreuses plus ou moins régulières de diamètre généralement compris entre 2 et 5 μm . Elles sont à base d'alumine ou plus souvent de silice ; leur surface peut être modifiée par différents greffons. La séparation des constituants d'un mélange résulte des différences d'intensité des interactions (i) entre la phase stationnaire et les solutés, (ii) la phase mobile et les solutés, (iii) la phase mobile et la phase stationnaire.

Les chromatographes en phase liquide sont constitués des quatre éléments : un dispositif d'injection, un module de pompage, une colonne chromatographique et un système de détection. Plus précisément, le dispositif d'injection est constitué d'une vanne 6 voies et d'une boucle d'injection de quelques dizaines de μl . L'injection est soit totale (le volume injecté est égal au volume de la boucle), soit partielle (le volume injecté n'est qu'une fraction du volume de la boucle). Le module de pompage de la phase mobile est généralement composé de système de dégazage de la phase mobile afin d'éviter la formation de microbulles, de pompes binaires ou quaternaires qui réalisent des gradients de composition de la phase mobile. Un gradient est une variation programmée des pourcentages des deux ou quatre liquides qui composent la phase mobile. Constituent également les modules de pompages, un mélangeur qui homogénéise la phase mobile, un amortisseur de pulsation des pompes ainsi qu'un capteur de pression, qui est un indicateur du bon fonctionnement du système.

La colonne chromatographique contient l'adsorbant qui a été sélectionnée en fonction des interactions avec lesquelles on veut travailler pour obtenir une séparation. Elle est généralement thermorégulée autour de la température ambiante et est constante durant l'analyse.

Le système de détection fait l'objet de la partie 3.3 et ne sera pas décrit dans ce paragraphe

2.2.2 Fonctionnement

L'échantillon est d'abord introduit en tête de colonne via le système d'injection. Les différents composés de l'échantillon sont élués par la phase mobile le long de la colonne et se partagent entre la phase mobile et la phase stationnaire.

L'éluition de la majorité des solutés de la colonne est conditionnée par la composition de la phase mobile. En mode d'éluition isocratique, la composition de la phase mobile ne varie pas lors de la séparation ; en mode gradient, la fraction du solvant le plus éluant augmente au cours de la séparation selon un programme défini par l'expérimentateur.

A la sortie de la colonne, les composés sont dirigés vers le détecteur qui évalue en continue la quantité de chacun des constituants séparés grâce à la mesure de différentes propriétés physique de l'effluent.

Le détecteur envoie un signal électronique à l'enregistreur et les données sont retraitées.

2.2.3 Choix de la colonne

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). Ces caractéristiques sont assez dispersées. En effet, le pKa des antibiotiques étudiés couvre une gamme allant de 2.5 à 9. Quant au log P estimé, il est compris entre -3.6 et 2.75.

Trois phases stationnaires de type C18 ont été testées : une Symmetry C18 (50x2.1mm, 3.5 μm), une Sunfire (150x2.1mm, 3.5 μm) et une Polaris (100x2mm, 3 μm). 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.

Ainsi, la colonne Symmetry est constituée de particules de silice greffée par des chaînes octadécyles directement liée aux groupements silanols de la surface. Cette phase très apolaire peut présenter des silanols résiduels libres à la surface de la particule entraînant des traînées de pic lors d'analyse de composés basiques. Cette phase n'est également pas conçue pour travailler avec une phase mobile constituée d'eau à 100%.

La colonne Sunfire est également constituée de particules de silice greffée des chaînes octaécyles comme la Symmetry présentée précédemment. Cependant, les silanols résiduels présents à la surface de la silice ont subi un greffage par un petit groupement polaire. Ce dernier permet de travailler à de fort pourcentage de

phase aqueuse et limite les traînées sur les pics des composés basiques.

La colonne Polaris est composée de particules de silice greffées par des chaînons comprenant un groupement polaire directement lié aux silanols et un groupement octadécyle lié au groupement polaire. Cette configuration est intéressante car, comme pour la colonne Sunfire, le groupement polaire limite les traînées de pic des composés acides tout en permettant de travailler en phase aqueuse pure. De plus, ce groupement polaire est plus accessible que celui de la colonne Sunfire, permettant de jouer sur des interactions polaires-apolaires entre la colonne et les analytes.

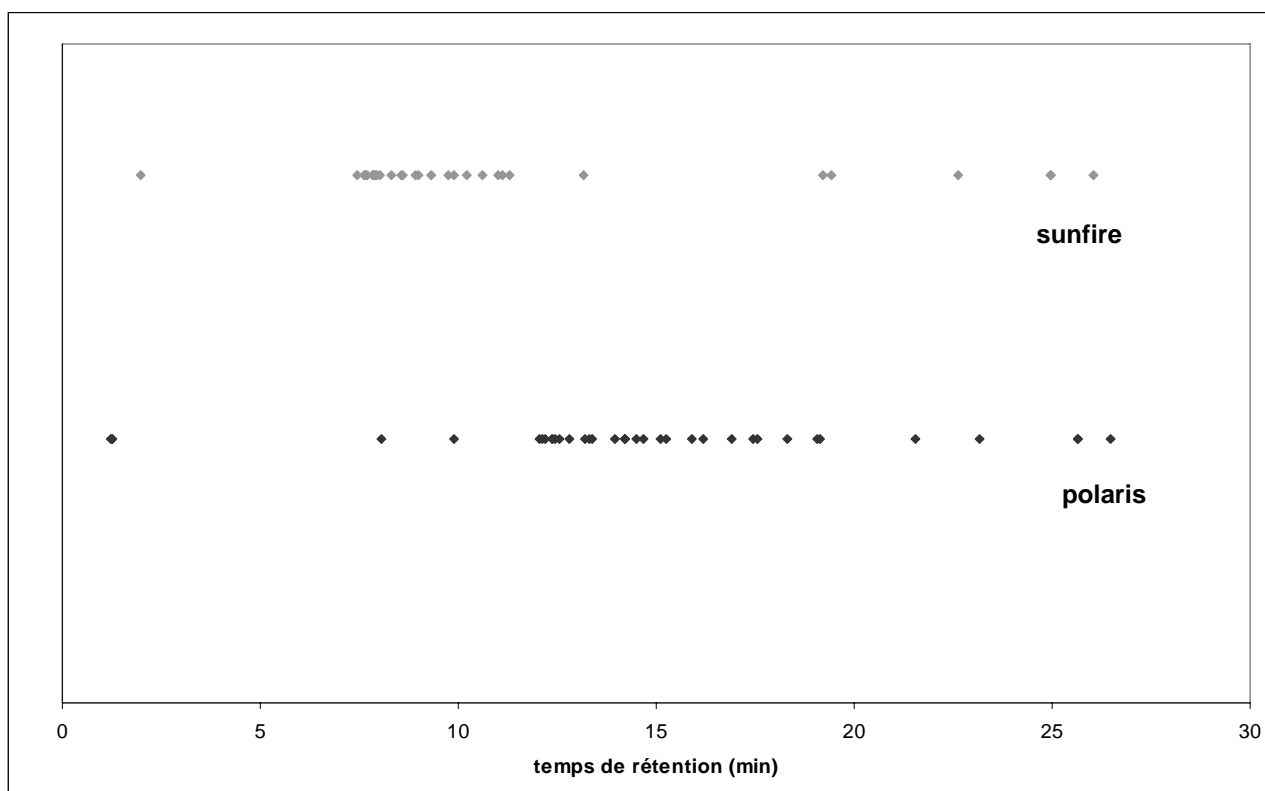


Figure 6 : Graphique représentant les temps de rétention des composés analysés en fonction du type de colonne utilisé.

La figure 6 présente la répartition des temps de rétention obtenus avec un même gradient sur des colonnes différentes. De par le fonctionnement du spectromètre de masse, il est plus intéressant d'opter pour une colonne de type et dimensions Polaris plus que du type Sunfire. En effet, la configuration du spectromètre de masse repose sur l'emploi de segments de temps pendant lesquels sont enregistré des transitions MRM données (signaux permettant l'analyse des composés élués lors de la période de temps correspondante). Plus un segment comporte d'analytes, moins leur détection sera performante et au-delà d'un certain nombre, le spectromètre ne fournira pas des données d'assez bonne qualité. C'est pourquoi il est intéressant de travailler avec une séparation performante des composés, afin de réduire le nombre de composés par segments.

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.

2.2.4 Choix de la phase mobile

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 testés 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. Les résultats sont présentés sur la figure 7 en ce qui concerne l'acide formique.

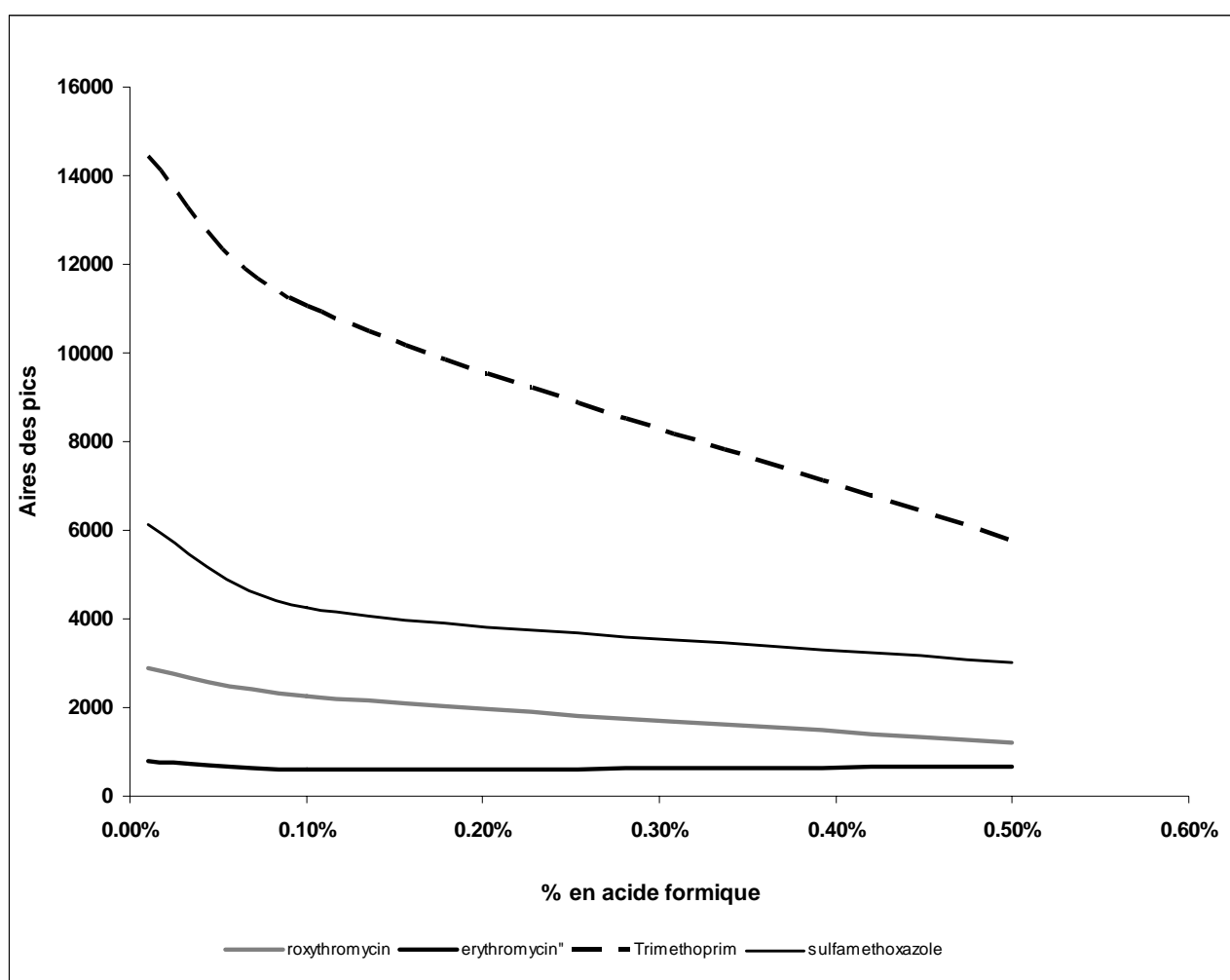


Figure 7 : Graphique représentant les aires de spics obtenues en fonction des composition de phase mobile testées. Chaque éluant (eau et acétonitrile) ont été préparés avec les pourcentages d'acide formique indiqués sur la figure.

La figure 7 présente les résultats obtenus sur quelques molécules et 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. La séparation ne présentait pas de différences suffisamment avantageuses pour modifier la composition de la phase mobile.

2.2.5 Choix du gradient

Plusieurs gradients ont été testés afin d'optimiser les paramètres de la séparation tels que résolution, efficacité et temps d'analyse. Plusieurs gradient ont été mis au point sur chaque colonne testée afin d'optimiser au mieux la séparation en fonction des colonnes.

Nous avons tout d'abord observé une certaine instabilité de la séparation lorsque le pourcentage d'eau au début de l'analyse n'était pas à 100%, les premiers composés coéluant. La présence de deux pentes différentes a également permis d'optimiser la séparation au niveau de la résolution.

2.3 La spectrométrie de masse

2.3.1 Principe

La spectrométrie de masse est une technique de détection sensible qui fournit des informations structurales sur les molécules étudiées. Son couplage à un système de chromatographique est une association complexe mais puissante pour l'identification d'un soluté à l'état de trace dans un mélange complexe.

Le couplage entre la spectrométrie de masse avec la chromatographie en phase liquide a longtemps été freiné par deux limitations techniques liées à l'incompatibilité des pressions et des débits. Depuis les années 90 et l'avènement des interfaces à pressions atmosphérique, les chromatographistes ont à leur disposition deux types de sources d'ionisation : l'ionisation chimique à pression atmosphérique, (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI) et l'ionisation par électrospray (Electrospray Ionisation, ESI). Les performances de ces deux sources sont, dans une certaine mesure, indépendantes des conditions chromatographiques ce qui permet l'emploi de gradients de composition. De plus, ces deux interfaces sont compatibles avec l'emploi de colonnes capillaires et, surtout, dans le cadre de notre projet, avec celui de colonnes remplies.

Source de désorption et d'ionisation par Electrospray

Le principe de l'ESI repose sur l'introduction en continu à faible débit (de l'ordre de quelques $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) de l'échantillon en solution par un capillaire très fin (de 30 à 100 μm de diamètre interne) maintenu sous haute tension (de 3 à 5 kV par rapport à la contre-électrode).

Cette différence de potentiel génère un champ électrique élevé qui nébulise la solution et crée un spray de fines gouttelettes (1 μm), chargées à leur surface (positivement en mode positif et négativement en mode négatif). Dans la source à pression atmosphérique, les gouttelettes s'évaporent progressivement en perdant des molécules de solvant par des mécanismes complexes de désolvatation et d'évaporation. La taille des gouttelettes diminue et la densité de charge augmente au sein de la solution. Lorsque la répulsion coulombienne excède la tension superficielle, la gouttelette explose pour former des gouttelettes de seconde génération, beaucoup plus petites.

L'étape ultime de formation des ions en phase gazeuse est encore vivement discutée. Après plusieurs étapes de désintégration, la densité de charge deviendrait telle, dans la gouttelette, que le champ électrostatique local très intense conduirait à la désorption des ions par effet de champ. On obtiendrait alors les ions en phase gazeuse, physiquement intacts, et pouvant porter plusieurs charges s'il existe plusieurs sites ionisables

sur la molécule. L'obtention d'ions multi-chargés $(M+zH)^{z+}$ avec $z \leq 50$ permet d'atteindre des masses moléculaires supérieures à 150 000 u avec des rapports m/z , ou masses apparentes, comprises dans la gamme classique de masse d'un analyseur quadripolaire (50-2000 Th).

2.3.2 Détermination des ions majoritaires et des paramètres d'ionisation,

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 déssolvation,
- 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 déssolvation, la tension du capillaire et les débits des gaz sont à optimiser en fonction de l'ensemble des molécules. En effet, ces paramètres ne peuvent varier au cours d'une même analyse. Ils doivent donc être adapté 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 déssolvation 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 de la figure 8 récapitule les paramètres du spectromètre de masse optimisés selon les molécules.

Figure 8 : tableau récapitulatif des paramètres d'ionisation optimisés du spectromètre de masse.

Antibiotiques	nom	ion père	ion fils majoritaire	Tension cône	Energie de collision	pKa	logP estimé
Sulfamides	Sufachloropyridazine	284.6	155.7	20	27	5.5 - 7.5	0.31
	Sulfamerazine	264.6	155.7	15	17	7.0 - 2.2	0.21
	Sulfamethoxazole	253.8	155.7	12	12	5.7 - 1.8	0.48
macrolides	Erythromycin	734.2	157.8	23	25	8.8	2.48
	Neomycin sulfate	614.8	161	55	30	/	/
	Spiramycin	421.9	100.8	15	13	7.9	/
	Roxithromycin	836.7	157.8	30	30	8.8	2.75
glycopeptide	Vancomycin	724.9	161	17	8	2.78 - 6.96 - 8.37 - 8.76 - 10.1	
pyrimidines	Trimethoprim	290.7	229.8	37	20	7.2	0.73
bétalactamides	Abamectin	895.8	327.3	7	50	/	/
	Amoxicillin trihydrate	397.5	348.6	20	15	2.4 - 7.4	0.97
	Ampicillin trihydrate	381.8	332.8	20	18	2.7 - 7.3	1.45
tetracycline	Chlorotetracyclin.HCl	478.4	443.6	23	17	6.5	-3.6
	Oxytetracyclin. HCl	460.5	425.8	20	13	3.3 - 7.3 - 9.1	-3.6
	Tetracyclin	444.5	409.8	20	15	3.36 - 7.1 - 9.2	-3.7
Fluoroquinolones	Oxolinic acid	261.7	243.7	20	15	/	1.7
	Ciprofloxacin	331.5	287.6	32	15	6	0
	Norfloxacin	319.7	275.8	27	15	6.14 - 8.31	-0.31
	Ofloxacin	361.6	317.7	28	12	6.0 - 8.0	-0.2

3 Résultats obtenus

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.

3.1 Résultats obtenus sur les échantillons issus de rus forestiers

Des échantillons issus de ruisseaux forestiers du bassin de l'orge 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 forêt domaniale de St Michel

Station 8 ru de la forêt d'Hirson

Station 61 ru de la pâture Par

Les analyses ont été réalisées en SPEoffline-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.

3.2 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 Forgee Re jet 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 9 et 10) permettent de situer où l'échantillonnage a été effectué.

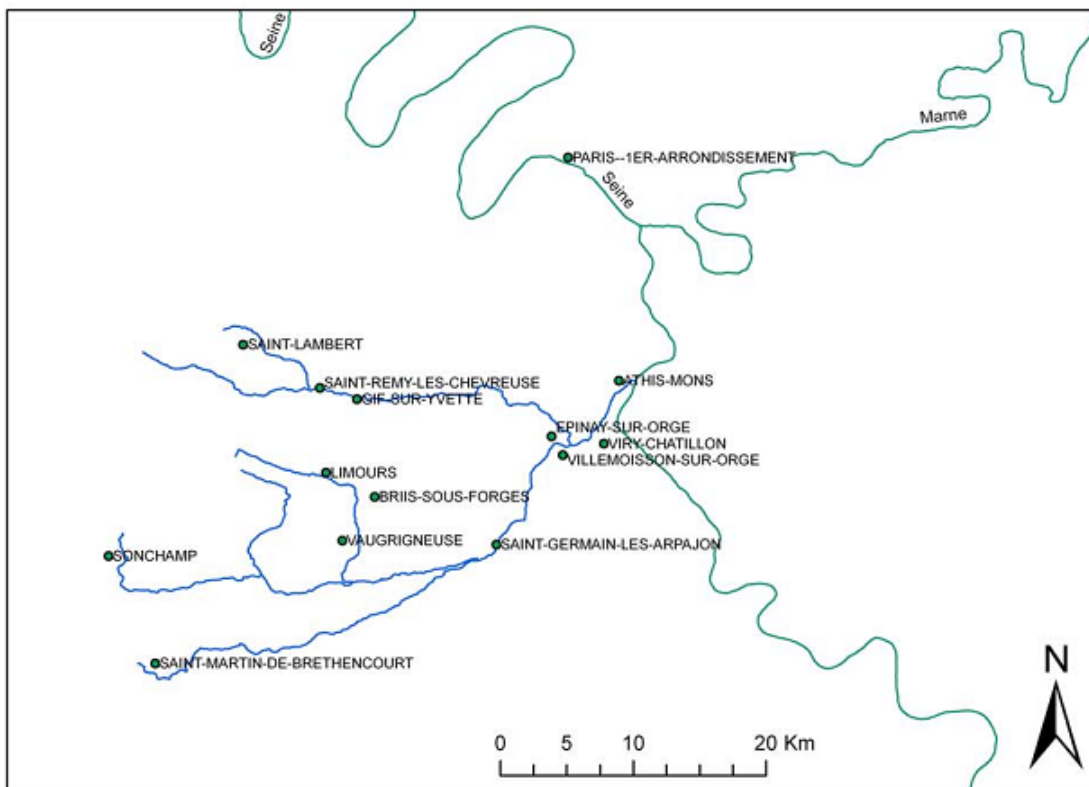


Figure 9 : Carte représentant une vue d'ensemble des principaux cours d'eau (en bleu) du bassin versant de l'Orge.

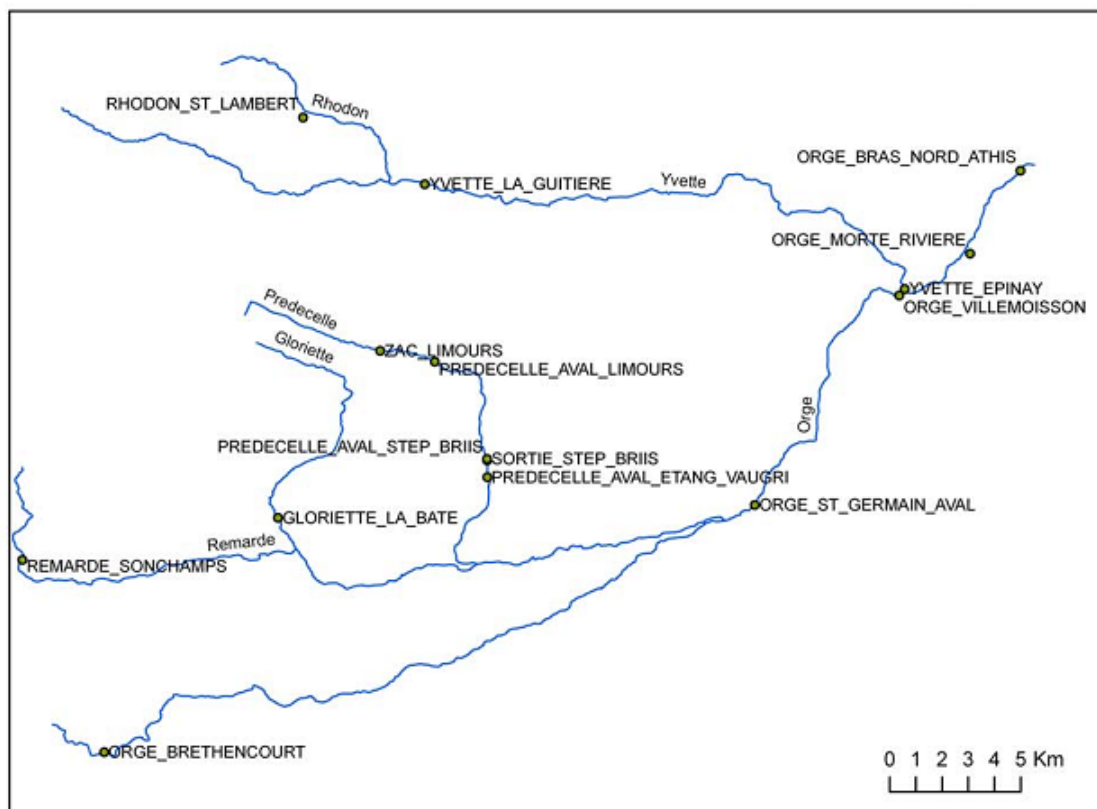


Figure 10 : carte représentant les principaux cours d'eau et certains des lieux de prélèvement du bassin versant de l'Orge.

Ces échantillons ont été analysés selon le protocole décrit plus haut. 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 les tableaux et diagrammes ci-dessous :

Figure 11 : 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 teneurs en dessous de la limite de quantification sont représentées en grisées (LD < chiffre en grisé < LQ).

Composés en ng/L	Campagne sept 07							
	Rejet step Briis sous Forge	Aval Step Briis	Aval étang vagueux	Amont Limours	Aval Limours	Epinay sur Yvette	Orge Villemoisson	Orge Viry Châtillon
vancomycin	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfamerazine	-	-	-	-	-	-	-	-
Triméthoprim	8.3	1.9	2.8	-	-	1.3	0.4	0.9
norfloxacin	17.9	31.6	5.6	1.2	1.4	3.3	1.9	1.8
Ciprofloxacine hydrochloride	10.8	28.0	2.9	0.6	0.6	1.7	1.3	0.6
Ofloxacin	44.6	44.7	12.5	0.5	0.5	7.5	1.3	1.4
Amoxicillin trihydrate	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxytétracycline	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin trihydrate	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Spiramycin</i>	44.4	137.5	94.3	-	-	-	-	-
Tétracycline Hydrochloride	3.7	12.6	-	-	-	-	-	-
Sulfaméthoxazole -Ac	4.2	-	-	-	-	-	-	-
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-	-	-
Chlortétracycline Hydrochloride	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythromycin	122.9	44.9	52.7	-	-	-	-	-
Roxythromycin	13.5	1.5	2.0	-	-	-	-	-

Les résultats exprimés dans le tableau 11 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 intervient ensuite, ce qui explique que ces antibiotiques soient détectés mais que leur concentration ne puisse être qu'estimée.

Figure 12 : 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).

Composés en ng/L	Campagne mars 08					
	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 Vaugrenewe
vancomycin	-	-	-	-	-	-
Sulfamerazine	-	-	-	-	-	-
Triméthoprim	1.0	3.9	25.0	6.4	4.9	1.9
norfloxacine	1.4	33.4	21.9	0.9	0.9	0.9
Ciprofloxacine hydrochloride	1.1	17.6	19.8	0.5	0.5	0.5
Ofloxacine	1.4	49.2	27.2	0.8	0.5	1.4
Amoxicillin trihydrate	-	13.7	-	-	-	-
Oxytétracycline	-	-	-	-	-	-
Ampicillin trihydrate	-	-	-	-	-	-
<i>Spiramycin</i>	55.7	-	164.9	72.3	-	-
Tétracycline Hydrochloride	-	2.7	3.9	-	-	-
Sulfaméthoxazole -Ac	-	-	3.2	-	-	-
Oxolinic acid	-	-	-	-	-	-
Chlortétracycline Hydrochloride	-	-	-	-	-	-
Erythromycin	-	1.2	23.1	0.7	-	-
Roxythromycin	-	1.4	3.0	-	-	-

L'analyse qui peut être faite des résultats issus du tableau 12 est similaire à celle faite pour le tableau 11. 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.

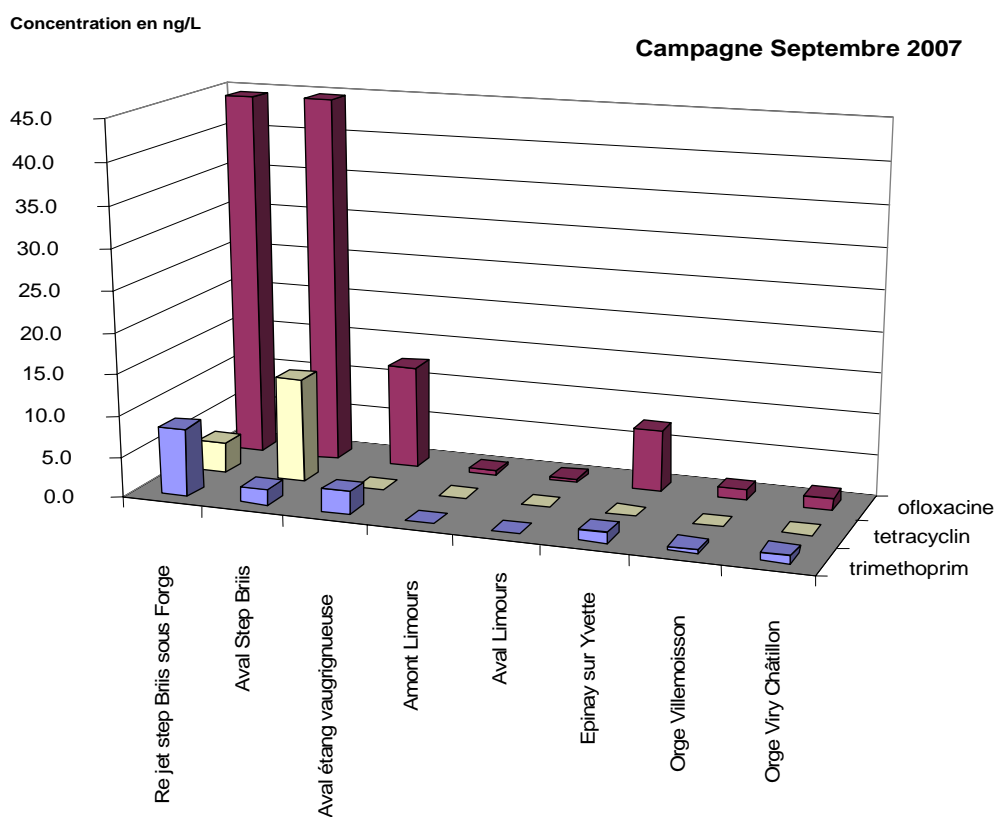


Figure 13 : diagramme comparant les résultats obtenus lors de la campagne de Septembre 2007 le long de la rivière Prédecelle pour trois antibiotiques étudiés également par le département R&D Biologie du CRECEP.

Campagne Mars 2008

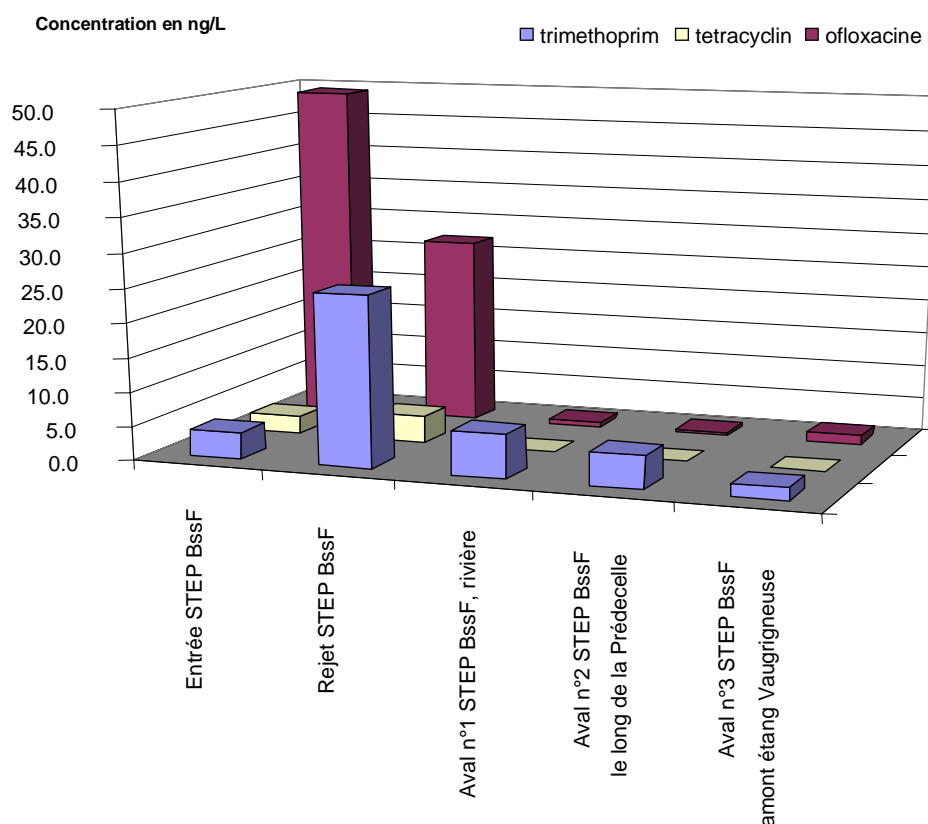


Figure 14 : diagramme comparant les résultats obtenus lors de la campagne de Mars 2008 le long de la rivière Prédécelle pour trois antibiotiques étudiés également par le département R&D Biologie du CRECEP.

Les diagrammes des figures 13 et 14 représentent bien cet effet d'apport via les STEP d'antibiotiques dans l'environnement et la dilution qui s'en suit. Les antibiotiques représentés sur ces diagrammes ont été choisis afin de coordonner nos résultats avec ceux du département R&D Biologie qui travaillent également sur ces trois molécules. Comme l'ont montré l'ensemble de ces figures.

3.3 Résultats obtenus sur des échantillons d'un hôpital parisien

Parmi les échantillons environnementaux reçus certains provenaient de prélèvements réalisés dans l'enceinte d'un hôpital parisien en Novembre 2007. Ces échantillons proviennent de cinq points du réseau d'eaux usées de cet hôpital. Ces échantillons nous permettent d'évaluer la charge en antibiotiques contenue dans ces canalisations et de corrélérer nos résultats avec le laboratoire de Biologie du CRECEP qui travaille sur la présence de souches antibiorésistantes dans ces mêmes effluents.

Comme attendu, nous indique que les concentrations en antibiotiques contenues dans les effluents hospitaliers présentées en figure 15 sont extrêmement importantes par rapport à ce que nous avons pu observer dans des échantillons prélevés en rivière. Par ailleurs, on remarque la présence d'antibiotiques dont l'usage est généralement réservé au milieu hospitalier (la vancomycine) à des teneurs très importantes.

Figure 15 : tableau récapitulatif des niveaux de contamination des échantillons prélevés lors d'une campagne effectuée en Novembre 2007 dans un hôpital parisien en nanogramme par litre.

Composés en ng/L	Rejet Hôpital				
	point 1 - Fosse	point 2 - grand Fosse ext	point 3 - <i>Fougère</i>	point 4 - Sortie Bichat	point 5 - Trèfle
vancomycin	44428.2	102469.3	30209.2	124606.0	45793.5
Sulfamerazine					
Triméthoprim	12111.0	26073.9	-	29317.6	1256.4
norfloxacin	55.9	138.0	-	237.8	9.2
Ciprofloxacine hydrochloride	2205.0	35923.8	-	36264.6	5042.3
Ofloxacin	31.9	2148.9	-	2479.2	142.6
Amoxicillin trihydrate	-	-	-	42.9	8.7
Oxytétracycline	11.8	-	-	-	-
Ampicillin trihydrate	9.0	101.9	-	-	51.0
<i>Spiramycin</i>	3028.1	1026.6	72.1	725.4	77.3
Tetracycline Hydrochloride	7.8	13.5	-	37.6	24.8
Sulfamethoxazole -Ac	599.1	2348.8	536.4	3772.4	109.8
Oxolinic acid					
Chlortétracycline Hydrochloride	-	-	-	-	-
Erythromycin	445.0	75.2	350.8	28.6	-
Roxythromycin	-	156.3	-	161.1	-

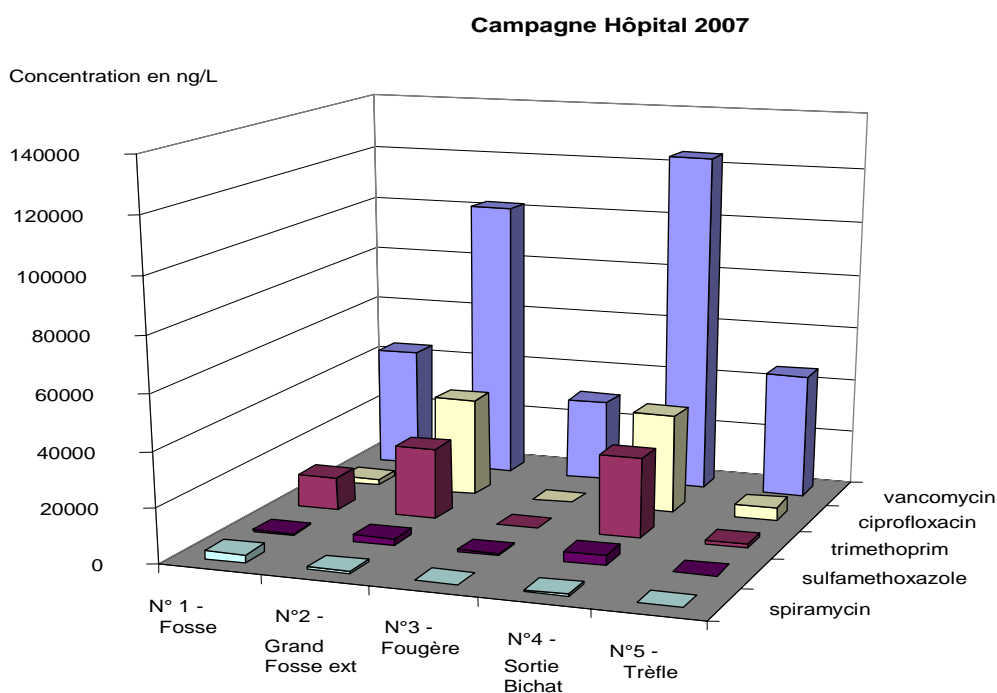


Figure 16 : diagramme comparant les différents points obtenus lors de la campagne de Novembre 2008 dans un hôpital parisien pour cinq antibiotiques.

La figure 16 illustre les rapports de concentrations entre plusieurs types d'antibiotiques sur les 5 sites de prélèvement. Un problème matériel concernant le volume d'échantillon prélevé pour la préconcentration sur cartouche de l'échantillon n°3 Fougère peut expliquer les niveaux plus bas de ce point de prélèvement par rapport aux autres.

La figure 17 permet de comparer les niveaux de concentrations présents en entrée et sortie de STEP et ceux présents dans les effluents hospitaliers. Les rapports des concentrations entre ces deux milieux sont de l'ordre de 100 à 50000 selon les antibiotiques.

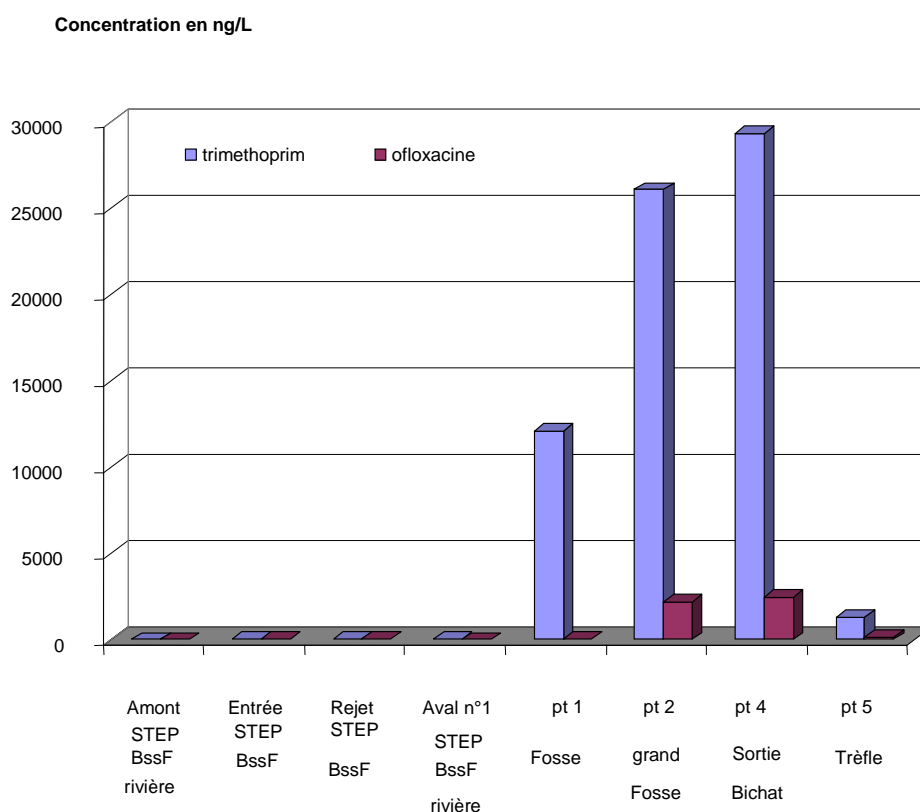


Figure 17 : diagramme comparant des résultats obtenus lors de la campagne de Novembre 2008 dans un hôpital parisien et des résultats obtenus sur la campagne de Mars 2008 effectuée dans le bassin versant de l'Orge.

3.4 Résultats obtenus sur les échantillons de Seine

Des prélèvements sur la Seine ont été effectués au cours du mois d'Août 2008 à raison d'un prélèvement par semaine. Ces prélèvements ont eu lieu en amont de la ville de Paris jusqu'en aval de la ville. Cependant les sites dont les résultats sont présentés dans ce rapport sont le pont de Tolbiac, le pont du Garigliano, le pont de Suresnes et le pont de Clichy. La figure 18 schématise sur une carte les points de prélèvements en Seine.

Les prélèvements effectués ont été analysés selon le processus analytique décrit dans les paragraphes précédents. La figure 18 présente le tableau récapitulatif des composés retrouvés dans la Seine aux différents points étudiés.



Figure 18 : Carte représentant une vue d'ensemble des principaux points de prélèvements le long de la Seine.

Figure 19 : Tableau récapitulatif des concentrations en ng/L obtenues sur les points de prélèvements le long de la Seine.

		Pont Tolbiac	Pont Garigliano	Pont Suresnes	Pont Clichy
campagne du 06/08/2008	Triméthoprim	7.0	3.5	4.0	5.0
	norfloxacine	9.5	4.3		2.9
	Ofloxacine		11.2	12.5	7.5
	Sulfamethoxazole	10.4	44.8	14.8	21.2
	Chlortetracyclin		27.3	24.3	
	Roxythromycin	9.1	9.1	11.0	14.7
campagne du 13/08/2008	Erythromycin	65.0	40.0	34.0	46.0
	norfloxacine	32.0	43.0		
	Ofloxacine	39.0	24.0	28.0	18.0
	Roxythromycin	4.0	3.0	3.0	3.0
campagne du 20/08/2008	Ofloxacine		19.0		22.0
	Erythromycin	100.0	22.0	12.0	24.0
campagne du 27/08/2008	Triméthoprim	5.8	3.0	4.8	3.3
	norfloxacine	7.7	4.6	4.3	3.5
	Ofloxacine	11.6	14.9		
	Sulfamethoxazole	26.7	18.2	19.6	19.6
	Erythromycin	4.5	4.0	3.9	4.8
	Roxythromycin	8.5	9.3	8.4	9.1

Plusieurs conclusions peuvent être tirées du tableau récapitulatif de résultats présentés en figure 19. En effet, les teneurs en antibiotiques sont relativement similaires d'un point de prélèvement à l'autre sur une même journée de prélèvement. Ceci est cohérent avec le fait qu'il n'y ait pas d'apports issus de station d'épuration ou de rejets directs dans la Seine sur le trajet étudié. Des variations des concentrations en antibiotiques peuvent être observées d'une semaine à l'autre mais semblent non significatives dans l'ensemble.

Les antibiotiques retrouvés font majoritairement partie de la famille des fluoroquinolones néanmoins d'autres familles sont également représentées.

4 Conclusions

Dans le cadre de ce projet, le Crecep a développée une méthode analytique pour l'analyse de résidus antibiotiques dans les eaux. Cette méthode a permis de déterminer les concentrations des composés cibles lors des divers prélèvements réalisés en milieu hospitalier, en STEP (entrée et sortie) et sur des eaux de surface (Bassin de l'Orge 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 teneurs retrouvées dépendent énormément du type de prélèvement. Ainsi, les effluents hospitaliers présentent les concentrations les plus élevées avec la présence forte d'un antibiotique, la vancomycine, que l'on ne retrouve pas dans les eaux de surface, ni dans les entrées de STEP échantillonnées. Les entrées et sorties de STEP présentent quand à elles des concentrations beaucoup plus faibles que dans le réseau d'eaux usées des hôpitaux. Cependant, les teneurs sont plus importantes que celles retrouvées dans les eaux de surface. En effet, un effet important de dilution intervient entre le rejet d'une STEP et les prélèvements effectués en rivières. Ainsi, les eaux de surface présentent des teneurs en antibiotiques de l'ordre du nanogramme à la centaine de nanogrammes par litre. D'une part, il s'agit maintenant 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. D'autre part, la présence à 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.

Des études complémentaires sur ces mêmes compartiments environnementaux ainsi que d'autres restent à mener afin d'évaluer les concentrations présentes dans l'environnement et leur variation au cours de l'année. Par ailleurs, ces molécules peuvent subir des dégradations dans les milieux environnementaux produisant de nouvelles molécules dont la structure, les concentrations et la toxicité sont peu connues. Il est également fréquent qu'une partie plus ou moins importante des antibiotiques soit excrétée sous forme de métabolites qui restent à quantifier dans l'environnement selon des modèles qu'il faut définir afin d'avoir une meilleure photographie de l'état des eaux de surface, des eaux entrant et sortant des stations d'épuration et des rejets hospitaliers.