

Contamination des eaux superficielles par les produits pharmaceutiques : diffusion d'antibiotiques par la médecine humaine et les activités d'élevage

Joëlle Eurin, Donatienne Ollivon, Brigitte Garban, Karen Tiphagne et Marc Chevreuil.

Laboratoire Hydrologie et Environnement EPHE/UMR Sisyphe, 4 place Jussieu 75252 Paris cedex 5

Joelle.Eurin@ccr.jussieu.fr

1.Introduction.....	1
2.Etat actuel des connaissances sur la contamination des eaux superficielles par les antibiotiques... 1	
2.1. Choix des antibiotiques de la famille des quinolones et fluoroquinolones.....	3
2.2. Validation de la méthode de dosage	4
3.Résultats.....	6
3.1. Le site atelier de la Blaise	6
3.2. L'axe fluvial de la Seine	8
4.Conclusion et perspectives.....	9
5.Bibliographie	9

1. Introduction

La France est de tous les pays européens le premier consommateur d'antibiotiques et il n'y a pas actuellement de réglementation concernant leurs niveaux de présence dans l'environnement. Si les antibiotiques sont indispensables pour lutter contre les infections bactériennes chez l'homme et l'animal, le problème concernant leur écotoxicité doit être posé. En effet, après l'administration d'antibiotiques chez l'homme ou l'animal, on sait maintenant que ces molécules biologiquement actives sont retrouvées dans les eaux de surface à des concentrations de l'ordre du ng L^{-1} et parfois supérieures à $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (Halling-Sorensen *et al.*, 1998, Hirsch *et al.*, 1999). Ces antibiotiques décelés dans les eaux de surface peuvent y être introduits par les effluents domestiques ou hospitaliers, les effluents de stations d'épuration, les effluents agroalimentaires ou le ruissellement après épandage de lisiers (Kümmerer, 2003). Le rôle de facteurs environnementaux, des modes d'élevage et l'impact réel des épandages de déchets de l'assainissement urbain ou de l'élevage sur la dissémination de bactéries résistantes est très mal connu. La question qui se pose est de connaître les concentrations de ces antibiotiques dans l'environnement pour évaluer un éventuel impact en terme de santé publique et de qualité des milieux aquatiques.

2. Etat actuel des connaissances sur la contamination des eaux superficielles par les antibiotiques.

Parmi les nombreux contaminants retrouvés dans l'environnement, les antibiotiques représentent une classe importante comme le montre une étude de l'USGS (United States Geological Survey). Cette étude a porté sur l'analyse de 95 molécules réparties en 15 classes basées selon leur activité générale dont 22 antibiotiques. Les prélèvements ont été réalisés pendant les années 1999 et 2000 dans 139 cours d'eau situés dans des zones d'activités susceptibles de contamination humaine, industrielles ou rurales. Un ou plusieurs antibiotiques ont été retrouvés avec une fréquence de détection d'environ 50 % des échantillons et représentent en concentration un pourcentage de 1,5 % de la totalité des contaminants décelés (Figure 1) (Kolpin *et al.*, 2002).

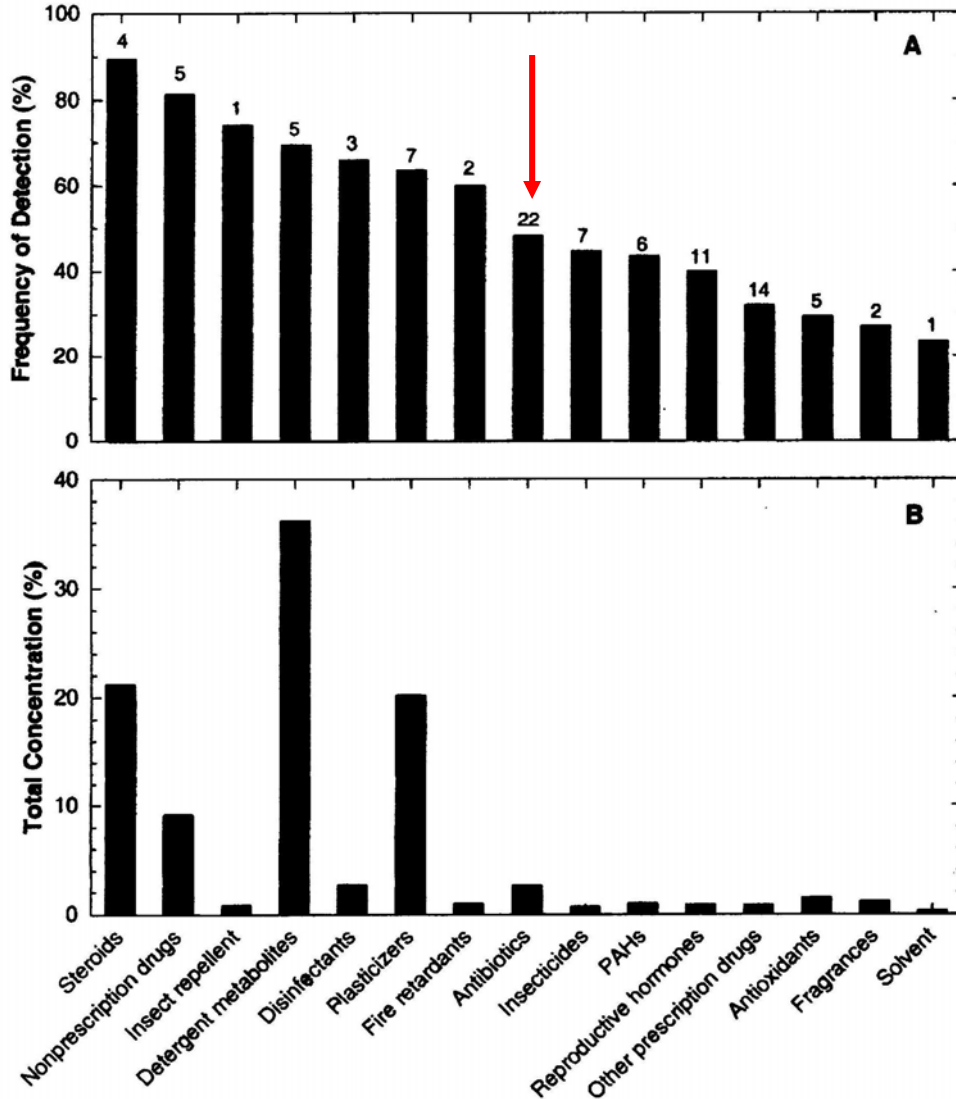


Figure 1: Pourcentage de détection des contaminants organiques dans des eaux superficielles (A) et pourcentage des concentrations totales mesuré (B) pour chaque catégorie de contaminants

En milieu urbain, les antibiotiques sont présents dans les rejets hospitaliers, industriels et domestiques qui aboutissent dans les stations d'épuration où ils ne sont pas complètement dégradés. Par conséquent, ils peuvent être rejetés dans les eaux de surface et/ou les sols agricoles via les boues urbaines destinées à l'épandage (Carballa *et al.*, 2004). La Figure 2 représente un exemple des concentrations de ciprofloxacine et de norfloxacine rencontrées dans les effluents hospitaliers en Suisse et leurs devenir à travers la filière de traitement de la station d'épuration jusqu'à leurs rejets dans la rivière (Giger *et al.*, 2003). La concentration prédictive sans effet pour l'environnement (PNEC) étant dépassée pour les concentrations de ciprofloxacine mesurées dans les effluents hospitaliers, il est nécessaire d'évaluer les effets toxicologiques de cette substance. De même, si les concentrations dans la rivière de $0,01\mu\text{g L}^{-1}$ sont inférieures aux valeurs pouvant présenter un risque pour l'environnement, la présence cumulée de toutes ces molécules pourrait conduire à des concentrations totales présentant un risque toxique pour l'écosystème aquatique. Ce risque toxique a été évalué par Backhaus *et al.*, (2000) en comparant la toxicité d'une ou d'un mélange de 10 quinolones sur les bactéries bioluminescentes *Vibrio fischeri*.

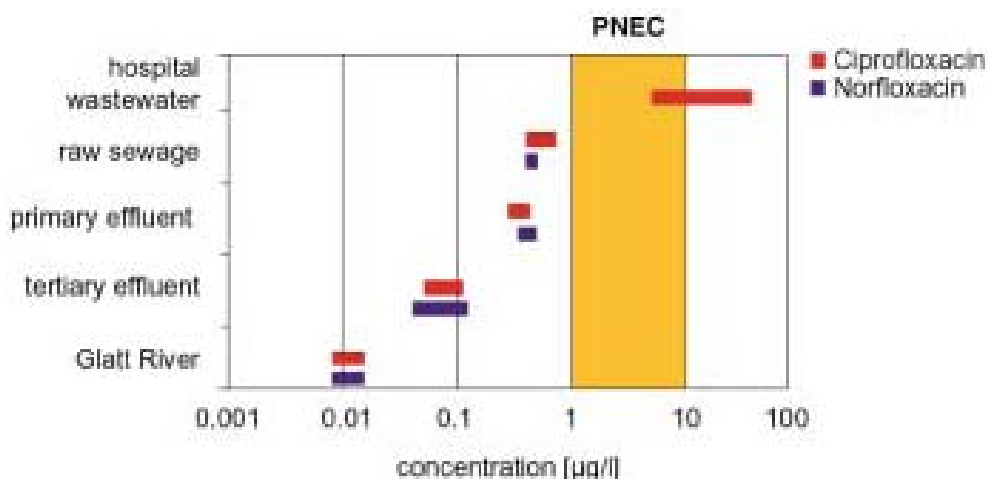


Figure 2: Suivi des concentrations de ciprofloxacine et norfloxacine depuis les effluents hospitaliers jusqu'à la rivière

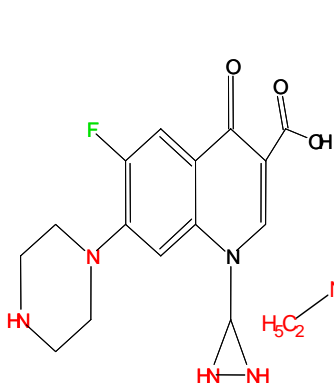
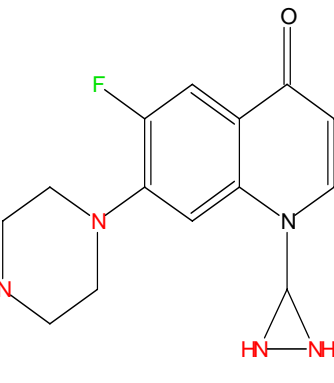
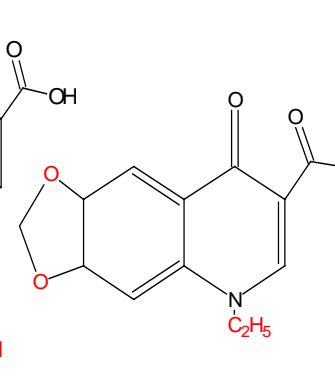
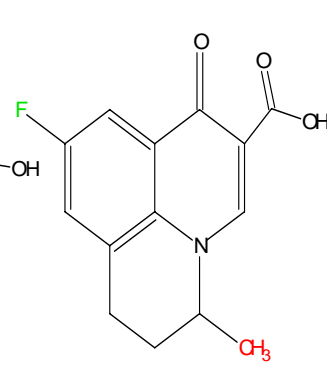
En milieu rural, les eaux de surface peuvent également être contaminées par les antibiotiques par l'intermédiaire de l'épandage via les eaux de ruissellement ou d'infiltrations superficielles. Les travaux d'Hamscher *et al.*, (2002) ont montré par exemple la mobilité des tétracyclines dans un sol traité avec du lisier de porc dont la concentration de ces antibiotiques était de 4 mg kg⁻¹. A la profondeur du sol de 0-10, 10-20 et 20-30 cm, on retrouvait respectivement 86,2, 198,7 et 171,1 µg kg⁻¹ de tétracyclines. De même, les antibiotiques peuvent être introduits dans les sols lors de l'épandage des boues de stations d'épuration. Lindberg *et al.*, (2003) ont ainsi étudié la persistance de la ciprofloxacine contenue dans des boues de station d'épuration à la concentration de 2 mg kg⁻¹ de poids sec et épandues sur les sols agricoles. Après 8 et 21 mois, les concentrations de ciprofloxacine dans les sols étaient respectivement de 0,32 et 0,27 mg Kg⁻¹.

En France, en 2001, la consommation d'antibiotiques a été de 2500 tonnes d'antibiotiques en médecine humaine et de 1364 tonnes en médecine vétérinaire. Ces données justifient l'intérêt de définir les sources et le mode de transfert de ces substances pharmaceutiques mais la diversité des familles d'antibiotiques et de ces substances impose un choix. Notre travail s'est donc attaché à la mise au point d'une méthode d'analyse dans les eaux de surface de principes actifs ciblés et issus des classes thérapeutiques des quinolones et fluoroquinolones.

2.1. Choix des antibiotiques de la famille des quinolones et fluoroquinolones

Nous avons choisi l'étude des quinolones et fluoroquinolones comme molécules pilotes pour plusieurs raisons. En premier lieu, leur utilisation tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire progresse ces dernières années et elles tendent à remplacer d'autres familles d'antibiotiques pour lesquelles la résistance bactérienne est en augmentation. Ainsi, les ventes des fluoroquinolones ont progressé de 17,8% entre 1997 et 2002 (Guillemot *et al.*, 2004). De plus, leurs propriétés physico-chimiques en font des molécules persistantes dans l'environnement, pouvant être diffusées dans les eaux de surface ou s'adsorber dans les boues de STEP (Golet *et al.*, 2002) et dans les sols agricoles (Tolls *et al.*, 2001) (Tableau 1).

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des quatre antibiotiques

Famille	Fluoroquinolone	Fluoroquinolone	Quinolone	Fluoroquinolone
Molécule	Ciprofloxacine	Enrofloxacin	Acide oxolinique	Fluméquine
	Médecine Humaine	Médecine vétérinaire	Médecine humaine et vétérinaire	
				
PM	331,35	359,40	261,23	261,25
Solubilité	30 g L ⁻¹	130 g L ⁻¹	0,004 g L ⁻¹	0,07 g L ⁻¹
Kd (L Kg ⁻¹)	250	110	935	2500
Sol/eau				

Il est établi que la ciprofloxacine est un métabolite de l'enrofloxacin et dès lors, bien que non utilisé en médecine vétérinaire, la présence de ciprofloxacine en milieu rural n'est pas exclue (Thorsten et al., 2003)

2.2. Validation de la méthode de dosage

La difficulté du dosage des molécules d'antibiotiques vient de leur très grande diversité de structure et de leur comportement suivant les conditions du milieu. La molécule d'acide oxolinique est stable et ne pose pas de problème particulier. Par contre les trois fluoroquinolones sont des molécules amphotères et la mise au point de leur technique d'extraction a nécessité de nombreux essais. Les échantillons d'eau sont prélevés dans des bouteilles teintées et filtrés à travers des membranes de nitrate de cellulose (0,45µm). Nous avons utilisé une méthode d'extraction en phase solide (SPE) qui permet l'enrichissement en analytes en diminuant les interférences. 100 ml d'eau filtrée sont passés à un débit de 2 ml/min sur les colonnes préalablement conditionnées par 1 ml de méthanol puis 1 ml d'eau. Le lavage est effectué avec 2 ml d'eau contenant 5% de méthanol et l'élution se fait avec 5 ml de méthanol. L'extrait est ensuite concentré jusqu'à un volume d'environ 500 µl. 20 µl de cet extrait est analysé en chromatographie liquide haute pression.

Nous avons testé différentes colonnes d'extraction : Les colonnes SPEC-C18 et SPEC-MP3 (Varian), la colonne Discovery DSC-18 (Supelco) et la colonne Oasis HLB (Waters). La Figure 3 montre les différents profils chromatographiques obtenus à partir d'un échantillon d'eau de surface (Blaise) dans lequel nous avons ajouté 25 ppb des quatre molécules standards et extrait selon le protocole décrit précédemment. Seule la colonne Oasis HLB (Waters) donne une récupération des standards satisfaisante (90 à 95%). Nous avons donc retenu ces colonnes Oasis HLB (Waters) dont le support hydrophile-lipophile de phase inverse permet l'analyse de composés acides, neutres et basiques.

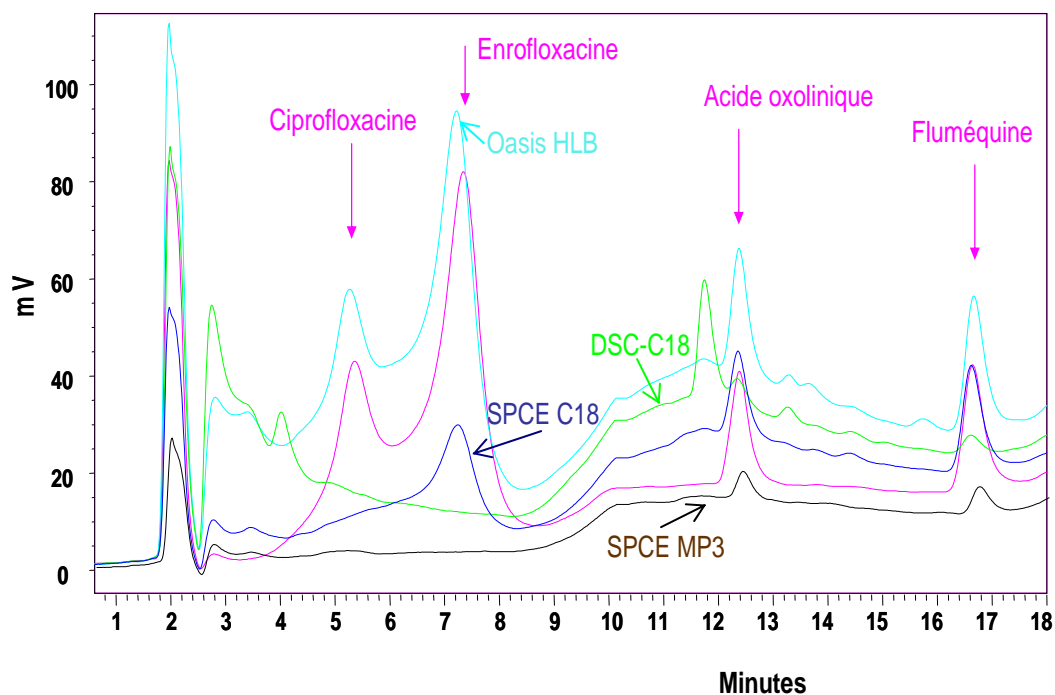


Figure 3 : Echantillons de la Blaise avec un ajout de 25 ppb de chaque standard et analysés sur différentes colonnes d'extraction, comparés au même standard dans le méthanol, directement chromatographié (courbe magenta).

Après des essais d'extraction à des pH variant de 4 à 8, nous avons choisi de traiter tous les échantillons à pH 7, seule valeur de pH donnant une récupération satisfaisante pour les quatre molécules analysées.

Les analyses ont été effectuées sur un chromatographe liquide haute pression (Waters 2695). La colonne est une Symmetry C18 (3,5µm, 2,1x150mm). Le débit est de 0,25ml/min. La phase mobile est constituée par un mélange acétonitrile/tampon phosphate 0,02M pH3, que l'on fait varier de 15/85 (v/v) pour la ciprofloxacin et l'enrofloxacin à 34-66 (v/v) pour l'acide oxolinique et la fluméquine. La ciprofloxacin et l'enrofloxacin sont détectées par fluorescence avec une longueur d'onde d'émission de 280nm et une longueur d'onde d'excitation de 450nm. L'acide oxolinique et la fluméquine sont détectés à des longueurs d'onde d'émission de 312nm et d'excitation de 366 nm. Chaque échantillon a été dosé au moins deux fois, l'un en direct, l'autre en ajoutant à l'eau une solution contenant les standards (Figure 4).

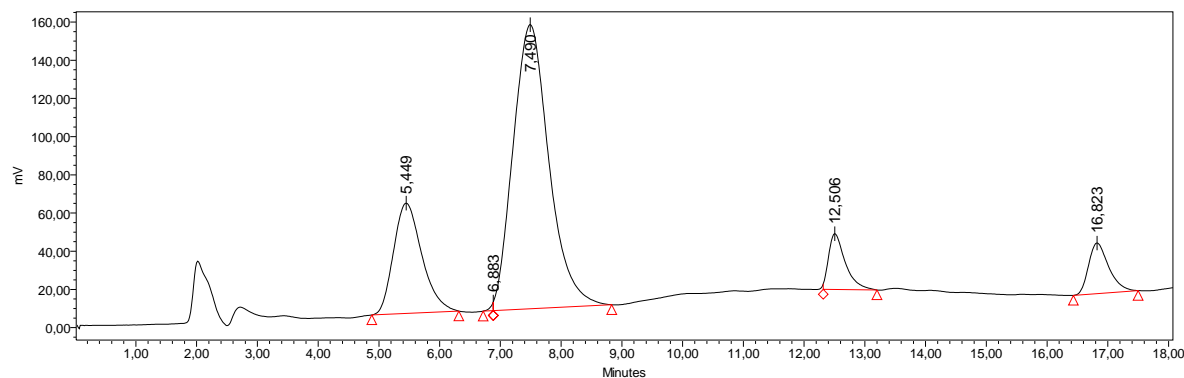


Figure 4 : Chromatogramme d'un échantillon d'eau d'Evian avec un ajout de 25 ppb de chacun des quatre standards

Suivant notre mode opératoire, la limite de quantification est de l'ordre de 0,5 ng L⁻¹.

3. Résultats

3.1. Le site atelier de la Blaise

Dans le cadre du programme PIREN Seine, des études pilotes sur le bassin de la Blaise ont été réalisées pour mieux comprendre les relations intervenant entre les pratiques d'élevage et la qualité de l'eau (Férant *et al.*, 2003). Nous avons donc choisi ce site atelier pour rechercher et analyser les molécules d'antibiotiques que nous avons sélectionnées (Figure 5).

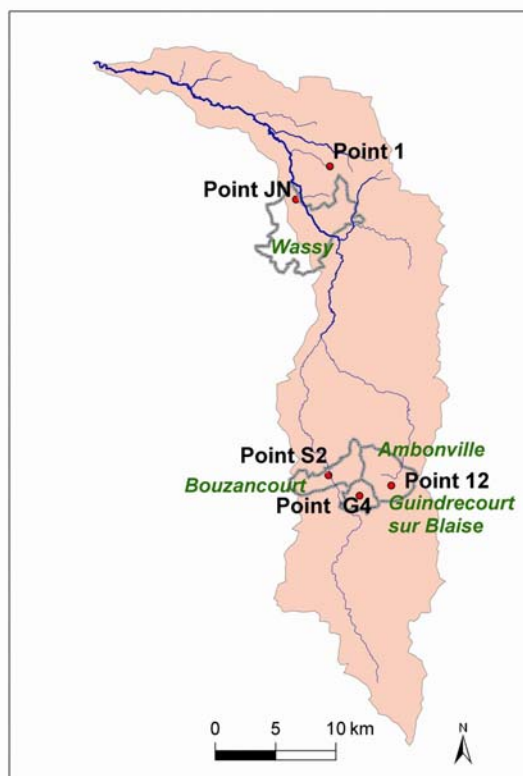


Figure 5 : Carte de localisation des points de prélèvements sur le bassin de la Blaise

Deux campagnes de prélèvements ont été faites sur le bassin versant de la Blaise en mars (période sèche) et novembre 2004 (après de fortes pluies). Nous avons retrouvé les quatre molécules d'antibiotiques recherchés dans les échantillons prélevés en mars au point 12 correspondant à une petite rivière à la sortie du village d'Ambonville. Les concentrations de ciprofloxacine, d'enrofloxacin et d'acide oxolinique étaient de l'ordre de 4 à 5 ng L⁻¹ et de 10 ng L⁻¹ pour la fluméquine. Ces quatre molécules étaient également présentes dans les échantillons prélevés à ce même point en novembre mais à de plus faibles concentrations (de l'ordre du ng L⁻¹). Les molécules d'acide oxolinique et de fluméquine étaient décelables (1 à 2 ng L⁻¹) dans les échantillons prélevés en mars au point 1 (petit ru traversant une zone de prairies). En novembre, aucune des quatre molécules recherchées n'a été retrouvée au point JN (situé en aval de Wassy) et au point G4 (ru à la sortie du village de Guindrecourt) et seule la molécule d'enrofloxacin était décelable au point S2 (ru traversant une exploitation de Bouzancourt). Ces résultats sont représentés sur la Figure 6.

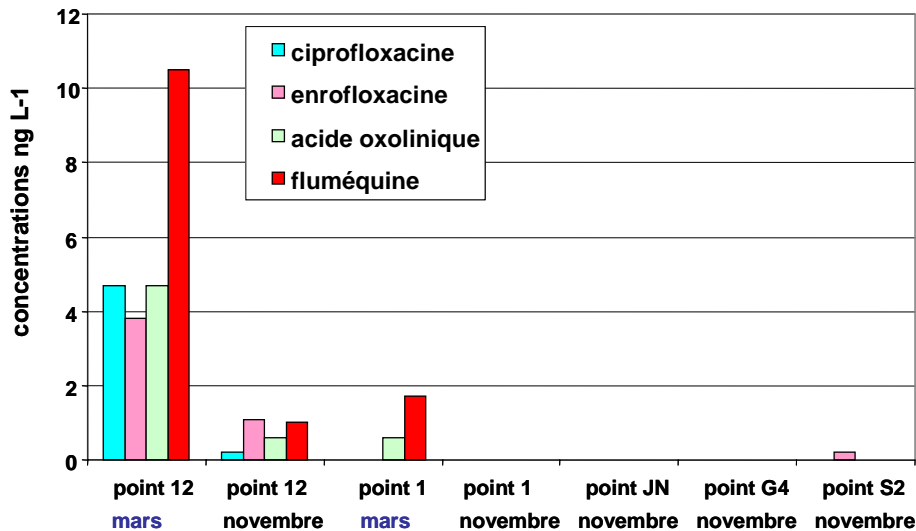


Figure 6: Concentrations des antibiotiques aux différents point de prélèvements sur le bassin versant de la Blaise en mars et novembre 2004.

Deux raisons peuvent expliquer la différence importante de concentrations en antibiotiques entre mars et novembre :

1°) Le bétail n'est pas soumis à des traitements en continus par les antibiotiques, et l'hivers (janvier-mars) est l'époque la plus propice, semble-t-il, pour ces traitements.

2°) Les prélèvements de novembre ont été effectués pendant une période très pluvieuse, ce qui aurait pu entraîner une sorte de « dilution » de la contamination potentielle assortie d'une infiltration dans les sols.

Nous avons effectué en mars 2004 un prélèvement dans la cuve de récupération des eaux blanches, vertes et de ruissellement d'une exploitation agricole de la commune de Bouzancourt. La Figure 7 représente les concentrations mesurées d'acide oxolinique et de fluméquine respectivement de 50 et 130 ng L⁻¹ soit environ dix fois supérieure à celle mesurées dans la rivière au point 12. Les molécules de ciprofloxacine et d'enrofloxacine n'ont pas pu être quantifiées en raison de la complexité de la matrice et une étape supplémentaire de purification est en cours d'expérimentation. Des interférences avec les matrices ont déjà été décrites dans des effluents hospitaliers pour la ciprofloxacine par Lindberg *et al.*, (2004).

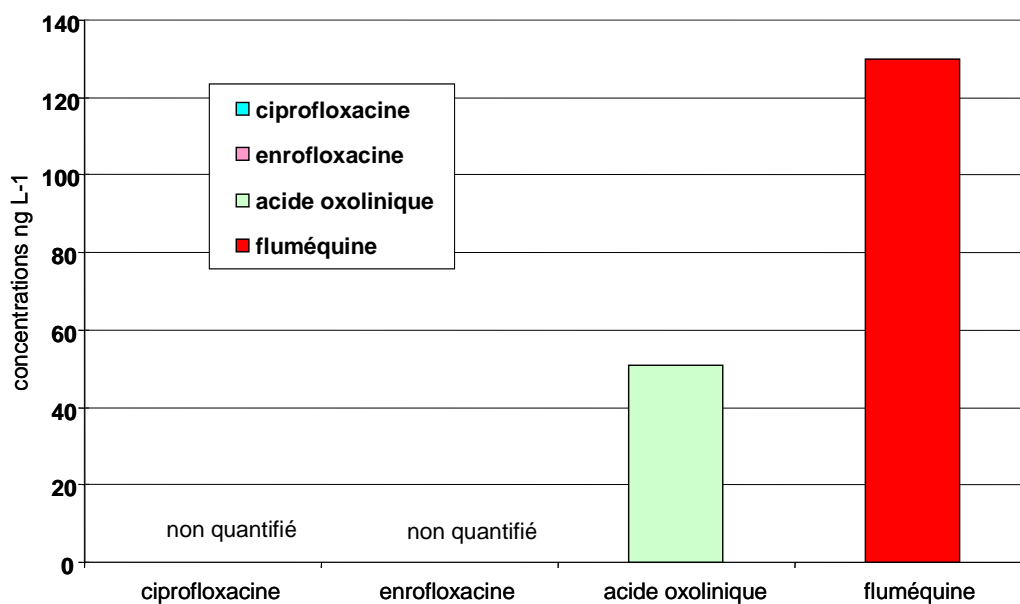


Figure 7 : Concentrations des antibiotiques dans une cuve de récupération des eaux blanches et vertes et de ruissellement d'une exploitation agricole sur le site de la Blaise en mars 2004

Ce résultat indique la possibilité de retrouver les antibiotiques contenus dans ces eaux de récupération des effluents d'élevage après leur épandage sur les sols agricoles. Des études d'accumulation de ces antibiotiques dans les sols, de dégradation chimique, de biodégradation ou de transfert seraient intéressantes pour évaluer les risques réels de la présence de ces antibiotiques dans l'environnement.

3.2. L'axe fluvial de la Seine

Nous avons prélevé des échantillons d'eau de la Seine à Paris au niveau de la Faculté de Jussieu. Les deux prélèvements d'octobre 2004 ont montré que les trois molécules d'antibiotiques utilisés en médecine humaine (la ciprofloxacine, l'acide oxolinique et la fluméquine) étaient retrouvées à des concentrations de 1 à 40 ng L⁻¹. Le débit de la Seine lors de ces deux prélèvements était un débit d'étiage (environ 150 m³/s). En décembre 2004, nous avons fait trois prélèvements. Le premier, le 16 décembre, jour où le débit de la Seine était similaire à celui d'octobre, nous avons mesuré des concentrations de ciprofloxacine et d'acide oxolinique identiques (9 et 38 ng L⁻¹ respectivement) mais nous n'avons pas retrouvé de fluméquine. Le second prélèvement a été fait avec un débit atteignant 429 m³/s et nous avons observé une concentration d'acide oxolinique deux fois plus élevée (87 ng L⁻¹). Puis, le troisième prélèvement fait le 27 décembre a montré des concentrations d'acide oxolinique qui étaient revenues à celles observées en octobre et début décembre, alors que le débit de la Seine était encore à un niveau relativement élevé de 411 m³/s (Figure 8).

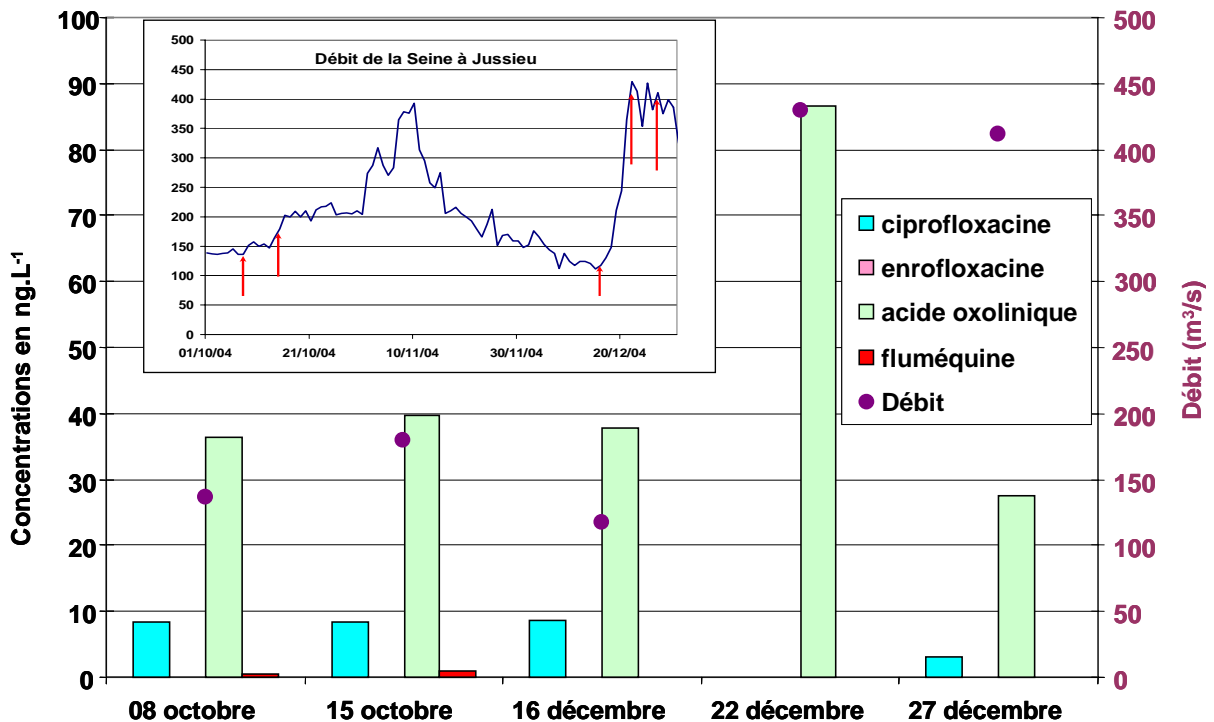


Figure 8: Evolution des concentrations d'antibiotiques dans des échantillons d'eau prélevés dans la Seine à Paris (devant la Faculté de Jussieu) pendant des périodes de faible et de plus haut débit de la Seine.

Ces premières données sont le résultat des dosages des échantillons d'eau préalablement filtrée. Pour expliquer l'augmentation des concentrations d'acide oxolinique parallèlement à l'augmentation du débit de la Seine, il serait intéressant de réaliser les dosages sur les matières en suspension pour savoir s'il s'agit d'une remise en suspension des molécules adsorbées et/ou d'un apport supplémentaire d'antibiotiques par lessivage ou surverse d'eaux usées.

4. Conclusion et perspectives

Ce travail constitue une première étape dans le bilan de la contamination des eaux superficielles par les antibiotiques. Il devrait contribuer à définir les sources, cibler les rejets et suivre le devenir de ces molécules dans les écosystèmes aquatiques. L'effet de l'exposition des microorganismes des milieux naturels aux antibiotiques peut-il faire évoluer les populations bactériennes de l'environnement et contribuer à l'augmentation du nombre de souches résistantes aux antibiotiques observées en médecine humaine et en médecine vétérinaire. Pour essayer de répondre à ces questions, nous poursuivrons les campagnes de prélèvements sur le site atelier de la Blaise au niveau des effluents d'élevage et du réseau hydrographique. Il serait intéressant également d'étudier le transfert de ces antibiotiques dans les eaux superficielles et les rechercher en particulier dans les effluents d'hôpitaux ainsi qu'en entrée et en sortie des stations d'épuration.

5. Bibliographie

- Backhaus T., Scholze M., Grimme L.H. (2000). The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquatic toxicology*, **49**: 49-61.
- Carballa M., Omil F., Lema J.M., Llompart M., Garcia-Jares C., Rodriguez I., Gomez M., Ternes T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*, **38**: 2918-2926.
- Férant F. (2003). Relation entre les pratiques d'élevage et la qualité de l'eau. Etude pilote sur le bassin de la Blaise. Mémoire de stage de diplôme d'études approfondies de Science et techniques de l'Environnement, Maître de stage : Josette Garnier.
- Giger W., Alder A.C., Golet E.M., Kohler H.E., McArdeall C.S., Molnar E., Siegrist H., Suter M. (2003). Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. *Chimia*, **57**: 485-491.
- Golet E., Strehler A., Alder A., Giger W. (2002). Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Analytical Chemistry*, **74**: 5455-5462.
- Guillemot D., Maugendre P., Chauvin C., Sermet C. (2004). Consommation des antibiotiques en France. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, n°32-33 : 144-147.
- Halling-Sorensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Lutzhoft H.C., Jorgensen S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. *Chemosphere*, **36**: 357-393.
- Hamscher G., Sczesny S., Hoper H., Nau H. (2002). Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **74**: 1509-1518.
- Hirsch R., Ternes Th.A., Haberer K., Kratz K.L., (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, **225**: 109-118.
- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and others organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, **36**: 1202-1211.
- Kümmerer K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**:5-7.
- Lindberg R., Wennberg P., Johansson M., Tysklind M. (2003). Screening of antibiotics substances in sewage water and sludge in Sweden. ENVIRPHARMA European Conference, Lyon- France, 14-16 avril.
- Lindberg R., Jarnheimer P.A., Olsen B., Johansson M., Tysklind M. (2004). Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere*, **57**: 1479-1488.
- Thorsten C., Schneider R.J., Färber H.A., Skutlarek D., Goldbach H.E. (2003). Determination of antibiotic residues in manure, soil and surface waters. *Acta hydrochimica and hydrobiologica*, **31**: 36-44.
- Tolls J. (2001). Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils : A review. *Environmental Science and Technology*, **35**: 3397-3406.