HAL
open science

Devenir dans l'environnement dulçaquicole de l'oxytétracycline, l'acide oxolinique et la fluméquine, antibiotiques utilisés en thérapeutique piscicole

Raphaël Delépée

To cite this version:

Raphaël Delépée. Devenir dans l'environnement dulçaquicole de l'oxytétracycline, l'acide oxolinique et la fluméquine, antibiotiques utilisés en thérapeutique piscicole. Autre. Université de Nantes, 2003. Français. NNT : . tel-00353666

HAL Id: tel-00353666

https://theses.hal.science/tel-00353666v1

Submitted on 16 Jan 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Devenir dans l'environnement dulçaquicole de l'oxytétracycline, l'acide oxolinique et la fluméquine, antibiotiques utilisés en thérapeutique piscicole

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : Chimie Biologie
Spécialité : Chimie Environnementale

présentée
et soutenue publiquement par

Raphaël Delépée

le 05 février 2003, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :	Pr. P. Vasseur	Université de Metz
	Dr G. Remaud	Laboratoire Merck
Examinateurs :	Dr. G. Monod	INRA de Rennes
	Pr. H. Le Bris	INRA – Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes
	Pr. N. Naulet	Université de Nantes
Invité :	Dr. R. Lallemant	Université de Nantes
Directeur de thèse :	Dr. H. Pouliquen	INRA – Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

La sagesse de la Terre
est une complicité totale
entre l'homme et son environnement
Pierre-Jakez Hélias

Remerciements

Les travaux exposés dans ce mémoire ont été réalisés au sein de l'Unité Mixte de Recherche INRA–ENVN « Chimiothérapie Aquacole et Environnement» , sous la direction de Monsieur Hervé Le Bris.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur Hervé Pouliquen pour m'avoir confié ce travail. Je le remercie pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées dans l'orientation des travaux.

Je remercie

Madame Paule Vasseur et Monsieur Gérald Remaud, qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail.

Messieurs Richard Lallemeant, Hervé Le Bris, Gilles Monod et Norbert Naulet pour avoir accepté de faire partie du jury.

Je tiens à remercier Messieurs Bernard Méchin, Gilles Monod, Hervé Le Bris et Hervé Pouliquen pour leurs conseils éclairés lors des comités de Thèse.

L'Unité Mixte de Recherche INRA–ENVN « Chimiothérapie Aquacole et Environnement» est en partie hébergée au sein de l'Unité de Pharmacologie–Toxicologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes dirigée par Monsieur Marc Gogny. Je le remercie de m'avoir accueilli pendant ces années.

Je remercie sincèrement Françoise Armand, Agnès Bouju-Albert, Daniel Chauvet, Nathalie De la Cotte, Claire Donnay-Moreno, Marie-Line Morvan et Michaëlle Verdier-Larhantec pour leur assistance technique sans laquelle tout ce travail n'aurait pu être réalisé.

Je remercie Etienne Giraud et Chantal Thorin pour leur disponibilité et leurs précieux conseils.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements envers tout le personnel du LABERCA et particulièrement Jean-Philippe Antignac, Bruno Le Bizec et Daniel Maume pour leurs compétences et leur aide en spectrométrie de masse.

Mes remerciements vont également à Monsieur Jacques Haury pour son aide concer-

nant la partie bryophytes, à Monsieur Joël Aubin pour son accueil à la SEMII, à Monsieur Xavier Bourrain pour ses conseils sur les transferts de mousses et à Monsieur Geoffrey Williams pour ses pertinentes remarques lors de la rédaction des articles et du résumé en anglais.

Je tiens également à remercier Monsieur Louis Pinault pour sa grande disponibilité et son aide bienveillante.

Je remercie sincèrement Stéphanie Gaillard, Samuel Guillou et Elodie Ferrer pour avoir mis leurs compétences au service de ce travail au cours des stages qu'ils ont effectués.

Je tiens à remercier tous ceux qui d'une manière ou d'une autre ont participé à ce travail. Ils sont trop nombreux pour être tous cités mais qu'ils soient assurés qu'ils n'ont pas été oubliés.

Je tiens enfin exprimer toute ma reconnaissance et mon affection à mes proches, ma famille et mes amis pour leur aide et leur soutien au cours de ces années.

Table des matières

Introduction **xix**

Partie I L'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline : propriétés, utilisations et devenir dans l'environnement **1**

1 Introduction **3**

2 Structures et propriétés physico-chimiques **3**

2.1 Structures 3

2.2 Caractéristiques et propriétés physiques 5

2.3 Propriétés chimiques 6

2.3.1 Caractère acido-basique 6

2.3.2 Propriétés chélatrices 6

3 Activité antibactérienne **8**

3.1 Spectres d'activité 8

3.2 Relation structure activité 9

3.3 Mécanisme d'action 9

3.3.1 Acide oxolinique et fluméquine 9

3.3.2 Oxytétracycline 11

3.4 Résistances bactériennes dans l'environnement 12

3.4.1 Acide oxolinique et fluméquine 13

3.4.2 Oxytétracycline 14

3.4.3 Importance dans l'environnement dulçaquicole 15

4 Pharmacocinétique chez le poisson **16**
4.1 Résorption 16
4.2 Distribution 17
4.3 Biotransformations 18
4.4 Elimination 18

5 Toxicité **19**

6 Utilisation **20**
6.1 Thérapeutique animale 21
6.1.1 Piscicole 21
6.1.2 Non piscicole 21
6.2 Thérapeutique humaine 22
6.3 Autres utilisations 22
6.3.1 Traitement des plantes 22
6.3.2 Détermination de l'âge des espèces aquatiques 23

7 Devenir dans l'environnement **23**
7.1 Sources de contamination 24
7.2 Persistance dans l'eau 25
7.3 Persistance dans les sédiments 26
7.4 Persistance dans la faune et la flore sauvage 26

8 Conclusion **27**

Partie II Méthodes analytiques **29**

1 Revue des méthodes d'extraction et de purification des antibiotiques **31**

1.1 Extraction 31
1.2 Purification 34

2 Revue des méthodes de séparation et de détection des antibiotiques **34**

2.1 Méthodes microbiologiques 34
2.2 Chromatographie sur couche mince 35

2.2.1 Séparation 35
2.2.2 Détection 36
2.3 Chromatographie en phase gazeuse 36
2.4 Chromatographie liquide haute performance 37
2.4.1 Séparation 37
2.4.2 Détection 38
2.5 Electrophorèse capillaire 39

3 Protocole de validation 39
3.1 Spécificité et sélectivité 39
3.2 Fonction de réponse et linéarité des résultats 39
3.2.1 Préparation des échantillons des gammes de calibration 39
3.2.2 Résultats et analyse des résultats 40
3.3 Justesse 41
3.3.1 Préparation des échantillons 41
3.3.2 Résultats et analyse des résultats 41
3.4 Fidélité 42
3.4.1 Préparation des échantillons 42
3.4.2 Résultats et analyse des résultats 42
3.5 Rendement d'extraction 42
3.5.1 Préparation des échantillons 42
3.5.2 Résultats et analyse des résultats 43
3.6 Limites de détection et de quantification inférieur 43
3.6.1 Préparation des échantillons 43
3.6.2 Résultats et analyse des résultats 43

4 Méthodes de dosage de l'acide oxolinique et de la fluméquine 44
4.1 Méthode de dosage de l'acide oxolinique et de la fluméquine dans l'eau 44
4.2 Méthode de dosage de l'acide oxolinique et de la fluméquine dans les bryophytes 44
4.2.1 Matériels et méthodes 44
4.2.2 Résultats et discussion 47
4.3 Méthode de dosage de l'acide oxolinique et de la fluméquine dans les sédiments dulçaquicoles 49
4.3.1 Matériels et méthodes 49

4.3.2 Résultats et discussion 51

5 Méthodes de dosage de l'oxytétracycline 54

5.1 Méthode de dosage de l'oxytétracycline dans l'eau 54

5.2 Méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les bryophytes 54

5.2.1 Matériels et méthodes 54

5.2.2 Résultats et discussion 57

5.3 Méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les sédiments dulçaquicoles 64

5.3.1 Matériels et méthodes 64

5.3.2 Résultats et discussions 67

6 Conclusion 71

Partie III Etude expérimentale du devenir de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline en milieu dulçaquicole 75

1 Devenir dans l'eau 77

1.1 Photostabilité et hydrolyse 77

1.1.1 Matériels et méthodes 77

1.1.2 Résultats et discussion 80

1.2 Biodégradation 85

1.2.1 Matériels et méthodes 85

1.2.2 Résultats et discussion 88

1.3 Conclusion 91

2 Devenir dans les sédiments 92

2.1 Objectifs et enjeux 92

2.2 Stratégie 92

2.3 Caractéristiques des sédiments et de l'eau 93

2.4 Matériels et méthodes 94

2.4.1 Caractéristiques du milieu 94

2.4.2 Protocole expérimental 94

2.4.3 Essais préliminaires 95

2.4.4 Effet des caractéristiques de l'eau 96

2.4.5 Effets des caractéristiques sédimentaires 98
2.5 Résultats et discussion 101
2.5.1 Essais préliminaires 101
2.5.2 Essais d'adsorption 101
2.5.3 Essais de dégradation 111
2.5.4 Essais de désorption 118
2.6 Conclusion et perspectives 125

3 Bioaccumulation par un organisme benthique 126
3.1 Objectifs et enjeux 126
3.2 Choix du bioaccumulateur 126
3.2.1 Caractéristiques d'un bioaccumulateur idéal 126
3.2.2 Choix d'un bioaccumulateur, *a priori* 127
3.2.3 Choix de l'espèce bioaccumulatrice, *a priori* 130
3.3 Matériels et méthodes 131
3.3.1 Essais préliminaires : Evolution du rapport chlorophylle a sur phéophytine en réponse à un stress environnemental 131
3.3.2 Protocole d'étude des cinétiques de bioaccumulation et de décontamination 132
3.3.3 Protocole d'étude du mécanisme d'accumulation 135
3.4 Résultats et discussion 137
3.4.1 Essais préliminaires : évolution du rapport chlorophylle a sur phéophytine en réponse à un stress environnemental 137
3.4.2 Protocole d'étude des cinétiques de bioaccumulation et de décontamination 141
3.4.3 Protocole d'étude du mécanisme d'accumulation 151
3.5 Conclusion 153

Partie IV Etudes de terrain sur l'Elorn 155

1 Site d'étude 157
1.1 Présentation du fleuve 157
1.2 Activités humaines 157
1.2.1 Activités économiques 157

1.2.2 Activités de loisirs 158
1.2.3 Traitement de l'eau 158

2 Surveillance passive : utilisation d'échantillons autochtones 158
2.1 Objectif 159
2.2 Matériels et méthodes 159
2.2.1 Stations d'étude 159
2.2.2 Périodes de prélèvement 161
2.2.3 Echantillonnage 161
2.3 Résultats et discussion 163
2.3.1 Analyse des données brutes 163
2.3.2 Analyse en composantes principales et analyse des correspondances multiples 169
2.4 Conclusion 176

3 Surveillance active : technique des transferts de mousses 177
3.1 Objectif 178
3.2 Matériels et méthodes 178
3.2.1 Récolte des mousses 178
3.2.2 Sacs d'exposition 179
3.2.3 Technique de transfert 179
3.2.4 Période de transfert 179
3.2.5 Stations d'étude 179
3.2.6 Préparation des fontinales 180
3.3 Résultats et discussion 180
3.4 Conclusion 183

Conclusion 185

Glossaire 189

Bibliographie 195

Annexes 221

Liste des tableaux

1 *Longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la fluméquine, de l'acide oxolinique et de l'oxytétracycline* 6

2 *Solvants utilisés pour l'extraction des quinolones.* 33

3 *Principales phases stationnaires utilisées pour le dosage des quinolones et des tétracyclines.* 37

4 *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de l'acide oxolinique dans les bryophytes.* 48

5 *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de l'acide oxolinique dans les sédiments dulçaquicoles.* 52

6 *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de la fluméquine dans les sédiments dulçaquicoles.* 53

7 *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les bryophytes.* 57

8 *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les sédiments dulçaquicoles de type vase sableuse.* . . 66

9 *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les sédiments dulçaquicoles de type vase.* 67

10 *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les sédiments dulçaquicoles de type sable.* 68

11 *Tableau de synthèse des tests de Cochran d'homogénéité des variances des résidus de linéarité lors des validations des méthodes de dosage de l'oxytétracycline.* 71

12 *Caractéristiques chimiques de l'eau de la Chézine.* 77

13 *Caractéristiques chimiques de l'eau de mer reconstituée.* 78

14 *Matrice d'expériences du plan 2^3 de stabilité des antibiotiques dans l'eau ultra-pure.* . . . 79
15 *Matrice des effets du plan 2^3 de stabilité des antibiotiques dans l'eau ultra-pure.* . . . 81
16 *Résultats de l'étude de linéarité pour l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline.* . . . 82
17 *Paramètres de régression calculés pour les isothermes de photodégradation.* 82
18 *Tableau de synthèse des vitesses de dégradation en condition abiotiques.* . . . 83
19 *Tableau de synthèse des temps de demi-vie de dégradation en condition abiotiques.* . . . 83
20 *Flacons nécessaires à l'étude de biodégradation.* . . . 87
21 *Résultats des essais de biodégradation.* . . . 89

22 *Matrice d'expériences et matrice des effets de l'eau sur le coefficient de partage entre l'eau et le sédiment.* . . . 97
23 *Matrice d'expériences et matrice des effets des sédiments sur le coefficient de partage entre l'eau et le sédiment (plan 2^{7-4}).* . . . 99
24 *Matrice d'expériences et matrice des effets des sédiments sur le coefficient de partage entre l'eau et le sédiment (plan 2^3).* . . . 100
25 *Matrice des effets du plan 2^{5-2} des caractéristiques de l'eau sur l'adsorption des antibiotiques sur les sédiments.* . . . 102
26 *Matrice des effets du plan 2^{7-4} des caractéristiques sédimentaires sur l'adsorption des antibiotiques sur les sédiments.* . . . 106
27 *Matrice des effets du plan 2^3 des caractéristiques sédimentaires sur l'adsorption des antibiotiques sur les sédiments. Plan à partir d'un sable.* . . . 107
28 *Matrice des effets du plan 2^3 des caractéristiques sédimentaires sur l'adsorption des antibiotiques sur les sédiments. Plan à partir d'un sable. Cas particulier où les acides humiques remplacent la matière organique.* . . . 109
29 *Tableau récapitulatif des essais d'adsorption.* . . . 110
30 *Matrice des effets du plan 2^{5-2} des caractéristiques de l'eau sur la dégradation des antibiotiques dans les sédiments.* . . . 112
31 *Matrice des effets du plan 2^{7-4} des caractéristiques sédimentaires sur la dégradation des antibiotiques dans les sédiments. Plan à partir d'une vase.* 114
32 *Matrice des effets du plan 2^3 des caractéristiques sédimentaires sur la dégradation des antibiotiques dans les sédiments. Plan à partir d'un sable.* . . . 115
33 *Matrice des effets du plan 2^3 des caractéristiques sédimentaires sur la dégradation des antibiotiques dans les sédiments. Plan à partir d'un sable. Cas particulier où les acides humiques remplacent la matière organique.* . . . 117

34 *Tableau récapitulatif des essais de dégradation.* 118
35 *Matrice des effets du plan 2^{5-2} des caractéristiques de l'eau sur la désorption des antibiotiques dans les sédiments.* 119
36 *Matrice des effets du plan 2^{7-4} des caractéristiques sédimentaires sur la désorption des antibiotiques des sédiments. Plan à partir d'une vase.* 121
37 *Matrice des effets du plan 2^3 des caractéristiques sédimentaires sur la désorption des antibiotiques des sédiments. Plan à partir d'un sable.* 122
38 *Matrice des effets du plan 2^3 des caractéristiques sédimentaires sur la désorption des antibiotiques des sédiments. Plan à partir d'un sable. Cas particulier où les acides humiques remplacent la matière organique.* 123
39 *Tableau récapitulatif des essais de désorption.* 124

40 *Répartition des quatorze bacs pour l'étude du mécanisme d'accumulation des antibiotiques par* Fontinalis antipyretica. 136
41 *Facteurs de bioaccumulation calculés au jour 10 de l'expérimentation.* . . . 148
42 *Niveaux d'ionisation et coefficients de partage octanol/eau k_{ow} de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline.* 148
43 *Facteurs de bioaccumulation (FBA) des métaux par* Fontinalis antipyretica. 148
44 *Clairance et temps moyen de résidence calculés sur les trois derniers jours de l'expérimentation.* 151
45 *Temps moyens de résidences (TMR) obtenus dans la littérature.* 151
46 *Facteurs de bioaccumulation calculés au jour 10 du protocole d'étude du mécanisme d'accumulation.* 154

47 *Caractéristiques des stations d'étude de l'Elorn* 160
48 *Corrélation entre la concentration et les autres variables continues utilisées pour l'analyse en composantes principales.* 174

49 *Gradient de solvant utilisé lors de la méthode de dosage de l'aniline dans l'eau.* 228

50 *Végétaux prélevés sur l'Elorn.* 238
51 *Sédiments prélevés sur l'Elorn.* 239

Liste des figures

1 *Structure de l'acide oxolinique.* 4

2 *Structure de la fluméquine.* 4

3 *Structure de l'oxytétracycline.* 5

4 *Conséquences pratiques de la réactivité chimique de l'acide oxolinique et de la fluméquine.* 7

5 *Conséquences pratiques de la réactivité chimique de l'oxytétracycline.* . . . 7

6 *Action antibactérienne de l'acide oxolinique et de la fluméquine.* 10

7 *Action antibactérienne de l'oxytétracycline.* 12

8 *Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.* 14

9 *Voies possibles de contamination de l'environnement dulçaquicole par les antibiotiques à usage vétérinaire.* 24

10 *Spectres UV de quelques caroténoïdes.* 32

11 *Structure de quelques caroténoïdes.* 32

12 *Chromatogrammes de* Fontinalis antipyretica *non supplémentées en acide oxolinique et en fluméquine et supplémentées en acide nalidixique à 125 ng/g, supplémentées à 100 ng/g en acide oxolinique et fluméquine et 125 ng/g en acide nalidixique.* 47

13 *Chromatogrammes de sédiments non supplémentés en acide oxolinique et en fluméquine, supplémentés à 100 ng/g en acide oxolinique et fluméquine.* 51

14 Réaction de dérivation pré-colonne de l'oxytétracycline. 60

15 *Chromatogrammes d'un échantillon non supplémenté de* Fontinalis antipyretica *; d'un échantillon de* Fontinalis antipyretica *supplémenté avec respectivement 1 et 5 µg/g d'oxytétracycline et de tétracycline.* 63

16 *Chromatogrammes d'un échantillon de vase supplémenté à 500 ng/g en tétracycline et non supplémenté en oxytétracycline ; d'un échantillon de vase supplémenté avec respectivement 250 et 500 ng/g d'oxytétracycline et de tétracycline.* 69
17 *Rendements d'extraction de la méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les différents types de sédiments dulçaquicoles.* 70

18 *Graphiques de normalité des résidus des ajustements lors des essais de linéarité des validations des méthodes de dosage de l'oxytétracycline dans* Fontinalis antipyretica*, les sédiments dulçaquicoles de type vase sableuse, vase et sable.* 72

19 *Produits de dégradation de la tétracycline.* 84
20 *Biodégradation de a) l'aniline (ANI) ; b) l'acide oxolinique (AO) ; c) la fluméquine (FLU) et d) l'oxytétracycline (OTC).* 88
21 *Modèle de biodégradation d'une molécule organique.* 90

22 *Action bactéricide de $HgCl_2$ sur les bactéries aérobies cultivables d'une vase dulçaquicole.* 103
23 *Détermination du temps d'équilibre d'adsorption de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline sur une vase dulçaquicole.* 104

24 *Morphologie de Fontinalis antipyretica.* 130
25 *Dispositif expérimental pour l'exposition des fontinales lors de l'étude de bioaccumulation.* 133
26 *Disposition des bacs pendant l'étude de bioaccumulation.* 134
27 *Dispositif expérimental pour l'exposition des fontinales lors de l'étude de bioaccumulation.* 135
28 *Disposition des bacs pendant l'étude du mécanisme de bioaccumulation.* . . 136
29 *Influence de la congélation sur le rapport chlorophylle a sur phéophytine.* . 137
30 *Evolution de l'activité photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse.* 139
31 *Evolution du bilan carboné de plantes en fonction de la lumière en conditions de faible éclairement.* 140
32 *Evolution du rapport chlorophylle a sur phéophytine en fonction du temps pour différentes températures de l'eau.* 140
33 *Evolution du rapport chlorophylle a sur phéophytine en fonction du temps pour différentes valeurs du pH de l'eau.* 141
34 *Evolution de la concentration d'acide oxolinique dans* Fontinalis antipyretica *pendant l'expérimentation.* 143

35 *Evolution de la concentration de fluméquine dans* Fontinalis antipyretica *pendant l'expérimentation.* 144
36 *Evolution de la concentration d'oxytétracycline dans* Fontinalis antipyretica *pendant l'expérimentation.* 145
37 *Hypothèse de mécanisme d'accumulation de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline par* Fontinalis antipyretica. 146
38 *Courbes obtenues par le modèle d'accumulation.* 147
39 *Courbes obtenues par le modèle de décontamination.* 150
40 *Evolution de la concentration d'acide oxolinique dans* Fontinalis antipyretica *pendant l'expérimentation visant à déterminer le mécanisme d'accumulation.* 152
41 *Evolution de la concentration de fluméquine dans* Fontinalis antipyretica *pendant l'expérimentation visant à déterminer le mécanisme d'accumulation.* 153
42 *Evolution de la concentration d'oxytétracycline dans* Fontinalis antipyretica *pendant l'expérimentation visant à déterminer le mécanisme d'accumulation.* 154

43 *Localisation des stations d'étude sur l'Elorn* 161
44 *Profil longitudinal de la concentration en acide oxolinique des sédiments prélevés le long de l'Elorn* 164
45 *Profil longitudinal de la concentration en acide oxolinique des bryophytes prélevés le long de l'Elorn* 164
46 *Profil longitudinal de la concentration en fluméquine des sédiments prélevés le long de l'Elorn* 165
47 *Profil longitudinal de la concentration en fluméquine des bryophytes prélevés le long de l'Elorn* 165
48 *Profil longitudinal de la concentration en oxytétracycline des sédiments prélevés le long de l'Elorn* 167
49 *Profil longitudinal de la concentration en oxytétracycline des bryophytes prélevés le long de l'Elorn* 167
50 *Différences de concentration en acide oxolinique, fluméquine et oxytétracycline des échantillons prélevés en amont et en aval des stations d'étude* . . 168
51 *Représentation graphique du plan 1–2 de l'analyse factorielle des correspondances multiples pour l'acide oxolinique.* 171
52 *Représentation graphique du plan 1–2 de l'analyse factorielle des correspondances multiples pour la fluméquine.* 172
53 *Représentation graphique du plan 1–2 de l'analyse factorielle des correspondances multiples pour l'oxytétracycline.* 173

54 *Représentation graphique des variables continues sur le plan 1–2 de l'analyse en correspondances principales.* 175
55 *Représentation graphique des variables continues sur le plan 1–4 de l'analyse en correspondances principales.* 176
56 *Représentation graphique des modalités illustratives sur le plan 1–4 de l'analyse en correspondances principales.* 177

57 *Concentration en acide oxolinique des bryophytes utilisés dans le protocole de surveillance active.* 181
58 *Concentration en fluméquine des bryophytes utilisés dans le protocole de surveillance active.* 182
59 *Concentration en oxytétracycline des bryophytes utilisés dans le protocole de surveillance active.* 183

60 *Schéma d'intégration de la qualité dans une étude.* 223

61 *Chromatogrammes d'un échantillon d'eau ne contenant ni d'aniline ni de benzylamine.* 229
62 *Chromatogrammes d'un échantillon d'eau contenant 500 ng/mL d'aniline et de benzylamine.* 229

63 *Structure d'un caroténoïde.* 232
64 *Structure de la chlorophylle a. La phéophytine a correspond à la même structure sans l'atome de magnésium.* 233
65 *Schéma en zigzag du transport photosynthétique des électrons, de l'eau au NADP ; les systèmes rédox sont ordonnés selon leur potentiel.* 234
66 *Modèle représentant la structure de la membrane thylakoïdale, avec les éléments participant au transport photosynthétique des électrons, les complexes membranaires, y compris les systèmes rédox.* 235

Introduction

Durant la deuxième partie du XXe siècle, les antibiotiques ont révolutionné à la fois les médecines humaine et vétérinaire. La découverte de la pénicilline par Fleming en 1928 est le point de départ de cette révolution thérapeutique mais ce fut la production à grande échelle de cet antibiotique par fermentation dans les années 40 qui amplifia le phénomène. Il semble désormais impossible d'imaginer un monde sans antibiotique. On estime que, grâce à eux, l'espérance de vie de l'Homme a augmenté d'une dizaine d'années.

En élevage, l'utilisation et l'évolution des antibiotiques a permis de parfaire les instruments thérapeutiques pour le traitement des maladies bactériennes digestives, respiratoires et post-natales, mais également de contrôler les épisodes pathologiques et d'optimiser les performances. Ainsi l'adoption des méthodes d'élevage modernes en Europe conduit à la production d'aliments de qualité sanitaire croissante à un prix de plus en plus attractif pour le consommateur. Les antibiotiques jouent ici aussi un rôle. Leur administration prophylactique dans l'aliment ou l'eau prévient le développement d'infections sub-cliniques, ce qui a pour effet de limiter le stress des animaux et permet d'obtenir des performances optimales dans les élevages. En 1997, sur les 10500 t d'antibiotiques consommés en Europe, 48 % étaient à usage vétérinaire.

Cependant, certaines bactéries sont naturellement résistantes aux antibiotiques (les salmonelles sont par exemple résistantes à la pénicilline G), et d'autres développent une résistance au cours du temps sous la pression de sélection des antibiotiques. L'émergence de résistances bactériennes a des conséquences pour la santé humaine et animale, le traitement de certaines infections devenant de plus en plus problématique. L'utilisation souvent abusive des antibiotiques, dénoncée aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, notamment piscicole, contribue à ce processus.

La pisciculture est une activité en plein essor perçue le plus souvent comme une alternative à la surexploitation des ressources halieutiques conduisant à une diminution des stocks de poissons sauvages. De plus, cette activité répond aux attentes du consommateur.

Il est, en effet, aujourd'hui possible de trouver en toute saison des espèces variées de poissons sur les étals. Le consommateur peut acheter à tout moment un produit calibré, de qualité constante et bon marché. Avec l'intensification de la pisciculture, les disponibilités totales de produits aquacoles pour la consommation humaine ont augmenté, passant de 27,6 millions de tonnes en 1961 à plus de 93 millions de tonnes à la fin du XXe siècle. En France, l'aquaculture représente 31 % des poissons produits, 42 % d'entre eux provenant de la pisciculture dulçaquicole (FAO, 2000). La consommation apparente moyenne de poisson est passée d'environ 9 kg par personne et par an au début des années 60 à 16 kg en 1997. Les disponibilités par habitant ont donc pratiquement doublé en 40 ans.

En France, la production piscicole repose presque essentiellement sur l'élevage intensif. Les maladies d'origine bactérienne sont un grave problème dans ce type de production. En effet, la densité élevée d'animaux induit un stress favorisant l'apparition de maladies multiples et la transmission rapide des germes. En dépit d'une utilisation accrue de la vaccination et d'une meilleure surveillance du milieu d'élevage, l'utilisation des antibiotiques est aujourd'hui encore incontournable pour réduire efficacement de façon préventive ou curative les épisodes pathologiques dans les élevages piscicoles.

L'élevage piscicole, par rapport aux élevages terrestres, présente des spécificités quant à ses interactions avec l'environnement, notamment en ce qui concerne les antibiotiques. En effet, généralement administrés sous forme d'aliments médicamenteux, ils sont en contact avec l'eau avant d'atteindre l'animal. On considère que 70 à 80 % des antibiotiques ainsi administrés aux poissons atteignent l'environnement soit directement par la fraction d'aliment non ingérée, soit sous forme d'urine et de fèces (Martinsen et Horsberg, 1995; Elema *et al.*, 1995; Abedini *et al.*, 1998; Poher et Blanc, 1998; Haug et Hals, 2000; Samuelsen *et al.*, 2000).

Les antibiotiques utilisés dans d'autres formes d'élevage atteignent également l'environnement dulçaquicole ; rejetés dans les urines et les fèces, ils contaminent les eaux de surface par lessivage et les eaux souterraines par lixiviation.

L'état des écosystèmes aquatiques continentaux est donc préoccupant, surtout si l'on considère qu'en 1996, 25 médicaments différents étaient identifiés dans l'environnement et que ce chiffre atteignait 68 en 1999 (Ingerslev *et al.*, 2001).

L'acide oxolinique et la fluméquine sont parmi les antibiotiques les plus utilisés en pisciculture. L'oxytétracycline est également très courante en thérapeutique piscicole. La

famille des tétracyclines, dont elle fait partie, représente 66 % de la totalité des antibiotiques utilisés en Europe (FEDESA, 1999).

L'intérêt de l'étude de ces trois antibiotiques dans l'environnement prend donc toute sa mesure dans ce contexte. En effet, peu de données scientifiques existent dans ce domaine. Elles sont parcellaires ou très ponctuelles, rendant difficile toute définition de tendances prédictives nécessaires à la détermination de l'impact écologique de ces molécules. Afin d'obtenir des modèles pertinents du devenir des antibiotiques dans l'environnement, il est nécessaire de mener des études expérimentales validées ultérieurement sur le terrain. Ces deux étapes sont indissociables et la qualité finale du modèle dépend largement des qualités des méthodes analytiques et de l'échantillonnage (Holt *et al.*, 2000).

Pour mener à bien cette étude, la stratégie envisagée a été de décomposer l'environnement dulçaquicole en trois compartiments : l'eau, les sédiments et les organismes benthiques. La démarche propose d'étudier le devenir des molécules dans ces différents compartiments. La pertinence des résultats obtenus est vérifiée par des études *in situ*. Ces dernières doivent également permettre d'évaluer l'ampleur ainsi que les sources d'une éventuelle contamination de l'environnement.

La première partie de ce document est consacrée à une revue des propriétés physiques et chimiques ainsi qu'à l'utilisation et au devenir des trois antibiotiques dans l'environnement.

La deuxième partie concerne les méthodes analytiques mises au point et validées afin de réaliser l'étude.

La troisième partie porte sur les études expérimentales réalisées pour déterminer le devenir de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline dans l'eau, les sédiments et les bryophytes dulçaquicoles.

La dernière partie expose les résultats obtenus par les études de terrain et dresse un état des lieux de la contamination de l'Elorn (Finistère, France) par ces trois antibiotiques.

Première partie

L'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline : propriétés, utilisations et devenir dans l'environnement

1 Introduction

L'acide oxolinique et la fluméquine sont deux antibiotiques de synthèse appartenant à la famille des quinolones. Les quinolones dites de première génération ne possèdent pas d'atome de fluor dans leur formule brute. Les représentants de cette génération sont l'acide nalidixique et l'acide oxolinique, introduits en thérapeutique humaine respectivement en 1962 et 1974. Ils possèdent une activité bactéricide à spectre étroit contre les bactéries à Gram négatif. Les quinolones de deuxième génération possèdent un atome de fluor dans leur formule brute. Le seul représentant de cette génération, la fluméquine, brevetée en 1973, possède une activité bactéricide à spectre large contre les bactéries à Gram positif et négatif.

L'oxytétracycline est un antibactérien naturel de la famille des tétracyclines, isolé en 1948 par Finlay à partir d'échantillons de terre (d'où l'une de ses dénominations commerciales, la Terramycine®). Produite par un champignon inférieur de l'ordre des Actinomyctales (*Streptomyces rimosus*), elle possède une activité bactériostatique à spectre large sur les bactéries à Gram positif et négatif.

2 Structures et propriétés physico-chimiques

2.1 Structures

L'acide oxolinique et la fluméquine, comme toutes les quinolones, sont dérivés de la quinoline.

L'acide oxolinique (figure 1) se caractérise par :
- un noyau aromatique hétérocyclique et une fonction acétal cyclique, le noyau 4-oxo-1,4-dihydroquinoline,
- une fonction cétone en position para de l'azote hétérocyclique,
- une fonction acide carboxylique en position méta de l'azote hétérocyclique.

La fluméquine (figure 2) se caractérise par :
- un atome de fluor en position 6,
- une fonction cétone en position para de l'azote hétérocyclique,
- une fonction acide carboxylique en position méta de l'azote hétérocyclique.

Dans le cas de la fluméquine, la fonction acétal cyclique a disparu mais le grou-

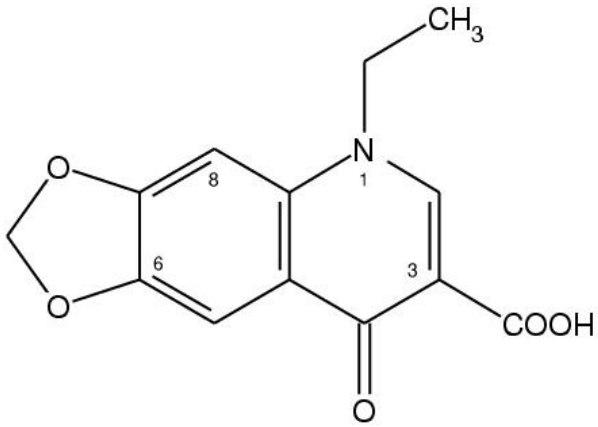


FIG. 1 – *Structure de l'acide oxolinique.*

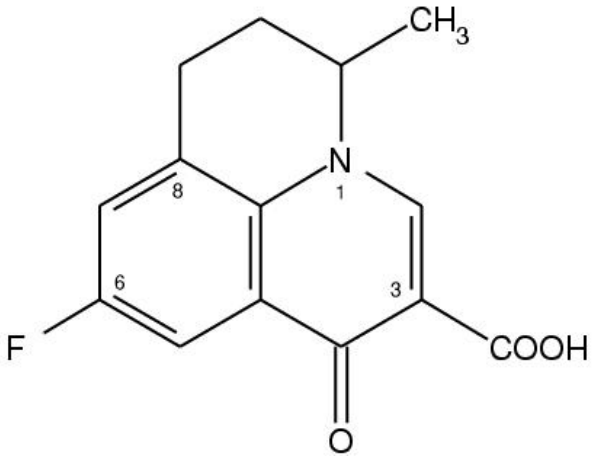


FIG. 2 – *Structure de la fluméquine.*

pement éthyl de l'azote hétérocyclique est replacé par un groupement propyl formant en positions 2 et 3 un cycle avec l'azote de l'hétérocycle et le carbone en β de cette position.

L'oxytétracycline (figure 3) se caractérise par :

- un squelette de base dérivé du naphtacène qui résulte de la condensation en ligne de quatre cycles insaturés à six chaînons,
- une structure très oxygénée comportant notamment :
  - un noyau phénol,
  - un enchaînement β-dicétophénolique, structure à doubles liaisons conjuguées comprenant un hydroxyle phénolique et énolique et 2 fonctions cétones,
  - un hydroxyle énolique,
- une fonction amine tertiaire basique (groupement diméthylamine),
- une fonction carboxamide.

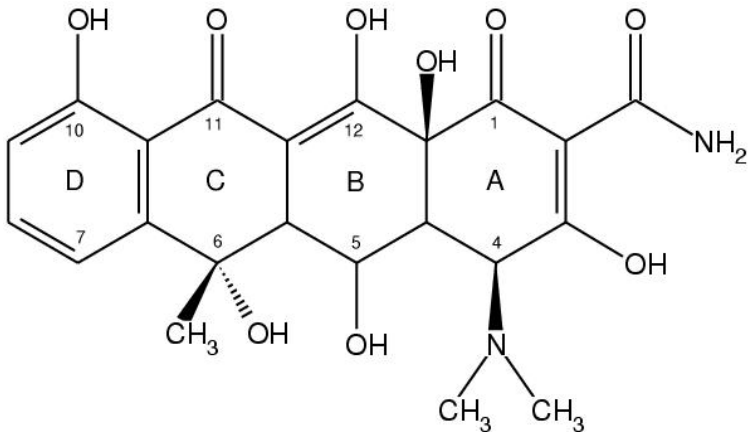


FIG. 3 – *Structure de l'oxytétracycline.*

2.2 Caractéristiques et propriétés physiques

L'acide oxolinique et la fluméquine se présentent sous la forme de poudres cristallines blanches. L'acide oxolinique a une masse molaire de 261,2 g et un point de fusion de 313 °C. La fluméquine possède également une masse molaire de 261,2 g et un point de fusion de 254 °C. Sous leur forme non ionisée, ils sont insolubles dans les solutions aqueuses mais solubles dans les solvants organiques. Sous leur forme ionisée, ils sont, par contre, solubles dans l'eau, peu solubles dans l'alcool et très peu solubles dans les solvants apolaires.

L'oxytétracycline est une poudre cristalline jaune de masse molaire 460,4 g et de point de fusion 182 °C. Sous sa forme non ionisée, elle est peu soluble dans l'eau. Sous sa forme ionisée, elle est soluble dans l'eau et les alcools mais insoluble dans les solvants organiques.

La présence de plusieurs carbones asymétriques confère à l'oxytétracycline une action sur la lumière polarisée. Le pouvoir rotatoire spécifique de l'oxytétracycline est de -196 ° dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 0,1 mol/L.

La présence de plusieurs systèmes de doubles liaisons conjuguées explique l'absorption de ces trois molécules à des longueurs d'onde situées dans l'ultraviolet et le visible, avec un maximum, dans la soude 0,1 mol/L, aux alentours de 355 nm pour l'oxytétracycline, de 235 nm pour la fluméquine et de 260 nm pour l'acide oxolinique. Ces doubles liaisons confèrent à l'acide oxolinique, à la fluméquine et à l'oxytétracycline une fluorescence (tableau 1).

TAB. 1 – *Longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la fluméquine, de l'acide oxolinique et de l'oxytétracycline dans un mélange d'acétonitrile et d'acide perchlorique 0.02 mol/L (24 :76, v/v).*

	FLU	AO	OTC
Excitation	325 nm	335 nm	430 nm
Emission	363 nm	385 nm	503 nm

2.3 Propriétés chimiques

2.3.1 Caractère acido-basique

L'acide oxolinique et la fluméquine possèdent une fonction acide carboxylique dont les pKa sont respectivement de 6,9 et 7,7. Cette fonction acide a des conséquences très importantes, à la fois galéniques, pharmacocinétiques et toxicologiques. Elle permet notamment la préparation de sels de sodium facilement dissociables, donc hydrosolubles.

La présence d'un groupement diméthylamine en position 4 est à l'origine du caractère basique de l'oxytétracycline. Par contre, les fonctions cétones et alcools induisent une acidité faible. L'oxytétracycline possède donc trois pKa à 3,3 (fonction énolique, carboxamide et cétone du cycle A), 7,3 (enchaînement dicétophénolique) et 9,1 (groupement diméthyamine). En milieu aqueux ou polaire, l'oxytétracycline manifeste un caractère amphotère. Le point isoélectrique se situe à un pH de 5,0.

La salification de la fonction amine tertiaire permet la préparation de sels tels que les chlorhydrates. Ces sels sont facilement dissociables donc hydrosolubles. Les solutions de ces sels sont acides et facilement hydrolysables, les rendant ainsi instables.

2.3.2 Propriétés chélatrices

Le goupement acide carboxylique ainsi que la fonction cétone en position 4, opposée à l'atome d'azote hétérocyclique et portée par une structure aromatique plane, sont responsables des propriétés chélatrices de l'acide oxolinique et de la fluméquine avec les cations divalents de calcium, magnésium, fer, zinc ou cuivre (Turel, 2002). Les quinolones sont capables de fixer un cation divalent pour deux molécules.

L'enchaînement β-dicétophénolique en positions 11 et 12 ainsi que le groupe énol-carboxamide en positions 1, 2 et 3 du cycle A expliquent les propriétés chélatrices de

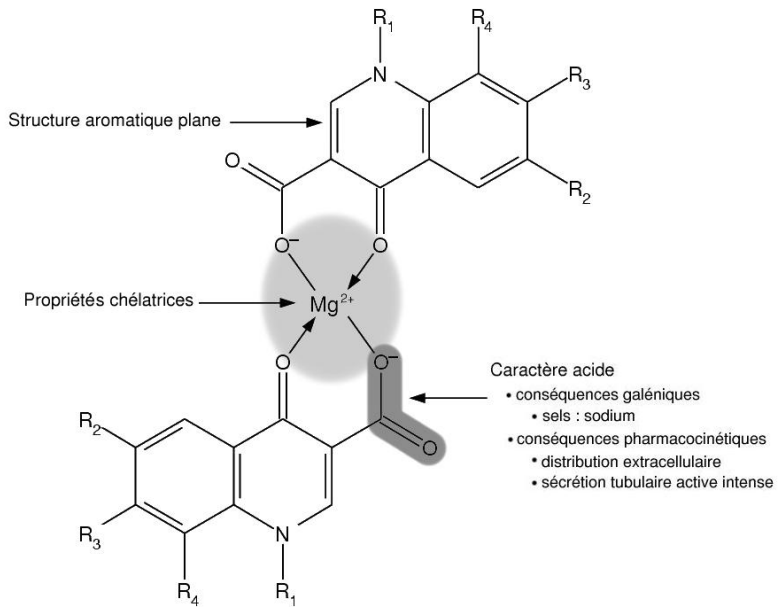


FIG. 4 – *Conséquences pratiques de la réactivité chimique de l'acide oxolinique et de la fluméquine.*

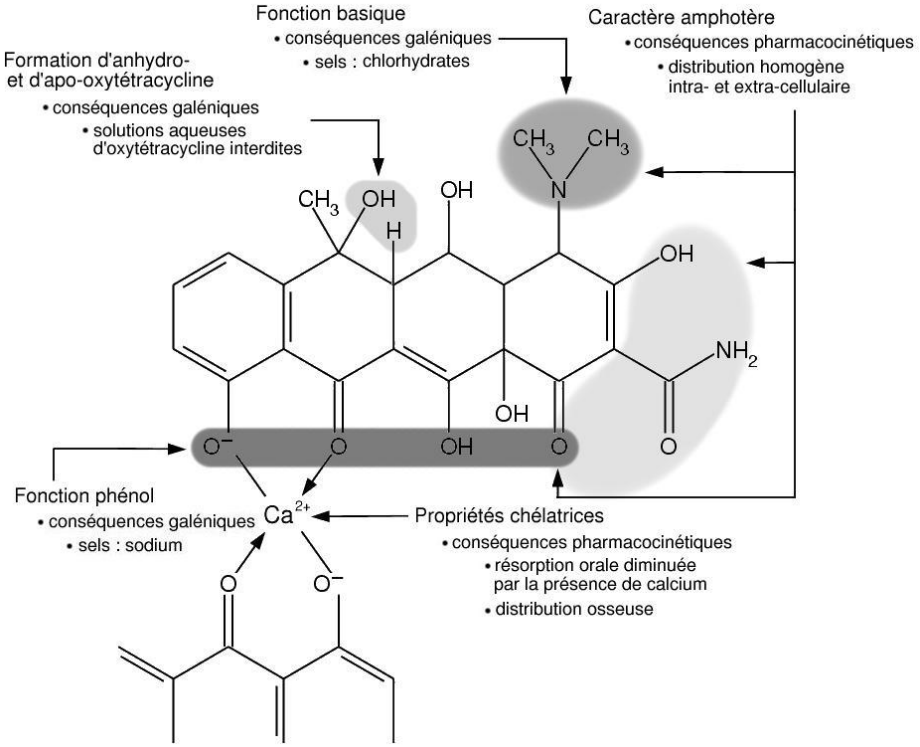


FIG. 5 – *Conséquences pratiques de la réactivité chimique de l'oxytétracycline.*

l'oxytétracycline (Chopra *et al.*, 1992). Cette molécule est en effet capable de fixer un cation divalent ou trivalent de calcium, magnésium, fer, aluminium, cuivre, cobalt ou zinc par molécule (Albert, 1953; Albert et Rees, 1956; Andrejak *et al.*, 1988). Par ailleurs, ces mêmes cations participent à la formation de complexes entre les macromolécules et les tétracyclines (Kohn, 1961). Elles expliquent également son affinité pour le calcium osseux et dentaire et certains aspects de sa toxicité chez les Mammifères.

Les principales propriétés chimiques de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline et leurs conséquences pratiques sont résumées sur les figures 4 et 5.

3 Activité antibactérienne

3.1 Spectres d'activité

L'acide oxolinique possède un spectre d'activité étroit dirigé contre les bactéries à Gram négatif, en particulier les entérobactéries.

L'activité antibactérienne de la fluméquine est élargie aux bactéries à Gram positif. Les bactéries anaérobies à Gram positif (*Clostridium*) et négatif (*Bacteroïdes*) sont naturellement résistantes à toutes les quinolones, de même que les streptocoques y sont très peu sensibles. L'acide oxolinique et la fluméquine sont également inactifs sur les mycoplasmes.

L'oxytétracycline possède un spectre d'activité large étendu des bactéries à Gram positif à celles à Gram négatif. Elle est également active sur les bactéries anaérobies, les mycoplasmes, les rickettsies, les *Chlamydiae* et les leptospires. Elle possède enfin une activité sur les amibes, les coccidies ainsi que sur *Histomonas*.

Chez les animaux aquacoles, ces trois antibiotiques sont utilisés contre les bactéries pathogènes à Gram négatif des genres *Aeromonas, Edwardsiella, Yersinia, Vibrio, Pseudomonas, Flexibacter, Cytophaga, Flavobacterium, Haemophilus*. L'oxytétracycline est également active contre quelques bactéries pathogènes à Gram positif des genres *Renibacterium, Streptococcus* et *Clostridium* (Snieszko *et al.*, 1951; Rodgers et Austin, 1983; Bowser et House, 1990; Lewin et Hastings, 1990; Bell et Lightner, 1992; Martinsen *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1992).

Par ailleurs, l'activité antibactérienne de l'oxytétracycline contre *Aeromonas salmoni-*

cida, Vibrio salmonicida, Vibrio anguillarum et *Yersinia ruckeri* est, *in vitro*, deux à huit fois plus faible à 4 °C qu'à 15 °C. A l'inverse, celle de l'acide oxolinique contre *Aeromonas salmonicida* et *Vibrio salmonicida* est, *in vitro*, deux à trois fois plus faible à 15 °C qu'à 4 °C (Martinsen *et al.*, 1992).

3.2 Relation structure activité

Le pharmacophore des quinolones est une 4-oxo-3-carboxylpyridine à laquelle est lié un cycle à six atomes. L'hydrogène en position 2, la fonction acide carboxylique en position 3 et l'oxygène exocyclique en position 4 sont à l'origine de la faculté de liaison des quinolones avec l'ADN gyrase. Le cycle fermant les positions 1 et 8 ne semble pas améliorer de façon significative l'activité de la fluméquine. La présence d'un atome de fluor en position 6 confère à la fluméquine une activité contre les bactéries à Gram positif (Appelbaum et Hunter, 2000).

Le pharmacophore des tétracyclines est composé de l'enchaînement à plat des quatre cycles à six chaînons, de la configuration stéréochimique α des carbones 4a et 12a (jonction des cycles A et B), de la fonction diméthylamine en position 4 et de la conservation de l'enchaînement dicéto-énolique (carbones 11, 12 et 12a) à proximité du cycle phénolique D. Les cycles A et D sont inchangés pour toutes les tétracyclines à l'exception de l'introduction d'un atome de chlore sur le cycle D. Des modifications des cycles B, C et D sont possibles pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques tant que l'enchaînement céto-énolique est conservé. Des études ont montré que la fonction carboxamide est responsable de l'accumulation de l'oxytétracycline dans les cellules bactériennes (Chopra et Roberts, 2001).

3.3 Mécanisme d'action

3.3.1 Acide oxolinique et fluméquine

Le mécanisme d'action de l'acide oxolinique et de la fluméquine suit le même schéma. Après avoir traversé la paroi bactérienne par les porines, ces quinolones agissent sur deux cibles, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (figure 6). Ces deux topoisomérases de type II[1] sont nécessaires à la réplication de l'ADN ; l'ADN gyrase est responsable du surenroulement des chaînes d'ADN assurant la compaction du matériel génétique. La topoisomérase IV agit en décaténant les doubles brins d'ADN circulaires issus de la

[1]Topoisomérases de type II car ces enzymes coupent l'ADN sur les deux brins.

réplication du chromosome et des plasmides. La topoisomérase IV est l'enzyme la plus sensible pour les bactéries à Gram négatif alors que c'est l'ADN gyrase qui est la plus sensible chez celles à Gram positif. Habituellement l'enzyme la plus sensible représente la cible primaire de l'antibactérien et le fait que ces mécanismes aient été étudiés initialement chez une bactérie à Gram positif (*Escherichia coli*) explique que seule l'ADN gyrase ait été historiquement considérée comme la cible unique des quinolones. L'ADN gyrase et la topoisomérase IV possèdent chacune deux sous-unités appelées GyrA et GyrB pour l'ADN gyrase, et ParC et ParE pour la topoisomérase IV. La structure de GyrA est similaire à celle de ParC et celle de GyrB est similaire à celle de ParE. Les quinolones forment un complexe ternaire quinolone–ADN–ADN gyrase ou topoisomerase IV qui bloquerait la fourche de réplication en empêchant la progression des enzymes le long de l'ADN (Hooper, 2002).

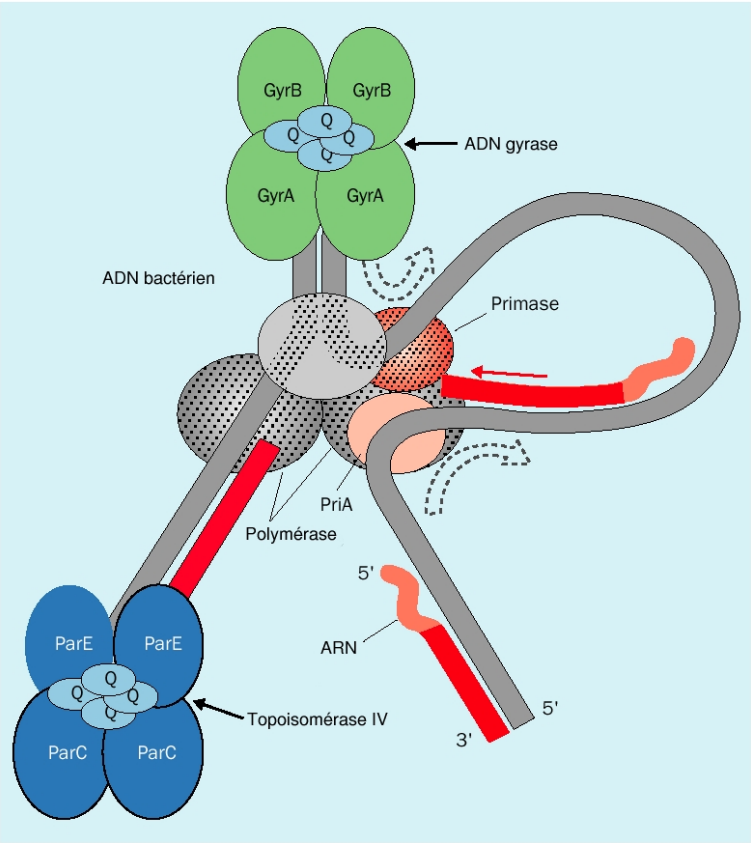


FIG. 6 – *Action antibactérienne de l'acide oxolinique et de la fluméquine (d'après Hooper (2002)).*

Un grand nombre d'hypothèses existe sur le mécanisme d'action bactéricide qui s'ensuit. La plus répandue explique cet effet par l'accumulation de fragments d'ADN

à l'intérieur de la cellule. Les coupures ainsi créées constituent des signaux induisant la production d'exonucléases qui pourraient dégrader l'ADN et être responsables d'un effet bactéricide. Cet effet ne peut donc se manifester que si la synthèse d'ARN et de protéines, consécutive à l'induction, est possible. Ces deux éléments sont donc essentiels à l'activité bactéricide des quinolones.

3.3.2 Oxytétracycline

Il est aujourd'hui largement reconnu que les tétracyclines inhibent la synthèse protéique bactérienne en empêchant l'association de l'aminoacyl-ARNt avec le ribosome bactérien (Chopra *et al.*, 1992). Pour interagir avec sa cible, l'oxytétracycline doit préalablement traverser un ou plusieurs systèmes membranaires dépendant du caractère Gram positif ou Gram négatif de la bactérie.

L'oxytétracycline, sous la forme de complexes cationiques (probablement de calcium ou de magnésium), traverse passivement la membrane externe des bactéries à Gram négatif par les canaux porines OmpF et OmpC. Le complexe cation métallique–oxytétracycline est attiré à travers la membrane externe par le potentiel de Donnan. Il s'accumule ensuite dans le périplasme où il est probalement dissocié pour libérer de l'oxytétracycline non ionisée, molécule faiblement lipophile capable de diffuser à travers la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique (Chopra et Roberts, 2001). De la même façon, la forme non ionisée lipophile est probablement l'espèce transférée à travers la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif. Le passage des tétracyclines à travers la membrane cytoplasmique est actif et dépendant de la différence de pH entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Pour que l'oxytétracycline se chélate, il faut que le pH et la concentration en ions métalliques soient plus élevés à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule (Schnappinger et Hillen, 1996). En fait, il est probable que l'espèce active de l'antibactérien qui se fixe au ribosome soit le complexe métallique d'oxytétracycline. La liaison de l'oxytétracycline avec le ribosome est réversible, ce qui explique l'effet bactériostatique de cet antibiotique (Chopra *et al.*, 1992).

Plusieurs études ont montré un unique site de fixation de haute affinité avec la sous-unité 30S du ribosome (Chopra *et al.*, 1992; Schnappinger et Hillen, 1996) aboutissant à une rigidification de l'ensemble et empêchant la fixation des aminoacyl-t-ARN sur le ribosome (Speer *et al.*, 1992). Il en résulte un blocage de la synthèse protéique par inhibition de sa phase d'élongation (figure 7). La chélation de l'oxytétracycline par les ions magnésium fixés sur les ribosomes ou l'ADN paraît être un phénomène secondaire (Chopra

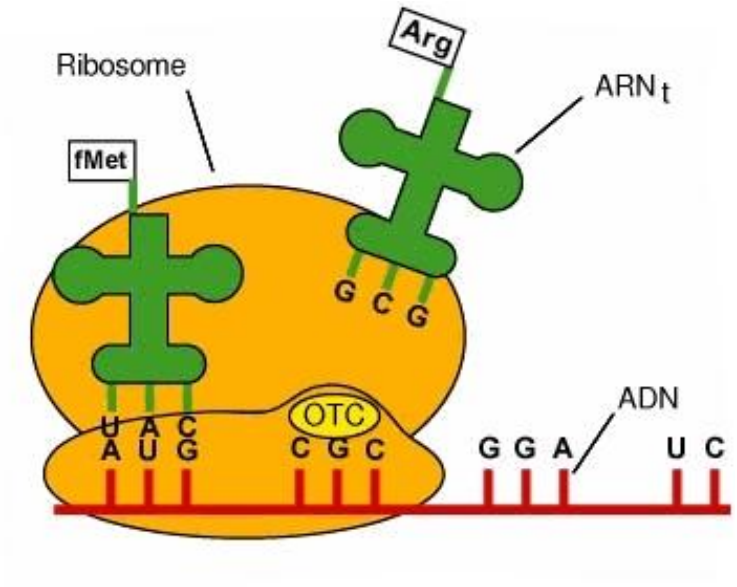


FIG. 7 – *Action antibactérienne de l'oxytétracycline.*

et al., 1992). D'autres cibles ont été proposées sans qu'elles puissent rendre compte de l'effet bactériostatique, en particulier aux concentrations thérapeutiques : sous-unité 16S des ribosomes contrôlant d'autres stades de la synthèse protéique, membranes (altérations), enzymes de la biosynthèse de l'ARN (Rasmussen *et al.*, 1991; Berthe, 1994).

3.4 Résistances bactériennes dans l'environnement

Les résistances bactériennes existent depuis l'introduction des antibiotiques en médecines humaine et vétérinaire. En effet, l'utilisation régulière d'antibiotiques s'accompagne d'une adaptation des bactéries liée à l'acquisition de nouvelles caractéristiques génomiques : modifications par mutation chromosomique ou acquisition de nouveau matériel génétique (Aoki, 1992; Dixon, 1994). La résistance aux antibiotiques remet en cause leur efficacité pour le traitement des maladies animales et humaines et soulève un problème de santé publique (Midtvedt et Lingaas, 1992; Piddock, 1996). En effet, la possibilité de transfert de résistance de l'animal à l'homme est principalement associée à la consommation de chair animale, par transfert de résidus d'antibiotiques et surtout de bactéries résistantes pouvant être pathogènes pour l'homme (Hirsch *et al.*, 1999).

L'antibiorésistance justifie, à lui seul, l'étude fine du devenir de l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline dans l'environnement dulçaquicole. Pour évaluer l'importance de ce problème, il suffit de savoir que dans le milieu des années 50, la majorité des

bactéries était sensible aux tétracyclines (Levy, 1984). Une étude montre que, sur 433 souches différentes d'*Enterobacteriaceae* collectées entre 1917 et 1954, seuls 2 % étaient résistantes aux tétracyclines (Hughes et Datta, 1983). Cette valeur est reconnue comme valeur de base dans un écosystème bactérien sans résistance induite. Des études récentes montrent que dans la rivière Arga, en Espagne, 27,5 % de ces mêmes *Enterobacteriaceae* sont résistantes aux tétracyclines (Goni-Urriza *et al.*, 1999) et qu'au Chili les effluents de salmoniculture peuvent contenir jusqu'à 69 % de bactéries résistantes à l'oxytétracycline (Miranda et Zemelman, 2002).

Classiquement, on distingue deux types d'antibiorésistance :

- L'antibiorésistance intrisèque est commune à toutes les bactéries d'une espèce. Elle est due à la présence de gènes chromosomiques communs à toutes les bactéries d'une même espèce. La résistance intrinsèque peut également être due à des particularités structurales (structure des membranes par exemple).
- Le terme d'antibiorésistance acquise est utilisé pour désigner des processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques. Les résistances acquises sont déterminées par des modifications génétiques, consistant en des mutations sur des gènes déjà présents chez la bactérie (résistance chromosomique), ou en l'acquisition de nouveaux gènes par transfert horizontal d'ADN (le plus souvent par le biais d'un plasmide).

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques sont variés (figure 8). Il peut s'agir d'une inactivation de l'antibactérien par hydrolyse enzymatique, d'une modification de la cible par mutation du gène codant pour la protéine cible, de l'acquisition d'une voie métabolique alternative ou de l'efflux spécifique de l'antibiotique et la protection ribosomale.

3.4.1 Acide oxolinique et fluméquine

La résistance aux quinolones est principalement chromosomique (Lewin, 1992). Cependant de récentes études font cas de résistances plasmidiques de *Klebsiella pneumoniae* aux quinolones (Paterson *et al.*, 2000). Toutefois le mécanisme de résistance de bas niveau acquise par ce plasmide est encore inconnu. Les mutations chromosomiques conférant une résistance aux quinolones peuvent être divisées en deux groupes :

- Les mutations des gènes codant pour les sous-unités de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV (*gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*) (Hooper *et al.*, 1998; Weigel *et al.*, 2002).

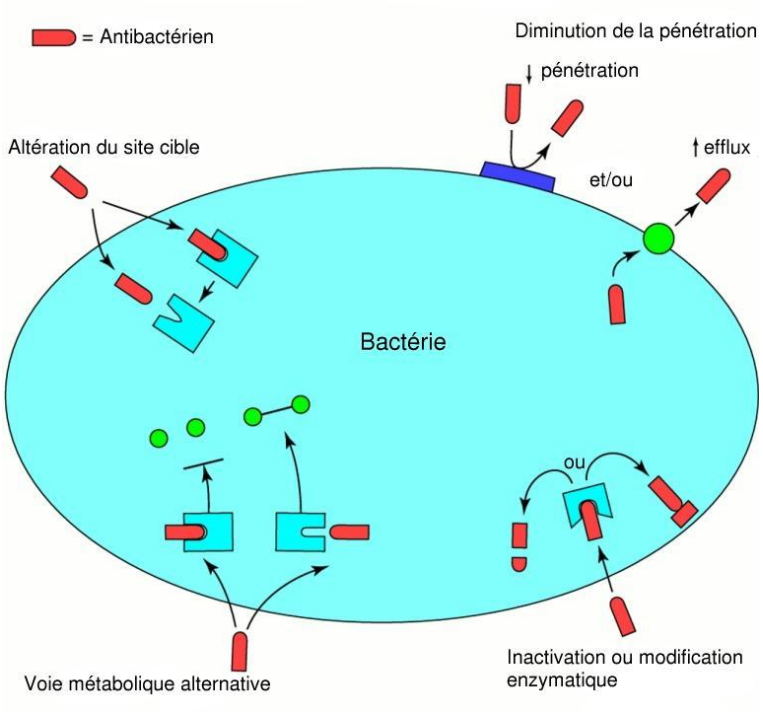


FIG. 8 – *Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.*

Ces mutations modifient le site de liaison des quinolones sur les topoisomérases empêchant ainsi leur fixation ;

– Les mutations réduisant l'accumulation des antibiotiques par

1- la diminution de la vitesse de pénétration par une baisse de l'expression ou une modification des porines,

2- l'augmentation de l'efflux par mutation des gènes régulateurs des systèmes d'efflux endogènes ou par acquisition d'un gène codant pour un nouveau système d'efflux (Piddock *et al.*, 2002). La concentration intracellulaire en antibiotique devient alors insuffisante pour avoir un effet bactéricide.

La mutation d'un seul de ces gènes (*gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*) est suffisante pour induire une résistance élevée à l'acide oxolinique alors que la mutation concomitante des gènes *gyrA* et *parC* est généralement nécessaire pour induire une résistance élevée à la fluméquine (Hooper *et al.*, 1998).

3.4.2 Oxytétracycline

L'oxytétracycline exerce une forte pression sur la flore bactérienne, à l'origine de la sélection de fréquentes résistances. Les gènes sont surtout plasmidiques ou transposables,

plus rarement chromosomiques (Andrejak *et al.*, 1988; Chopra *et al.*, 1992; Speer *et al.*, 1992). Trois mécanismes biochimiques de résistance des bactéries à l'oxytétracycline ont été identifiés (Chopra *et al.*, 1992; Lewin, 1992; Speer *et al.*, 1992; Chopra et Roberts, 2001).

- Dans la plupart des cas, la résistance est due à une excrétion transmembranaire active de l'oxytétracycline après pénétration dans la cellule bactérienne. Cette excrétion est contrôlée par des protéines particulières, les pompes à efflux (Tet-protéines), dont les déterminants sont transmis par des plasmides (Chopra *et al.*, 1992). La concentration intracellulaire en antibiotique devient alors insuffisante pour avoir un effet bactériostatique.
- Chez certaines souches de bactéries à Gram positif, le mécanisme implique une modification de la structure ribosomale empêchant la fixation de l'oxytétracycline (Taylor et Chau, 1996).
- Un dernier gène de résistance aux tétracyclines codant pour une protéine plus petite qu'une protéine d'efflux ou une protéine ribosomale a été décrit (Ridenhour *et al.*, 1996). Le mécanisme de cette résistance est cependant à ce jour encore inconnu.

3.4.3 Importance dans l'environnement dulçaquicole

Le développement de résistances bactériennes dans l'environnement est possible par la pression sélective créée par la présence d'antibiotiques et par la dissémination de gènes de résistances induits (Levy, 1994).

Certaines bactéries résistantes colonisent la microflore intestinale humaine et animale. Elles sont alors susceptibles et de transmettre leurs gènes de résistance, lors d'un contact transitoire, à des bactéries issues d'un autre environnement. Ces réservoirs de résistances communiquent et sont, l'un comme l'autre, susceptibles d'être source de gènes de résistance pour des bactéries pathogènes. Ces transferts de résistances ont été établis entre des bactéries des genres *Vibrio* ou *Pseudomonas* et *Escherichia coli* (Sandaa *et al.*, 1992; Padilla et Vasquez, 1993). La transmission à l'homme et aux animaux a alors lieu via la nourriture ou l'eau (Witte, 2000). Ces transmissions sont vraisemblablement dues à leur contamination par des bactéries fécales (Klare *et al.*, 1995; Witte et Klare, 1995; Pathak *et al.*, 1993; Pandey et Musarrat, 1993).

Les résistances aux tétracyclines ont déjà été identifiées dans de nombreuses espèces bactériennes pathogènes, commensales, environnementales (Roberts, 1996).

La concentration d'antibiotiques présents dans l'environnement est souvent inférieure

aux concentrations minimales inhibitrices. Il a cependant été montré que, pour l'oxytétracycline, de faibles concentrations stimulent le transfert de gènes de résistance (Salyers et Shoemaker, 1996). Des études réalisées sur les bactéries des systèmes environnementaux (lac, rivière, eaux souterraines) montrent que, malgré un nombre de coliformes bien sûr très inférieur à celui d'effluents de stations d'épuration, les bactéries isolées dans ces eaux présentent la même résistance que les coliformes directements isolés dans les égoûts (Cooke, 1976; Joyce *et al.*, 1984; Alvero, 1987; Campeau *et al.*, 1996). C'est-à-dire que 70 % de ces bactéries sont insensibles à au moins un antibiotique (Hirsch *et al.*, 1999). Les résistances à l'acide oxolinique seraient plus fréquentes que celles à l'oxytétracycline en eau douce (Spanggaard *et al.*, 1993). A l'inverse, les résistances à l'acide oxolinique seraient moins fréquentes que celles à l'oxytétracycline en eau de mer (Hansen *et al.*, 1992a). Par ailleurs, une multirésistance à l'oxytétracycline et à l'acide oxolinique a été démontrée chez des bactéries sédimentaires (Nygaard *et al.*, 1992; Spanggaard *et al.*, 1993).

Il a été montré que l'utilisation d'oxytétracycline et d'acide oxolinique en aquaculture est également à l'origine d'une augmentation du nombre de bactéries sédimentaires résistantes à l'un ou l'autre de ces antibiotiques (Austin, 1985; Björklund et Bylund, 1991; Husevag *et al.*, 1991; Hansen *et al.*, 1992b; Samuelsen *et al.*, 1992b; Barker et Alvarez, 1993; Kerry et Smith, 1993; Kerry *et al.*, 1993a,b; Lunestad *et al.*, 1993; Spanggaard *et al.*, 1993; Andersen et Sandaa, 1994; Kerry *et al.*, 1994).

4 Pharmacocinétique chez le poisson

La pharmacocinétique permet de décrire le devenir d'un xénobiotique dans un organisme. Dans le cadre de cette étude, il est utile d'aborder ces phénomènes, notamment la résorption, la distribution, les biotransformations et l'élimination afin d'appréhender la relation entre dose administrée et quantité excrétée dans l'environnement.

4.1 Résorption

La résorption d'un antibiotique est largement dépendante de la voie d'administration utilisée. Chez les poissons adultes, les antibiotiques sont principalement administrés par voie orale sous forme d'aliments médicamenteux. Les alevins et les juvéniles sont plus facilement traités par voie balnéatoire (Scott, 1993).

La résorption orale de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline est faible. La biodisponibilité orale absolue, c'est-à-dire la quantité résorbée au niveau digestif

lors d'une administration orale, est comprise entre 13,6 et 40,0 % pour l'acide oxolinique (Cravedi *et al.*, 1987; Björklund et Bylund, 1991), 40 et 50 % pour la fluméquine (Plakas *et al.*, 2000) et 0,4 et 13 % pour l'oxytétracycline (Elema *et al.*, 1996). L'administration d'acide oxolinique sous forme d'ester de carbitol permet d'améliorer la biodisponibilité de 25 à 71 % (Samuelsen *et al.*, 2000) du fait d'une augmentation de la lipophilie des molécules estérifiées. La différence de lipophilie explique également les meilleures biodisponibilités de la fluméquine et l'acide oxolinique par rapport à l'oxytétracycline. La biodisponibilité de ces molécules chez le poisson est influencée par la dose administrée puisqu'elle augmente généralement lorsque la dose diminue. La concentration en ions magnésium et calcium inflence aussi de façon importante la résorption orale des molécules étudiées. Celle-ci diminue quand la concentration ionique augmente. Ce phénomène a été montré pour l'oxytétracycline (Abedini *et al.*, 1998), l'acide oxolinique et la fluméquine (Hansen *et al.*, 2001).

4.2 Distribution

La distribution de l'acide oxolinique, du fait de ses caractères lipophile et acide, est plutôt extracellulaire et rapide (Hustvedt et Salte, 1991; Björklund *et al.*, 1992). Sa liaison aux protéines plasmatiques est assez faible. Elle n'est que de 39 % chez le saumon atlantique, *Salmo salar* L. (Hustvedt et Salte, 1992) et de 24,8 à 30,6 % chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* (Björklund et Bylund, 1991). Après administration orale, l'acide oxolinique se distribue dans les reins, le foie, le tissu musculaire, le cerveau, la graisse, la peau et l'os (Archimbault *et al.*, 1988; Ueno *et al.*, 1988a,b; Jacobsen, 1989; Ishida, 1990b; Steffenak *et al.*, 1991; Björklund *et al.*, 1992; Rogstad *et al.*, 1993).

La distribution de la fluméquine est plus homogène, davantage extracellulaire qu'intracellulaire (Brown, 1996). Sa liaison aux protéines plasmatiques est plus élevée que celle de l'acide oxolinique. Elle est de 67 à 89 % chez le poisson chat, *Ictalurus punctatus*, et de 30 à 40 % chez l'anguille, *Anguilla anguilla* L. (Boon, 1992). Après administration orale, la fluméquine se distribue dans les reins, le foie, le tissu musculaire, les branchies, les gonades, le mucus, le cerveau, la graisse, la peau et l'os (Plakas *et al.*, 2000).

La distribution de l'oxytétracycline, du fait de ses caractères lipophile et amphotère, est large, complète et homogène, aussi bien extracellulaire qu'intracellulaire. Chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, elle est plus lente et plus dépendante de la température que ne l'est la résorption orale (Björklund et Bylund, 1990). Chez cette espèce, sa liaison

aux protéines plasmatiques varie de 52,2 à 55,1 % (Björklund et Bylund, 1991). L'oxytétracycline se distribue dans les reins, le foie, le tissu musculaire, les branchies, les gonades, le cerveau, la peau, l'os et le mucus (Blasiola *et al.*, 1980; Keck *et al.*, 1984; Grondel *et al.*, 1987; Björklund et Bylund, 1991; Black *et al.*, 1991; Rogstad *et al.*, 1991; Romvary *et al.*, 1991; Wölwer-Rieck *et al.*, 1993).

4.3 Biotransformations

L'acide oxolinique subit quelques biotransformations chez les poissons ; celles-ci se limitent à des hydroxylations et des glucuronoconjugaisons. Deux métabolites d'hydroxylation ont été identifiés chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* : les acides 6-hydroxy-oxolinique et 7-hydroxy-oxolinique (Ishida, 1990c). Trois métabolites de conjugaison ont été identifiés chez plusieurs espèces de téléostéens d'eau douce et de mer : des glucuronoconjugués des acides oxolinique, 7-hydroxy-6-méthoxy-oxolinique et 6-hydroxy-7-méthoxy-oxolinique (Ueno *et al.*, 1988a,b; Ishida, 1990a, 1992).

La fluméquine subit quelques biotransformations ; celles-ci se limitent à des hydroxylations en position 7 et des glucuronoconjugaisons (Harrison *et al.*, 1986; Mevius *et al.*, 1990; Vree *et al.*, 1992). Un conjugué de la taurine a cependant été mis en évidence chez le poisson chat, *Ictalurus punctatus* (Plakas *et al.*, 2000).

L'oxytétracycline subit très peu de biotransformations dans l'organisme, celles-ci se limitant pratiquement à des conjugaisons chez les mammifères. A ce jour, aucun métabolite n'a été mis en évidence chez les poissons.

4.4 Elimination

L'acide oxolinique et la fluméquine sont éliminés rapidement, sous forme inchangée ou non, par les urines et les matières fécales (Ellis, 1991; Björklund *et al.*, 1992; Plakas *et al.*, 2000). Leur demi-vie d'élimination est fonction de l'espèce, de la température, de la salinité de l'eau et de la posologie.

Pour l'acide oxolinique, après administration par voies intravasculaire et orale, la demi-vie d'élimination est comprise respectivement entre 5,1 et 69,7 h et 11,5 et 146,4 h. L'élimination de l'acide oxolinique est plus rapide en eau de mer qu'en eau douce chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, et la sériole, *Plecoglossus altivelis* (Endo *et al.*, 1987b; Ishida, 1990b, 1992). Elle est modifiée par la température et le pH de l'eau. Selon

certains auteurs, elle serait plus rapide à température basse et à pH élevé (Kasuga *et al.*, 1984; Endo *et al.*, 1987a). Selon d'autres, elle serait plus rapide à température élevée (Björklund *et al.*, 1992). Enfin, elle est également plus rapide lorsque les poissons sont exposés à des polychlorobiphényls (Oshima *et al.*, 1994).

Pour la fluméquine, après administration par voies intravasculaire et orale, la demi-vie d'élimination chez le poisson chat est respectivement de 24,6 et 21,8 h. L'élimination de la fluméquine est également plus rapide en eau de mer qu'en eau douce (Plakas *et al.*, 2000). Elle est modifiée par la température et le pH de l'eau. Selon certains auteurs, elle serait plus rapide à température basse et à pH élevé (Plakas *et al.*, 2000). Selon d'autres, elle serait plus rapide à température élevée (Björklund *et al.*, 1992).

Après administration par voies intravasculaire et orale, la demi-vie d'élimination de l'oxytétracycline est comprise respectivement entre 60,3 et 139,8 h et 74,9 et 312,0 h. Cet antibiotique est éliminé lentement sous forme inchangée par les urines et les matières fécales (Björklund et Bylund, 1990; Rogstad *et al.*, 1991; Romvary *et al.*, 1991). Selon Grondel *et al.* (1987, 1989), cette lente élimination pourrait être due, chez la carpe, *Cyprinus carpio L.*, soit à la faible filtration glomérulaire et à l'absence de sécrétion tubulaire, soit à un lent relargage de la molécule à partir des tissus dans lesquels elle est stockée. Chez l'anguille, *Anguilla anguilla* L., l'oxytétracycline pourrait être éliminée par la peau et les branchies du fait du fort développement des réseaux capillaires à ces deux niveaux (Nouws *et al.*, 1993). L'élimination de l'oxytétracycline est donc fonction de l'espèce, mais aussi de la température. Elle est plus rapide à température élevée qu'à basse température. Chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, elle est augmentée de 10 % lors d'une élévation de la température de 1 °C (Salte et Liestol, 1983; Björklund et Bylund, 1990). Par contre, elle est indépendante de la posologie et de l'incorporation ou non d'enzymes protéolytiques dans l'aliment chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* (Keck *et al.*, 1984).

5 Toxicité

L'acide oxolinique présente une faible toxicité par voie orale chez le Poisson. Chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, et la carpe, *Cyprinus carpio*, la dose létale 50 après administration orale unique est supérieure à 4000 mg/kg par voie orale (Endo *et al.*, 1973; Björklund et Bylund, 1991). Chez la sériole, *Seriola quinqueradiata*, l'administration orale d'acide oxolinique à la posologie de 120 mg/kg/j pendant 7 j provoque une légère anémie macrocytaire, une néphrose et une diminution de la charge en lipides

des hépatocytes (Miyazaki *et al.*, 1984). Certaines lésions hépatiques ont été observées chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, après un traitement de 10 j à la dose de 10 mg/kg/j (Moutou *et al.*, 1997). Une étude de toxicité menée sur *Daphnia magna* a montré une toxicité aigüe de l'acide oxolinique. La concentration létale 50 (CL_{50}) chez cette espèce est de 4,6 mg/L après 96 h d'exposition. Par contre, les tests de reproduction ne montrent aucune toxicité chronique (Wollenberger *et al.*, 2000).

Peu de données sont disponibles sur la toxicité de la fluméquine. Outre sa néphrotoxicité chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, après un traitement de 10 j à la dose de 10 mg/kg/j (Moutou *et al.*, 1997), elle présente une CL_{50} de 96 mg/L pour *Artemia* après 96 h. Cette toxicité s'accompagne d'une dépigmentation (Migliore *et al.*, 1997). Elle est également toxique pour une plante aquatique, *Lythrum salicaria* à la concentration de 100 mg/L. Chez cette plante, après 30 j d'exposition, la fluméquine cause une réduction dramatique du développement post-germinatif (Migliore *et al.*, 2000). Cette toxicité a également été montrée après 35 j à des concentrations de 50 μg/L (Migliore *et al.*, 2000).

L'oxytétracycline présente une faible toxicité chez les poissons (Alderman, 1992). Chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, la dose létale 50, après administration orale unique, est supérieure à 4000 mg/kg (Björklund et Bylund, 1991). MacCracken *et al.* (1976) ne rapportent aucune mortalité chez cette espèce après des traitements oraux aux posologies de 750 mg/kg/j pendant 14 j ou de 10500 mg/kg à dose unique. De même, chez la truite de lac, *Salvelinus namaycush*, des concentrations supérieures à celles utilisées pour le traitement ne se sont pas révélées toxiques lorsque l'oxytétracycline est administrée sous forme d'aliment médicamenteux ou en balnéation (Marking *et al.*, 1988). Par contre, lors d'injections d'oxytétracycline par voie intramusculaire ou intrapéritonéale à une posologie supérieure à 165 mg/kg, des effets toxiques apparaissent : décoloration de la peau et hémorragies d'importance variable (Marking *et al.*, 1988). Une étude menée sur *Daphnia magna* n'a montré aucune toxicité aigüe (CL_{50} ≈1000 mg/L), par contre les tests de reproduction montrent une toxicité chronique avec une CE_{50} égale à 46,2 mg/L (Wollenberger *et al.*, 2000).

6 Utilisation

Pour bien comprendre la nécessité d'étudier le devenir des antibiotiques dans l'environnement dulçaquicole, il est nécessaire de mesurer les quantités administrées. Sachant que 90 % des antibiotiques produits dans le monde et destinés aux animaux (27000 t/an)

seraient distribués par l'aliment (Bories et Louisot, 1998) et compte tenu de la faible biodisponibilité orale de l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline, les quantités rejetées dans l'environnement sont assez proches de celles administrées. Connaître leurs indications permet enfin d'appréhender qu'elles peuvent être les sources de contamination.

6.1 Thérapeutique animale

6.1.1 Piscicole

L'oxytétracycline, la fluméquine et l'acide oxolinique sont utilisés en pisciculture d'eau douce et d'eau de mer pour le traitement curatif et préventif des maladies infectieuses provoquées par des germes sensibles à Gram positif et/ou négatif. Ils sont principalement indiqués dans le traitement et la prévention des infections bactériennes, à Gram positif d'une part (yersiniose, aéromonoses, flexibactériose, vibriose), chroniques à Gram négatif d'autre part et enfin à souches atypiques (Rodgers et Austin, 1983; Michel, 1985; Stoskopf, 1988; Barnes *et al.*, 1992).

L'oxytétracycline est utilisée, soit en bain à la posologie de 50 à 100 mg/l pendant 24 h, soit par voie orale à la posologie de 50 à 80 mg/kg/j pendant 7 à 10 j (Michel, 1985; Stoskopf, 1988; Alderman, 1992), soit par voie intramusculaire à la posologie de 10 mg/kg/j (Stoskopf, 1988). L'acide oxolinique et la fluméquine sont utilisés par voie orale à la posologie de 10 à 12 mg/kg/j pendant 7 à 15 j pour l'acide oxolinique et 3 à 5 j pour la fluméquine (Rodgers et Austin, 1983; Michel, 1985; Alderman, 1992).

6.1.2 Non piscicole

L'oxytétracycline, la fluméquine et l'acide oxolinique sont des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire pour les animaux de production terrestres, mais également pour les animaux de compagnie. Selon le syndicat de l'industrie du médicament vétérinaire, sur les 27000 t annuelles d'antibiotiques produits dans le monde et destinés aux animaux, 60 % sont utilisés chez les bovins, 20 % chez les volailles et les lapins, 18 % chez les ruminants autres que les bovins, 1 % chez les poissons et 1 % chez les animaux de compagnie.

L'acide oxolinique est aujourd'hui peu utilisé. Il est prescrit pour quelques infections respiratoires ou digestives chez les veaux, les porcs et les volailles. La posologie de l'acide oxolinique est 15 mg/kg/j pendant 7 j.

La fluméquine trouve également ses indications dans le traitement des infections respiratoires ou digestives. Son action contre les staphylocoques en fait une molécule plus utilisée que l'acide oxolinique. Elle est prescrite aux volailles, lapins, ovins, bovins, caprins, porcins, équins, chiens et chats. La posologie habituelle de la fluméquine chez ces espèces est 12 mg/kg/j pendant 3 à 5 j.

L'oxytétracycline, du fait de son large spectre d'activité, reste l'une des molécules les plus utilisées en antibiothérapie vétérinaire. Elle est largement administrée aux volailles, lapins, ovins, bovins, caprins, porcins, équins, chiens et chats. Ses indications sont nombreuses : infections des voies respiratoires, de l'appareil digestif, du péritoine, du péricarde, de l'endocarde, des méninges et du système nerveux central, infections cutanées, urinaires et génitales, infections mammaires, ophtalmiques et traumatiques, prévention des infections chirurgicales et obstétricales. La posologie habituelle de l'oxytétracycline est 25 mg/kg/j en traitement préventif et 50 mg/g/j en traitement curatif. La durée du traitement est de 3 à 5 j.

Certains antibiotiques ont été utilisés comme promoteurs de croissance depuis les années 50, aux Etats-Unis, puis en Europe. L'oxytétracycline faisait partie de ces molécules. Depuis 1997, les autorités européennes ont décidé de limiter l'autorisation d'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance et depuis septembre 1999, seules trois substances restent autorisées (avilamycine, flavophospholipol et salinomycine).

6.2 Thérapeutique humaine

Chez l'homme, seules la fluméquine et l'oxytétracycline sont aujourd'hui encore utilisées, l'acide oxolinique ayant été retiré de la vente. Ces antibiotiques ont cependant des indications réduites chez l'homme. L'oxytétracycline est utilisée dans le traitement local des infections ophtalmiques, auriculaires ou cutanées. La fluméquine est utilisée dans le traitement général d'infections urinaires. La posologie de la fluméquine est 1,2 g/j pendant 10 j.

6.3 Autres utilisations

6.3.1 Traitement des plantes

Aux Etats-Unis la réglementation autorise l'usage des antibiotiques pour les traitement des plantes. La streptomycine et l'oxytétracycline sont donc utilisées. Afin de

pouvoir être pulvérisés sur la surface feuillue des arbres, les antibiotiques sont mélangés à de l'eau, à des concentrations allant de 50 à 200 mg/L. Environ 1450 kg d'oxytétracycline sont ainsi utilisés pour traiter 8 % des surfaces cultivées de pêches et nectarines contre *Xanthomonas arboricola*, 5800 kg pour traiter 30 % des surfaces cultivées de poires contre *Erwinia amylovora* et 1450 kg pour traiter 5 % des surfaces cultivées de pommes contre *Erwinia amylovora* résistante à la streptomycine (McManus et Stockwell, 2001).

L'oxytétracycline est le seul antibactérien autorisé aux Etats-Unis pour un usage interne chez les plantes. Elle est injectée dans les troncs de palmiers et d'ormes pour traiter des maladies mortelles à phytoplasmes. Les injections d'antibiotiques ne sont, en pratique, utilisées que pour traiter les individus ornementaux de valeur commerciale élevée (McManus et Stockwell, 2001).

En 1999, ces applications concernaient environ 0,1 % des antibiotiques produits aux Etats-Unis (McManus et Stockwell, 2001).

6.3.2 Détermination de l'âge des espèces aquatiques

L'oxytétracycline, comme les autres tétracyclines, est utilisée comme marqueur du squelette en vue de la détermination de l'âge d'un certain nombre d'espèces aquatiques : le voilier, *Istiophorus platypterus*, le makaire indien, *Makaira indica* (Speare, 1992), la morue, *Gadus morhua L.* (Pedersen et Carlsen, 1991), le pagre, *Pagrus auratus* (Francis *et al.*, 1992), la civelle, *Anguilla anguilla L.* (Alcobendas *et al.*, 1991) et l'oursin, *Echinus esculentus L.* (Gage, 1992). Elle sert également de marqueur de la croissance de la coquille de certains bivalves, l'huître, *Crassostrea virginica*, le clam, *Mercenaria mercenaria*, et la moule, *Mytilus edulis* (Dey et Bolton, 1978). Elle est enfin utilisée pour étudier la spiculogénèse chez l'éponge, *Clathrina cerebrum* (Bavestrello *et al.*, 1993).

7 Devenir dans l'environnement

Les premières découvertes de médicaments dans l'environnement aquatique datent des années 70 (Tabak et Brunch, 1970; Norpoth *et al.*, 1973; Garrison *et al.*, 1976). Ces substances ont été détectées dans de nombreux systèmes aquatiques : des rivières comme le Rhin, l'Elbe, le Neckar, le Danube ou le Pô (Ternes, 1998; Klinger et Brauch, 2000; Zuccato *et al.*, 2001), mais aussi des lacs (lac de Constance, lacs Suisses) (Poiger *et al.*, 2001), des nappes phréatiques (Heberer *et al.*, 1995; Scheytt *et al.*, 2000) et des mers comme la mer du Nord et l'Adriatique (Buser *et al.*, 1998; Zuccato *et al.*, 2001; Kummerer, 2001).

7.1 Sources de contamination

En raison de l'utilisation limitée de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline en médecine humaine, seules les sources de contamination de l'environnement à partir de l'usage vétérinaire de ces antibiotiques seront envisagées (figure 9).

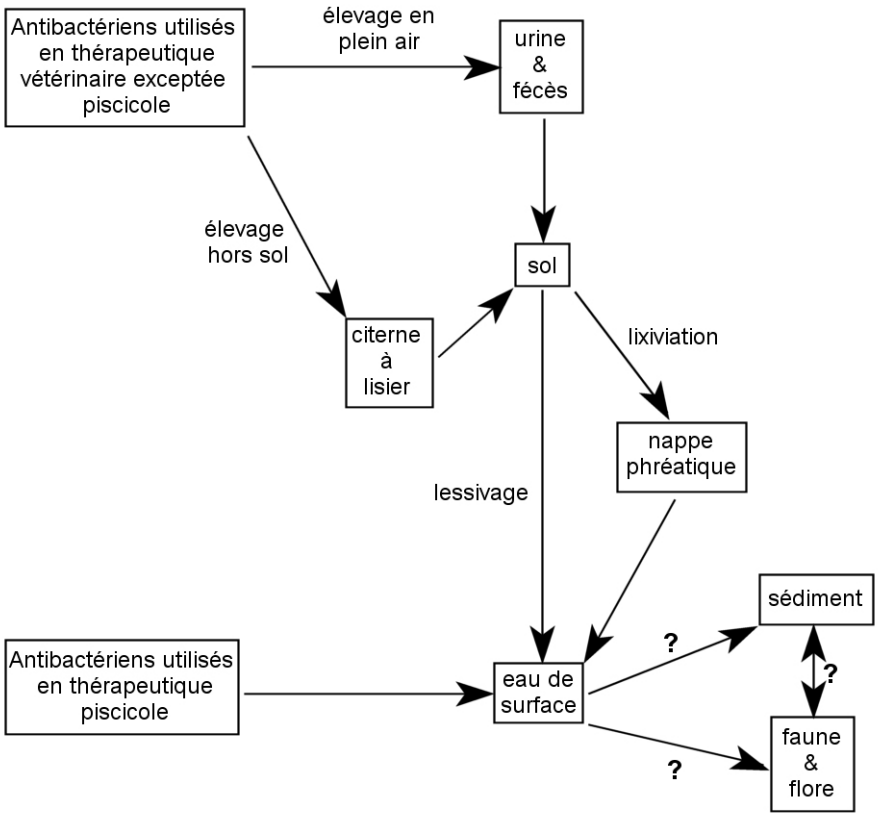


FIG. 9 – *Voies possibles de contamination de l'environnement dulçaquicole par les antibiotiques à usage vétérinaire.*

Les antibiotiques à usage vétérinaire, lorsqu'ils sont administrés à des animaux en élevage intensif, se retrouvent en grande majorité dans le lisier. Celui-ci est stocké en citerne avant d'être épandu et la durée de stockage ainsi que les conditions d'épandage sont fixées réglementairement à l'échelon national. Il a été montré que les tétracyclines ne sont pas dégradées dans le lisier après 120 j de stockage (Winckler et Grafe, 2000). La mobilité des molécules ou de leurs métabolites dans le sol détermine alors leur devenir (Jorgensen et Halling-Sorensen, 2000). Des concentrations de 20 ng/kg de tétracyclines ont ainsi été détectées dans le sol (Hamscher *et al.*, 2000). Elles peuvent alors conta-

miner les eaux de surface par lessivage ou contaminer les eaux souterraines par lixiviation.

Dans le cas où les antibiotiques sont administrés à des animaux au pâturage, les molécules ou leurs métabolites sont alors rejetés directement sur le champ dans les urines et les fèces et suivront le même cheminement que les antibiotiques dispersés avec le lisier. Les quantités rejetées par cette voie de contamination sont cependant moins importantes que les précédentes.

L'aquaculture constitue une source de contamination plus directe de l'environnement. Les antibiotiques sont généralement administrés aux poissons sous forme d'aliments médicamenteux. Ce mode d'administration conduit à ce qu'une grande partie des antibiotiques atteint l'environnement, soit directement car les molécules diffusent dans l'eau à partir de l'aliment non consommé, soit indirectement car les molécules sont faiblement résorbées (cf § 4.1), puis rejetées par les poissons dans les urines et les fèces. Ainsi, 70 à 80 % des antibiotiques administrés sous forme d'aliments médicamenteux en aquaculture atteignent l'environnement (Hektoen *et al.*, 1995).

Dans certains pays, les fabriquants de matières premières sont également responsables de la contamination de l'environnement. En effet, des concentrations de 50 mg d'oxytétracycline par litre d'effluent de station d'épuration ont été retrouvées près d'une usine de production en Chine (Qiting et Xiheng, 1988).

7.2 Persistance dans l'eau

L'oxytétracycline, en solution aqueuse, est susceptible de subir une dégradation rapide. Elle peut donner naissance à la 4-épi-oxytétracycline par suite d'une réaction d'épimérisation à pH compris entre 2 et 6 (MacCormick *et al.*, 1957). Elle peut aussi subir une déshydratation en milieu acide. L'anhydro-oxytétracycline ainsi formée est instable et facilement transformée en α- et β-apo-oxytétracycline (Khan *et al.*, 1987, 1992). La dégradation de l'oxytétracycline est d'autant plus rapide que la lumière naturelle ou artificielle est intense, et que la température est élevée. Des études ont montré que l'oxytétracyline est dégradée très rapidement dans l'eau de mer sous lumière naturelle. La dégradation totale est obtenue en moins de 9 j mais la cinétique de dégradation n'a cependant pas été étudiée (Lunestad *et al.*, 1995). Une étude récente montre que l'oxytétracycline est détectée dans l'eau d'une pisciculture uniquement pendant la période d'administration de l'antibiotique.

Peu de données sont disponibles sur la stabilité des quinolones. Seule la dégradation

en eau de mer a été étudiée (Lunestad *et al.*, 1995). Cette étude montre que l'acide oxolinique serait plus stable que la fluméquine à la lumière naturelle. En effet, après 9 j, 77 % d'acide oxolinique persistent dans l'eau alors que la fluméquine n'est plus détectable.

Le traitement de l'eau par les stations d'épuration a une efficacité limitée sur les antibiotiques. En effet, l'adsorption sur les boues activées est un phénomène faisant intervenir principalement des interactions hydrophobes qui sont limitées pour des molécules polaires comme l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline (Hirsch *et al.*, 1999). Les boues de stations d'épuration peuvent également être épandues sur les champs. Les antibiotiques contenus dans ces boues subissent donc le même sort que ceux contenus dans le lisier.

7.3 Persistance dans les sédiments

Le sédiment est aujourd'hui considéré comme le compartiment dans lequel se concentrent les antibiotiques présents dans l'environnement aquatique. La capacité d'un sédiment à adsorber les antibiotiques dépend de la composition de ce sédiment en terme de granulométrie et de teneur en matière organique. En milieu marin, l'adsorption de l'oxytétracycline sur les sédiments est plus importante que celle de l'acide oxolinique (Pouliquen et Le Bris, 1996). L'oxytétracycline se dégrade à la même vitesse que l'acide oxolinique dans le premier centimètre de sédiment marin avec un temps de demi-vie de 151 j (Hektoen *et al.*, 1995). Cette dégradation, dans les mêmes conditions, est plus rapide pour la fluméquine ($T_{1/2}$=60 j). Ces temps de demi-vie passent à plus de 300 j dans les couches plus profondes du sédiment (5 à 7 cm) (Hektoen *et al.*, 1995).

Une étude récente évalue la concentration minimum dans les sédiments dulçaquicoles ayant un effet sur la flore bactérienne à 0,63 mg/kg pour l'acide oxolinique et à 20 mg/kg pour l'oxytétracycline (O'Reilly et Smith, 2001) malgré que son activité antibactérienne y soit réduite de 15 % (Vaughan *et al.*, 1996).

7.4 Persistance dans la faune et la flore sauvage

Actuellement aucune donnée n'est disponible concernant la contamination de la faune sauvage dulçaquicole par les antibiotiques. Des données sont cependant disponibles en milieu marin. Des études expérimentales avaient montré l'absence de contamination d'huîtres placées dans une eau de mer contenant de l'oxytétracycline ou de la tétracycline (Tibbs *et al.*, 1989; Peterson *et al.*, 1993). Des études plus récentes ont montré que

les huîtres et les moules sont capables d'accumuler des résidus d'antibiotiques (Capone *et al.*, 1996; Pouliquen *et al.*, 1996). L'oxytétracycline persiste plus longtemps que l'acide oxolinique dans les bivalves.

Des études, conduites à proximité d'élevages piscicoles, utilisant de l'oxytétracycline, de l'acide oxolinique ou de la fluméquine ont également mis en évidence des concentrations résiduelles d'antibiotiques dans la chair de poissons sauvages, de crabes ou de moules pendant plusieurs jours après la fin du traitement piscicole (Hansen *et al.*, 1992a; Lunestad, 1992; Samuelsen *et al.*, 1992a, 1993; Ervik *et al.*, 1994; Coyne *et al.*, 1997).

Une étude expérimentale a permis de montrer la capacité d'accumulation de la fluméquine par un macrophyte aquatique, *Lythrum salicaria* (Migliore *et al.*, 2000). La concentration maximale de fluméquine dans la plante est de 65 μg/g de matière sèche pour 100 mg/L dans l'eau. La capacité d'accumulation de cette plante est cependant rapidement restreinte par un effet toxique de la fluméquine.

8 Conclusion

Du fait de leur utilisation courante en aquaculture, l'acide oxolinique, l'oxytétracycline et, dans une moindre mesure, la fluméquine ont été étudiés dans l'environnement. Ces études portent principalement en milieu marin sur l'eau, les sédiments et les bivalves. Les données scientifiques disponibles en milieu dulçaquicoles sont parcellaires ou très ponctuelles rendant impossible une vue intégrative de la contamination de l'environnement par ces antibiotiques. Or, en milieu d'eau douce, les sources de contamination sont multiples et les volumes de dilution sont bien inférieurs à ceux du milieu marin. Il est alors logique de craindre une contamination de l'environnement dulçaquicole. Compte tenu du danger que représentent les résistances bactériennes, il est nécessaire de déterminer quelle est l'importance de cette contamination pour en définir le risque.

L'environnement dulçaquicole peut être divisé en trois compartiments principaux. L'eau est le compartiment par lequel les antibiotiques atteignent l'environnement. Le sédiment est le compartiment considéré comme réservoir dans lequel se concentrent et se dégradent les antibiotiques. La faune et la flore, notamment benthique, constituent le dernier compartiment.

Cette vue globale de la contamination de l'environnement dulçaquicole doit permettre, à terme, de définir des modèles prédictifs. Afin d'obtenir des modèles pertinents, il est

nécessaire de mener des études expérimentales validées ensuite sur le terrain. Ces deux étapes sont indissociables et la qualité finale du modèle dépend largement des qualités des méthodes analytiques et de l'échantillonnage (Holt *et al.*, 2000).

Des méthodes analytiques dans les différentes matrices seront donc mises au point puis validées en tenant compte des propriétés physico-chimiques des molécules. Des études expérimentales visant à étudier le devenir des trois molécules étudiées dans les trois compartiments de l'environnement précéderont des études de terrain.

Deuxième partie

Méthodes analytiques

Les méthodes décrites ont été réalisées en suivant une démarche qualité (annexe A).

1 Revue des méthodes d'extraction et de purification des antibiotiques

1.1 Extraction

A l'instar des ions métalliques, les protéines se chélatent avec les tétracyclines. Il a été montré que les acides concentrés et les agents déprotéinisants acides permettent d'extraire les tétracyclines (Chappell *et al.*, 1986; Nordlander *et al.*, 1987). Cependant, les tétracyclines se décomposent sous leur forme anhydro- en milieu acide (pH<2,0) et s'épimérisent à la chaleur. C'est pourquoi l'extraction est aujourd'hui réalisée par un solvant moyennement acide contenant de l'éthylène-diamino-tétra-acétate disodique (Na_2EDTA) (Oka *et al.*, 2000). Le rendement d'extraction de l'oxytétracycline dans les tissus animaux est alors d'environ 87 % (Oka *et al.*, 1985).

De plus, plusieurs problèmes apparaissent lors du dosage de l'oxytétracycline dans le milieu dulçaquicole. Outre les problèmes habituels que pose cette molécule (manque de sensibilité en détection U.V., problème de sélectivité à 365 nm, ...) de nouveaux problèmes apparaissent dans le milieu dulçaquicole. En effet, les débris organiques (caroténoïdes, acides humiques...) présents dans les matrices sont extraits avec l'oxytétracycline et coéluent avec une forte absorption en UV (figure 10).

Les caroténoïdes interviennent dans les réactions de photosynthèse, principalement dans le photosystème II. Leur couleur varie de jaune à rouge et ils sont constitués d'une chaîne aliphatique formée de 8 unités d'isoprène contenant 40 atomes de carbone (figure 11). Ils sont divisés en carotènes (chaînes aliphatiques insaturées) et xanthophylles (dérivés oxygénés des premiers).

Aucune méthode de dosage d'antibiotiques dans les matrices dulçaquicoles n'est décrite dans la littérature. L'ensemble des méthodes de détermination des tétracyclines dans les sédiments marins a été testé (Martinez et Shimoda, 1988; Koenings *et al.*, 1986; Kitts *et al.*, 1992; Du *et al.*, 1997; Ueno *et al.*, 1989; Carignan *et al.*, 1993; Furusawa, 1999; Ueno et Aoki, 1995; Cooper *et al.*, 1998; Houglum *et al.*, 1998; Agasöster et Rasmussen, 1992; Long *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 1987). Les solvants d'extraction sont aussi divers que l'acide trichloroacétique, le méthanol, l'acide oxalique, le Na_2EDTA, l'acide méthaphosphorique, l'acétonitrile, purs ou en mélange. Aucune

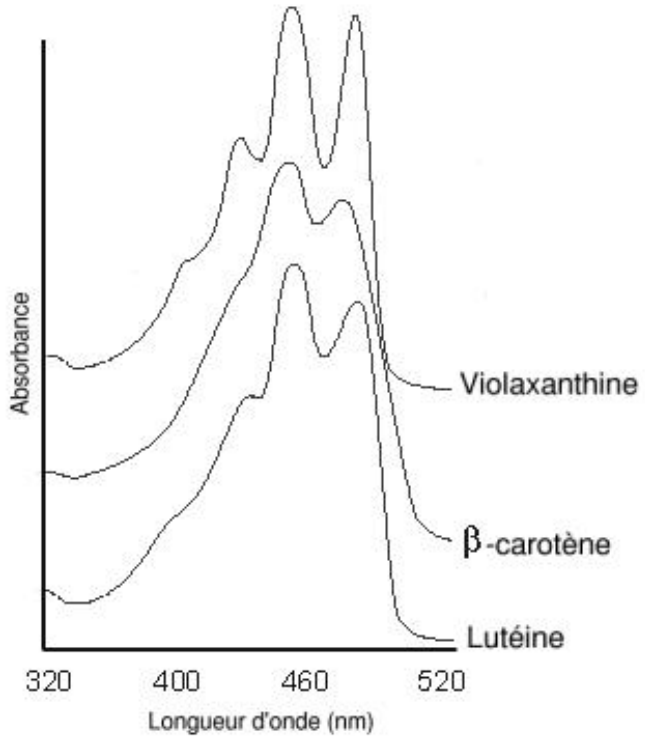


FIG. 10 – *Spectres UV de quelques caroténoïdes.*

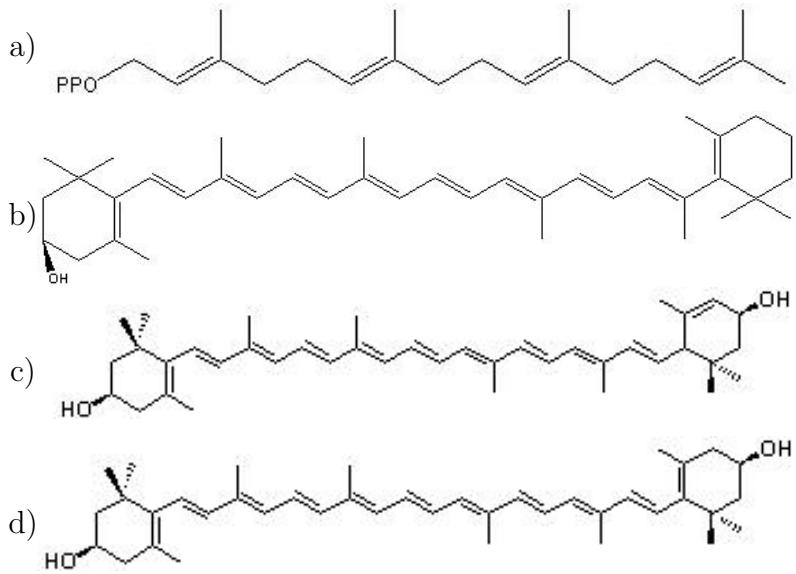


FIG. 11 – *Structure de quelques caroténoïdes (a : géranyl géranyl diphosphate (GGPP), b : β-carotène, c : lutéine, d : zéaxanthine).*

de ces méthodes n'a donné de résultat satisfaisant en terme d'extraction ou de purification.

TAB. 2 – *Solvants utilisés pour l'extraction des quinolones. Les unités sont les proportions d'études utilisant le solvant considéré.*

Solutions acides	**28 %**
de méthanol	15 %
d'acétonitrile	7 %
d'éthanol	5 %
aqueuses	1 %
Solvants non miscibles à l'eau	**24 %**
acétate d'éthyle	16 %
dichlorométhane	6 %
chloroforme	2 %
Solutions basiques	**22 %**
d'acétonitrile	10 %
aqueuses	9 %
d'acétone	2 %
de méthanol	1 %
Solvants miscibles à l'eau	**16 %**
acétone	10 %
acétonitrile	6 %
Autres	**10 %**
pas d'extraction	7 %
dispersion matrice–phase solide	1 %
autre	2 %

Les solvants d'extraction des quinolones décrits dans la littérature sont des solutions acides ou basiques, des solvants miscibles ou non miscibles à l'eau ou une dispersion de phase solide dans la matrice (tableau 2) (Hernandez-Arteseros *et al.*, 2002).

1.2 Purification

L'extraction en phase solide le meilleur moyen de purifier des extraits contenant de l'oxytétracycline. Les cartouches sont le plus souvent des silices greffées de type C_{18}. La combinaison d'une extraction par un tampon MacIlvaine contenant de l'EDTA et d'une purification sur cartouche C_{18} est apparue pour la première fois en 1983 (Oka *et al.*, 1983). Cette méthode est aujourd'hui le standard en matière de purification des tétracyclines.

D'autres méthodes utilisent cependant les propriétés chélatrices de l'oxytétracycline pour la purifier par chromatographie d'affinité métallique (Carson *et al.*, 1998; Croubels *et al.*, 1998).

Dans le cadre de notre étude, des colonnes d'extraction en phase inverse (octyl, octadécyl, nitrile, Oasis HLB®) ont donné de mauvais résultats en terme de purification.

La purification liquide–liquide est choisie dans 34 % des méthodes de dosage des quinolones. La solubilité dans chaque phase est modifiée par une variation de pH. Le chloroforme est le solvant organique le plus utilisé pour la purification liquide–liquide mais certaines méthodes utilisent le dichlorométhane ou l'acétate d'éthyle (Hernandez-Arteseros *et al.*, 2002). La purification en phase solide sur cartouches C_{18}, C_8 ou polystyrène–divinyl benzène est également décrite. Le rendement d'extraction est souvent plus faible lors de la purification sur cartouche que lors d'extraction liquide–liquide.

2 Revue des méthodes de séparation et de détection des antibiotiques

Différentes méthodes existent pour le dosage de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline. Le but ici n'est pas de faire une revue exhaustive des méthodes de dosage des trois antibiotiques étudiés mais, à partir d'exemples précis, d'expliquer les choix faits.

2.1 Méthodes microbiologiques

L'activité antibactérienne de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline peut être utilisée pour déterminer leur concentration. Le principe des méthodes microbiologiques est simple : une culture d'une souche bactérienne est mélangée à une

gélose nutritive en surfusion, laquelle est coulée sur une plaque de verre. Des puits sont réalisés dans l'épaisseur de la gélose prise en masse. Les échantillons contenant l'antibiotique à doser y sont alors déposés. Après un temps d'incubation compris entre 24 et 72 h, une culture bactérienne est visible sur toute la surface de la plaque excepté autour des puits contenant de l'antibiotique. Le diamètre des zones d'inhibition de croissance autour des puits indique la concentration d'antibiotique présente dans l'échantillon, par comparaison à une gamme de référence.

Ces méthodes sont peu onéreuses et simples à mettre en œuvre pour un grand nombre d'échantillons (Nouws *et al.*, 1999b). Elles sont également assez sensibles avec des seuils de détection de respectivement 30 et 150 ng/mL pour l'oxytétracycline et la fluméquine dans le lait (Nouws *et al.*, 1999b) et 125 ng/mL pour l'acide oxolinique dans le plasma de saumon atlantique *Salmo salar* (Giles *et al.*, 1994). Les coefficients de variation de fidélité intermédiaire sont également acceptables avec 6,5 % pour l'oxytétracycline et 9,8 % pour les quinolones (Nouws *et al.*, 1999b).

Ces méthodes sont cependant peu spécifiques. Il est, en effet, impossible de distinguer l'effet dû à la tétracycline de celui dû à l'oxytétracycline. De même, des réactions non-spécifiques provoquant des cercles d'inhibition autour de puits ne contenant pas d'antibiotique, induisent des « faux-positifs » (Nouws *et al.*, 1998, 1999a).

En fait, plus qu'un dosage de l'antibiotique lui-même, c'est une mesure de son activité dans une matrice « naturelle » qui est réalisée.

2.2 Chromatographie sur couche mince

2.2.1 Séparation

Quelques méthodes utilisent la chromatographie sur couche mince pour le dosage de l'oxytétracycline (Oka *et al.*, 2000), de la fluméquine (Choma *et al.*, 1999) et de l'acide oxolinique (Kondo *et al.*, 1994). Les adsorbants peuvent être du kieselguhr (Bossuyt *et al.*, 1976; Gatsonis et Ageloudis, 1982), du gel de silice (Oka *et al.*, 1987; Naidong *et al.*, 1990; Choma *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 1994) ou de la cellulose (Szabo *et al.*, 1978; Omer *et al.*, 1981). Généralement la chromatographie sur couche mince est simple et ne requiert pas d'équipement coûteux. Toutefois, les méthodes décrites dans la littérature nécessitent un temps de préparation prohibitif. Il faut, en effet, supprimer les traces d'éléments métalliques pour éviter toute chélation avec les antibiotiques. Il est ainsi habituel d'ajouter de

l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) pour chélater et donc rendre indisponible les ions métalliques résiduels. Il existe des plaques commerciales de chromatographie sur couche mince mais celles-ci ne permettent pas une bonne résolution chromatographique des tétracyclines (Naidong *et al.*, 1990).

2.2.2 Détection

Plusieurs modes de détection sont possibles après une chromatographie sur couche mince. Une révélation permet de détecter spécifiquement les molécules par changement de couleurs sous rayonnement ultra-violet ou fluorescence à longueur d'onde sélective (Oka *et al.*, 2000). La spectrométrie de masse peut également être utilisée ; la méthode est alors d'une spécificité totale mais nécessite un équipement lourd.

Les limites de détection respectives de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline par chromatographie sur couche mince sont au mieux de 75 ng/mL, 100 ng et 100 ng/mL respectivement (Kondo *et al.*, 1994; Choma *et al.*, 1999; Oka *et al.*, 2000).

2.3 Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est très peu utilisée pour l'analyse de l'oxytétracycline. La présence de nombreux groupements hydroxyles et carbonyles, de fonctions amines et amides et de quatre cycles en ligne confère à la molécule une faible volatilité et une importante thermolabilité. Ce type de molécule nécessite donc une dérivation. Seule l'utilisation de dérivés silylés est décrite dans la littérature (Tsuji et Robertson, 1973; Mineo *et al.*, 1992). Des essais réalisés en 1998 sur les dérivés silylés, acylés et halogénés (Delépée, 1998) n'ont pas donné de résultats satisfaisants.

La chromatographie en phase gazeuse est également peu utilisée pour l'analyse des quinolones. La dérivation utilisée est généralement une décarboxylation par une réduction par le tétrahydroborate de sodium (Takatsuki, 1991, 1992; Pfenning *et al.*, 1996). Cette réduction est une addition de Michael d'un ion hydrure sur les quinolones. Cette dérivation est efficace pour des solutions standards mais délicate à réaliser dans des matrices biologiques complexes.

2.4 Chromatographie liquide haute performance

2.4.1 Séparation

Certains auteurs ont passé en revue les méthodes de dosages des tétracyclines et des quinolones dans les produits alimentaires. Entre les années 70 et aujourd'hui, Oka *et al.* (2000) recensent 120 méthodes utilisant la chromatographie liquide haute performance pour le dosage des tétracyclines et Hernandez-Arteseros *et al.* (2002) en recensent 93 pour le dosage des quinolones. Ces revues permettent de dégager des tendances sur les phases stationnaires utilisées (tableau 3). Les phases inverses en représentent 90 % dans la littérature, avec une majorité écrasante pour les silices greffées par un groupement octadécyle. Dans ces conditions, il est possible de considérer que les colonnes de type C_{18} sont les plus adaptées au dosage de l'oxytétracycline, de la fluméquine et de l'acide oxolinique quelle que soit la matrice.

Tab. 3 – *Principales phases stationnaires utilisées pour le dosage des quinolones et des tétracyclines. Les unités sont les proportions d'études utilisant la phase considérée.*

Phase stationnaire	Quinolones (%)	Tétracyclines (%)
Octadécyle	57	42
Octyle	17	27
Styrène/Divinyl-benzène	15	17
Phényl	6	4
Cyano	0	2,5
Echangeur d'ions	2	2,5
Amine	3	1
Autre	2	4

Les tétracyclines et les quinolones forment des chélates avec les ions métalliques présents dans la phase stationnaire et s'adsorbent sur les sites silanol résiduels (Walsh *et al.*, 1992; Hernandez-Arteseros *et al.*, 2002). La conséquence de ces phénomènes est un pic chromatographique traînant. Pour éviter cette trainée, les acides phosphorique, citrique, tartrique ou éthylène-diamino-tétra-acétique (EDTA) sont utilisés (Oka *et al.*, 2000; Hernandez-Arteseros *et al.*, 2002). L'utilisation d'acide oxalique dans la phase mobile est un moyen d'obtenir des pics chromatographiques symétriques lorsque la phase stationnaire est une silice greffée contenant des impuretés. Les phases récentes de type « end-capped », synthétisées à partir de silices pures à 99,99 %, permettent de s'affranchir

de l'utilisation d'acide oxalique car elles ne contiennent plus de traces d'ions métalliques ni de sites silanols résiduels. D'autres phases stationnaires récentes sont des copolymères de styrène et divinyl-benzène. La préparation de ces phases ne fait pas intervenir de silice, et il n'y a donc plus de sites silanols résiduels dans celles-ci.

Le pH joue un rôle prépondérant dans la séparation chromatographique des tétracyclines. Le pH optimal de la phase mobile pour ces molécules est situé à 2,0 (Oka *et al.*, 2000). Un tel pH provoque une hydrolyse acide du greffage du groupement octadécyle sur la silice. Afin de conserver la phase stationnaire dans un état satisfaisant, il est nécessaire de remonter quotidiennement le pH (Bryan et Stewart, 1993) en rinçant la colonne par un mélange d'acétonitrile et d'eau par exemple.

2.4.2 Détection

La spectrométrie UV-visible est le mode de détection habituel des tétracyclines. Sur les 120 méthodes listées par Oka *et al.* (2000), 103 utilisent un détecteur UV-visible. La fluorescence naturelle des tétracyclines n'autorise pas une limite de détection suffisamment faible. La chélation des tétracyclines avec des ions magnésium, calcium ou zirconium est utilisée pour améliorer les capacités de fluorescence des tétracyclines (Oka *et al.*, 2000). Cette chélation permet d'améliorer la sensibilité de 50 à 100 fois. Une dégradation alcaline permet également d'augmenter la fluorescence des tétracyclines (Oka *et al.*, 2000). Grâce aux progrès effectués dans le couplage chromatographie liquide–spectrométrie de masse, des méthodes récentes ont recours à la spectrométrie de masse pour détecter les tétracyclines (Oka *et al.*, 2000). Ce type d'appareillage permet une spécificité et une sensibilité supérieures aux autres modes de détection mais reste encore particulièrement coûteux.

Les premières méthodes de dosages détectaient les quinolones par spectrométrie UV-visible alors que les méthodes modernes ont recours la détection fluorimétrique, plus sensible et plus sélective (Hernandez-Arteseros *et al.*, 2002). Cette évolution a suivi celle des détecteurs. Au total, environ 62 % des méthodes de la littérature utilisent la détection fluorimétrique. La fluorescence des quinolones, contrairement à leur absorption dans l'UV-visible, est fortement dépendante du pH de la phase mobile. Le pH optimal se situe entre 2,5 et 4,5 (Hernandez-Arteseros *et al.*, 2002). Des méthodes récentes utilisent également la spectrométrie de masse pour détecter les quinolones (Hernandez-Arteseros *et al.*, 2002).

2.5 Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une amélioration technologique considérable de la méthode d'électrophorèse sur bandelette, notamment grâce aux acquis de la chromatographie liquide haute performance. Elle se caractérise par un grand pouvoir de résolution (10^6 plateaux/m), un court temps d'analyse et une faible quantité de solvants organiques utilisés dans la solution-tampon électrolyte. Elle est, dans ces domaines, beaucoup plus performante que la chromatographie liquide haute performance.

Malgré ces avantages, l'électrophorèse capillaire est peu utilisée pour le dosage de l'acide oxolinique, de la fluméquine ou de l'oxytétracycline. Ceci est principalement dû au faible volume d'échantillon applicable sur le capillaire électrophorétique (quelques nanolitres) (Oka *et al.*, 2000) réduisant considérablement la sensibilité de la méthode. Les limites de quantification pour l'acide oxolinique et la fluméquine dans le plasma de porc sont respectivement de 2,4, 1,6 μg/mL (Hernandez *et al.*, 2000) et 0,025 μg/mL pour l'oxytétracycline (Tjörnelund et Hansen, 1997). Les coefficients de fidélité intermédiaire de cette méthode sont toujours inférieurs à 5 % pour l'oxytétracycline.

3 Protocole de validation

3.1 Spécificité et sélectivité

La spécificité et la sélectivité sont déterminées par comparaison des chromatogrammes obtenus après injection dans le système chromatographique :

- du ou des solvants utilisés pour préparer les solutions standard,
- des solutions standard,
- de l'extrait issu de la matrice non supplémentée,
- de l'extrait issu de la matrice supplémentée en la substance à analyser,
- de l'extrait issu de la matrice supplémentée en d'autres composants (standard interne).

3.2 Fonction de réponse et linéarité des résultats

3.2.1 Préparation des échantillons des gammes de calibration

Deux gammes de calibration sont réalisées, l'une dans la matrice dite « biologique » (volume de la supplémentation généralement inférieur ou égal à 10 % du volume de la

matrice biologique), l'autre dite « non biologique », dans de l'eau ou la phase mobile. La gamme « non biologique » peut être préparée par dilution des solutions utilisées pour la gamme « biologique ».

Chacune des deux gammes de calibration doit comporter un minimum de cinq points (niveaux de concentration), le blanc étant exclu. Les cinq points de gamme peuvent être choisis comme suit :

- la concentration du seuil de quantification inférieur,
- la concentration égale au double de la concentration du seuil de quantification inférieur,
- la concentration du seuil de quantification supérieur,
- la concentration médiane située entre la concentration maximale et le seuil de quantification inférieur,
- la concentration intermédiaire entre la concentration médiane et le seuil de quantification inférieur.

Chacune des deux gammes de calibration doit être réalisée pendant n jours avec $n \geqslant 4$. Dans la mesure du possible, si n séries sont réalisées, n solutions mères et n sources indépendantes de la matrice sont constituées afin de réaliser dans la matrice biologique n gammes de calibration différentes.

3.2.2 Résultats et analyse des résultats

Pour chaque échantillon, le signal mesuré est rapporté à la concentration théorique et la fonction de réponse est déterminée en utilisant une éventuelle pondération ou transformation mathématique des données (Caporal-Gautier *et al.*, 1992b,a; Chapuzet *et al.*, 1997, 1998).

Les modèles les plus utilisés sont :

- la régression linéaire non pondérée,
- la régression linéaire pondérée ($1/x$, $1/x^2$, $1/y$, $1/y^2$, $\log(x)$, $\log(y)$),
- la méthode du facteur de réponse (réponse/concentration de substance).

Pour chaque échantillon, la concentration mesurée est calculée en utilisant la fonction de réponse précédemment déterminée et le biais relatif (= exactitude) est déterminé comme suit :

$$\frac{(\textit{concentration mesurée} - \textit{concentration théorique}) \times 100}{\textit{concentration théorique}} \tag{3.1}$$

3.3 Justesse

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques.

3.3.1 Préparation des échantillons

Au minimum, neuf échantillons correspondant à au moins trois niveaux de concentration sont supplémentés dans la matrice biologique (volume de la supplémentation inférieur ou égal à 10 % du volume de la matrice biologique). Chaque niveau de concentration doit être traité au minimum en triplicata. La supplémentation de la matrice biologique doit employer une solution mère différente de celle utilisée pour la préparation des gammes de calibration « non biologique » et « biologique ».

Les trois niveaux de concentration peuvent être choisis comme suit :
- la concentration correspondant au double de la limite de quantification inférieur,
- la concentration correspondant à 80–90 % de la limite de quantification supérieur,
- la concentration médiane située entre les deux concentrations précédentes.

Les échantillons peuvent être soit :
- préparés pendant n jours (n⩾4), les mêmes jours que ceux de la préparation des gammes de calibration,
- préparés, aliquotés et congelés le premier jour puis décongelés les n jours suivants (n⩾3).

3.3.2 Résultats et analyse des résultats

Pour chaque échantillon, le signal mesuré, la concentration théorique, la concentration mesurée (calculée en utilisant la fonction de réponse de la gamme de calibration « biologique » du même jour) et le biais relatif (en pourcentage) calculé par l'équation 3.1 sont rapportés.

La moyenne du biais relatif pour chacun des jours et/ou pour chacun des niveaux de concentration peut également être calculée. La justesse est considérée comme satisfaisante si les biais sont compris entre -20 % et +20 % pour la limite de quantification, et -15 % et +15 % pour le reste du domaine de linéarité.

3.4 Fidélité

La fidélité fournit une indication sur les erreurs aléatoires.

La fidélité est évaluée à deux niveaux :
- répétabilité (intra-laboratoire et intrajour),
- fidélité intermédiaire (intra-laboratoire et interjour) avec étude de l'effet jour et éventuellement d'autres effets (opérateur, équipement, etc).

Elle peut, dans certains cas, être évaluée à un troisième niveau, appelé reproductibilité (interlaboratoire), qui n'est à considérer que dans le cas de la standardisation d'une procédure d'analyse.

3.4.1 Préparation des échantillons

Les échantillons ayant été utilisés dans la détermination de l'exactitude sont les mêmes que ceux utilisés dans la détermination de la fidélité.

3.4.2 Résultats et analyse des résultats

Pour chaque échantillon, le signal et la concentration mesurés (calculée en utilisant la fonction de réponse de la gamme de calibration « biologique » du même jour) sont rapportés.

Pour un niveau de concentration donné, la moyenne et l'écart type de la concentration sont calculés pour chacun des jours. Les variances de répétabilité, intergroupes et de fidélité intermédiaire, puis les coefficients de variation (CV) de répétabilité et de fidélité intermédiaire, sont également calculés pour chaque niveau de concentration (Caporal-Gautier *et al.*, 1992b,a; Chapuzet *et al.*, 1997, 1998). La méthode est considérée comme fidèle si les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont inférieurs à 15 %.

3.5 Rendement d'extraction

3.5.1 Préparation des échantillons

Les échantillons utilisés dans la détermination de la fonction de réponse et de la linéarité des résultats sont les mêmes que ceux utilisés dans la détermination du rendement d'extraction.

3.5.2 Résultats et analyse des résultats

Les signaux mesurés de l'échantillon extrait et de l'échantillon non extrait ainsi que le rendement d'extraction (en pourcentage) calculé par l'équation 3.2 sont rapportés.

$$\frac{signal\ de\ l'échantillon\ extrait \times 100}{signal\ de\ l'échantillon\ non\ extrait} \tag{3.2}$$

Pour chaque niveau de concentration, il convient de

- calculer une moyenne et un écart type du rendement d'extraction pour chacun des jours,
- vérifier l'homogénéité des variances entre les jours et l'absence de différence significative des moyennes entre les jours et calculer un rendement d'extraction moyen (moyenne et écart type) (Caporal-Gautier *et al.*, 1992b,a; Chapuzet *et al.*, 1997, 1998).

3.6 Limites de détection et de quantification inférieur

3.6.1 Préparation des échantillons

La détermination de la limite de détection peut être réalisée suivant quatre méthodes :

Méthode 1 : réalisation d'un enregistrement d'un blanc d'analyse (extrait issu d'une matrice non supplémentée),

Méthode 2 : réalisation de n ($n \geqslant 6$) mesures de blancs d'analyse indépendants,

Méthode 3 : extrapolation du seuil de détection à partir du seuil de quantification inférieur,

Méthode 4 : calcul à partir des droites obtenues pour les gammes «biologiques» lors des essais de linéarité.

3.6.2 Résultats et analyse des résultats

La limite de détection peut être estimé par :

Méthode 1 : $3 \times h_{max}$ avec h_{max}, amplitude maximale du signal sur une distance égale à vingt fois la largeur à mi-hauteur du pic correspondant à la substance à rechercher (Caporal-Gautier *et al.*, 1992b,a),

Méthode 2 : $m_{blanc} + 3 \times s_{blanc}$, avec m_{blanc}, moyenne des n mesures de blancs d'analyse indépendants, et s_{blanc}, écart-type des n mesures de blancs d'analyse indépendants,

Méthode 3 : $\bar{a} + 3 \times \sqrt{MSE}$, avec $\bar{a}$, ordonnée à l'origine de la droite moyenne de régression linéaire obtenue pour les gammes « biologiques » lors des essais de linéarités, MSE, écart-type résiduel de cette droite moyenne.

Le seuil de quantification inférieur est la concentration la plus faible de l'intervalle de dosage.

4 Méthodes de dosage de l'acide oxolinique et de la fluméquine

4.1 Méthode de dosage de l'acide oxolinique et de la fluméquine dans l'eau

La méthode de dosage de l'acide oxolinique et de la fluméquine dans l'eau ultra-pure et l'eau de mer est celle publiée par Pouliquen *et al.* (1994). La méthode de dosage de ces antibiotiques dans l'eau douce varie légèrement car 6 μL d'acide perchlorique concentré sont ici ajoutés à 1 mL d'eau pour atteindre une concentration de 0,1 mol/L. Cette acidification permet de précipiter les acides humiques et ainsi d'améliorer la linéarité de la méthode dans l'eau douce.

Cette méthode ne nécessite pas d'extraction ou de purification. Les échantillons d'eau sont centrifugés à 8000×g pendant 5 min et directement injectés dans le chromatographe.

Les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont tout deux de 1,2 % et les limites de quantification et de détection respectivement de 32 et 10 ng/mL.

4.2 Méthode de dosage de l'acide oxolinique et de la fluméquine dans les bryophytes

4.2.1 Matériels et méthodes

Réactifs

L'acétonitrile (Merck, Darmstadt, Allemagne), le chloroforme (BDH, Poole, Grande-Bretagne) et l'acétate d'éthyle (BDH) sont de qualité chromatographique. L'acide orthophosphorique 85 % (Merck), l'hydroxyde de sodium 1 mol/L (Panréac Quimica SA, Barce-

lone, Espagne), l'acide acétique glacial (Panréac) et l'acide oxalique (Merck) sont de qualité analytique. L'acide oxolinique (Lot 020H0315, 97,6 %), la fluméquine (Lot 79F0089, 99,9 %) et l'acide nalidixique (Lot 043H1094, 100 %) proviennent de Sigma (Saint Louis, MO, Etats-Unis).

Appareillages

Le chromatographe est composé d'une pompe 307 (Gilson, Villiers le bel, France) et d'un injecteur automatique 234 (Gilson) équipé d'une vanne d'injection Rhéodyne. La cartouche LiChroCart® 125×4 mm et la précartouche identique 4×4 mm remplies de phase stationnaire apolaire PuroSpher® 100 RP-18e (5 μm) (Merck) sont disposées dans un four CTO.10 AS VP (Shimadzu, Kyoto, Japon). La détection est assurée par un détecteur de fluorescence FP-1520 (Jasco, Tokyo, Japon) et l'intégration par un intégrateur D-2500® (Merck).
L'eau ultra-pure est produite par un système MilliQ academic (Millipore, Bedford, MA, Etats-Unis).

Conditions chromatographiques

La phase mobile, composée d'un mélange d'acide orthophosphorique 0,02 mol/L et d'acétonitrile en proportions volumiques respectives de 67 et 33 %, est dégazée 15 min avant utilisation. Le débit est de 1,0 mL/min et le volume de la boucle d'injection de 20 μL. La colonne chromatographique est maintenue à une température de 27 °C.

Après chaque journée de travail, la cartouche et la précartouche sont rincées par un mélange d'eau et d'acétonitrile en proportions volumiques égales. Ce rinçage s'effectue pendant au moins 30 min à un débit de 0,5 mL/min.

Les longueurs d'ondes de détection d'excitation et d'émission sont respectivement 325 et 365 nm.

Préparation des solutions mères d'acide oxolinique et de fluméquine

Les solutions mères d'acide oxolinique, d'acide nalidixique et de fluméquine sont préparées en double à la concentration de 1 mg/L dans la soude 0,03 mol/L. Ces solutions sont stables pendant 1 mois à +4 °C. Les solutions filles sont préparées chaque jour par dilution des solutions mères dans l'eau.

Préparation des bryophytes

Les bryophytes sont prélevées dans la Chézine (Loire-Atlantique, France, 1°37'O, 47°14'N) et nettoyées dans de l'eau de la rivière. Elles sont ensuite transportées au laboratoire et lavées à l'eau courante avant d'être séchées sur papier absorbant. Une masse de 2 g (± 0,01 g) est enfin congelée à -20 °C jusqu'à son analyse.

Préparation des échantillons

Les échantillons de *Fontinalis antipyretica* (2,0 g exactement pesés) sont supplémentés par 50 μL de la solution de standard interne à 5 μg/mL d'acide nalidixique. Après 30 min de contact, 25 mL d'une solution d'acide oxalique 0,1 M préparée dans l'acétate d'éthyle sont ajoutés à l'échantillon. Le tube est alors placé dans l'azote liquide pendant environ 10 sec et les fontinales sont hâchées à l'aide d'un homogénéiseur (Ultra-turrax®, Bioblock Scientific, Illkirch, France). Après agitation 10 min à l'agitateur rotatif (Heildolph Reax2, Bioblock), les tubes sont centrifugés à 8000×g pendant 5 min à température ambiante (Centrifugeuse MR 1822, Jouan, Saint-Herblain, France). Le surnageant est récolté et à nouveau centrifugé pendant 5 min à 8000×g. Le surnageant est extrait deux fois avec 5 mL de soude 1 mol/L. L'extraction est réalisée par une agitation de 10 min suivie d'une centrifugation de 5 min à 8000×g. La phase alcaline est alors acidifiée par 2 mL d'acide acétique glacial et agitée à l'agitateur vibreur (Vortex, Bioblock). La phase aqueuse est enfin extraite par 5 puis 3 mL de chloroforme en agitant pendant 10 min puis en centrifugeant pendant 5 min à 8000×g. Le chloroforme est alors évaporé à sec sous courant d'azote à 35 °C (bain à sec, Bioblock, Barnstead thermolyne, Dubuque, IA, Etats-Unis) puis l'extrait sec est dissous dans 1 mL de phase mobile.

Validation

Les courbes de calibration sont réalisées par supplémentation des bryophytes de façon à atteindre des concentrations finales de 10, 25, 50, 125, 250 et 500 ng/g. Un échantillon non supplémenté est également extrait pour vérifier la spécificité de la méthode. Après un temps de contact de 30 min, les échantillons sont extraits en suivant la méthode décrite ci-dessus. Chaque niveau de concentration est extrait une fois par jour pendant 4 j.

La fidélité et la précision sont estimées en supplémentant des échantillons de contrôle à 25, 200 et 400 ng/g.

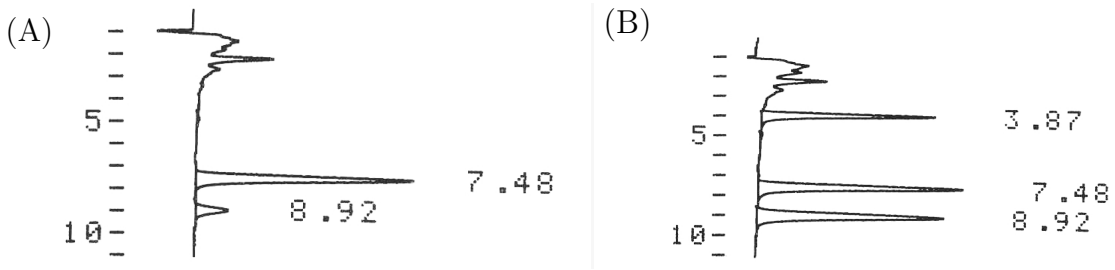


FIG. 12 – *Chromatogrammes de* Fontinalis antipyretica *(A) non supplémentées en acide oxolinique et en fluméquine et supplémentées en acide nalidixique à 125 ng/g (B) supplémentées à 100 ng/g en acide oxolinique (3,87 min) et fluméquine (8,92 min) et 125 ng/g en acide nalidixique (7,48 min).*

4.2.2 Résultats et discussion

La présence d'un pic chromatographique de hauteur variable au temps de rétention de la fluméquine (figure 12) n'a pas permis de valider la méthode pour cette molécule. Les résultats du protocole de validation pour l'acide oxolinique sont résumés dans le tableau 4.

Conditions chromatographiques

La méthode décrite ici utilise une phase stationnaire apolaire C_{18} « end-capped ». Aucun agent complexant n'est donc nécessaire dans la phase mobile. La phase mobile optimale est un mélange d'acide othophosphorique et d'acétonitrile en proportions volumiques respectives de 67 % et 33 %.

La détection de fluorescence permet une spécificité et une sensibilité élevées (figure 12).

Extraction, purification et recouvrements

Aucune méthode de dosage des quinolones, ou même d'un antibiotique, dans les plantes n'était disponible dans la littérature. Quelques méthodes de dosage existent pour les biphényls polychlorés dans les macrophytes (Vanier *et al.*, 1999) ou les hydrocarbures polycycliques aromatiques dans les bryophytes (Roy *et al.*, 1996). Ces méthodes utilisent l'extraction Soxhlet (Vanier *et al.*, 1999) ou l'extraction à l'azote liquide (Roy *et al.*, 1996). De nombreuses techniques ont été testées pour extraire les quinolones des bryophytes : le broyage au mortier avec du sable de Fontainebleau, l'extraction Soxhlet, l'hydrolyse alcaline et le broyage dans l'azote liquide. Les rendements d'extraction par broyage au mortier et extraction Soxhlet (avec un azéotrope ternaire composé d'eau, de méthanol et de chloroforme en proportions massiques respectives

TAB. 4 – *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de l'acide oxolinique dans les bryophytes.*

	Domaine de 10 à 500 ng/g					
Spécificité	oui					
Linéarité/régression						
Pente	0,00652 – 0,00697					
Ordonnée à l'origine	-0,02725 – +0,03387					
Coefficient de corrélation	0,9998 – 0,9999					
Ajustement significatif à 5 %	oui					
Concentration (ng/g)	25		200		400	
Exactitude						
Biais	-6,1 – +13,9		-5,8 – +8,8		-4,7 – +14,9	
Fidélité (%)						
CV répétabilité	3,6		3,0		1,9	
CV fidélité intermédiaire	6,5		4,0		7,2	
Concentration (ng/g)	10	25	50	125	250	500
Recouvrement (%)						
Moyen	70,0	71,6	68,7	71,1	61,9	66,7
Maximum	105,9	98,9	91,9	87,7	78,1	82,5
Minimum	42,9	37,8	39,1	42,2	35,2	34,0
Limite de détection	5 ng/g					
Limite de quantification	10 ng/g					

1,3 :8,2 :90,5) sont inférieurs à 50 %. Les extraits obtenus à la suite de l'hydrolyse alcaline contiennent un gel rendant la purification extrêmement délicate. Le broyage dans l'azote liquide conduit à des rendements d'extraction élevés. Deux agents chélatants ont été testés. L'acide oxalique 0,1 mol/L donne de meilleurs résultats que le Na_2EDTA. L'acétate d'éthyle a été choisi comme solvant d'extraction car son point de fusion est inférieur au point de congélation des bryophytes et l'extrait obtenu ne contenait pas de gel.

Le principal objectif de la méthode de purification était de supprimer de l'extrait le plus possible de pigments. La purification liquide/liquide, faisant intervenir les propriétés physico-chimiques des quinolones, était préférable à la purification en phase solide en terme de rendement d'extraction. L'extraction de l'acétate d'éthyle par la soude

supprimait les pigments lipophiles comme les caroténoïdes et celle par le chloroforme supprimait les composés polaires.

Dans ces conditions, le recouvrement moyen de l'acide oxolinique était de 68,3 %.

Linéarité, régression, fidélité, exactitude, limites de détection et de quantification

Le coefficient de corrélation élevé et le test d'existence de la pente significatif au risque 5 % montrent que la méthode est linéaire entre 10 et 500 ng/g. Elle est fidèle, avec des coefficients de variation moyens de répétabilité et de fidélité intermédiaire de 2,8 et 5,9 % respectivement. La méthode est exacte, avec des biais toujours inférieurs à 15 %. La limite de détection est de 5 ng/g.

4.3 Méthode de dosage de l'acide oxolinique et de la fluméquine dans les sédiments dulçaquicoles

4.3.1 Matériels et méthodes

Réactifs

L'acétonitrile (Merck, Darmstadt, Allemagne) et le chloroforme (BDH, Poole, Grande-Bretagne) sont de qualité chromatographique. L'acide orthophosphorique 85 % (Merck), l'hydroxyde de sodium en pastilles purissimum (Panréac Quimica SA, Barcelone, Espagne) et l'acide chlorhydrique 1 mol/L (Panréac) sont de qualité analytique. L'acide oxolinique (Lot 020H0315, 97,6 %) et la fluméquine (Lot 79F0089, 99,9 %) proviennent de Sigma (Saint Louis, MO, Etats-Unis).

Appareillages

Le chromatographe est composé d'une pompe 307 (Gilson, Villiers le bel, France) et d'un injecteur automatique 234 (Gilson) équipé d'une vanne d'injection Rhéodyne. La cartouche LiChroCart® 125×4 mm et la précartouche identique 4×4 mm remplies de phase stationnaire apolaire PuroSpher® 100 RP-18e (5 μm) (Merck) sont disposées dans un four CTO.10 AS VP (Shimadzu, Kyoto, Japon). La détection est assurée par un détecteur de fluorescence FP-1520 (Jasco, Tokyo, Japon) et l'intégration par un intégrateur D-2500 (Merck).

L'eau ultra-pure est produite par un système MilliQ academic (Millipore, Bedford, MA, Etats-Unis).

Conditions chromatographiques

La phase mobile, composée d'un mélange d'acide orthophosphorique 0,02 mol/L et d'acétonitrile en proportions volumiques respectives de 70 et 30 %n est dégazée 15 min avant utilisation. Le débit est de 0,8 mL/min et le volume de la boucle d'injection de 10 μL. La colonne chromatographique est maintenue à une température de 27 °C.

Après chaque journée de travail, la cartouche et la précartouche sont rincées par un mélange d'eau et d'acétonitrile en proportions volumiques égales. Ce rinçage s'effectue pendant au moins 30 min à un débit de 0,5 mL/min.

Les longueurs d'ondes de détection d'excitation et d'émission sont respectivement de 325 et 365 nm.

Préparation des solutions mères d'acide oxolinique et de fluméquine

Les solutions mères d'acide oxolinique et de fluméquine sont préparées en double à la concentration de 1 mg/L dans la soude 0,03 mol/L. Ces solutions sont stables pendant 1 mois à +4 °C. Les solutions filles sont préparées chaque jour par dilution des solutions mères dans l'eau.

Préparation des échantillons

Une masse de 1 g de sédiment, exactement pesée, est placée dans un tube jetable de 15 mL puis extraite par 4 mL de soude à 0,2 mol/L par agitation pendant 10 min à l'agitateur rotatif (Heildolph® Reax2, Bioblock, Barnstead thermolyne, Dubuque, IA, Etats-Unis). Les tubes sont ensuite centrifugés (centrifugeuse MR 1822, Jouan, Saint-Herblain, France) pendant 5 min à 10000×g à température ambiante. Le surnageant est récolté et l'extraction est renouvelée avec 2×4 mL de soude 0,2 mol/L. Les phases alcalines sont ensuite réunies et acidifiées par 3 mL d'acide chlorhydrique 1 mol/L. La phase aqueuse est extraite par 4 mL de chloroforme en agitant pendant 5 min à l'agitateur rotatif puis en centrifugeant pendant 5 min à 7000×g. La phase organique est recueillie et l'opération est renouvelée avec 4 mL de chloroforme. Les phases chloroformiques réunies sont enfin évaporées à sec sous courant d'azote à 35 °C (bain à sec, Bioblock) et l'extrait sec est dissous dans 1 mL de phase mobile.

Validation

Les courbes de calibration sont réalisées par supplémentation du sédiment de façon à atteindre des concentrations finales de 50, 100, 200, 400, 600, 800 et 1000 ng/g. Un échantillon non supplémenté est également extrait pour vérifier la spécificité de la méthode. Après 30 min de contact, les échantillons sont extraits en suivant la méthode décrite ci-dessus. Chaque niveau de concentration est extrait une fois par jour pendant 4 j.

La fidélité et la précision sont estimées en supplémentant des échantillons de contrôle à 50, 500 et 1000 ng/g.

4.3.2 Résultats et discussion

La méthode utilisée ici est dérivée de celle décrite par Pouliquen *et al.* (1994) dans les sédiments marins. Les résultats du protocole de validation sont résumés dans les tableaux 5 et 6.

Conditions chromatographiques

La phase mobile a été modifiée de façon à être plus éluante. La quantité d'acétonitrile est passée de 76 à 70 %. Cela a permis de réduire le débit de 1,0 à 0,8 mL/min tout en conservant un temps d'analyse identique. La quantité d'extrait introduite dans le chromatographe a été réduite de 50 à 10 μL grâce à la détection fluorimétrique, beaucoup plus sensible et spécifique que la détection UV. Les chromatogrammes obtenus sont ceux de la figure 13.

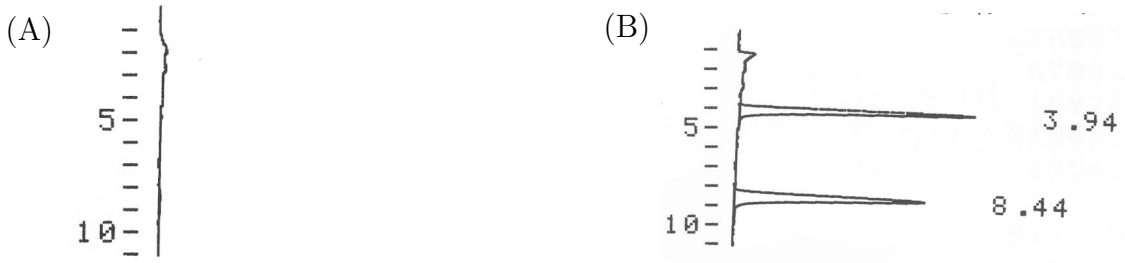


FIG. 13 – *Chromatogrammes de sédiments (A) non supplémentés en acide oxolinique et en fluméquine (B) supplémentés à 100 ng/g en acide oxolinique (3,94 min) et fluméquine (8,44 min).*

TAB. 5 – *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de l'acide oxolinique dans les sédiments dulçaquicoles.*

	Domaine de 10 à 1000 ng/g						
Spécificité	oui						
Linéarité/régression							
Pente	93,84 – 107,91						
Ordonnée à l'origine	-1310,50 – -262,05						
Coefficient de corrélation	0,9867 – 0,9983						
Ajustement significatif à 5 %	oui						
Concentration (ng/g)	50		500		1000		
Exactitude							
Biais	-16,8 – +17,6		-9,7 – +5,38		-7,7 – +6,6		
Fidélité (%)							
CV répétabilité	4,76		1,62		5,84		
CV fidélité intermédiaire	15,34		7,29		6,00		
Concentration (ng/g)	50	100	200	400	600	800	1000
Recouvrement (%)							
Moyen	55,4	57,8	63,7	61,2	64,7	62,5	65,1
Maximum	57,0	62,0	65,3	65,4	68,2	69,8	67,4
Minimum	53,5	51,5	62,0	55,7	57,0	54,2	63,9
Limite de détection	3 ng/g						
Limite de quantification	10 ng/g						

Extraction, purification et recouvrements

Le mélange chloroforme/acétate d'éthyle utilisé par Pouliquen *et al.* (1994) lors de la purification liquide/liquide a été remplacé par du chloroforme seul. Cette modification n'a pas altéré les qualités de la méthode et a facilité la phase d'évaporation.

Le recouvrement moyen est plus élevé pour la fluméquine (77,9±1,5 %) que pour l'acide oxolinique (61,5±5,9 %).

TAB. 6 – *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de la fluméquine dans les sédiments dulçaquicoles.*

	Domaine de 10 à 1000 ng/g						
Spécificité	oui						
Linéarité/régression							
Pente	87,48 – 100,93						
Ordonnée à l'origine	-53,99 – +627,52						
Coefficient de corrélation	0,9957 – 0,9991						
Ajustement significatif à 5 %	oui						
Concentration (ng/g)	50		500		1000		
Exactitude							
Biais	-23,8 – +6,3		-7,4 – +4,1		-6,1 – +9,1		
Fidélité (%)							
CV répétabilité	3,55		0,34		3,48		
CV fidélité intermédiaire	13,66		6,29		6,44		
Concentration (ng/g)	50	100	200	400	600	800	1000
Recouvrement (%)							
Moyen	78,3	77,6	78,8	75,7	78,2	79,1	77,4
Maximum	79,7	83,4	81,3	77,9	81,9	82,6	80,1
Minimum	76,8	71,7	76,7	71,8	71,7	67,9	73,9
Limite de détection	3 ng/g						
Limite de quantification	10 ng/g						

Linéarité, régression, fidélité, exactitude, limites de détection et de quantification

La détection fluorimétrique a permis de réduire les seuils de détection et de quantification de 11 et 37 ng/g à 3 et 10 ng/g respectivement.

La méthode est linéaire de 50 à 1000 ng/g. Elle est fidèle avec des coefficients de variation moyens de répétabilité et de fidélité intermédiaire de 4,1 et 9,5 % respectivement pour l'acide oxolinique et 2,5 et 8,8 % respectivement pour la fluméquine. La méthode est exacte, avec des biais toujours inférieurs à 10 % sauf pour le point à 50 ng/g où les biais pour l'acide oxolinique sont compris entre -20 et +20 % et ceux de la fluméquine entre -25 et +10 %. Ces biais élevés pour le point à 50 ng/g indiquent que ce point est légèrement

en dessous de la limite de quantification réelle de la méthode. Ces biais restent cependant acceptables dans le cadre d'une étude écotoxicologique. La limite de détection, calculée à 3 ng/g, est la même pour l'acide oxolinique et la fluméquine.

5 Méthodes de dosage de l'oxytétracycline

5.1 Méthode de dosage de l'oxytétracycline dans l'eau

La méthode de dosage de l'oxytétracycline dans l'eau ultra-pure et l'eau de mer est celle publiée par Pouliquen *et al.* (1993). La méthode de dosage dans l'eau douce varie légèrement car 6 μL d'acide perchlorique concentré sont ici ajoutés à 1 mL d'eau pour atteindre une concentration de 0,1 mol/L. Cette acidification permet de précipiter les acides humiques et ainsi d'améliorer la linéarité de la méthode dans l'eau douce.

Cette méthode ne nécessite pas d'extraction ou de purification. Les échantillons d'eau sont centrifugés à 8000×g pendant 5 min et directement injectés dans le chromatographe.

Les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont respectivement de 2,2 % et 2,4 % et les limites de quantification et de détection de 47 et 14 ng/mL.

5.2 Méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les bryophytes

5.2.1 Matériels et méthodes

Réactifs

L'acétonitrile (Merck, Darmstadt, Allemagne) et le tétrahydrofurane (BDH, Poole, Grande Bretagne) sont de qualité chromatographique. L'acétone, l'acide citrique (Merck), l'hydrogénophosphate disodique (Panreac Quimica SA, Barcelone, Espagne), l'acide oxalique dihydraté (Sigma, Saint Louis, MO, Etats-Unis), l'acide octane sulfonique (Sigma), le méthanol (Carlo Erba, Milan, Italie), la soude 1 mol/L et l'éthylène-diamino-tétra-acétate de disodique (Na_2EDTA, Titriplex III, Merck) sont des solvants de qualité analytique. Le tampon MacIlvaine est préparé en mélangeant 79,45 % d'acide citrique 0,1 mol/L à 20,55 % d'hydrogénophosphate disodique 0,2 mol/L en proportions

volumiques. Le pH est ensuite ajusté à 3,0 au pH-mètre (Accumet model 15, Denver Instrument Company, CO, Etats-Unis).

La tétracycline (Lot 118F0050, 97,4 %) provient de Sigma et l'oxytétracycline (Lot 10318, 91,0 %) de Pfizer (Amboise, France).

Appareillages

Le chromatographe est composé d'une pompe 307 (Gilson, Villiers le bel, France) et d'un injecteur automatique 234 (Gilson) équipé d'une vanne d'injection Rhéodyne. La cartouche LiChroCart® 250×4 mm et la précartouche identique 10×4 mm remplies de phase stationnaire apolaire Spherisorb® ODS1 (5 μm) (Merck) sont disposées dans un four CTO.10 AS VP (Shimadzu, Kyoto, Japon). La détection est assurée par un détecteur UV–visible L-4250 (Merck) et l'intégration par un intégrateur D2500 (Merck).

L'eau ultra-pure est produite par un système MilliQ academic (Millipore, Bedford, MA, Etats-Unis).

Conditions chromatographiques

La phase mobile, composée d'un mélange d'acide oxalique 0,025 mol/L, d'acétonitrile et de tétrahydrofurane en proportions volumiques respectives de 75, 22,5 et 2,5 % est dégazée 15 min avant utilisation. Le débit est de 1,0 mL/min et le volume de la boucle d'injection de 100 μL. La colonne chromatographique est maintenue à une température de 30 °C.

Après chaque journée de travail, la cartouche et la précartouche sont rincées par un mélange d'eau et d'acétonitrile en proportions volumiques égales. Ce rinçage s'effectue pendant au moins 30 min à un débit de 0,5 mL/min.

La longueur d'onde de détection est de 355 nm.

Préparation des solutions mères d'oxytétracycline et de tétracycline

Les solutions mères d'oxytétracycline et de tétracycline sont préparées en double à la concentration de 1 mg/L dans le méthanol. Ces solutions sont stables pendant 1 mois à -20 °C. Les solutions filles sont préparées chaque jour par dilution des solutions mères dans l'eau ultra-pure.

Préparation des bryophytes

Les bryophytes sont prélevées dans la Chézine (Loire-Atlantique, France, 1°37'O, 47°14'N) et nettoyées dans de l'eau de la rivière. Elles sont ensuite transportées au laboratoire et lavées à l'eau courante avant d'être séchées sur papier absorbant. Une masse de 2 g (± 0,01 g) est enfin congelée à -20 °C.

Validation

Les courbes de calibration sont réalisées par supplémentation des bryophytes de façon à atteindre des concentrations finales de 100, 250, 500, 600, 750 et 1000 ng/g. Un échantillon non supplémenté est également extrait pour vérifier la spécificité de la méthode. Après un temps de contact de 30 min, les échantillons sont extraits en suivant la méthode décrite ci-dessus. Chaque niveau de concentration est extrait une fois par jour pendant 4 j.

La fidélité et la précision sont estimées en supplémentant des échantillons de contrôle à 200, 450 et 800 ng/g.

Préparation des échantillons

Une masse de 2 g de *Fontinalis antipyretica*, exactement pesée, est trempée dans l'azote liquide jusqu'à congélation complète. Les plantes sont alors réduites en poudre à l'aide d'une spatule. Les échantillons sont supplémentés par 5 μg de tétracycline (standard interne). Après 30 min de contact, les bryophytes sont extraites trois fois avec 10, 8 puis 3 mL d'un mélange d'acétone et de tampon MacIlvaine (50 : 50, v/v) saturé en Na_2EDTA (50 g/L). Les extractions consistent en 5 min d'agitation à l'agitateur rotatif (Heildolph® Reax2, Bioblock Scientific, Illkirch, France) suivies de 5 min de centrifugation à 3500×g à +4 °C (MR 1822, Jouan, Saint-Herblain, France). Le surnageant est alors centrifugé 5 min à 3500×g à +4 °C puis l'acétone est évaporée sous vide pendant 1h30 à +60 °C (SpeedVac SC 210A, Savant, Framingdale, NY, Etats-Unis). La purification est achevée en utilisant une cartouche BondElut C_{18} 500 mg (Varian, San Fernando, CA, Etats Unis). La phase stationnaire est activée par 5 mL de méthanol puis 5 mL de tampon MacIlvaine contenant 0,015 mol/L d'acide octanesulfonique. Le résidu de la phase d'évaporation est alors déposé sur la cartouche. Celle-ci est ensuite lavée par 2 mL d'un mélange d'acide oxalique 0,025 mol/L, d'acétonitrile et de tétrahydrofurane en proportions volumiques respectives 75, 22,5 et 2,5 % contenant 0,01 mol/L d'acide octanesulfonique. Les tétracyclines sont enfin éluées par 1,0 mL d'un mélange d'acide oxalique 0,025 mol/L et d'acétonitrile en proportions volumiques égales contenant 0,015 mol/L d'acide octanesulfonique.

5.2.2 Résultats et discussion

Les résultats du protocole de validation de la méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les bryophytes sont résumés dans le tableau 7.

TAB. 7 – *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les bryophytes.*

	Domaine de 100 à 1000 ng/g					
Spécificité	oui					
Linéarité/régression						
Pente	0,00325 – 0,00725					
Ordonnée à l'origine	-43,285 – 598,317					
Coefficient de corrélation	0,8853 – 0,9593					
Ajustement significatif à 5 %	oui					
Concentration (ng/g)	200		450		800	
Exactitude						
Biais	-22,8 – +24,5		-30,5 – +29,4		-10,6 – +28,7	
Fidélité (%)						
CV répétabilité	7,2		10,1		6,8	
CV fidélité intermédiaire	17,8		21,3		11,4	
Concentration (ng/g)	100	250	500	600	750	1000
Recouvrement OTC(%)						
Moyen	83,5	54,8	39,4	28,6	43,1	40,1
Maximum	129,2	104,4	64,2	34,1	67,2	56,2
Minimum	32,1	26,3	22,9	21,3	24,8	29,4
Recouvrement TC(%)						
Moyen	10,7					
Maximum	27,8					
Minimum	6,4					
Limite de détection	30 ng/g					
Limite de quantification	100 ng/g					

Le dosage de l'oxytétracycline dans les bryophytes n'a pas pu être réalisé par la méthode appliquée dans les sédiments pour deux raisons :

- la matrice contient beaucoup plus de composés gênants pour l'analyse chromatographique,

– l'extraction de l'oxytétracycline est beaucoup plus délicate dans cette matrice que dans les matrices précédentes.

Des essais ont été réalisés avec la méthode de purification en phase solide décrite pour les sédiments dulçaquicoles (§ 5.3). Cette méthode n'était pas satisfaisante car de nombreux pics coéluaient avec l'oxytétracycline et le rendement d'extraction était de l'ordre de 10 %.

Conditions chromatographiques

La première solution envisagée fut d'utiliser la chromatographie de paire d'ions.

On appelle paire d'ions l'entité formée par l'association de deux ions de charge opposée. Cette association peut être due :

– soit à des interactions électrostatiques, dans les solvants à faible constante diélectrique,
– soit à des effets hydrophobes : les ions organiques de grande taille comportant une partie apolaire et un groupement ionique s'associent en paires d'ions en solution aqueuse, formant des cavités telles que la structure de l'eau est perturbée le moins possible.

La propriété fondamentale des paires d'ions est leur aptitude à passer des solutions aqueuses dans des milieux de faible constante diélectrique.

La formation de paires d'ions peut être utilisée pour effectuer des séparations chromatographiques de substances ionisées ou ionisables. Elle rivalise avec la chromatographie d'échange d'ions. Lorsqu'elle met en œuvre des gels de silice vierge ou greffée, elle présente une efficacité supérieure et de meilleures propriétés mécaniques que ces phases stationnaires seules.

L'avantage sur l'échange d'ions réside dans le fait que les interactions mises en jeu peuvent être plus variées par le choix de l'ion antagoniste des solutés à séparer et par celui de la nature de la phase mobile (Rosset *et al.*, 1991).

On utilise des silices greffées de chaînes alkyle, octyle ou octadécyle. La phase mobile contient le contre-ion qui se partage entre la phase mobile et la phase stationnaire apolaire.

On a d'abord proposé deux mécanismes de rétention macroscopiques :
- le contre-ion est adsorbé par les chaînes octadécyle de la silice qui devient équivalente à un échangeur d'ions : on parle d'échangeur d'ions « dynamique »,
- le soluté et le contre-ion forment une paire d'ions qui est adsorbée sur la phase stationnaire apolaire.

Actuellement, on s'accorde pour considérer qu'il s'agit d'un mécanisme par formation d'une double couche électrique à l'interface solide hydrophobe–phase mobile (Rosset *et al.*, 1991). Le taux de recouvrement des chaînes par le contre-ion n'excède pas 30 %.

D'un point de vue pratique, la fixation du contre-ion est d'autant plus élevée que la chaîne hydrocarbonnée est longue et que la teneur en acétonitrile de la phase mobile est faible. Le facteur de capacité est multiplié par 2,5 quand le nombre de groupements alkyles augmente d'une unité. La rétention augmente quand la molécule est chargée négativement et l'optimum est atteint lorsque le pH est inférieur de deux unités au pKa de la molécule.

Dans notre cas, la phase stationnaire apolaire octadécyle était de type Waters ODS1 et la phase mobile était constituée d'acide oxalique, d'acétonitrile et de tétrahydrofurane. Dans ces conditions, l'ajout de 0,01 mol/L d'acide octanesulfonique augmente le facteur de capacité de l'oxytétracycline de 2 à 7 et 0,15 mol/L du même acide le fait passer à 8,5.

Cette solution a permis de séparer suffisament les tétracyclines des « pics matrice » mais a augmenté la largeur du pic à mi-hauteur et le temps d'analyse avec des temps de rétention de l'oxytétracycline passant de 8 à 18 min et pouvant atteindre 30 min si l'on ajoute un standard interne comme la tétracycline. Cette technique a donc été transposée à la purification.

Partant d'extraits purifiés, une méthode de détection par spectrométrie de masse avec une interface de type électrospray a été mise au point pour résoudre les problèmes de sensibilité.

La détection est réalisée par une méthode MRM[2] en cherchant quatre ions fils 461>443, 461>426, 445>427, 445>410.

[2]Multi Reaction Method : méthode masse/masse utilisant des conditions particulières de fragmentation pour chaque ion fils.

Les conditions opératoires du spectromètre de masse ont été optimisées comme suit :

Tension de capillaire	3,50 kV	LM Res 1	15,0
Tension de cône	30 V	HM Res 1	15,0
Extracteur	16 nm	IEnergy 1	0,1
Lentille radiofréquence	0,15	Entrée	25
Température de la source	130 °C	Dwell	0,5 sec
Température de désolvatation	350 °C	Sortie	25
Collision 461>443	18	LM Res 2	15,0
Collision 461>426	25	HM Res 2	15,0
Collision 445>427	15	IEnergy 2	3,0
Collision 445>410	25	Multiplicateur	700

Dans ces conditions, 5 ng/mL d'oxytétracycline sont détectés et quantifiés dans l'eau pour des solutions standard. Cette limite remonte à 200 ng/mL dans la matrice. Cette différence de sensibilité provient probablement de la présence de molécules très électrophiles captant les charges et empêchant ainsi les tétracyclines de se fragmenter.

Une dérivation pré-colonne a été testée afin de tenter de faire acquérir une fluorescence détectable à l'oxytétracycline. Le principe de cette dérivation est de fixer un groupement fluorescent sur l'antibiotique avant introduction dans le chromatographe (Knapp, 1979). Les essais ont été effectués sur solutions standard.

La réaction d'addition du chlorure de 5-diméthylaminonaphtalène-1-sulfonyl (DANSYL) sur l'oxytétracycline est réalisée en milieu alcalin (figure 14).

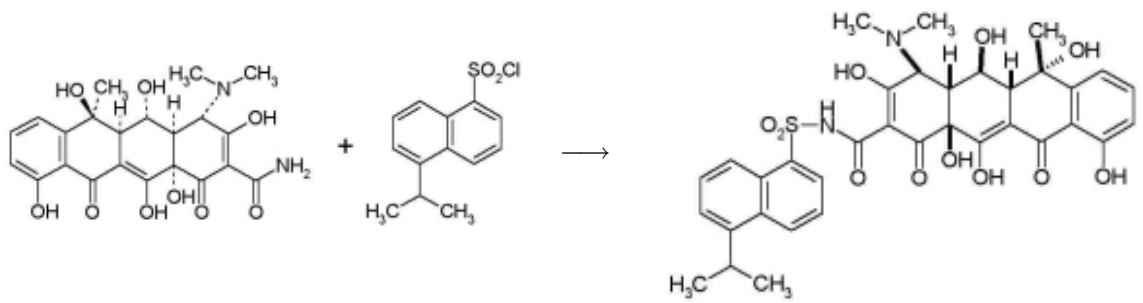


Fig. 14 – Réaction de dérivation pré-colonne de l'oxytétracycline.

Les résultats obtenus n'ont pas permis de différencier les produits de la réaction de l'oxytétracycline dérivée.

Une dérivation post-colonne a également été testée. Le principe de cette dérivation est de faire fluorescer l'oxytétracycline par complexation avec deux ions magnésium en présence d'un tampon borate à pH 9 (Pena *et al.*, 1998, 1999). Cette méthode donnait de bons résultats en terme de sensibilité (×50) et de spécificité. Elle a cependant été abandonnée car des problèmes de rupture de la cellule du spectrophotomètre de fluorescence dûs à la cristallisation du magnésium n'ont pu être résolus.

Suite aux essais encourageants de dérivation post-colonne, de nouveaux essais ont été réalisés mais cette fois en cellule ouverte, empêchant ainsi toute rupture de cellule. Les fractions de 1 mL étaient recueillies en sortie de colonne et mises en présence de magnésium dans un tampon borate avant d'être disposées dans un détecteur de fluorescence. Cette méthode a donné des résultats décevants en terme de sensibilité et de linéarité. La détection de l'oxytétracycline par fluorescence a donc été abandonnée. Néanmoins, les résultats obtenus par dérivation post-colonne restent intéressants et la méthode mériterait d'être approfondie ultérieurement et l'optimisation a porté sur la chromatographie.

La solution retenue a été de ne faire qu'une purification en phase solide en utilisant la chromatographie de paire d'ions avec une phase mobile assez éluante pour permettre une sensibilité suffisante en détection UV.

L'utilisation de la phase stationnaire Spherisorb ODS1 permet une meilleure séparation chromatographique des tétracyclines que celle d'une phase apolaire « end-capped ». Ceci est dû au mécanisme de rétention qui fait intervenir des interactions hydrophobes et ioniques. Les interactions ioniques proviennent des sites silanols résiduels et des impuretés métalliques de la silice. La concentration et la proportion d'acide oxalique utilisé dans la phase mobile permettent de réguler l'activité de ces impuretés. Le tétrahydrofurane est utilisé pour diminuer l'élargissement des pics dû aux sites silanols résiduels de la phase stationnaire.

Extraction, purification et recouvrements

Un grand nombre de cartouches d'extraction en phase solide a été testé. Les colonnes commerciales en phase normale (florisil, nitrile, diol, silice) purifiaient bien l'extrait mais ne permettaient qu'un rendement de l'ordre de 2 %. Des colonnes de phase mixte silice/Na_2EDTA (Stahl, 1969) ont également été préparées au laboratoire, ces colonnes ont donné les mêmes résultats que les colonnes commerciales.

Une enzyme a même été utilisée pour tenter de dégrader une partie des composés organiques de la matrice. L'utilisation d'une lipase de type II (Touraki *et al.*, 1995) n'a donné aucun résultat satisfaisant.

La solution a donc été d'affiner la purification en utilisant la chromatographie de paire d'ions.

L'extraction a été réalisée à l'aide de cartouches d'extraction en phase solide Bond Elut C_{18}. En ajoutant 0,15 mol/L d'acide octane sulfonique dans la phase mobile utilisée pour l'analyse de l'oxytétracycline (§ 5.3), la purification est satisfaisante. Le rendement d'extraction reste cependant très faible. La comparaison des rendements obtenus pour des échantillons extraits et des solutions standard a permis de déterminer un rendement d'extraction de la matrice vers le solvant d'environ 40 %. Ce faible rendement d'extraction couplé à la perte due aux cartouches d'extraction en phase solide mène à un rendement proche de 10 %.

Un effort a donc été porté sur le solvant d'extraction car les propriétés de l'oxytétracycline font qu'une partie de la molécule peut passer à l'intérieur des cellules. Le solvant d'extraction doit donc détruire les membranes des cellules pour permettre une solubilisation de l'oxytétracycline. Plusieurs solutions ont été envisagées :

- les ultra-sons ne permettaient pas de détruire les membranes cellulaires et, de plus, faisaient chauffer l'extrait, ce qui pouvait être responsable d'une dégradation de l'antibiotique,
- le sulfatedodécyle de sodium (SDS) extrayait bien l'oxytétracycline mais la viscosité de ce solvant provoquait des colmatages des cartouches d'extraction en phase solide. Le problème n'était que très partiellement résolu en précipitant le SDS dans la glace car cette précipitation faisait également chuter le rendement d'extraction,
- l'acétone a enfin été testée pour dissoudre les membranes. Ce solvant a permis d'obtenir de bons rendements d'extraction, l'optimum étant un mélange acétone/tampon MacIlvaine (50 : 50, v/v). L'acétone, posant des problèmes lors de l'extraction en phase solide, est évaporée après extraction.

Dans ces conditions les chromatogrammes en figure 15 sont obtenus.

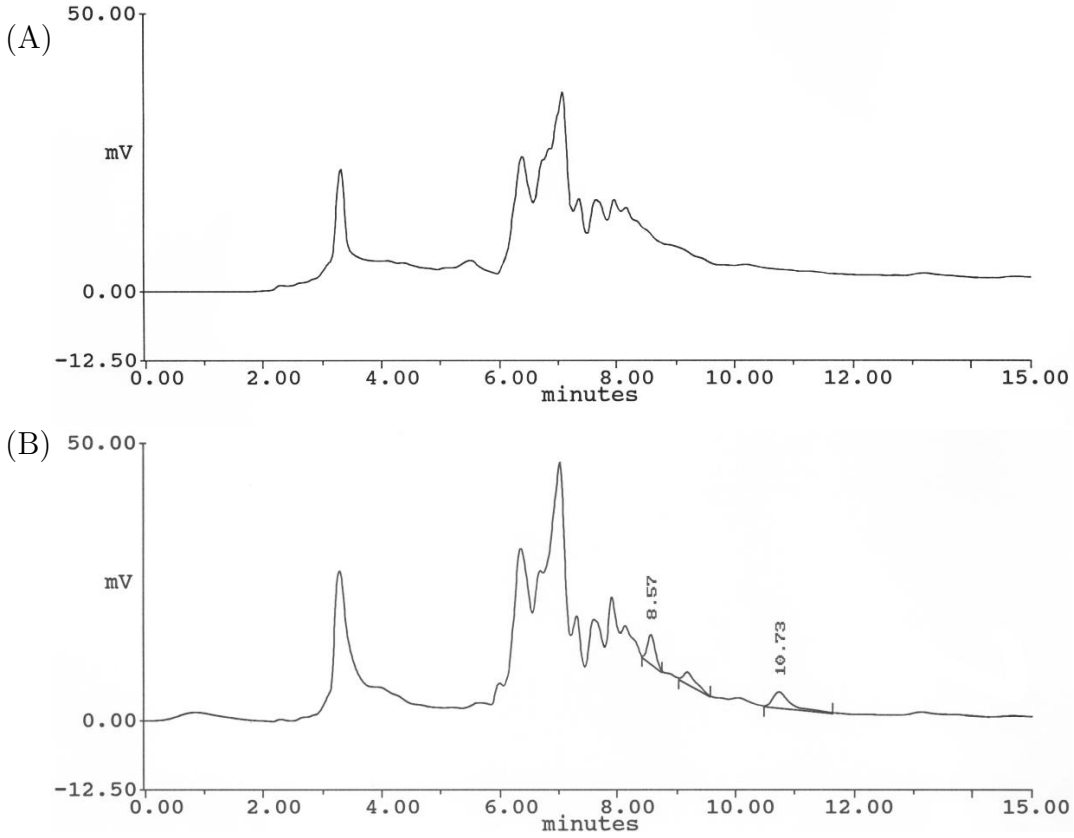


FIG. 15 – *Chromatogrammes (A) d'un échantillon non supplémenté de* Fontinalis antipyretica*; (B) d'un échantillon de* Fontinalis antipyretica *supplémenté avec respectivement 1 et 5 µg/g d'oxytétracycline (8,57 min) et de tétracycline (10,73 min).*

Linéarité, régression, fidélité, exactitude, limites de détection et de quantification

La méthode est linéaire entre 100 et 1000 ng/g. Son coefficient de variation de répétabilité moyen de 8,0 % est acceptable. Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire est élevé (16,8 %). Ceci signifie que les conditions environnementales influent de façon non négligeable sur cette méthode. De plus, les biais sont compris entre -30,5 % et +30,0 %. Ces valeurs sont supérieures aux normes que nous nous étions fixées. La limite de détection calculée est de 30 ng/g.

5.3 Méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les sédiments dulçaquicoles

5.3.1 Matériels et méthodes

Réactifs

L'acétonitrile (Merck, Darmstadt, Allemagne) et le tétrahydrofurane (BDH, Poole, Grande Bretagne) sont de qualité chromatographique. L'acide oxalique dihydraté et l'éthylène-diamino-tétra-acétate de disodique (Na_2EDTA, Titriplex III, Merck) sous forme de poudres proviennent de Merck. Le tampon MacIlvaine est préparé en mélangeant en proportions volumiques 79,45 % d'acide citrique 0,1 mol/L avec 20,55 % d'hydrogénophosphate disodique 0,2 mol/L. Le pH est ensuite ajusté à 3,0 au pH-mètre (Accumet model 15, Denver Instrument Company, CO, Etats-Unis). L'acide acétique glacial, l'ammoniaque 30 % et l'acétone technique sont achetés chez Panréac (Panréac Quimica SA, Barcelone, Espagne). Le méthanol provient de chez Carlo Erba (Milan, Italie).

La tétracycline (Lot 118F0050, 97,4 %) provient de Sigma (Saint Louis, MO, Etats-Unis) et l'oxytétracycline (Lot 10318, 91,0 %) de Pfizer (Amboise, France).

Appareillages

Le chromatographe est composé d'une pompe 307 (Gilson, Villiers le bel, France) et d'un injecteur automatique 234 (Gilson) équipé d'une vanne d'injection Rhéodyne. La cartouche LiChroCart® 250×4 mm et la précartouche identique 10×4 mm remplies de phase stationnaire apolaire Spherisorb ODS1 (5 μm) (Merck) sont disposées dans un four CTO.10 AS VP (Shimadzu, Kyoto, Japon). La détection est assurée par un détecteur UV–visible L-4250 (Merck) et l'intégration par un intégrateur CR4-A (Shimadzu).

L'eau ultra-pure est produite par un système MilliQ academic (Millipore, Bedford, MA, Etats-Unis).

Conditions chromatographiques

La phase mobile, composée d'un mélange d'acide oxalique 0,025 mol/L, d'acétonitrile et de tétrahydrofurane en proportions volumiques respectives de 75, 22,5 et 2,5 %, est dégazée 15 min avant utilisation. Le débit est de 1,0 mL/min et le volume de la boucle d'injection de 100 μL. La colonne chromatographique est maintenue à une température

de 30 °C.

Après chaque journée de travail, la cartouche et la précartouche sont rincées par un mélange d'eau et d'acétonitrile en proportions volumiques égales. Ce rinçage s'effectue pendant au moins 30 min à un débit de 0,5 mL/min.

La longueur d'onde de détection est de 355 nm.

Préparation des solutions mères d'oxytétracycline et de tétracycline

Les solutions mères d'oxytétracycline et de tétracycline sont préparées en double à la concentration de 1 mg/L dans le méthanol. Ces solutions sont stables pendant 1 mois à -20 °C. Les solutions filles sont préparées chaque jour par dilution des solutions mères dans l'acide perchlorique 0,1 mol/L.

Préparation des échantillons

Une masse de 1,5 g de sédiments, exactement pesée, est supplémentée à 500 ng/g avec de la tétracycline. Après un temps de contact de 30 min, 0,3 g de Na_2EDTA est ajouté aux sédiments. L'échantillon est ensuite extrait par 7 mL de tampon MacIlvaine pH 3,0. L'opération est réalisée par agitation pendant 5 min à l'agitateur rotatif (Heildolph Reax2, Bioblock Scientific, Illkirch, France) puis centrifugation pendant 5 min à 8000×g à +4 °C (MR 1822, Jouan, Saint-Herblain, France). Le surnageant est récolté et l'opération est renouvelée avec 2×7 mL de tampon MacIlvaine pH 3,0. La purification des phases aqueuses est poursuivie sur cartouche BondElut Certify® 300 mg. La phase stationnaire est activée par 5 mL de méthanol puis 5 mL de tampon MacIlvaine. L'échantillon est alors déposé sur la cartouche. Celle-ci est ensuite lavée par 5 mL de méthanol, puis le pH est remonté par 5 mL d'un mélange acétone–ammoniaque (96 : 4, v/v). Les tétracyclines sont enfin éluées par 1,5 mL d'eau. L'éluat est alors placé sous courant d'azote à 35 °C pendant 10 min afin d'éliminer le résidu d'acétone. Le résidu est acidifié par 20 μL d'acide acétique glacial.

Validation

Les courbes de calibration sont réalisées par supplémentation du sédiment de façon à atteindre des concentrations finales de 50, 100, 200, 400, 600, 800 et 1000 ng/g. Un échantillon non supplémenté est également extrait pour vérifier la spécificité de la méthode. Après un temps de contact de 30 min, les échantillons sont extraits en suivant la méthode

décrite ci-dessus. Chaque niveau de concentration est extrait une fois par jour pendant 4 j.

La fidélité et la précision sont estimées en supplémentant des échantillons de contrôle à 50, 500 et 1000 ng/g.

TAB. 8 – *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les sédiments dulçaquicoles de type vase sableuse.*

	Domaine de 50 à 1000 ng/g					
Spécificité	oui					
Linéarité/régression						
Pente	0,002 – 0,003					
Ordonnée à l'origine	-0,055 – 0,039					
Coefficient de corrélation	0,9920 – 0,9986					
Ajustement significatif à 5 %	oui					
Concentration (ng/g)	100		400		800	
Exactitude						
Biais	-12,3 – +10,7		-7,1 – +10,9		-12,0 – +11,2	
Fidélité (%)						
CV répétabilité	6,9		5,4		6,2	
CV fidélité intermédiaire	8,0		6,3		8,8	
Concentration (ng/g)	50	100	250	500	800	1000
Recouvrement OTC(%)						
Moyen	45,1	42,7	46,8	44,8	45,4	48,6
Maximum	51,8	46,3	53,0	45,7	50,2	54,5
Minimum	39,8	41,0	37,4	43,3	39,4	42,8
Recouvrement TC(%)						
Moyen	36,2					
Maximum	42,8					
Minimum	29,9					
Limite de détection	15 ng/g					
Limite de quantification	50 ng/g					

TAB. 9 – *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les sédiments dulçaquicoles de type vase.*

	Domaine de 50 à 1000 ng/g					
Spécificité	oui					
Linéarité/régression						
Pente	0,004 – 0,005					
Ordonnée à l'origine	-0,246 – 0,116					
Coefficient de corrélation	0,9948 – 0,9987					
Ajustement significatif à 5 %	oui					
Concentration (ng/g)	100		400		800	
Exactitude						
Biais	-10,0 – +12,9		-14,8 – +14,6		-13,4 – +9,4	
Fidélité (%)						
CV répétabilité	4,9		7,5		7,1	
CV fidélité intermédiaire	19,7		11,1		12,5	
Concentration (ng/g)	50	100	250	500	800	1000
Recouvrement OTC(%)						
Moyen	24,8	21,2	20,4	22,7	20,5	21,3
Maximum	40,7	28,4	23,7	22,9	22,8	21,9
Minimum	13,7	16,3	17,6	22,5	17,1	20,8
Recouvrement TC(%)						
Moyen	10,3					
Maximum	15,0					
Minimum	7,2					
Limite de détection	15 ng/g					
Limite de quantification	50 ng/g					

5.3.2 Résultats et discussions

Cette méthode a été validée dans la vase, la vase sableuse et le sable. Les résultats du protocole de validation dans la vase sableuse sont résumés dans le tableau 8. Les résultats dans la vase et le sable sont résumés respectivement dans les tableaux 9 et 10.

TAB. 10 – *Tableau de synthèse des résultats de validation de la méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les sédiments dulçaquicoles de type sable.*

	Domaine de 50 à 1000 ng/g					
Spécificité	oui					
Linéarité/régression						
Pente	0,002 – 0,002					
Ordonnée à l'origine	-0,046 – 0,054					
Coefficient de corrélation	0,9987 – 0,9996					
Ajustement significatif à 5 %	oui					
Concentration (ng/g)	100		400		800	
Exactitude						
Biais	-11,0 – +14,2		-13,6 – +13,4		-11,0 – +12,2	
Fidélité (%)						
CV répétabilité	3,4		5,8		7,3	
CV fidélité intermédiaire	14,1		7,8		7,4	
Concentration (ng/g)	50	100	250	500	800	1000
Recouvrement OTC(%)						
Moyen	45,7	38,8	39,7	39,4	37,5	28,8
Maximum	65,7	43,0	54,2	43,5	45,5	32,4
Minimum	32,1	32,2	31,4	35,5	28,2	25,0
Recouvrement TC(%)						
Moyen	39,1					
Maximum	49,2					
Minimum	31,1					
Limite de détection	15 ng/g					
Limite de quantification	50 ng/g					

Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques de la méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les bryophytes ont été conservées. Dans ces conditions les chromatogrammes en figure 16 sont obtenus.

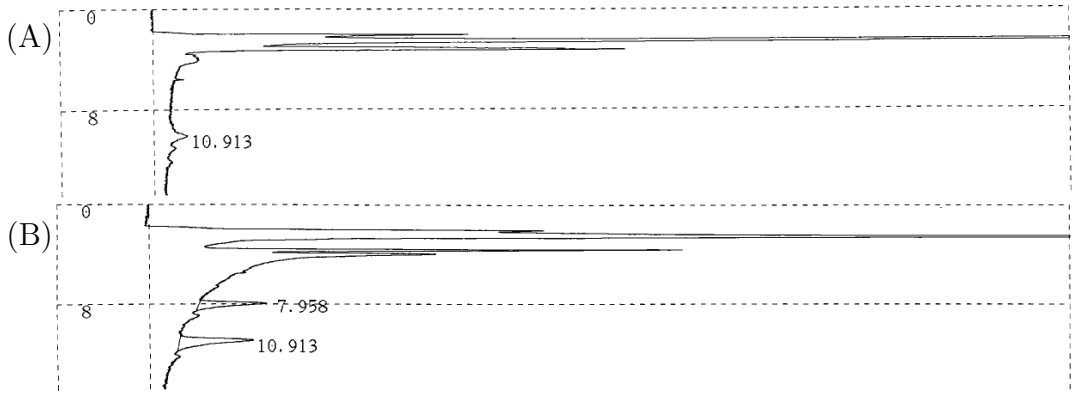


FIG. 16 – *Chromatogrammes (A) d'un échantillon de vase supplémenté à 500 ng/g en tétracycline et non supplémenté en oxytétracycline ; (B) d'un échantillon de vase supplémenté avec respectivement 250 et500 ng/g d'oxytétracycline (7,96 min) et de tétracycline (10,91 min).*

Extraction, purification et recouvrements

La cartouche d'extraction Bond Elut Certify® est constituée d'une phase mixte. Elle contient en effet à la fois de la silice greffée octadécyle et de la silice greffée acide benzène-sulfonique. Elle se comporte donc à la fois comme une silice greffée échangeuse de cations et une silice greffée apolaire.

Etant donné leur caractère échangeur de cations, ces phases doivent être activées par du méthanol puis conditionnées avec un tampon acide (celui utilisé pour l'extraction liquide/solide). Les tétracyclines, pour être retenues, doivent avoir une charge globale positive. Il faut donc que le pH soit inférieur à leur premier pKa (3,3). Le pH est remonté par de l'acétate d'éthyle contenant 4 % d'ammoniaque. Les tétracyclines sont alors éluées par une phase aqueuse.

La validation dans les trois types de sédiments a permis de s'assurer que les qualités de la méthode étaient acceptables pour toutes les matrices. Plus le sédiment contient de la matière organique (vase>vase sableuse>sable), plus le pic matrice est important. Dans ce cas une purification plus efficace a permis de résoudre les problèmes liés aux matrices dulçaquicoles.

Les rendements d'extraction obtenus pour la vase sableuse et le sable ne sont pas significativement différents au risque de première espèce de 5 % (figure 17). Le rendement obtenu pour la vase est, par contre, significativement différent. L'effet « type de sédiment »

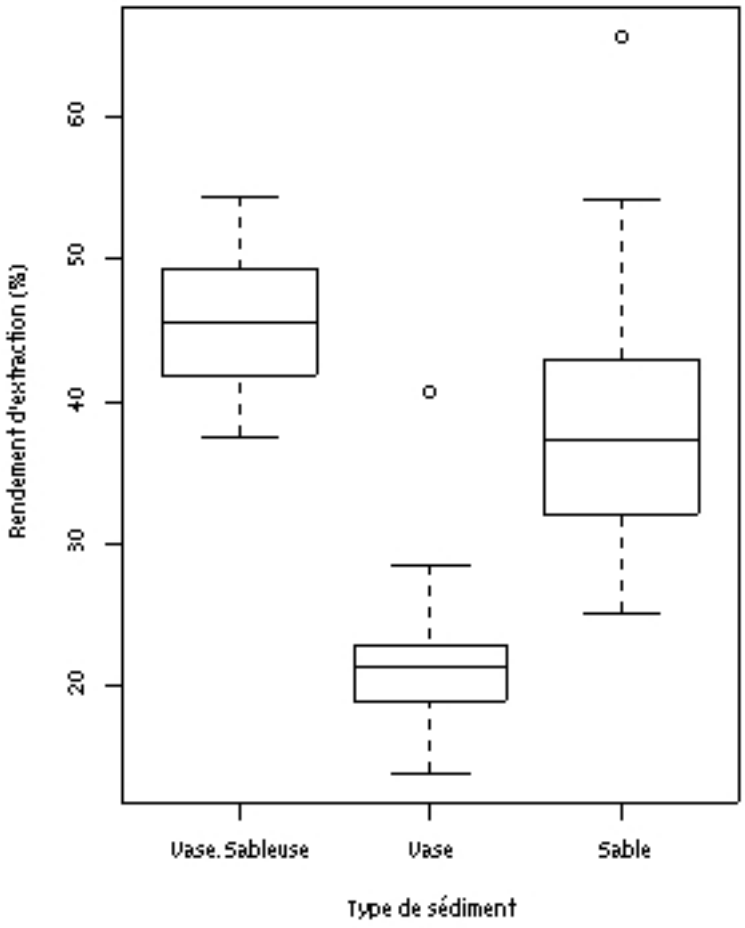


FIG. 17 – *Rendements d'extraction de la méthode de dosage de l'oxytétracycline dans les différents types de sédiments dulçaquicoles.*

est donc significatif et devra être pris en compte lors du dosage des échantillons. En effet, un sédiment de type « vase sableuse » doit être analysé par rapport à une gamme extraite à partir d'une « vase sableuse ».

Linéarité, régression, fidélité, exactitude, limites de détection et de quantification

La méthode est linéaire entre 50 et 1000 ng/g. Elle est fidèle avec des coefficients de variation moyens de répétabilité et de fidélité intermédiaire respectivement de 6,1 et 10,6 %. La méthode est exacte, avec des biais toujours inférieurs à 15 %. La limite de

détection calculée est de 15 ng/g.

6 Conclusion

Les méthodes décrites ci-avant sont toutes spécifiques car on n'observe aucun pic coéluant avec les pics correspondant aux antibiotiques et les temps de rétention sont constants.

La validation des méthodes de dosage décrites précédemment montre que le modèle linéaire ne peut pas être rejeté. En effet, outre les coefficients de correlation satisfaisants, pour chacune des droites d'ajustement, le test de Fisher a permis de déterminer que la pente est significative et l'ajustement valide au risque 5 %.

Les méthodes de dosage de l'oxytétracycline dans le milieu dulçaquicole ont fait l'objet de tests de linéarité supplémentaires. L'homoscédasticité est vérifié par les graphiques de normalité des résidus (figure 18) et par les tests de Cochran (tableau 11).

TAB. 11 – *Tableau de synthèse des tests de Cochran d'homogénéité des variances des résidus de linéarité lors des validations des méthodes de dosage de l'oxytétracycline.*

Méthode de dosage	Critère de Cochran	Valeur critique ($\alpha = 0,05$)	Homoscédasticité
Vase sableuse	0,427	0,616	oui
Vase	0,432	0,781	oui
Sable	0,374	0,781	oui
Fontinalis antipyretica	0,283	0,616	oui

L'exactitude est estimée par les biais des échantillons de contrôle par rapport à la concentration théorique. Ce biais est compris entre ±15 % pour les méthodes de dosage de l'acide oxolinique et de l'oxytétracycline dans les sédiments et ±30 % pour les méthodes de dosage de la fluméquine dans les sédiments et de l'oxytétracycline dans les bryophytes. Cette valeur de ±30 % peut paraître élevée. Néanmoins, les méthodes décrites sont destinées à être appliquées à des échantillons de terrain. Lors d'une contamination de ces échantillons par des antibiotiques, on observe, chez les bryophytes, de grandes variations de concentrations au sein même d'une touffe. Les erreurs systématiques de la méthode deviennent alors négligeables devant la variabilité naturelle des échantillons.

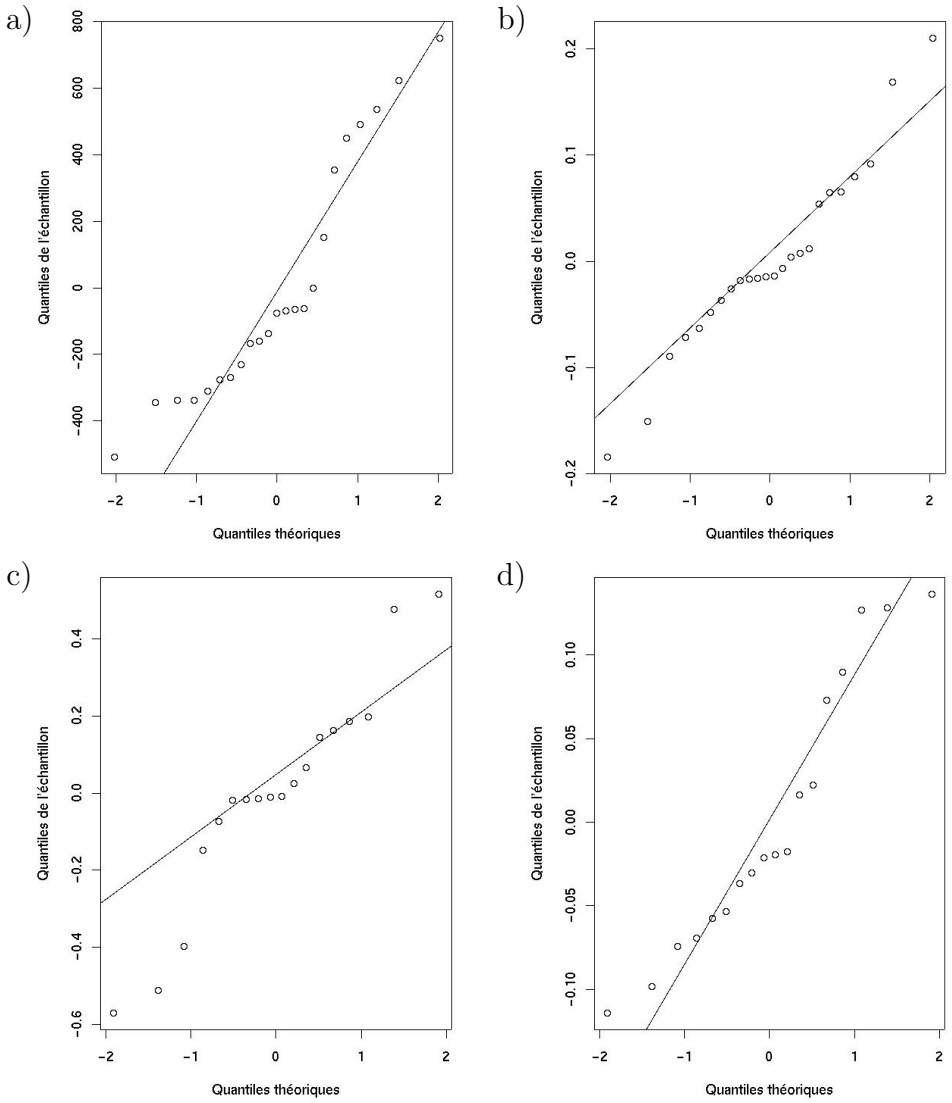


FIG. 18 – *Graphiques de normalité des résidus des ajustements lors des essais de linéarité des validations des méthodes de dosage de l'oxytétracycline dans* Fontinalis antipyretica *(a), les sédiments dulçaquicoles de type vase sableuse, vase et sable (b,c,d).*

Les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont au plus très proches de respectivement 10 et 20 %. Ces valeurs permettent aisément de pouvoir comparer les données obtenues au cours des différents dosages.

Les rendements d'extraction sont à la fois plus stables et plus élevés pour la méthode de dosage de l'acide oxolinique et de la fluméquine dans les sédiments dulçaquicoles (60–80 %) que pour les méthodes de dosage de l'oxytétracycline (30–40 %). Ceci explique l'absence

de standard interne pour la méthode de dosage de l'acide oxolinique et de fluméquine dans les sédiments dulçaquicoles. Les problèmes liés à la variabilité ainsi qu'à la faible valeur du rendement d'extraction des méthodes de dosage de l'oxytétracycline sont partiellement résolus par l'utilisation de la tétracycline comme standard interne.

Troisième partie

Etude expérimentale du devenir de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline en milieu dulçaquicole

1 Devenir dans l'eau

Cette étude a trois objectifs. Le premier est d'étudier l'influence du pH, de l'intensité lumineuse et de la concentration en antibiotique sur la photodégradation et l'hydrolyse de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline. Le second est d'étudier de façon comparative la cinétique de photodégradation et d'hydrolyse de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline dans l'eau ultra-pure, l'eau douce et l'eau de mer. Le dernier est enfin de déterminer les cinétiques de biodégradation de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline dans l'eau douce.

1.1 Photostabilité et hydrolyse

1.1.1 Matériels et méthodes

Eau

L'eau ultra-pure utilisée pour cette étude est produite par un système de production d'eau MilliQ academic (Millipore, Bedford, MA, Etats-Unis).

L'eau douce provient de la Chézine (Loire-Atlantique, France). Elle est prélevée dans le courant, en surface, et maintenue à +4 °C au laboratoire. Les caractéristiques chimiques de cette eau sont résumées dans le tableau 12.

Tab. 12 – *Caractéristiques chimiques de l'eau de la Chézine.*

Chlorures	26	mg/L Cl^-
Sulfates	26	mg/L SO_4^{2-}
Hydrogéno-carbonates	54,9	mg/L HCO_3^-
Calcium	17,4	mg/L Ca^{2+}
Magnésium	5,1	mg/L Mg^{2+}
Sodium	22,5	mg/L Na^+
Potassium	3,7	mg/L K^+
pH	7,95	

L'eau de mer reconstituée est préparée par dissolution de 40 g de sel de mer (Sigma, Saint Louis, MO, Etats-Unis) dans 1 L d'eau ultra-pure. Les caractéristiques chimiques de cette eau sont résumées dans le tableau 13.

TAB. 13 – *Caractéristiques chimiques de l'eau de mer reconstituée.*

Chlorures	20264	mg/L Cl^-
Sulfates	2799	mg/L SO_4^{2-}
Hydrogéno-carbonates	202	mg/L HCO_3^-
Calcium	419	mg/L Ca^{2+}
Magnésium	1386	mg/L Mg^{2+}
Sodium	11323	mg/L Na^+
Potassium	423	mg/L K^+
pH	8,35	

Les trois types d'eau sont stérilisés avant le début de l'expérimentation par passage sur membrane de porosité 0,22 μm (Stéricup 0,22 μm, Millipore, Bedford, MA, Etats-Unis).

Protocole d'étude

Plan d'expériences

Un plan d'expériences est réalisé dans l'eau ultra-pure pour étudier l'influence de différents facteurs sur la photodégradation et l'hydrolyse de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline. Ces paramètres sont le temps de dégradation, la concentration en antibiotique, la température de l'eau, la luminosité, le pH de l'eau et la quantité d'oxygène dissous dans l'eau.

Le temps de dégradation est évidemment un paramètre extrêmement critique de la photodégradation. La mesure de son influence est, par définition, le but d'une étude cinétique. Il n'est donc pas utile de faire varier ce paramètre dans le cadre de cette étude préliminaire. Il est fixé à 7 j .

La concentration est également un paramètre critique. Il est important de connaître la fonction de réponse de la dégradation en fonction de la concentration. Seules des gammes de concentrations peuvent déterminer cette fonction de réponse. Pour le plan d'expériences, la concentration en antibiotique est fixée à 1 μg/mL. L'effet des concentrations est ensuite étudié en maintenant dans les conditions optimales pendant 7 j des tubes contenant de l'eau à 500 ng/mL, 700 ng/mL, 1000 ng/mL, 1500 ng/mL pour l'oxytétracycline et 100 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL pour l'acide oxolinique et la fluméquine.

La lumière est fournie par un tube néon de type Biolux®. La distance des tubes à la

source lumineuse est fixée de manière à obtenir des luminosités de 0, 700 et 1400 lux.

Le pH de l'eau est ajusté par ajout d'acide chlorhydrique 1 mol/L ou de soude 1 mol/L. Les pH étudiés doivent reflèter le domaine de pH observable *in situ* (7,5 à 8,5).

La quantité d'oxygène dissous peut intervenir dans les phénomènes d'oxydation. L'eau est donc saturée en oxygène par bullage d'air ou appauvrie en oxygène par bullage d'azote (environ 100 % ou 10 % d'oxygène respectivement).

Afin d'obtenir des conditions stériles, les solutions sont filtrées sur membrane de porosité 0,22 μm puis réparties dans des tubes en quartz préalablement stérilisés (110 °C pendant 1 h, tubes bouchés). Ces tubes sont ensuite placés dans les conditions prévues par le plan d'expériences (tableau 14). Les prélèvements sont effectués en triplicata au bout de 7 j et immédiatement analysés.

TAB. 14 – *Matrice d'expériences du plan 2^3 de stabilité des antibiotiques dans l'eau ultra-pure.*

Numéro de l'essai	Facteur 1 (pH)	Facteur 2 (O_2)	Facteur 3 (Luminosité)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0

niveau -	7,5	10 %	0 lux
niveau 0	8,0	50 %	700 lux
niveau +	8,5	100 %	1400 lux

Etude de la cinétique

Quelques rappels de cinétique sont disponibles en annexe B. Pour chaque molécule, la solution contenant 1 μg/mL d'antibiotique est filtrée sur membrane de porosité 0,22 μm et répartie dans des tubes en quartz (Batailler, Nantes, France). Immédiatement après la filtration, 3×1 mL de solution sont prélevés et stockés à -18 °C. Ce point de prélèvement correspond à J_0.

Les tubes sont alors placés sur un portoir dans une étuve maintenue à 8±1 °C dont la température est vérifiée à chaque prélèvement. Un tube néon de type Biolux® fournit une intensité lumineuse mesurée à chaque prélèvement et doit être comprise entre 1350 et 1450 lux. Les tubes servant de témoins sont placés à l'obscurité. Avant chaque prélèvement, les tubes sont agités 10 fois par retournement.

Des prélèvements de 1 mL sont effectués en triplicata aux temps 6 h, 1 j, 1 j+6 h, 2 j, 3 j, 4 j, 7 j, 8 j, 9 j, 10 j, 11 j et 14 j. Ils sont immédiatement stockés à -18 °C.

La concentration en antibiotique est déterminée à l'issue de l'expérimentation.

1.1.2 Résultats et discussion

Les résultats du plan d'expériences dans l'eau ultra-pure sont résumés dans le tableau 15. Les plans sont valides car les effets des point moyens (essais 9 et 10) sont proches de la moyenne des effets. Un effet est considéré comme significatif lorsqu'il est au moins égal à 10 % de la moyenne des effets.

Aucun des trois paramètres étudiés ne semble avoir d'influence sur la dégradation de l'acide oxolinique et de la fluméquine. Ceci confirme la stabilité de ces deux molécules. Seuls le pH et l'intensité lumineuse semblent avoir un effet positif sur la dégradation de l'oxytétracycline. L'effet du pH peut laisser supposer l'existence de phénomènes d'hydrolyse et l'effet de la luminosité rend compte d'une réelle photosensibilité de cette molécule.

Les conditions optimales pour l'étude de la linéarité sont obtenues à partir des effets du plan d'expériences. Pour obtenir la dégradation la plus rapide, le pH et la luminosité sont maximisés (8,5 et 1400 lux respectivement).

TAB. 15 – *Matrice des effets du plan 2^3 de stabilité des antibiotiques dans l'eau ultra-pure. Seuls le pH et la luminosité ont un effet significatif sur la dégradation de l'oxytétracycline.*

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur 1 pH	Facteur 2 O_2	Facteur 3 Lum	interaction 12	interaction 13	interaction 23	interaction 123	Réponse AO	Réponse FLU	Réponse OTC
1	+	-	-	-	+	+	+	-	0,63	1,05	0,81
2	+	+	-	-	-	-	+	+	0,65	1,02	0,54
3	+	-	+	-	-	+	-	+	0,58	1,04	0,85
4	+	+	+	-	+	-	-	-	0,67	1,03	0,46
5	+	-	-	+	+	-	-	+	0,59	1,02	0,46
6	+	+	-	+	-	+	-	-	0,67	1,02	0,22
7	+	-	+	+	-	-	+	-	0,55	1,03	0,66
8	+	+	+	+	+	+	+	+	0,63	1,05	0,28
9	0	0	0	0	0	0	0	0	**0,69**	**1,03**	**0,55**
10	0	0	0	0	0	0	0	0	**0,65**	**1,04**	**0,43**
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8			
Effets											
AO	**0,620**	0,034	-0,015	-0,010	0,008	0,006	-0,008	-0,009			
FLU	**1,032**	-0,002	0,005	-0,003	0,005	0,009	0,006	0,000			
OTC	**0,535**	**-0,160**	0,028	**-0,130**	-0,033	0,005	0,038	-0,003			

TAB. 16 – *Résultats de l'étude de linéarité pour l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline.*

	Stabilité (%)		
Concentration	AO	FLU	OTC
100 ng/mL	24,4±0,6	95,9±3,2	—
250 ng/mL	38,1±0,3	92,1±1,6	—
500 ng/mL	48,3±1,1	98,9±1,3	63,4±0,9
750 ng/mL	—	—	59,5±1,0
1000 ng/mL	69,1±0,8	95,9±0,3	75,4±0,4
1500 ng/mL	—	—	75,1±0,1

Les résultats obtenus avec les isothermes (tableau 16) ont permis un calcul de régression linéaire (tableau 17) avec l'équation $\%Stab = k \times C + \%Stab_{min}$ où $\%Stab$ est la stabilité de la molécule exprimée en pourcentage, k la pente de la droite en %/ng/mL, C la concentration en antibiotique et $Stab_{min}$ la stabilité en pourcentage lorsque C tend vers 0.

TAB. 17 – *Paramètres de régression calculés pour les isothermes de photodégradation.*

	AO	FLU	OTC
$\%Stab_{min}$ (%)	23 ‡	95 ‡	55 ‡
pente k (%/ng/mL)	$4{,}7.10^{-2}$ ‡	$0{,}2.10^{-2}$ *	$1{,}5.10^{-2}$ †

* Non significatif. † Significatif au risque 5 %. ‡ Significatif au risque 0,1 %

Les résultats, en terme de stabilité, sont en contradiction avec ceux du tableau 15. En effet, l'acide oxolinique semble ici moins stable que l'oxytétracycline. L'acide oxolinique est l'antibiotique dont la stabilité est le plus dépendante de la concentration. La stabilité minimale est de 23 % alors qu'elle est de 55 % pour l'oxytétracycline et de 95 % pour la fluméquine. La stabilité de la fluméquine ne semble pas être non plus influencée par la concentration en antibiotique.

Les cinétiques de dégradation de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline semblent être d'ordre 1 car une transformation logarithmique linéarise les données. Après linéarisation, les vitesses de dégradation k_1 ont été déterminées (tableau 18). Le temps de demi-vie est calculé par l'équation 6 à partir de la pente des droites significativement différente de 0 au risque inférieur ou égal à 5 % (tableau 19).

TAB. 18 – *Tableau de synthèse des vitesses de dégradation en condition abiotiques.*

k_1 / Eau	Obscurité			Lumière		
	AO	FLU	OTC	AO	FLU	OTC
ultra-pure	0,0093 †	0,0001 *	0,0070 *	0,0105 †	0,0003 ‡	0,0424 ‡
Douce	0,0000 *	0,0001 *	0,0136 ‡	0,0016 *	0,0002 *	0,1422 ‡
Mer	0,0000 *	0,0000 *	0,0135 ‡	0,,0070 †	0,0002 ‡	0,1610 ‡

* Non significatif. † Significatif au risque 5 %. ‡ Significatif au risque 0,1 %

TAB. 19 – *Tableau de synthèse des temps de demi-vie de dégradation en condition abiotiques.*

$t_{\frac{1}{2}}$ / Eau	Obscurité			Lumière		
	AO	FLU	OTC	AO	FLU	OTC
ultra-pure	75 j	ND	ND	66 j	108 j	16 j
Douce	ND	ND	51 j	ND	ND	5 j
Mer	ND	ND	51 j	99 j	121 j	4 j

ND : non déterminé (pente non significativement différente de 0)

L'étude comparée de la stabilité de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline permet de montrer que les quinolones et l'oxytétracycline ont des stabilités différentes. Les molécules sont moins stables dans l'ordre fluméquine>acide oxolinique>oxytétracycline. Les phénomènes d'hydrolyse estimés par la dégradation à l'obscurité sont globalement peu importants. Seule l'hydrolyse de l'oxytétracycline dans l'eau de mer et l'eau douce ainsi que celle de l'acide oxolinique dans l'eau ultra-pure est détectée au bout de 14 j.

La persistance de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline dans l'eau a été abordée au paragraphe 7.2. Peu d'études concernent les quinolones mais quelques précisions peuvent être apportées concernant l'oxytétracycline. Doi et Stoskopf (2000) ont montré l'importance de la température, du pH et de la lumière sur la dégradation de l'oxytétracycline. Le temps de demi-vie diminue de 14 à 0,26 j lorsque la température augmente de 25 °C à 43 °C et de 46,4 à 9,1 j quand le pH passe de 3 à 10. Cette même étude montre que la dégradation de l'oxytétracycline est trois fois plus importante à la lumière qu'à l'obscurité.

Liang *et al.* (1999) ont étudié la dégradation de la tétracycline dans le méthanol. Après six mois à température ambiante, quatorze nouveaux produits de dégradation ont été mis en évidence dont huit ont été identifiés (figure 19). Aucun de ceux décrits au paragraphe 7.2 n'ont cependant été identifiés dans cette étude.

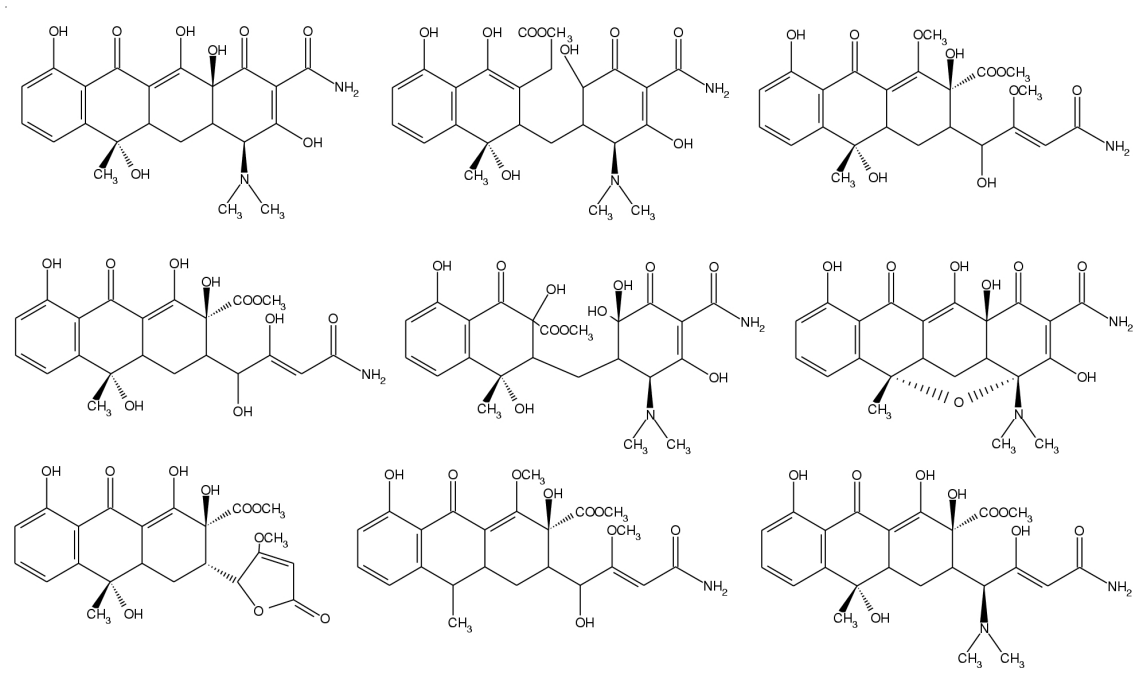


FIG. 19 – *Produits de dégradation de la tétracycline (première molécule sur le schéma) identifiés par Doi et Stoskopf (2000).*

L'oxytétracycline est plus stable dans l'eau ultra-pure que dans l'eau douce ou l'eau de mer. Le tableau 15 montre que le pH est le paramètre ayant le plus d'effet sur la dégradation de l'oxytétracycline. La dégradation de l'oxytétracycline dans les trois types d'eau varie bien dans le sens du pH (tableaux 12, 13 et pH de l'eau ultra-pure=7). Ce facteur joue donc un rôle prépondérant dans la photodégradation mais également l'hydrolyse de l'oxytétracycline.

La biodégradation de l'oxytétracycline dans l'eau douce est lente (Ingerslev *et al.*, 2001). Le temps de demi-vie calculé est de 45,9 j et n'est pas fonction de la concentration d'antibiotique. Les conditions anaérobies réduisent la vitesse de dégradation de l'oxytétracycline et le temps de demi-vie peut alors atteindre 175 j.

Les phénomènes d'hydrolyse sont peu ou pas responsables de la dégradation de l'acide oxolinique et de la fluméquine. Ces molécules sont cependant sensibles à la lumière.

Cette photodégradation n'a pas été mise en évidence après 7 j lors du plan d'expériences. Elle est cependant détectée dans l'eau ultra-pure que dans l'eau de mer ou l'eau douce. La stabilisation des quinolones peut être due à la formation de complexes avec les ions divalents. Ceci a été mis en évidence pour les quinolones avec le cuivre II (Mendoza-Diaz *et al.*, 1996) et plus récemment pour des macromolécules (Belfiore *et al.*, 2001). Si la complexation des quinolones avec les ions divalents était leur seule source de stabilisation, la stabilité dans l'eau de mer devrait être supérieure à celle dans l'eau douce. Les résultats présentés dans les tableaux 12 et 13 sont en contradiction avec cette hypothèse. Il faut donc envisager un autre mécanisme de stabilisation des quinolones. Compte tenu des paramètres chimiques des deux types d'eau et de la capacité d'adsorption des quinolones sur la matière organique (Kukkonen et Landrum, 1996), notamment les acides humiques (tableaux 12 et 13), il est possible de considérer un phénomène de stabilisation de l'acide oxolinique et de la fluméquine par adsorption sur la matière organique. Cette hypothèse n'est pas vérifiée mais peut servir de base de travail à des essais complémentaires.

1.2 Biodégradation

1.2.1 Matériels et méthodes

Le protocole d'étude est largement inspiré de la ligne directrice 306 de l'OCDE (OCDE, 1992). Cette ligne directrice relative à la biodégradabilité dans l'eau de mer propose deux méthodes.

La première méthode, dite du flacon fermé, est utilisée pour reproduire les conditions environnementales dans lesquelles l'eau n'est pas réoxygénée régulièrement. La solution d'antibiotique est conservée dans un flacon rempli fermé, dans l'obscurité et dans une enceinte thermostatée.

La deuxième méthode, dite du flacon agité, est utilisée pour reproduire des conditions environnementales aérobies. La solution d'antibiotique est conservée dans un flacon rempli à moitié, agité dans l'obscurité et dans une enceinte thermostatée.

Le protocole d'étude décrit ici est inspiré de la méthode du flacon agité car celle-ci correspond mieux aux conditions environnementales des cours d'eau étudiés.

Préparation de l'eau

Quatre solutions nutritives sont préparées dans l'eau ultra-pure. La solution nutritive A est préparée par dissolution de 8,5 g de dihydrogénophosphate monopotassique (KH_2PO_4), de 21,75 g d'hydrogénophosphate dipotassique (K_2HPO_4), de 33,3 g d'hydrogénophosphate disodique dihydraté (Na_2HPO_4, 2 H_2O) et de 0,5 g de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) dans 1 L d'eau ultra-pure. La solution nutritive B est préparée par dissolution de 27,50 g de chlorure de calcium anhydre ($CaCl_2$) dans 1 L d'eau ultra-pure. La solution nutritive C est préparée par dissolution de 22,50 g de sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4$, 7 H_2O) dans 1 L d'eau ultra-pure. La solution nutritive D est préparée par dissolution de 22,50 g de chlorure de fer III hexahydraté ($FeCl_3$, 6 H_2O) dans 1 L d'eau ultra-pure dans laquelle une goutte d'acide chlorhydrique concentré est ajoutée.

L'eau douce utilisée pour ces essais est la même que celle utilisée pour les essais de photodégradation. Elle provient de la Chézine (Loire-Atlantique, France) et est filtrée sur filtre GF-C (Whatman, Maidstone, Angleterre) afin d'en éliminer les matières en suspension. Les caractéristiques chimiques de cette eau sont résumées dans le tableau 12.

Afin de permettre une croissance optimale des bactéries, 1 mL de chacune des quatre solutions nutritives est ajouté par litre d'eau douce.

Préparation des flacons pour l'étude

Lors de la préparation, les flacons doivent être propres et sans trace de contamination due aux essais de protocoles précédents, mais non nécessairement stériles. Les erlenmeyers utilisés pour l'étude de biodégradation sont donc lavés avec de l'acide chlorhydrique alcoolique, puis rincés et séchés.

L'eau douce contenant des éléments nutritifs (250 mL) est versée dans un erlenmeyer de 500 mL propre et sec. L'antibiotique et/ou la substance de référence sont ajoutés (tableau 20) puis les flacons sont recouverts de façon non hermétique à l'aide d'un morceau de feuille d'aluminium. Les flacons sont alors placés dans une enceinte thermostatée à 15±2 °C à l'obscurité puis agités à plat à environ 100 t/min.

Un prélèvement de 2 mL est réalisé dans chaque flacon immédiatement après préparation des solutions puis après 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 25 et 42 j. Ces échantillons sont immédiatement stockés à -18 °C et les concentrations en antibiotique et substance de

référence sont déterminées à l'issue de l'expérimentation.

Flacons pour l'étude

Pour chaque antibiotique, deux flacons sont utilisés pour étudier la dégradation dans l'eau douce. Afin de faciliter l'interprétation des résultats, il est nécessaire de faire des essais complémentaires à ceux de biodégradation stricte. Un témoin de biodégradation est utilisé pour vérifier la capacité de biodégradation du système. L'aniline est utilisée car c'est une substance biodégradable dont le temps de demi-vie varie de 1 à 10 j. De même, un témoin en conditions abiotiques est nécessaire pour distinguer la part de dégradation due aux bactéries de celle due à l'hydrolyse. Le chlorure mercurique ($HgCl_2$) est un biocide puissant. Il est utilisé à la concentration de 1 mg/L pour stériliser l'eau des essais. Dans ces conditions, 16 flacons sont nécessaires à l'étude de biodégradation de l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline (tableau 20).

Tab. 20 – *Flacons nécessaires à l'étude de biodégradation.*

Flacons	OTC (μg/mL)	AO (μg/mL)	FLU (μg/mL)	Aniline (μg/mL)	$HgCl_2$ (mg/mL)	Eau douce (mL)
1 et 2	1	0	0	0	0	250
3 et 4	0	1	0	0	0	250
5 et 6	0	0	1	0	0	250
7	1	0	0	1	0	250
8	0	1	0	1	0	250
9	0	0	1	1	0	250
10	0	0	0	1	0	250
11	1	0	0	0	1	250
12	0	1	0	0	1	250
13	0	0	1	0	1	250
14	0	0	0	1	1	250
15 et 16	0	0	0	0	0	250

La concentration de chaque molécule dans les flacons est de 1 μg/mL.

Dénombrement bactérien

Le comptage est réalisé sur les bactéries aérobies et anaérobies facultatives cultivables sur milieu PCA (plate count agar). Les bactéries aérobies totales cultivables sont donc

dénombrées dans chaque flacon sur un milieu nutritif non sélectif de type PCA au début et à la fin de l'expérimentation. Chaque dilution (10^0, 10^{-1}, 10^{-2}) est étalée en triplicata et incubée 48 h à 22 °C.

1.2.2 Résultats et discussion

Les essais de biodégradation ont été réalisés à l'obscurité pour éviter un développement algal. La température est de 15 °C pour que les bactéries puissent se développer de façon optimale. Dans ces conditions, il est difficile de comparer les résultats de cette étude à ceux du paragraphe 1.1.2.

Le dénombrement bactérien a montré que les flacons contenant du mercure ont bien été stérilisés car aucune bactérie cultivable n'a été détectée dans ces conditions. La quantité de bactéries dans les flacons en condition biotique aérobie n'a pas diminuée après 42 j d'expérimentation. Des différences d'aspects des colonies bactériennes cultivées avant et après l'expérimentation ont été observées indiquant une importante modification qualitative du peuplement bactérien dans tous les flacons.

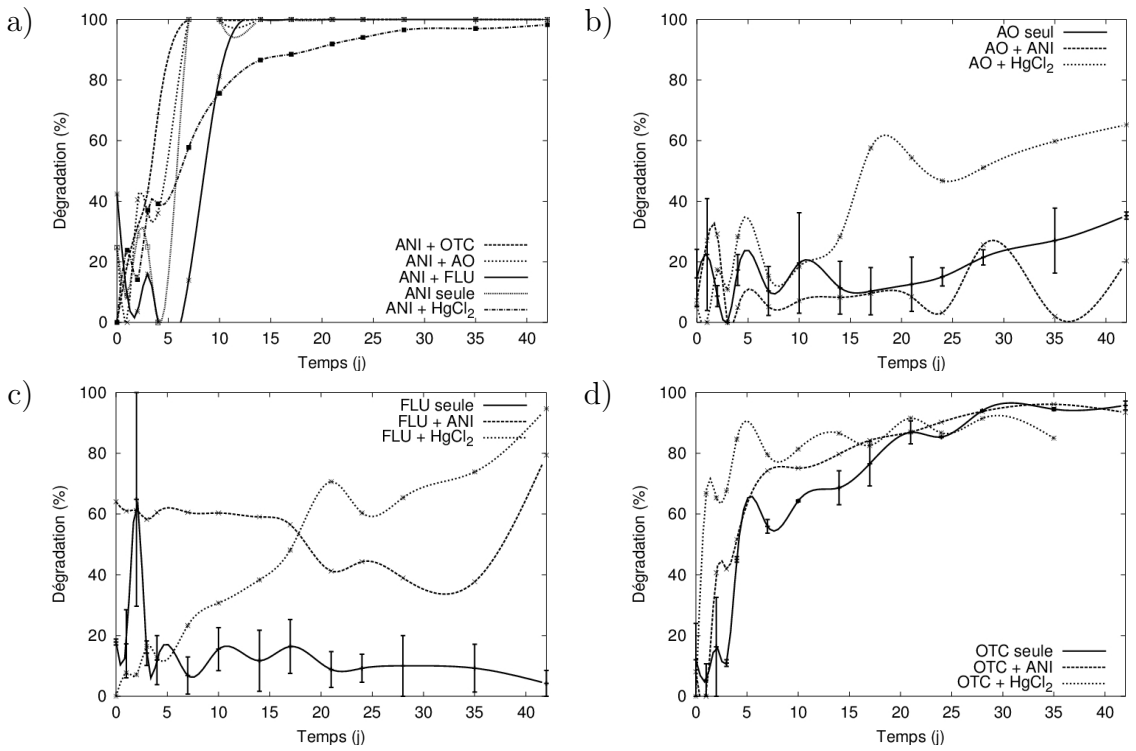


FIG. 20 – *Biodégradation de a) l'aniline (ANI) ; b) l'acide oxolinique (AO) ; c) la flumé-quine (FLU) et d) l'oxytétracycline (OTC).*

TAB. 21 – *Résultats des essais de biodégradation. Seule l'oxytétracycline semble être sensible à la biodégradation.*

Flacons	Pente				$t_{\frac{1}{2}}$			
	OTC	AO	FLU	ANI	OTC	AO	FLU	ANI
1	0,0767 ‡	—	—	—	9 j	—	—	—
2	0,0855 ‡	—	—	—	8 j	—	—	—
3	—	0,0065 †	—	—	—	107 j	—	—
4	—	0,0040 *	—	—	—	ND	—	—
5	—	—	0,0000 *	—	—	—	ND	—
6	—	—	0,0000 *	—	—	—	ND	—
7	0,0746 ‡	—	—	0,2673 †	9 j	—	—	3 j
8	—	0,0001 *	—	0,0766 *	—	ND	—	ND
9	—	—	0,0000 *	0,1086 *	—	—	ND	ND
10	—	—	—	0,0000 *	—	—	—	ND
11	0,0409 ‡	—	—	—	17 j	—	—	—
12	—	0,0245 ‡	—	—	—	28 j	—	—
13	—	—	0,0039 ‡	—	—	—	18 j	—
14	—	—	—	0,1009 ‡	—	—	—	7 j

* Non significatif. † Significatif au risque 5 %. ‡ Significatif au risque 0,1 %

Les résultats obtenus lors des essais de biodégradation sont résumés dans la figure 20 et le tableau 21. Les paramètres utilisés pour évaluer la biodégradation sont la durée de la phase de latence (t_L) et le temps nécessaire après la phase de latence pour obtenir 50 % de dégradation (t_{50}) (figure 21). La toxicité des molécules étudiées sur la flore du milieu est évaluée par comparaison de la dégradation d'une molécule de référence (aniline) en présence et en l'absence des molécules étudiées.

Une méthode de dosage de l'aniline dans l'eau douce a été mise au point, elle est résumée en annexe C. L'aninile est dégradée seule et en présence des trois antibiotiques (figure 20 a). La présence de fluméquine semble cependant induire une courte phase de latence. La présence de mercure modifie l'allure de la courbe et ralentit la dégradation de l'aniline. Dans ces conditions, la capacité de biodégradation du système microbien peut être considérée comme normale.

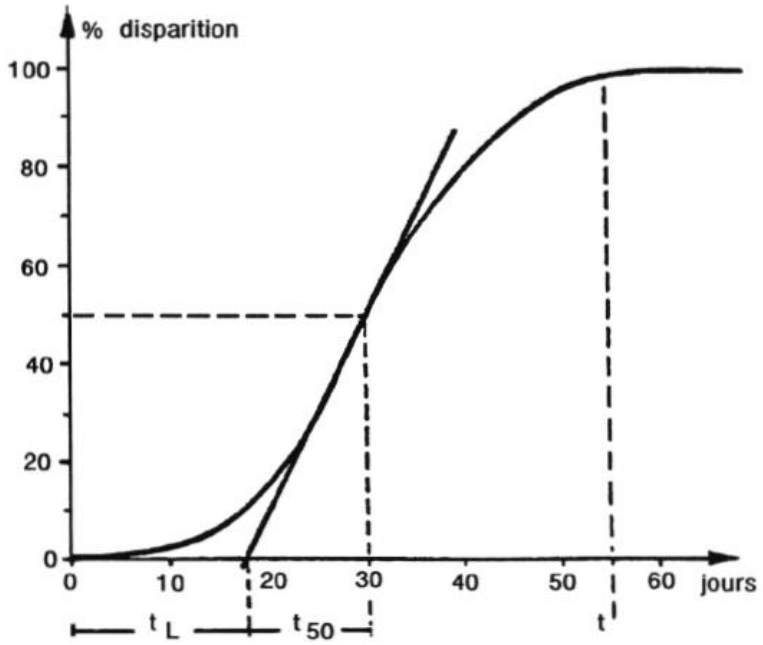


FIG. 21 – *Modèle de biodégradation d'une molécule organique.*

L'acide oxolinique et la fluméquine (figure 20 b et c) ne sont pas plus dégradés en présence de bactéries qu'en eau douce axénique. Ils ne sont donc pas dégradés par les micro-organismes présents dans les flacons. Martens *et al.* (1996) ont cependant mis en évidence la dégradation d'une fluoroquinolone par un champignon responsable de la putréfaction du bois.

L'acide oxolinique et la fluméquine sont cependant dégradés dans les tubes axéniques. Ces résultats sont en complète contradiction avec ceux du paragraphe 1.1.2. Cette dégradation peut être attribuée à différents facteurs. Tout d'abord, la température des essais a varié de 8 °C à 15 °C ; cependant les essais, à la même température et en présence de micro-organismes, n'ont pas montré de dégradation plus importante que les essais de photostabilité du paragraphe 1.1.2. L'effet température dans ce cas peut donc être écarté. Ensuite, les conditions axéniques sont obtenues par la présence de mercure dans le flacon. Une interaction entre le mercure et les quinolones est envisageable. Cette interaction peut être de deux ordres. Le mercure pourrait se chélater avec les quinolones et ce complexe ne serait plus dosé dans les conditions chromatographiques fixées. Cette hypothèse semble peu probable car une telle réaction est habituellement beaucoup plus rapide et n'a pas des temps de demi vie de plusieurs jours. Le mercure est également un puissant catalyseur souvent utilisé dans les réactions de synthèse organique. Les réactions d'hydrolyse pourraient donc être catalysées par la présence de mercure. La dégradation

observée serait donc due à une hydrolyse induite par la présence de mercure.

L'oxytétracycline se dégrade significativement plus rapidement dans les essais de biodégradation que dans ceux du paragraphe 1.1.2 (figure 20 d). Cette diminution du temps de demi-vie de 51 à 9 j peut être due à la biodégradation mais également à la température. Une augmentation de température est, en effet, responsable d'une dégradation plus rapide de l'oxytétracycline (Doi et Stoskopf, 2000). Le temps de demi-vie de l'oxytétracycline en conditions axéniques est cependant supérieur à celui des tubes 1 et 2. La biodégradation est donc bien une des causes de la dégradation de l'oxytétracycline dans l'eau douce. Le temps de demi-vie inférieur dans le tube 11 à celui obtenu dans l'obscurité dans l'eau douce au paragraphe 1.1.2 ne permet cependant d'exclure ni un effet température, ni un effet de catalyse par le mercure.

1.3 Conclusion

Les expérimentations sur la dégradation des antibiotiques dans l'eau ont montré une stabilité croissante dans l'ordre oxytétracycline, acide oxolinique et fluméquine.

L'étude de stabilité des antibiotiques dans l'eau a permis de mettre en évidence que les trois molécules étudiées étaient sensibles à la lumière, mais de façon moins marquée pour l'acide oxolinique et la fluméquine. Le pH semble avoir une influence sur la dégradation de l'oxytétracycline. La stabilité de l'oxytétracycline mais surtout de l'acide oxolinique est corrélée positivement à leur concentration dans l'eau. L'acide oxolinique et la fluméquine sont stabilisés dans l'eau douce. Cette stabilisation peut être due à une adsorption des quinolones sur la matière organique contenue dans l'eau. La dégradation plus rapide de l'oxytétracycline dans l'eau douce et l'eau de mer est probablement due à l'effet du pH.

Les essais de biodégradabilité des trois antibiotiques ont montré que l'acide oxolinique et la fluméquine sont peu ou pas biodégradables mais que la présence de mercure dans les tubes catalyse leur hydrolyse. L'oxytétracycline semble par contre être biodégradée

puisque le temps de demi-vie de dégradation chute de moitié en conditions biotiques.

2 Devenir dans les sédiments

2.1 Objectifs et enjeux

L'un des problèmes majeurs concernant les études habituellement menées sur les sédiments est le manque d'homogénéité des résultats dû à une trop grande variabilité dans les caractéristiques des sédiments (quand celles-ci sont disponibles). Cette étude tente d'apporter une réponse à ce problème en déterminant l'influence des différentes caractéristiques physico-chimiques des sédiments et de l'eau sur les constantes d'adsorption, de désorption et de dégradation des antibiotiques.

L'enjeu de cette étude est de trouver une relation entre les caractéristiques des sédiments et leurs capacités d'adsorption, de désorption et de dégradation des xénobiotiques. Il sera ensuite possible de « normaliser » le protocole afin de rendre les différentes études sur les sédiments comparables et de prédire les capacités d'adsorption, de désorption et de dégradation des trois antibiotiques étudiés pour un sédiment dont les caractéristiques physico-chimiques seront connues (Lawrence *et al.*, 2000).

2.2 Stratégie

La première étape est de choisir, *a priori*, les paramètres pouvant influencer le devenir de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline dans les sédiments. Parmi ces paramètres, un plan d'expériences permet de déterminer les plus critiques. Des isothermes permettront ensuite de déterminer les constantes cinétique d'adsorption, de désorption et de dégradation.

L'ensemble des données recueillies lors des différentes études ainsi que des mesures effectuées en faisant varier les paramètres désignés critiques par les plans d'expériences serviront enfin à réaliser une étude statistique descriptive des relations existant entre adsorption, désorption, dégradation et caractéristiques globales des sédiments.

2.3 Caractéristiques des sédiments et de l'eau

La matière organique est le principal adsorbant des xénobiotiques dans le sédiment. La distribution dépend de la teneur en carbone organique, de la taille des particules et des caractéristiques physico-chimiques des xénobiotiques. La fraction sédimentaire habituellement considérée comme adsorbante est la fraction pélitique dont le diamètre des particules est inférieur à 63 μm. Cette fraction est parfois utilisée seule pour simuler un sédiment complet (Albrechtsen *et al.*, 1997).

Sous jacent à la taille des particules, c'est en fait leurs caractéristiques physico-chimiques qui dictent l'adsorption de la matière organique. Pour Kukkonen et Landrum (1996), la particule de sédiment peut être vue comme une base inorganique, contenant un ou plusieurs minéraux, revêtue de molécules organiques telles que les substances humiques (Zhou *et al.*, 2001). Ainsi, une relation linéaire a été mise en évidence entre la fraction pélitique d'un sédiment marin et sa teneur en matière organique (Le Bris, 1988). Chaque minéral possède une charge de surface caractéristique (Sposito, 1992). Cette charge influence l'interaction entre la matière organique dissoute et la surface minérale (Wattel-Koekkoek *et al.*, 2001). Les minéraux, dont la smectite et la kaolinite sont les principaux représentants sédimentaires, possèdent un rôle très important dans la stabilisation des composés organiques (Wattel-Koekkoek *et al.*, 2001).

Ainsi, la nature de la matière organique dissoute et les caractéristiques de la phase aqueuse modifient l'adsorption (Zhou *et al.*, 1994). Une augmentation de la force ionique d'une solution conduit à une augmentation de l'adsorption de la matière organique dissoute sur différentes particules (Zhou *et al.*, 1994).

Certaines études laissent à penser que la flore bactérienne adsorbée sur les particules sédimentaires influencerait également l'adsorption des xénobiotiques (Rao *et al.*, 1993).

Certaines caractéristiques de l'eau, telles que le pH, la résistivité et la teneur en acides humiques, ont un effet caractéristique sur la dégradation et probablement l'adsorption et la désorption des antibiotiques.

2.4 Matériels et méthodes

2.4.1 Caractéristiques du milieu

Pour chaque sédiment, les teneurs en carbone organique total, matière organique totale, pélites, sable fin, sable moyen, rudites, acides humiques, carbonates, Mg, K, Na, Mn, Ca, Na, Fe sont mesurés. De même le pH, la résistivité et la teneur en acides humiques de l'eau sont déterminés.

2.4.2 Protocole expérimental

Le protocole expérimental est inspiré de la directive 106 de l'OCDE relative aux essais d'adsorption et de désorption.

Essai d'adsorption

Les solutions d'acide oxolinique, de fluméquine et d'oxytétracycline sont préparées dans de l'eau douce (Chézine). Une prise d'essai de 10 g de sédiment est placée dans un tube et un volume d'eau douce contenant l'antibiotique est ajouté au sédiment. L'agitation à l'agitateur rotatif (Heildolph®) commence immédiatement. Elle doit être continue et suffisante pour maintenir le sédiment en suspension mais ne doit pas être trop vigoureuse afin de ne pas briser la structure du sédiment. L'agitation est poursuivie jusqu'au temps d'équilibre. La suspension est alors centrifugée à 900×g pendant 5 min à +4 °C. Le surnageant est prélevé et son volume est mesuré. Une prise d'essai de 2 g de sédiment est réalisée. La concentration d'antibiotiques est enfin déterminée dans l'eau et le sédiment. Si m_{sed} est la masse de sédiment, C_s la concentration finale dans les sédiments, V_0 le volume initial d'eau, C_0 la concentration initiale de l'eau en antibiotique, V_e le volume de surnageant mesuré et C_e la concentration finale dans le surnageant, alors le coefficient d'adsorption est déterminé par l'équation 2.1.

$$K' = \frac{C_s \times m_{sed} - (V_0 - V_e) \times C_e}{m_{sed} \times C_e} \tag{2.1}$$

Essai de désorption

Un volume d'eau ne contenant pas d'antibiotique est ajouté au tube ayant servi pour l'essai d'adsorption (correction faite de la masse de sédiment prélevée). L'agitation à l'agitateur rotatif (Heildolph®) commence immédiatement. Un prélèvement de 1 mL d'eau est réalisé après centrifugation à 900×g pendant 5 min aux temps définis pour l'essai. Le surnageant est prélevé et son volume est mesuré. Une prise d'essai de 2 g de sédiment est

réalisée. La concentration d'antibiotiques est enfin déterminée dans l'eau et le sédiment. Les concentrations dans l'eau sont corrigées des volumes prélevés. La désorption est déterminée par le rapport final des concentrations dans l'eau et les sédiments.

Dégradation

La dégradation de l'antibiotique lors de l'essai est déterminée par un bilan de matière et définie comme étant la différence entre la quantité introduite dans le tube et la quantité dosée dans l'eau et le sédiment.

2.4.3 Essais préliminaires

Etude du potentiel bactéricide du chlorure mercurique

Le chlorure mercurique ($HgCl_2$) est un agent biocide utilisé pour rendre un sédiment axénique (Cornelissen *et al.*, 2000). L'objectif de cette étude préliminaire est de déterminer la concentration de $HgCl_2$ ainsi que le temps de contact nécessaires à la stérilisation d'un sédiment. L'ensemble des essais est réalisé sur une vase. L'efficacité de la stérilisation par $HgCl_2$ est testée aux concentrations de 0,001 %, 0,01 %, 0,1 % et 1 %, après 5, 10, 15, 30 et 60 min de contact. Un comptage des bactéries aérobies est réalisé après chaque traitement.

Afin d'être sûr de l'effet bactéricide de $HgCl_2$, des essais qualitatifs de bactéricidie sont réalisés en parallèle des essais quantitatifs.

Essais quantitatifs de bactéricidie Une masse de 1 g de sédiment vaseux est mélangée à 9 mL de solution aqueuse de chlorure de sodium à 9 g/L contenant une concentration croissante de $HgCl_2$. Le tube est agité vigoureusement pendant 10 s puis 5, 10, 15, 30 et 60 min à l'agitateur rotatif (Heildolph®). Lors des prélèvements, l'agitation est stoppée, et le sédiment est laissé au repos pendant 30 s afin d'obtenir une décantation. Des prélèvements de 100 μL sont étalés en triplicata sur milieu nutritif gélosé. Ces boîtes correspondent à une dilution 10^{-1}. Le surnageant est ensuite dilué 10, 100 et 1000 fois avant d'être étalé en triplicata sur milieu nutritif gélosé. Le témoin est réalisé avec de l'eau ne contenant pas de $HgCl_2$ étalée sur gélose au temps unique de 15 min.

Les boîtes sont ensuite mises à incuber à +20 °C pendant 48 h. Les résultats quantitatifs sont obtenus en comptant le nombre de colonies dans la boîte la « moins diluée » contenant entre 30 et 300 colonies. Les résultats sont donnés sous la forme de moyenne et écart-type des trois mesures à la même dilution.

Essais qualitatifs de bactéricidie Le protocole est le même que pour les essais quantitatifs mais les prélèvements sont de 1 mL et l'incubation est réalisée dans un milieu coeur, poumon et cervelle très riche à +20 °C pendant 3 j puis à +30 °C pendant 4 j. Seule la dilution 10^{-1} est testée.

Un résultat qualitatif est considéré positif si un trouble apparaît dans le tube au bout d'une semaine, sinon le résultat est négatif.

Détermination du temps d'équilibre

Le temps d'équilibre est le temps à partir duquel le rapport des concentrations dans l'eau et les sédiments reste constant. Afin de déterminer ce temps d'équilibre (t_{eq}), de l'eau de rivière filtrée sur membrane de porosité 0,22 μm contenant de l'oxytétracycline, de l'acide oxolinique ou de la fluméquine à la concentration 1 μg/mL est mise en contact avec de la vase stérilisée par 0,1 % de $HgCl_2$. La concentration d'antibiotique dans l'eau et les sédiments est déterminée au bout de 2, 6, 9, 24, 30 et 48 h.

Cette étude est réalisée en triplicata. Dans chaque tube, une prise d'essai de 10 g de vase à laquelle sont ajoutés 10 mg de $HgCl_2$ est mise en contact avec 20 mL d'eau de la Chézine contenant de l'acide oxolinique, de la fluméquine ou de l'oxytétracycline à la concentration de 1 μg/mL. Les tubes sont agités à l'obscurité et à température ambiante. Un tube est prélevé à chaque temps et les concentrations en acide oxolinique, fluméquine ou oxytétracycline sont déterminées dans l'eau et les sédiments.

Les essais de désorption sont réalisés à partir du sédiment utilisé pour les essais d'adsorption. Les sédiments à l'équilibre sont remis en contact avec de l'eau de rivière passée sur membrane de porosité 0,22 μm. Des volumes de 0,5 mL d'eau du tube sont prélevés pour dosage d'acide oxolinique, de fluméquine ou d'oxytétracycline après 2, 6 et 24 h de contact. De plus après 24 h de contact, le sédiment est prélevé pour dosage des antibiotiques.

2.4.4 Effet des caractéristiques de l'eau

Cette étude est menée sur les trois antibiotiques à la concentration de 1 μg/mL en conditions axéniques et à température constante de 20 °C. Les facteurs étudiés sont le rapport eau/sédiment ($R_{E/S}$), le pH, la concentration en acides humiques (AH), la force ionique (par ajout de NaCl), et le type de sédiment (Sed). Un prélèvement unique de sédiment et d'eau est réalisé à t_{eq} + 24 h et les effets sont déterminés par la valeur du coefficient de partage entre le sédiment et l'eau (k_p).

TAB. 22 – *Matrice d'expériences et matrice des effets de l'eau sur le coefficient de partage entre l'eau et le sédiment.*

Numéro de l'essai	Ajout NaCl (1)	$R_{E/S}$ (2)	Acides humiques (3)	pH (4=123)	Type sédimentaire (5=13)
1	-	-	-	-	+
2	+	-	-	+	-
3	-	+	-	+	+
4	+	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-
6	+	-	+	-	+
7	-	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+

niveau -	0 g/L	1 : 1	0	7,0	vase
niveau +	20 g/L	4 : 4	1 %	8,0	sable

Les essais de désorption sont réalisés à partir du sédiment utilisé pour les essais d'adsorption. Les sédiments à l'équilibre sont remis en contact avec de l'eau de rivière filtrée sur membrane de porosité 0,22 μm. Du sédiment et un volume de 1,0 mL d'eau du tube sont prélevés après 24 h de contact pour dosage de l'acide oxolinique, de la fluméquine ou de l'oxytétracycline.

L'étude de ces paramètres est réalisée à l'aide d'un plan d'expériences fractionné $2^{5-2} = 2^3$; huit expériences sont donc nécessaires pour réaliser ce plan (tableau 22). Chaque point est tripliqué.

Si le facteur 1 est l'ajout de chlorure de sodium, le facteur 2 le rapport volume d'eau/masse de sédiment, le facteur 3 la teneur en acides humiques, le facteur 4 le pH et le facteur 5 le type de sédiment, en aliasant 4=123 et 5=13 on obtient huit contrastes :

$$
\begin{aligned}
l_1 &= 1 + 35 + 234 + 1245 \\
l_2 &= 2 + 45 + 134 + 1235 \\
l_3 &= 3 + 15 + 124 + 2345 \\
l_4 &= 4 + 25 + 123 + 1345 \\
l_5 &= 5 + 13 + 24 + 12345 \\
l_{12} &= 12 + 34 + 145 + 235 \\
l_{23} &= 23 + 14 + 125 + 345 \\
l_M &= \mathrm{I} + 135 + 245 + 1234
\end{aligned}
$$

Si les effets ne peuvent pas être clairement définis à partir des contrastes, un ou plusieurs plans complémentaires peuvent être nécessaires.

2.4.5 Effets des caractéristiques sédimentaires

Cette étude est menée sur les trois antibiotiques à la concentration de 1 μg/mL en conditions axéniques et à température constante de +20 °C. Le rapport volume d'eau/masse de sédiment est fixé à partir des résultats obtenus précédemment et l'eau utilisée provient de la Chézine et est filtrée sur membrane de porosité 0,22 μm. Lors de cette étude, trois plans d'expériences sont menés.

Le premier plan porte sur une vase. Il détermine les effets de la capacité d'échange de cations (représentative des charges de surface du sédiment), de la teneur en sable, magnésium, potassium, sodium, carbonates, fer II et fer III. Ce plan fractionné $2^{7-4} = 2^3$ nécessite huit mesures tripliquées (tableau 23).

La variation de la capacité d'échange de cations est réalisée en ajoutant au sédiment 5 % d'une résine échangeuse faible de cations (Amberlite IRP-64, Sigma). La variation de proportion de sable est obtenue par ajout de sable de Fontainebleau chauffé à +550 °C pendant une nuit. Les différents ions sont ajoutés au sédiment à raison de 5 % de la masse fraîche par supplémentation d'oxyde de magnésium, de chlorure de fer II, de chlorure de potassium, de chlorure de sodium. Le carbonate de calcium est également ajouté au sédiment à raison de 5 % de sa masse.

En aliasant 4=123, 5=12, 6=23 et 7=13 et en négligeant les interactions d'ordre supérieur à 2, on obtient sept contrastes :

TAB. 23 – *Matrice d'expériences et matrice des effets des sédiments sur le coefficient de partage entre l'eau et le sédiment (plan 2^{7-4}).*

Numéro de l'essai	CEC (1)	% sable (2)	Mg (3)	K (4) **4=123**	Na (5) **5=12**	Fe (6) **6=23**	$CaCO_3$ (7) **7=13**
1	-	-	-	-	+	+	+
2	+	-	-	+	-	+	-
3	-	+	-	+	-	-	+
4	+	+	-	-	+	-	-
5	-	-	+	+	+	-	-
6	+	-	+	-	-	-	+
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

Niveau -	0	0	0	0	0	0	0
Niveau +	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %

$$l_1 = 1 + 25 + 37 + 46 + ...$$
$$l_2 = 2 + 15 + 36 + 47 + ...$$
$$l_3 = 3 + 17 + 26 + 45 + ...$$
$$l_4 = 4 + 16 + 27 + 35 + ...$$
$$l_5 = 5 + 12 + 34 + 67 + ...$$
$$l_6 = 6 + 14 + 23 + 57 + ...$$
$$l_7 = 7 + 13 + 24 + 56 + ...$$

Si les effets ne peuvent pas être clairement définis à partir des contrastes, un ou plusieurs plans complémentaires peuvent être nécessaires.

Le second plan sur la base d'un sable est réalisé pour déterminer les effets de la teneur en carbone organique total et matière organique totale (étudiés ensemble car la teneur en carbone organique total est fonction de celle en matière organique totale (Hily *et al.*, 1985; Rice *et al.*, 1986)), d'ajout de kaolinite et/ou de smectite. Ce plan nécessitera 2^3, soit huit mesures dupliquées. La matière organique est ajoutée sous forme d'un bouillon de Müeller-Hinton. Pour chaque niveau haut, 5 % de la masse fraîche de sédiment sont ajoutés.

Un dernier plan 2^3 est réalisé en triplicata pour le cas particulier où la matière organique exogène n'est apportée que par des acides humiques.

Si le facteur 1 est l'ajout de matière organique totale, le facteur 2 l'ajout de kaolinite et le facteur 3 l'ajout de smectite, ces 2 derniers plans d'expériences peuvent être représentés par le tableau 24.

TAB. 24 – *Matrice d'expériences et matrice des effets des sédiments sur le coefficient de partage entre l'eau et le sédiment (plan 2^3).*

Numéro de l'essai	Facteur 1 (MOT)	Facteur 2 (Kaolinite)	Facteur 3 (Smectite)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0

niveau -	0 %	0 %	0 %
niveau +	5 %	5 %	5 %

Un prélèvement de sédiment et d'eau est réalisé à t_{eq} + 24 h et les effets sont déterminés par la valeur du coefficient de partage entre le sédiment et l'eau (k_p). Le sédiment à l'équilibre est ensuite remis en contact avec de l'eau de la rivière filtrée sur membrane de porosité 0,22 μm et un prélèvement de 1 mL d'eau est réalisé au bout de 24 h.

2.5 Résultats et discussion

2.5.1 Essais préliminaires

Etude du potentiel bactéricide du chlorure mercurique

De nombreuses méthodes existent pour stériliser des matrices. Notre objectif était d'obtenir la meilleur stérilisation en perturbant le moins possible le sédiment. Les méthodes d'autoclavage ou de tyndallisation posaient des problèmes en terme de modifications structurales du sédiment. La stérilisation chimique s'est donc rapidement imposée. Par souci de sécurité le chlorure mercurique a été préféré à l'azoture de sodium car celui-ci provoque des dégagements gazeux en milieu acide.

La figure 22 illustre les résultats obtenus avec $HgCl_2$ pour le dénombrement bactérien. Une concentration de 0,001 % de $HgCl_2$ n'a aucun effet sur la population bactérienne car on observe une croissance des bactéries. Une concentration de 0,1 % commence a avoir une activité bactériostatique à partir de 30 min. Les concentrations de 0,1 et 1 % ont, quant à elles, une action bactéricide dès les cinq premières minutes de contact. De plus, à ces concentrations, les bouillons BHI n'ont montré aucun trouble dès 5 min de contact.

La stérilisation du sédiment est donc réalisée par 0,1 % de $HgCl_2$, avec un temps de contact initial de 5 min. Dans ces conditions, des essais ont montré qu'il n'y avait aucune interaction avec les méthodes de dosage de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline dans les sédiments et l'eau.

Détermination du temps d'équilibre

L'obtention d'un plateau sur la figure 23 permet de vérifier que la concentration en acide oxolinique, fluméquine et oxytétracycline est stable dans le sédiment après 24 h d'agitation.

2.5.2 Essais d'adsorption

Les effets ou les contrastes des plans d'expériences sont considérés comme significatifs s'ils représentent au moins 10 % de la moyenne des effets ou contrastes.

Effets des caractéristiques de l'eau

Les résultats du plan d'expériences visant à déterminer les caractéristiques de l'eau ayant un effet sur l'adsorption des trois antibiotiques sur les sédiments sont résumés dans le tableau 25. Ce plan est fractionné de type 2^{5-2} c'est-à-dire que les résultats obtenus

TAB. 25 – *Matrice des effets du plan 2^{5-2} des caractéristiques de l'eau sur l'adsorption des antibiotiques sur les sédiments. Les contrastes soulignés ne sont dus qu'à l'effet du paramètre et non aux interactions. Les contrastes en gras sont significatifs.*

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur + interaction					interaction		Réponse		
		1+35 NaCl	2+45 Re/s	3+15 AH	4+25 pH	5+13+24 Sed	12	23	AO	FLU	OTC
1	+	-	-	-	-	+	+	+	2,97	23,62	32,41
2	+	+	-	-	+	-	-	+	100,00	100,00	67,41
3	+	-	+	-	+	+	-	-	5,89	42,62	30,28
4	+	+	+	-	-	-	+	-	95,12	89,41	52,48
5	+	-	-	+	+	-	+	-	84,75	68,50	100,0
6	+	+	-	+	-	+	-	-	26,35	41,19	35,61
7	+	-	+	+	-	-	-	+	43,00	53,19	54,31
8	+	+	+	+	+	+	+	+	6,70	12,76	21,37
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8			
Contrastes											
AO	**46**	**11**	**-8**	**-5**	4	**-35**	2	**-7**			
FLU	**54**	**7**	-4	**-10**	2	**-24**	-5	**-7**			
OTC	**49**	**-5**	**-10**	4	**6**	**-19**	2	**-5**			

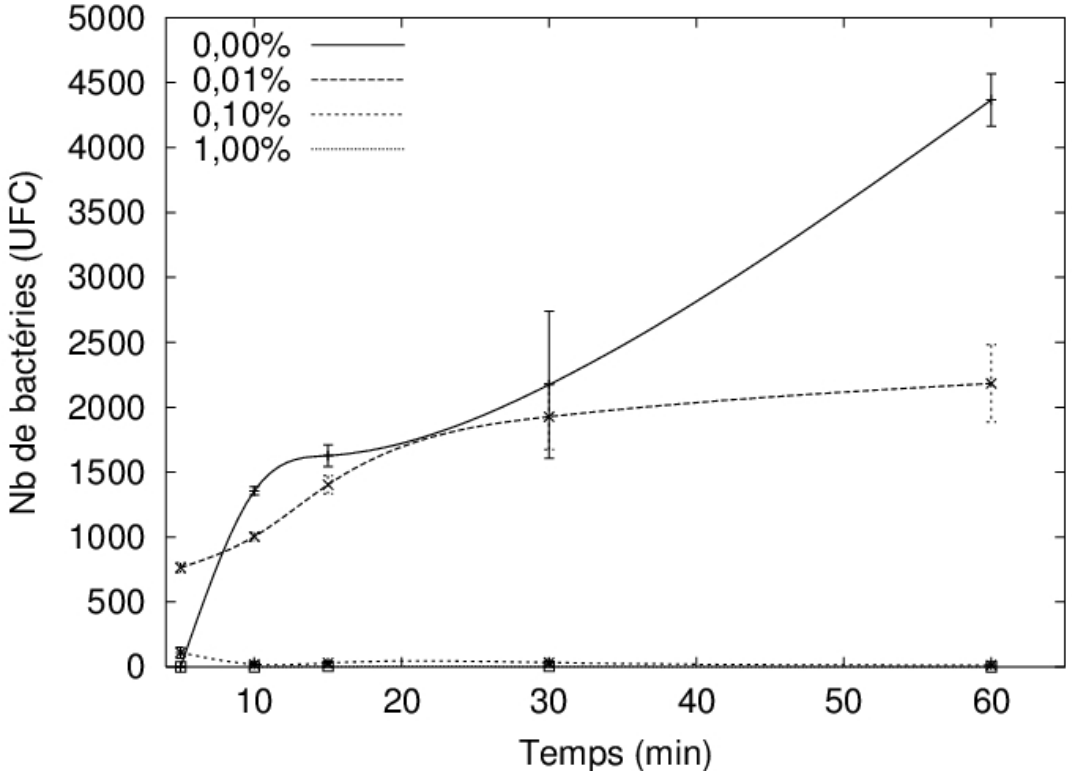


FIG. 22 – *Action bactéricide de $HgCl_2$ sur les bactéries aérobies cultivables d'une vase dulçaquicole. UFC : unité formant colonie.*

sont des contrastes et non des effets. Un contraste correspond à la somme d'un effet et de une ou plusieurs interactions. Dans ce cas, il est parfois difficile de définir clairement les effets à partir des contrastes. Un ou plusieurs plans complémentaires sont alors nécessaires.

Le plan d'expériences décrit par le tableau 25 permet de définir certains effets des caractéristiques de l'eau sur l'adsorption de l'acide oxolinique sur les sédiments dulçaquicoles. Ce plan montre de façon certaine que l'augmentation du rapport volume d'eau/masse de sédiment a un effet négatif et que le pH n'a aucun effet sur l'adsorption de l'acide oxolinique. Les contrastes 1, 3 et 5 ne permettent pas de tirer de conclusion définitive sur l'effet de la force ionique, de la concentration en acides humiques et de la nature du sédiment. Le contraste positif de la force ionique pourrait provenir de l'interaction entre l'effet des acides humiques et celui du type sédimentaire (sable ou vase). De même le contraste négatif des acides humiques pourrait être dû à l'interaction entre la force ionique et la nature du sédiment. La nature du sédiment est probablement la cause principale du contraste négatif important observé comme cela a déjà été montré par Pouliquen et Le Bris (1996). Il est cependant impossible d'exclure une interaction

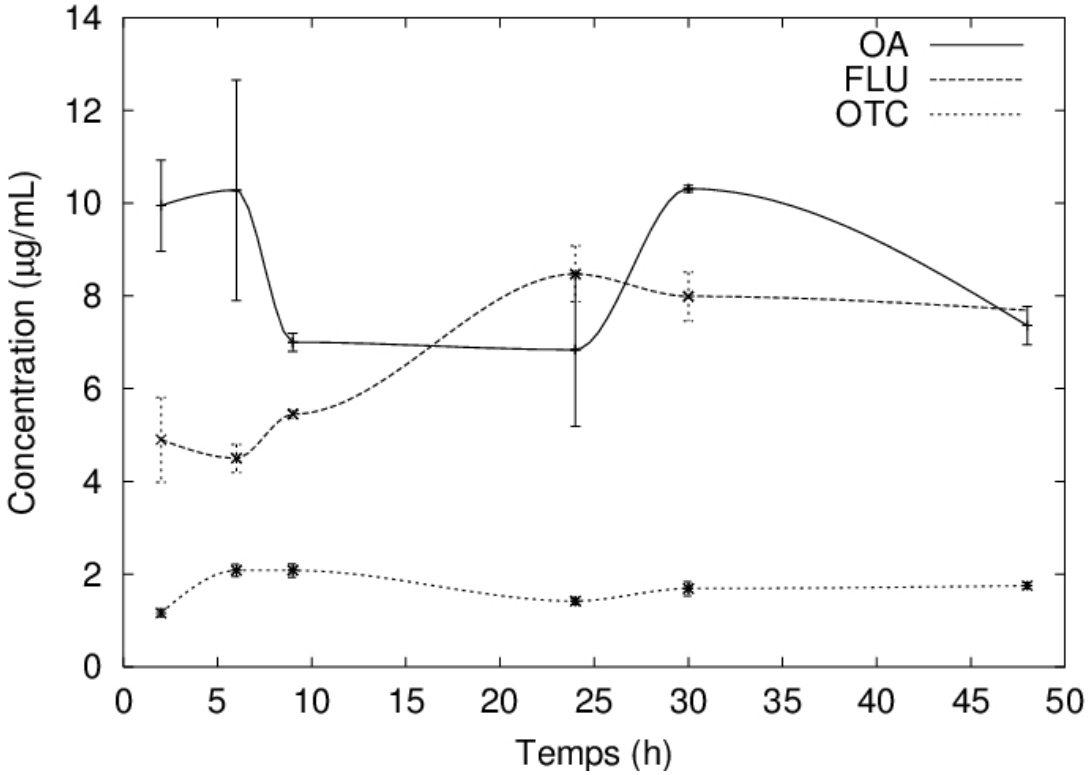


FIG. 23 – *Détermination du temps d'équilibre d'adsorption de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline sur une vase dulçaquicole.*

entre la force ionique et la teneur en acides humiques. L'exploitation complète des résultats de ce plan d'expériences concernant l'acide oxolinique nécessite la réalisation de plans complémentaires.

Les seules informations non ambiguës apportées par le tableau 25 sur l'effet des caractéristiques de l'eau sur l'adsorption de la fluméquine sur les sédiments dulçaquicoles sont l'absence d'effet du rapport volume d'eau/masse de sédiment et du pH. Comme pour l'acide oxolinique, les contrastes 1, 3 et 5 ne permettent pas de tirer de conclusion sûre sur l'effet de la force ionique, de la concentration en acides humiques et de la nature du sédiment. L'exploitation complète des résultats de ce plan d'expériences concernant la fluméquine nécessite également la réalisation de plans complémentaires.

L'effet de la force ionique et l'absence d'effet de la teneur en acides humiques dans l'eau sur l'adsorption de l'oxytétracycline sont montrés par le plan d'expériences décrit dans le tableau 25. Les effets du rapport volume d'eau/masse de sédiment, du pH et de la nature du sédiment ne peuvent pas être démontrés de façon certaine. En effet, le contraste négatif

du rapport volume d'eau/masse de sédiment pourrait être dû à l'interaction entre le pH et la nature du sédiment (sable ou vase). Le contraste positif du pH peut lui même provenir de l'interaction entre le rapport volume d'eau/masse de sédiment et la nature du sédiment. Le contraste de la nature du sédiment peut lui-même être dû à l'interaction entre le pH et le rapport volume d'eau/masse de sédiment. La réalisation d'un plan complémentaire est également nécessaire pour lever les ambiguïtés sur l'effet des caractéristiques de l'eau sur l'adsorption de l'oxytétracycline sur les sédiments dulçaquicoles.

Effets des caractéristiques sédimentaires

Le plan d'expériences décrit par le tableau 26 est un plan 2^{7-4}. Les informations apportées par ce plan sont donc limitées mais permettent de définir principalement les caractéristiques n'ayant pas d'effet ou celles ayant un effet dans le cas où un contraste contient des interactions entre caractéristiques sans effet.

Les variations de la capacité d'échange de cations, de la granulométrie, de la concentration en fer et en carbonate de calcium n'ont pas d'effet sur l'adsorption de l'acide oxolinique sur les sédiments dulçaquicoles. Les contrastes du magnésium, du potassium et du sodium sont supérieurs à 10 %. Ceux du magnésium et du sodium sont négatifs alors que celui du potassium est positif. Ces contrastes ne permettent pas de conclure car ils peuvent provenir de l'effet des paramètres mais également de l'interaction entre les deux autres paramètres pouvant avoir un effet. Afin de lever les ambiguïtés il est nécessaire de réaliser un plan complémentaire.

Concernant la fluméquine, seul l'effet de la teneur en magnésium a été montré. Ce paramètre possède une influence négative sur l'adsorption sur les sédiments. Les variations de le capacité d'échange de cations, de la granulométrie, des concentrations en fer, potassium, sodium et carbonate de calcium n'ont pas d'effet sur l'adsorption de la fluméquine sur les sédiments dulçaquicoles.

Les variations de la capacité d'échange de cations, de la granulométrie, de la concentration en magnésium et en potassium n'ont pas d'effet sur l'adsorption de l'oxytétracycline sur les sédiments dulçaquicoles. Comme pour l'acide oxolinique, les concentrations en sodium, fer et carbonate de calcium possèdent des contrastes supérieurs à 10 % pour lesquels il n'est pas possible de distinguer l'effet des interactions.

Le plan d'expériences décrit par le tableau 27 est un plan complet. Cela signifie que les effets et les interactions sont déterminés sans incertitude. La concentration en matière

TAB. 26 – *Matrice des effets du plan 2^{7-4} des caractéristiques sédimentaires sur l'adsorption des antibiotiques sur les sédiments. Plan à partir d'une vase. Les contrastes soulignés ne sont dus qu'à l'effet du paramètre et non aux interactions. Les contrastes en gras sont significatifs.*

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur + interaction							Réponse		
		1+25+37+46 CEC	2+15+36+47 Sable	3+17+26+45 Mg	4+16+27+35 K	5+12+34+67 Na	6+14+23+57 Fe	7+13+24+56 $CaCO_3$	AO	FLU	OTC
1	+	-	-	-	-	+	+	+	57,53	88,84	22,29
2	+	+	-	-	+	-	+	-	100,00	98,29	26,71
3	+	-	+	-	+	-	-	+	89,58	100,00	100,00
4	+	+	+	-	-	+	-	-	86,48	90,71	21,32
5	+	-	-	+	+	+	-	-	54,90	86,50	31,62
6	+	+	-	+	-	-	-	+	26,73	63,62	87,37
7	+	-	+	+	-	-	+	-	30,93	74,44	34,28
8	+	+	+	+	+	+	+	+	29,68	55,61	35,33
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8			
Contrastes											
AO	**100**	2	-1	**-40**	**15**	**-14**	-4	-8			
FLU	**100**	-6	-3	**-15**	3	-6	-2	-4			
OTC	**100**	-5	6	5	8	**37**	**-38**	**-34**			

TAB. 27 – *Matrice des effets du plan 2^3 des caractéristiques sédimentaires sur l'adsorption des antibiotiques sur les sédiments. Plan à partir d'un sable. Les effets en gras sont significatifs.*

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur			interaction				Réponse		
		1 MOT	2 Kaolinite	3 Smectite	12	13	23	123	AO	FLU	OTC
1	+	-	-	-	+	+	+	-	64	45	38
2	+	+	-	-	-	-	+	+	48	44	27
3	+	-	+	-	-	+	-	+	66	65	38
4	+	+	+	-	+	-	-	-	58	49	31
5	+	-	-	+	+	-	-	+	2	40	45
6	+	+	-	+	-	+	-	-	16	54	78
7	+	-	+	+	-	-	+	-	7	38	38
8	+	+	+	+	+	+	+	+	60	52	85
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8			
Effets											
AO	**40**	**6**	**8**	**-19**	**6**	**11**	**5**	**4**			
FLU	**48**	2	3	-2	-2	6	-4	2			
OTC	**48**	**8**	0	**14**	2	**12**	0	1			

organique totale et la teneur en kaolinite du sédiment ont un effet positif sur l'adsorption de l'acide oxolinique alors que la teneur en smectite possède un effet négatif important sur cette adsorption. Ces trois paramètres interagissent également fortement entre eux.

Aucun des paramètres étudiés par le plan d'expériences décrit par le tableau 27 n'a d'effet sur l'adsorption de la fluméquine sur les sédiments dulçaquicoles.

Les teneurs en matière organique totale et en smectite ainsi que l'interaction de ces paramètres ont un effet positif sur l'adsorption de l'oxytétracycline sur les sédiments tandis que la teneur en kaolinite ne possède aucun effet.

Le plan d'expériences décrit par le tableau 28 montre un effet négatif extrêmement important de la teneur en acides humiques du sédiment sur l'adsorption des trois antibiotiques. Cet effet est tellement important qu'il rend difficile toute autre interprétation de ce plan d'expériences.

Conclusion

Le tableau 29 résume les effets des paramètres étudiés par les plans d'expériences sur l'adsorption de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline sur les sédiments dulçaquicoles.

Kukkonen et Landrum (1996) et Zhou *et al.* (1994) ont montré qu'une diminution de la force ionique conduit à une diminution de l'adsorption des hydrocarbures polyaromatiques et des polychlorobenzènes sur les sédiments. Ces auteurs attribuent cet effet à une désorption de la matière organique à la surface de la particule et à une désagrégation des particules sédimentaires. Les résultats obtenus pour l'oxytétracycline sont en contradiction avec ceux de ces études. Il semble que pour des molécules polaires une augmentation de la force ionique stabilise, au contraire, les forces de liaison entre la molécule et la particule et/ou la matière organique adsorbée sur cette dernière.

Une augmentation du rapport volume d'eau/masse de sédiment diminue l'adsorption de l'acide oxolinique sur les sédiments. Cet effet montre que le phénomène d'adsorption de l'acide oxolinique est concentration dépendant c'est-à-dire d'ordre 1.

L'augmentation de la teneur en matière organique du sédiment augmente l'adsorption de l'acide oxolinique et de l'oxytétracycline. Cet effet confirme que la matière organique joue un rôle important dans les phénomènes d'adsorption. L'effet de la composition de la

TAB. 28 – *Matrice des effets du plan 2^3 des caractéristiques sédimentaires sur l'adsorption des antibiotiques sur les sédiments. Plan à partir d'un sable. Cas particulier où les acides humiques remplacent la matière organique. Les effets en gras sont significatifs.*

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur			interaction				Réponse		
		1 AH	2 Kaolinite	3 Smectite	12	13	23	123	AO	FLU	OTC
1	+	-	-	-	+	+	+	-	73	71	40
2	+	+	-	-	-	-	+	+	0	10	10
3	+	-	+	-	-	+	-	+	71	44	41
4	+	+	+	-	+	-	-	-	1	11	12
5	+	-	-	+	+	-	-	+	1	45	37
6	+	+	-	+	-	+	-	-	0	11	12
7	+	-	+	+	-	-	+	-	16	40	39
8	+	+	+	+	+	+	+	+	0	44	13
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8			
Effets											
AO	**20**	**-20**	2	**-16**	-2	**16**	2	-2			
FLU	**35**	**-16**	0	0	8	8	7	1			
OTC	**26**	**-14**	1	0	0	1	0	0			

TAB. 29 – *Tableau récapitulatif des essais d'adsorption.*

Paramètre	AO	FLU	OTC
Force ionique	+ ?	+ ?	-
Rapport volume d'eau/masse de sédiment	-	no	- ?
Teneur en acides humiques dans l'eau	- ?	- ?	no
pH	no	no	+ ?
Nature du sédiment (+ : Sable ; - : Vase)	-- ?	-- ?	-- ?
Capacité d'échange de cations	no	no	no
Granulométrie	no	no	no
Magnésium	-- ?	-	no
Potassium	+ ?	no	no
Sodium	- ?	no	+ ?
Fer	no	no	- ?
Carbonate de calcium	no	no	- ?
Acides humiques dans le sédiment	--	--	--
Matière organique totale	+	no	+
Kaolinite	+	no	no
Smectite	--	no	+

no : pas d'effet observé ; + : effet positif ; - : effet négatif ; ? effet nécessitant un plan complémentaire

fraction minérale (smectite et/ou kaolinite) sur l'adsorption de l'acide oxolinique et de l'oxytétracycline conforte la vision de Kukkonen et Landrum (1996) de la particule de sédiment considérée comme une base inorganique, contenant un ou plusieurs minéraux et revêtue de molécules organiques.

L'effet négatif de la concentration en acides humiques dans le sédiment peut être discutée. En effet, ces acides sont ajoutés artificiellement aux sédiments sous forme de poudre. Cette poudre passe en solution dans l'eau lorsqu'elle est ajoutée pour réaliser les essais. Or, la concentration en acides humiques dans l'eau a un effet négatif possible sur l'adsorption des antibiotiques sur les sédiments.

L'oxyde de magnésium utilisé dans les plans d'expériences pour augmenter artificiellement la teneur en magnésium du sédiment est très peu soluble dans l'eau et devrait donc être piégé dans la fraction solide du sédiment. De nombreux auteurs ont montré les propriétés chélatrices de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline vis-à-vis du magnésium. Dans ces conditions, il est probable que l'oxyde

de magnésium réagisse avec d'autres ions pour former une nouvelle espèce soluble. Le magnésium passe alors dans l'eau et déplace l'équilibre d'adsorption vers la phase aqueuse.

L'absence d'influence de la granulométrie et de la capacité d'échange de cations, en contradiction avec les propriétés des molécules et certaines études sur le même sujet (Pouliquen et Le Bris, 1996), posent deux questions principales :

- les bornes des paramètres étudiés sont-elles suffisantes pour montrer un effet ?
- les méthodes analytiques mises au point dans des sédiments « naturels » sont-elles adaptées aux sédiments modifiés pour les plans d'expériences ?

Ces problèmes de méthodes analytiques peuvent être responsables des coefficients d'adsorption supérieurs à 100 %, obligeant à un centrage des réponses.

L'analyse de ces plans d'expériences permet donc d'obtenir des informations qui devront être confirmées par l'étude de sédiments naturels.

2.5.3 Essais de dégradation

Effets des caractéristiques de l'eau

Les résultats du plan d'expériences visant à déterminer l'influence des caractéristiques de l'eau sur la dégradation des trois antibiotiques dans les sédiments sont résumés dans le tableau 30. Ce plan est le même que celui utilisé pour les essais d'adsorption, seul le calcul de la réponse est différent.

Ce plan d'expériences ne permet pas de définir de façon certaine d'effet des caractéristiques de l'eau sur la dégradation de l'acide oxolinique dans les sédiments dulçaquicoles. Le contraste 5 est si important qu'un effet de la nature du sédiment peut être envisagé. Cet effet, s'il était vérifié par un plan complémentaire, définirait une dégradation plus importante dans le sable que dans la vase. L'exploitation complète des résultats de ce plan d'expériences concernant l'acide oxolinique nécessite la réalisation de plans complémentaires.

Les seules informations non ambiguës apportées par le tableau 30 sur l'effet des caractéristiques de l'eau sur la dégradation de la fluméquine dans les sédiments dulçaquicoles sont l'absence d'effet dû à la force ionique et à la concentration en acides humiques. Les contrastes 2, 4 et 5 ne permettent pas de tirer de conclusion définitive sur l'effet du rapport volume d'eau/masse de sédiment, du pH et de la nature du sédiment. Cependant,

TAB. 30 – *Matrice des effets du plan 2^{5-2} des caractéristiques de l'eau sur la dégradation des antibiotiques dans les sédiments. Les contrastes soulignés ne sont dus qu'à l'effet du paramètre et non aux interactions. Les contrastes en gras sont significatifs.*

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur + interaction					interaction		Réponse		
		1+35 NaCl	2+45 Re/s	3+15 AH	4+25 pH	5+13+24 Sed	12	23	AO	FLU	OTC
1	+	-	-	-	-	+	+	+	91	58	58
2	+	+	-	-	+	-	-	+	0	0	0
3	+	-	+	-	+	+	-	-	90	46	71
4	+	+	+	-	-	-	+	-	0	0	17
5	+	-	-	+	+	-	+	-	0	0	0
6	+	+	-	+	-	+	-	-	45	9	23
7	+	-	+	+	-	-	-	+	0	0	23
8	+	+	+	+	+	+	+	+	88	81	59
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8			
Contrastes											
AO	**39**	**-6**	**5**	**-6**	**5**	**39**	**5**	**5**			
FLU	**24**	<u>-2</u>	**7**	<u>-2</u>	**7**	**24**	**10**	**10**			
OTC	**31**	<u>**-7**</u>	<u>**11**</u>	**-5**	<u>1</u>	**21**	2	**4**			

comme pour l'acide oxolinique, la valeur élevée du contraste 5 laisse supposer un effet de la nature de sédiment sur la dégradation de l'antibiotique. L'exploitation complète des résultats de ce plan d'expériences concernant la fluméquine nécessite cependant la réalisation de plans complémentaires.

L'effet du rapport volume d'eau/masse de sédiment et l'absence d'effet du pH sur la dégradation de l'oxytétracycline dans les sédiments sont montrés par le plan d'expériences décrit dans le tableau 30. Les effets de la force ionique, de la concentration en acides humiques et de la nature du sédiment ne peuvent pas être démontrés de façon certaine. Comme pour l'acide oxolinique et la fluméquine, la valeur élevée du contraste 5 laisse supposer que l'antibiotique se dégrade plus dans le sable que dans la vase. La réalisation d'un plan complémentaire est également nécessaire pour lever les ambiguïtés sur l'effet des caractéristiques de l'eau sur la dégradation de l'oxytétracycline dans les sédiments dulçaquicoles.

Effets des caractéristiques sédimentaires

Compte tenu de la faible dégradation de l'acide oxolinique observée dans le tableau 31, il est difficile d'appliquer la limite de 10 % afin de déterminer les contrastes significatifs. Dans le cas de l'acide oxolinique, seul le magnésium semble avoir un effet positif sur la dégradation dans les sédiments.

Concernant la fluméquine, aucun paramètre ne semble avoir d'effet sur la dégradation. Seule l'interaction de tous les paramètres indiquée par l'essai numéro 8 semble avoir un effet. Ceci confirme l'interrogation sur les limites des méthodes analytiques pour les sédiments semi-synthétiques utilisés dans ces plans d'expériences.

Le plan d'expériences décrit par le tableau 31 ne permet pas de tirer de conclusion sur l'effet des paramètres étudiés sur la dégradation de l'oxytétracycline dans les sédiments. L'oxytétracycline semble être peu dégradée dans le sédiment mais, comme pour la fluméquine, l'essai numéro 8 pose des questions sur les méthodes analytiques.

Le plan d'expériences décrit par le tableau 32 montre que la concentration en matière organique totale et la teneur en kaolinite du sédiment ont un effet négatif sur la dégradation de l'acide oxolinique alors que la teneur en smectite possède un effet positif important sur cette dégradation. Les teneurs en acides humiques et smectite interagissent fortement entre elles.

TAB. 31 – *Matrice des effets du plan 2^{7-4} des caractéristiques sédimentaires sur la dégradation des antibiotiques dans les sédiments. Plan à partir d'une vase. Les contrastes soulignés ne sont dus qu'à l'effet du paramètre et non aux interactions. Les contrastes en gras sont significatifs.*

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur + interaction							Réponse		
		1+25+37+46 CEC	2+15+36+47 Sable	3+17+26+45 Mg	4+16+27+35 K	5+12+34+67 Na	6+14+23+57 Fe	7+13+24+56 $CaCO_3$	AO	FLU	OTC
1	+	-	-	-	-	+	+	+	0	0	24
2	+	+	-	-	+	-	+	-	0	0	0
3	+	-	+	-	+	-	-	+	0	0	0
4	+	+	+	-	-	+	-	-	0	0	22
5	+	-	-	+	+	+	-	-	0	0	0
6	+	+	-	+	-	-	-	+	59	0	22
7	+	-	+	+	-	-	+	-	38	0	0
8	+	+	+	+	+	+	+	+	42	100	100
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8			

Effets								
AO	**17**	**<u>8</u>**	**<u>3</u>**	**<u>18</u>**	**<u>-7</u>**	**<u>8</u>**	**<u>-7</u>**	**<u>3</u>**
FLU	**13**	**<u>13</u>**	**<u>13</u>**	**<u>13</u>**	**<u>13</u>**	**<u>13</u>**	**<u>13</u>**	**<u>13</u>**
OTC	**21**	**15**	**10**	**<u>10</u>**	**<u>4</u>**	**15**	**16**	**10**

TAB. 32 – *Matrice des effets du plan 2^3 des caractéristiques sédimentaires sur la dégradation des antibiotiques dans les sédiments. Plan à partir d'un sable. Les effets en gras sont significatifs.*

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur			interaction				Réponse		
		1 MOT	2 Kaolinite	3 Smectite	12	13	23	123	AO	FLU	OTC
1	+	-	-	-	+	+	+	-	36	56	63
2	+	+	-	-	-	-	+	+	48	50	57
3	+	-	+	-	-	+	-	+	33	34	63
4	+	+	+	-	+	-	-	-	38	46	56
5	+	-	-	+	+	-	-	+	98	61	55
6	+	+	-	+	-	+	-	-	84	46	19
7	+	-	+	+	-	-	+	-	92	61	60
8	+	+	+	+	+	+	+	+	39	46	7
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8			
Contrastes											
AO	**59**	**-6**	**-8**	**20**	-4	**-11**	-6	-5			
FLU	**50**	-3	-3	3	-2	-4	2	3			
OTC	**48**	**-13**	-1	**-12**	-2	**-10**	-2	-1			

Aucun des paramètres étudiés par le plan d'expériences décrit par le tableau 32 n'a d'effet sur la dégradation de la fluméquine dans les sédiments dulçaquicoles.

Les teneurs en matière organique totale et en smectite ainsi que l'interaction de ces paramètres ont un effet négatif sur la dégradation de l'oxytétracycline dans les sédiments tandis que la teneur en kaolinite ne possède aucun effet.

Le plan d'expériences décrit par le tableau 33 ne montre qu'un effet positif de la teneur en acides humiques du sédiment sur la dégradation des trois antibiotiques. L'effet positif de la smectite sur la dégradation de l'acide oxolinique est ici confirmé.

Conclusion

Le tableau 34 résume les effets des paramètres étudiés par les plans d'expériences sur la dégradation de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline dans les sédiments dulçaquicoles.

Les résultats du tableau 34 peuvent être comparés à ceux obtenus pour la photostabilité et l'hydrolyse au paragraphe 1.1. Le résultat concernant l'effet du pH de l'eau sur la dégradation de l'oxytétracycline est différent pour les deux études. En effet l'étude de photostabilité et d'hydrolyse a montré une dégradation plus rapide lorsque le pH augmente. Or, l'étude dans les sédiments ne montre aucun effet du pH sur la dégradation de l'oxytétracycline. Cette différence de résultat montre l'impact du choix des bornes des facteurs sur le résultat des plans d'expériences. En effet, pour des bornes de pH situées à 7,5 et 8,5, un effet est démontré alors qu'entre 7,0 et 8,0, aucun effet n'est détecté.

L'hypothèse d'une stabilisation des quinolones par les ions divalents émise au paragraphe 1.1 est contredite par cette étude. La dégradation de la fluméquine n'est ici pas influencée par la présence de fer ou de magnésium alors que l'acide oxolinique est davantage dégradé en présence de magnésium.

L'augmentation de la teneur en matière organique du sédiment semble stabiliser l'acide oxolinique et l'oxytétracycline, ce qui confirme l'hypothèse émise au paragraphe 1.1.

Les acides humiques semblent favoriser la dégradation des trois antibiotiques. La composition de la fraction minérale du sédiment semble également jouer un rôle dans la dégradation de l'acide oxolinique et de l'oxytétracycline. L'augmentation de la teneur en kaolinite stabilise l'acide oxolinique alors que l'augmentation de la quantité de

TAB. 33 – *Matrice des effets du plan 2^3 des caractéristiques sédimentaires sur la dégradation des antibiotiques dans les sédiments. Plan à partir d'un sable. Cas particulier où les acides humiques remplacent la matière organique. Les effets en gras sont significatifs.*

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur			interaction				Réponse		
		1 AH	2 Kaolinite	3 Smectite	12	13	23	123	AO	FLU	OTC
1	+	-	-	-	+	+	+	-	26	28	60
2	+	+	-	-	-	-	+	+	100	89	87
3	+	-	+	-	-	+	-	+	30	56	58
4	+	+	+	-	+	-	-	-	99	89	87
5	+	-	-	+	+	-	-	+	100	55	62
6	+	+	-	+	-	+	-	-	101	89	87
7	+	-	+	+	-	-	+	-	90	58	57
8	+	+	+	+	+	+	+	+	101	54	85
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8			
Effets											
AO	**81**	**19**	-1	**17**	2	**-16**	1	-2			
FLU	**65**	**16**	-1	-1	-1	**-8**	**-8**	**-8**			
OTC	**73**	**14**	-2	0	0	-1	0	0			

TAB. 34 – *Tableau récapitulatif des essais de dégradation.*

Paramètre	AO	FLU	OTC
Force ionique	- ?	no	-
Rapport volume d'eau/masse de sédiment	+ ?	+ ?	++
Teneur en acides humiques dans l'eau	- ?	no	- ?
pH	+ ?	+ ?	no
Nature du sédiment (+ : Sable ; - : Vase)	++ ?	++ ?	++ ?
Capacité d'échange de cations	no	no	+ ?
Granulométrie	no	no	+ ?
Magnésium	+	no	++
Potassium	no	no	no
Sodium	no	no	+ ?
Fer	no	no	+ ?
Carbonate de calcium	no	no	+ ?
Acides humiques dans le sédiment	+	+	+
Matière organique totale	-	no	-
Kaolinite	-	no	no
Smectite	++	no	-

no : pas d'effet observé ; + : effet positif ; - : effet négatif ; ? effet nécessitant un plan complémentaire

smectite dans le sédiment favorise la dégradation de ce même antibiotique mais stabilise l'oxytétracycline.

Ces résultats exactement opposés à ceux concernant les essais d'adsorption pour la teneur en acides humiques, en kaolinite et smectite posent cependant à nouveau des questions sur la validité des méthodes analytiques pour ce type de sédiment.

D'une manière générale, cette étude montre une grande stabilité dans le sédiment des quinolones, et plus particulièrement de la fluméquine, comparée à celle de l'oxytétracycline.

2.5.4 Essais de désorption

Effets des caractéristiques de l'eau

Les résultats du plan d'expériences visant à déterminer l'influence des caractéristiques de l'eau sur la désorption des trois antibiotiques des sédiments sont résumés dans le

TAB. 35 – *Matrice des effets du plan 2^{5-2} des caractéristiques de l'eau sur la désorption des antibiotiques dans les sédiments. Les contrastes soulignés ne sont dus qu'à l'effet du paramètre et non aux interactions. Les contrastes en gras sont significatifs.*

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur + interaction					interaction		Réponse		
		1+35 NaCl	2+45 Re/s	3+15 AH	4+25 pH	5+13+24 Sed	12	23	AO	FLU	OTC
1	+	-	-	-	-	+	+	+	12	12	0
2	+	+	-	-	+	-	-	+	1	1	1
3	+	-	+	-	+	+	-	-	8	6	0
4	+	+	+	-	-	-	+	-	1	1	0
5	+	-	-	+	+	-	+	-	1	1	1
6	+	+	-	+	-	+	-	-	11	9	0
7	+	-	+	+	-	-	-	+	1	1	0
8	+	+	+	+	+	+	+	+	129	11	0
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8			
Contrastes											
AO	**20**	**15**	**14**	**15**	**14**	**19**	**15**	**15**			
FLU	**5**	0	**-1**	0	**-1**	**4**	**1**	**1**			
OTC	**0**	0	0	0	0	0	0	0			

tableau 35. Les réponses calculées ici ne le sont qu'à partir de l'eau, c'est à dire que le résultat est entièrement dépendant de la limite de quantification des méthodes de dosage des trois antibiotiques dans l'eau.

Ce plan d'expériences ne permet pas de définir d'effet des caractéristiques de l'eau sur la désorption de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline dans les sédiments dulçaquicoles. L'acide oxolinique semble toutefois être mieux désorbé que les deux autres antibiotiques. Il faut nuancer ces résultats par la différence de limite de quantification des deux méthodes dans l'eau (32 ng/mL pour l'acide oxolinique et la fluméquine contre 47 ng/mL pour l'oxytétracycline).

Effets des caractéristiques sédimentaires

Le plan d'expériences fractionné décrit par le tableau 36 permet de montrer que, comme pour l'adsorption, la capacité d'échange de cations n'a aucune influence sur la désorption des trois antibiotiques. De même la teneur en sodium du sédiment n'a pas d'effet sur la désorption de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline. Des contrastes importants, respectivement positif et négatif, sont obtenus pour le magnésium et le carbonate de calcium. Le rôle de l'effet des paramètres et de celui des interactions ne peuvent cependant pas être déterminés même si l'importance du contraste préfigure un effet important.

Aucun des paramètres étudiés ne semble avoir d'effet sur la désorption de la fluméquine et de l'oxytétracycline. La très faible désorption de ces deux antibiotiques rend cependant l'interprétation du plan d'expériences hasardeuse.

Le plan d'expériences décrit par le tableau 37 montre qu'une augmentation de la teneur en smectite du sédiment diminue la désorption de l'acide oxolinique et de la fluméquine. Une augmentation de la matière organique semble également augmenter la désorption de la fluméquine. Aucune désorption de l'oxytétracycline n'est ici visible.

Le plan d'expériences décrit par le tableau 38 ne montre qu'un effet positif des teneurs en acides humiques et en smectite du sédiment sur l'adsorption de l'acide oxolinique. Ces deux paramètres interagissent fortement entre eux. Aucune désorption n'est observée pour la fluméquine et l'oxytétracycline.

TAB. 36 – *Matrice des effets du plan 2^{7-4} des caractéristiques sédimentaires sur la désorption des antibiotiques des sédiments. Plan à partir d'une vase. Les contrastes soulignés ne sont dus qu'à l'effet du paramètre et non aux interactions. Les contrastes en gras sont significatifs.*

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur + interaction							Réponse		
		1+25+37+46 CEC	2+15+36+47 Sable	3+17+26+45 Mg	4+16+27+35 K	5+12+34+67 Na	6+14+23+57 Fe	7+13+24+56 $CaCO_3$	AO	FLU	OTC
1	+	-	-	-	-	+	+	+	0	1	4
2	+	+	-	-	+	-	+	-	1	1	3
3	+	-	+	-	+	-	-	+	1	1	1
4	+	+	+	-	-	+	-	-	1	1	3
5	+	-	-	+	+	+	-	-	44	1	1
6	+	+	-	+	-	-	-	+	65	1	0
7	+	-	+	+	-	-	+	-	24	1	1
8	+	+	+	+	+	+	+	+	15	18	0
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8			
Contrastes											
AO	**19**	2	**-9**	**18**	**-4**	1	**-4**	**-19**			
FLU	**3**	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**			
OTC	**2**	0	0	**-1**	0	0	0	0			

TAB. 37 – *Matrice des effets du plan 2^3 des caractéristiques sédimentaires sur la désorption des antibiotiques des sédiments. Plan à partir d'un sable. Les contrastes en gras sont significatifs.*

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur			interaction				Réponse		
		1 MOT	2 Kaolinite	3 Smectite	12	13	23	123	AO	FLU	OTC
1	+	-	-	-	+	+	+	-	3	6	0
2	+	+	-	-	-	-	+	+	7	12	0
3	+	-	+	-	-	+	-	+	2	5	0
4	+	+	+	-	+	-	-	-	6	11	0
5	+	-	-	+	+	-	-	+	2	3	0
6	+	+	-	+	-	+	-	-	1	2	0
7	+	-	+	+	-	-	+	-	7	4	0
8	+	+	+	+	+	+	+	+	0	2	0
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8			
Effets											
AO	**3**	0	0	**-1**	**-1**	**-2**	**-1**	**1**			
FLU	**6**	**1**	0	**-3**	0	**-2**	0	0			
OTC	**0**	0	0	0	0	0	0	0			

TAB. 38 – *Matrice des effets du plan 2^3 des caractéristiques sédimentaires sur la désorption des antibiotiques des sédiments. Plan à partir d'un sable. Cas particulier où les acides humiques remplacent la matière organique. Les contrastes en gras sont significatifs.*

Numéro de l'essai	Moyenne	Facteur			interaction				Réponse		
		1 AH	2 Kaolinite	3 Smectite	12	13	23	123	AO	FLU	OTC
1	+	-	-	-	+	+	+	-	2	0	0
2	+	+	-	-	-	-	+	+	100	0	0
3	+	-	+	-	-	+	-	+	2	0	0
4	+	+	+	-	+	-	-	-	93	0	0
5	+	-	-	+	+	-	-	+	0	0	0
6	+	+	-	+	-	+	-	-	0	0	0
7	+	-	+	+	-	-	+	-	0	0	0
8	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8			
Effets											
AO	**25**	**24**	-1	**25**	1	**-24**	-1	1			
FLU	**0**	0	0	0	0	0	0	0			
OTC	**0**	0	0	0	0	0	0	0			

Conclusion

Le tableau 39 résume les effets des paramètres étudiés par les plans d'expériences sur la désorption de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline sur les sédiments dulçaquicoles.

TAB. 39 – *Tableau récapitulatif des essais de désorption.*

Paramètre	AO	FLU	OTC
Force ionique	+ ?	no	no
Rapport volume d'eau/masse de sédiment	+ ?	- ?	no
Teneur en acides humiques dans l'eau	+ ?	no	no
pH	+ ?	- ?	no
Nature du sédiment (+ : Sable ; - : Vase)	+ ?	+ ?	no
Capacité d'échange de cations	no	no	no
Granulométrie	- ?	no	no
Magnésium	+ + ?	no	no
Potassium	- ?	no	no
Sodium	no	no	no
Fer	- ?	no	no
Carbonate de calcium	- - ?	no	no
Acides humiques dans le sédiment	+ +	no	no
Matière organique totale	no	+ ?	no
Kaolinite	no	no	no
Smectite	+ +	-	no

no : pas d'effet observé ; + : effet positif ; - : effet négatif ; ? effet nécessitant un plan complémentaire

L'oxytétracycline n'est pas, ou très peu, désorbée au cours des essais réalisés dans le cadre des plans d'expériences. Il est difficile dans ce cas de définir des paramètres ayant un effet sur la désorption de cet antibiotique. De même, seuls peu d'effets pour la fluméquine sont révélés par ces plans d'expériences à cause d'une faible désorption.

Bien que le plan d'expériences visant à déterminer l'effet des paramètres de l'eau ne le montre pas de façon certaine, la désorption semble plus intense dans la vase que dans le sable pour les trois antibiotiques.

L'augmentation de la désorption avec celle des teneurs en acides humiques et, proba-

blement, en magnésium est sans doute due à un artefact expérimental ayant pour cause la solubilisation de ces substances dans l'eau.

2.6 Conclusion et perspectives

Cette étude est incomplète et nécessite la réalisation de plan d'expériences complémentaires. Elle permet cependant d'obtenir des informations sur les paramètres sédimentaires influençant l'adsorption et, dans une moindre mesure, la dégradation et la désorption de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline. Au delà de ces informations, elle pose des questions d'ordre méthodologique sur l'étude ces phénomènes dans les sédiments.

Cette étude montre le rôle important que joue la matière organique, et plus particulièrement les acides humiques, sur les phénomènes d'adsorption et de désorption. La composition de la fraction minérale du sédiment, souvent peu étudiée, s'est révélée être un paramètre majeur dans ces mêmes phénomènes. Le rôle des cations monovalents et du fer II semble être limité alors que celui du magnésium et du carbonate de calcium est probablement important. Ces suppositions devront être vérifiées à l'aide de plans d'expériences complémentaires.

Cette étude rappelle également la complexité de la matrice sédimentaire. La vision du sédiment proposée par Kukkonen et Landrum (1996) est ici confirmée. Des ajouts de composants sédimentaires à partir de réactifs de laboratoire ne rendent pas compte des forces mises en jeu entre les différents constituants du sédiment. Une telle approche ne permet pas d'obtenir un nouveau sédiment mais tout au plus de déterminer si ledit constituant possède un effet sur l'adsorption, la désorption ou la dégradation des molécules étudiées. Les informations obtenues par ces plans d'expériences doivent donc être validées par des études menées avec des sédiments natifs de composition différente et parfaitement caractérisée.

Cette expérimentation doit être poursuivie par la réalisation d'isothermes à quatre concentrations (0,1 μg/mL, 1 μg/mL, 10 μg/mL et 100 μg/mL) sur deux types sédimentaires différents. Ces essais nécessiteront quatre expérimentations, chacune étant dupliquée. Les premières concerneront des isothermes d'adsorption et de désorption de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline sur une vase stérilisée par ajout de 0,1 % de $HgCl_2$. Les expérimentations suivantes seront des répétitions des premières, mais sur un sable.

Enfin, en utilisant les données obtenues lors des essais préliminaires, des plans d'expériences et des essais d'isothermes et en réalisant des gammes supplémentaires de sédiments en faisant varier les paramètres critiques de façon aléatoire, il sera possible, à partir d'une cinquantaine de sédiments différents de réaliser une analyse en composantes principales. Pour chaque sédiment, le rapport des concentrations dans l'eau et les sédiments sera déterminé en duplicata au temps d'équilibre. Cette analyse statistique devrait permettre d'obtenir un graphique permettant de « cartographier » les capacités d'adsorption, de désorption et de dégradation des sédiments en fonction des caractéristiques physico-chimiques et bactériologiques choisies.

3 Bioaccumulation par un organisme benthique

3.1 Objectifs et enjeux

Le but de cette étude est de déterminer la contamination et la décontamination d'un organisme animal ou végétal par l'oxytétracycline, la fluméquine et l'acide oxolinique. Pour cela, un être vivant révélateur d'une éventuelle contamination est choisi. Sa capacité d'adaptation et les conditions environnementales nécessaires aux essais expérimentaux sont étudiés. L'objectif final de cette étude est de déterminer un facteur de bioconcentration de ces trois antibiotiques dans l'organisme choisi.

3.2 Choix du bioaccumulateur

Plusieurs types de bioaccumulateurs sont décrits dans la littérature.

3.2.1 Caractéristiques d'un bioaccumulateur idéal

Ramade (1992) a listé les caractéristiques nécessaires à une espèce pour être considérée comme bioaccumulatrice.

1. Tous les individus de l'espèce doivent présenter une bonne corrélation entre la concentration en xénobiotique dans le milieu et leur teneur en ce polluant, et ce, quelles que soient les conditions environnementales.
2. L'espèce ne doit pas être tuée par le xénobiotique et sa reproduction ne doit pas être affectée.

3. L'espèce doit être sédentaire.
4. L'espèce doit être abondante dans la zone étudiée ou être facilement transplantable dans celle-ci.
5. Les espèces à forte longévité sont préférables car elle permettent une accumulation plus longue et la réalisation de prélèvements sur plusieurs classes d'âges.
6. L'espèce doit être de taille suffisante pour fournir des tissus en quantité importante pour analyse.
7. L'espèce doit être facile à prélever.

3.2.2 Choix d'un bioaccumulateur, *a priori*

Les polychètes et les oligochètes

Les polychètes sont couramment utilisés comme indicateurs de contamination (Ankley *et al.*, 1993; Pergent, 1991; Reeders et de Vaate, 1992). L'absence de métabolisation (Egeler *et al.*, 1997), la corrélation du facteur de bioaccumulation avec le coefficient de partage octanol/eau (Hoke *et al.*, 1995) et la teneur élevée en lipides de l'animal (Maruya *et al.*, 1997) sont autant d'éléments favorables au choix des polychètes comme bioaccumulateurs de l'oxytétracycline et de l'acide oxolinique. Le fait que certains de ces animaux soient détritivores est aussi intéressant pour la bioaccumulation des xénobiotiques à partir des sédiments (Kaag *et al.*, 1997; Mulsow et Landrum, 1995; Nebeker *et al.*, 1989; Neff, 1984). Néanmoins, la biodisponibilité des xénobiotiques dans les sédiments dépend de la taille des particules : il existe donc de fortes variations en fonction du type de sédiment (Neff, 1984).

Les facteurs limitants à l'utilisation de ces animaux comme bioindicateurs sont, d'une part l'absence de corrélation entre les concentrations en xénobiotiques des sédiments et celles des animaux (Schuytema *et al.*, 1990), d'autre part la forte variation des facteurs de bioaccumulation en fonction de nombreux paramètres intrinsèques (teneur en lipides, génotype, histoire de l'animal, cycle de reproduction, ...) et extrinsèques (température, turbidité, pH, taille des particules de sédiment, ...) (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1991; Driscoll *et al.*, 1997b; Forbes et Forbes, 1997; Ingersoll *et al.*, 1995; Kaag *et al.*, 1997; Lang, 1997; Meador *et al.*, 1997; Thybaud et Caquet, 1991; West *et al.*, 1997). Le choix des polychètes comme bioindicateurs semble donc ici pouvoir, *a priori*, être rejeté, d'autant qu'il est difficile de maintenir les animaux dans de bonnes conditions pendant une expérimentation (Ankley *et al.*, 1993).

Les poissons

Malgré leur fréquente utilisation comme indicateurs de contamination (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1991), leur forte teneur en lipides permettant une bonne bioaccumulation (Nebeker *et al.*, 1989) et le fait que certains poissons comme la brème puissent se nourrir sur le fond et donc accumuler à partir des sédiments (Porte et Albaigés, 1993), l'utilisation des poissons dans les essais écotoxicologiques sur des antibiotiques semble difficile du fait de leur forte capacité de métabolisation des xénobiotiques (l'acide oxolinique est hydroxylé et glucuronoconjugué) (Ueda *et al.*, 1988; Yamamoto *et al.*, 1997). De plus, le facteur de bioaccumulation dépend de la teneur en lipides et de l'état physiologique, très différents pour chaque animal (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1991). Ils ne sont pas sédentaires, bien que ce problème puisse être résolu par l'utilisation de cages. Enfin, pour Ravera et Riccardi (1997), les poissons sont de moins bons bioindicateurs que les macrophytes ou les bivalves.

Les bivalves

Les bivalves sont couramment utilisés comme indicateurs de contamination (Pergent, 1991) car ils sont très présents dans le milieu naturel (Metcalfe et Charlton, 1990) et peuvent être détritivores (Hickey *et al.*, 1995). De plus, ils sont d'un entretien facile en laboratoire (Mäkelä et Oikari, 1995) et leur exposition sur le terrain est facile en cage (Doyotte *et al.*, 1997; Metcalfe et Charlton, 1990; Storey et Edward, 1989). Leur facteur de bioaccumulation est élevé avec une bonne corrélation avec la concentration du milieu extérieur (Chevreuil *et al.*, 1996; Maruya *et al.*, 1997). Ils adsorbent les métaux, souvent sur les parties molles (Gagnon et Fisher, 1997; Rajendran *et al.*, 1988; Szefer *et al.*, 1997) et métabolisent faiblement les hydrocarbures (Porte et Albaigés, 1993).

Cependant, le fait que le facteur de bioaccumulation dépende de nombreux facteurs intrinsèques (teneur en lipides, historique de l'animal, sexe et cycle de reproduction, espèce, ...) et extrinsèques (site d'exposition, ...) (Mäkelä et Oikari, 1995; Boryslawskyj *et al.*, 1988; Ferreira *et al.*, 1990; Hameed *et al.*, 1990; Ostapczuk *et al.*, 1997; Storey et Edward, 1989; Ueda *et al.*, 1988; Uno *et al.*, 1997; Weis *et al.*, 1993) et soit différent pour une étude en laboratoire et sur le terrain (Borcherding et Jantz, 1997) pose problème pour l'utilisation de ces animaux dans nos études. De plus, l'oxytétracycline s'accumule moins dans les moules que dans les sédiments (Coyne *et al.*, 1997) et la moule est très peu bioconcentratrice d'hydrocarbures (Porte et Albaigés, 1993). Enfin, la métabolisation des pesticides est souvent intense chez ces animaux (Hickey *et al.*, 1995; Ueda *et al.*, 1988; Uno *et al.*, 1997) ce qui est préocupant pour leur utilisation comme bioaccumulateurs de

molécules facilement métabolisables telles que les antibiotiques.

Les insectes

L'accumulation des antibiotiques chez les insectes est réduite du fait de leur faible espérance de vie et leur forte capacité de métabolisation (Driscoll *et al.*, 1997a). Leur prélevèment est difficile car il faut un grand nombre d'individus pour obtenir une biomasse suffisante à l'analyse (Hare, 1992). Leur facteur de bioaccumulation est soumis aux variations des même facteurs que les bivalves (Hare, 1992). Pour toutes ces raisons, ces animaux ne semblent pas posséder les caractéristiques requises pour former de bons bioindicateurs malgré le fait qu'ils soient nombreux, facilement identifiables (Hare, 1992) et qu'il soit possible d'utiliser des cages pour leur exposition (Montañés *et al.*, 1995).

Les macrophytes

Les macrophytes sont considérées comme de bons bioindicateurs des milieux dulçaquicoles, tant pour des molécules organiques qu'inorganiques (Ramade, 1992; Ostapczuk *et al.*, 1997; Ravera et Riccardi, 1997; Roy et Hänninen, 1995; Siebert *et al.*, 1996; Vincent *et al.*, 2001; Sanchiz *et al.*, 2001; Maine *et al.*, 2001). En effet, elles possèdent des facultés de régénération, de transplantation et de colonisation aisées (Barrat-Segretain *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 1996) ce qui facilite les expérimentations *in vitro*. Claveri *et al.* (1995) ont cependant noté une différence de facteur de bioaccumulation entre les plantes autochtones et les plantes transplantées. Le facteur de bioaccumulation des métaux change également en fonction des conditions extérieures (Wang et Lewis, 1997), particulièrement de la teneur en substances organiques dissoutes (Crum *et al.*, 1999; Pempkowiak et Kosakowska, 1998). Les macrophytes sont facilement identifiables, prélevables (Stewart et Malley, 1999) et les dommages physiologiques causés aux plantes ne posent pas de problème pour l'adsorption des métaux ; en effet, même mortes, les macrophytes sont d'excellentes bio-adsorbants (Mersch et Reichard, 1998; Schneider et Rubio, 1999). Les études menées dans la littérature montrent que leur facteur de bioaccumulation n'est pas corrélé avec les facteurs environnementaux — pour le mercure — (Thompson *et al.*, 1999) ce qui a permis de mettre au point un modèle mathématique pour les métaux (Gonçalves et Boaventura, 1998). Un autre avantage des macrophytes, dans notre cas, est que certaines espèces peuvent accumuler les xénobiotiques à partir des sédiments (souvent de l'eau intersticielle) (Stewart et Malley, 1999; Thompson *et al.*, 1999) : c'est le cas par exemple de *Eriocaulon septangulare*, même si ces auteurs ont remarqué que la concentration en xénobiotique dans cette macrophyte n'est pas corrélée avec celle des sédiments. Une étude sur le terrain peut en outre être facilitée par l'utilisation de mousses transférées depuis un site témoin.

3.2.3 Choix de l'espèce bioaccumulatrice, *a priori*

Au vu de l'analyse bibliographique précédente, le meilleur compromis entre les différentes caractéristiques d'un bioaccumulateur idéal (§ 3.2.1) est obtenu avec une macrophyte. Les bryophytes et plus particulièrement *Fontinalis antipyretica*, ont déjà été utilisées dans de nombreuses études en milieu dulçaquicole, notamment sur l'accumulation des métaux (Siebert *et al.*, 1996; Wang et Lewis, 1997; Vasquez *et al.*, 1999; Gonçalves et Boaventura, 1998; Mersch et Reichard, 1998) mais également des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Roy *et al.*, 1996). Cette espèce a l'avantage d'être très répandue dans nos régions mais également d'être de grande taille et présente toute l'année, ce qui facilite les prélèvements. Elle est également polluo-tolérante donc présente tout au long d'un cours d'eau. D'autres espèces telles que *Hypnum rusciforme* possèdent les mêmes avantages que *Fontinalis antipyretica* et peuvent être utilisées en cas d'absence de cette dernière *in situ*.

Fontinalis antipyretica

Fontinalis antipyretica est une bryophyte de l'ordre des *Hypnaceae* et de la famille des *Fontinalaceae*. C'est une plante dioïque avec une capsule terminant des rameaux de 3 à 6 mm. Les feuilles sont sans nervure, sur trois rangs, entières et pliées en long suivant la partie moyenne. Les feuilles mesurent de 3 à 8,5 mm de long et le limbe est généralement plus long que large (1,5 à 3,5 sur 1). La tige de taille très variable allant de 20 cm à 90 cm présente trois faces bien nettes (figure 24). Quelques rappels sur la physiologie des macrophytes sont disponibles en annexe D.

FIG. 24 – *Morphologie de Fontinalis antipyretica.*

3.3 Matériels et méthodes

3.3.1 Essais préliminaires : Evolution du rapport chlorophylle a sur phéophytine en réponse à un stress environnemental

Le rapport chlorophylle a sur phéophytine est indicateur de stress physiologique chez les bryophytes (Peñuelas, 1984b,a; Zapata, 1988; Lopez et Carballeira, 1990). L'objectif de ces essais est de déterminer l'évolution de ce rapport en réponse à différentes variations de conditions environnementales afin de s'assurer de l'état physiologique convenable des plantes, et donc de leur capacité d'accumulation. Cette étude doit aboutir à la détermination d'une valeur seuil du rapport chlorophylle a sur phéophytine.

Préparation des échantillons

Les bryophytes (*Fontinalis antipyretica*) et l'eau nécessaires à l'étude sont prélevées dans la Chézine. Les végétaux sont maintenus à l'humidité dans une glacière grâce à des linges humides et amenés le plus rapidement possible au laboratoire.

Le rapport chlorophylle a sur phéophytine est mesuré à partir de 100±2 mg de *Fontinalis antipyretica* exactement pesés. L'échantillon est séché sur papier absorbant et placé dans un tube à essai. Les bryophytes sont immergées totalement dans 6 mL d'un mélange acétone : eau (90 : 10, v/v). Le tube est maintenu pendant 1 h à l'obscurité, à +20±2 °C puis centrifugé à 2500×g pendant 3 min. L'absorbance du pigment extrait est déterminée à 665 nm (spectrophotomètre Jasco 7800, Tokyo, Japon). Un volume de 3 mL d'extrait est prélevé et acidifié par 30 μL d'acide chlorhydrique 1 mol/L. L'absorbance de l'extrait acidifié à 665 nm est déterminée et le rapport chlorophylle a sur phéophytine est alors calculé comme l'absorbance à 665 nm de l'échantillon divisée par l'absorbance à 665 nm de l'échantillon acidifié.

Protocole d'étude

L'effet de la température de l'eau, du pH et de la teneur en oxygène de l'eau sur le rapport chlorophylle a sur phéophytine est étudié. L'absence d'effet du stockage des bryophytes au congélateur sur le rapport chlorophylle a sur phéophytine est également vérifiée. Lors de cette étude, un seul paramètre varie, toutes choses égales par ailleurs. Pour chaque paramètre, l'étude est tripliquée et l'eau utilisée est celle de la Chézine et un essai témoin est réalisé pour chaque mesure dans l'eau de la Chézine non modifiée à +20 °C.

L'étude de l'effet des températures est réalisée en immergeant 100±2 mg de *Fontinalis antipyretica* dans 1 L d'eau maintenu à +4 °C, +20 °C, +30 °C ou +50 °C.

Les essais concernant l'effet du pH sont réalisés en plongeant 100±2 mg de *Fontinalis antipyretica* dans 1 L de solution tampon acétate à pH 4,4 ou de solution tampon phosphate à pH 7,0 ou de solution tampon phosphate dipotassique à pH 9,0.

L'effet de la teneur en oxygène dissout dans l'eau sur le rapport chlorophylle a sur phéophytine est étudié en utilisant une eau apauvrie en oxygène par bullage d'azote, une eau « native », et une eau saturée par bullage en oxygène.

Pour chaque essai, le rapport chlorophylle a sur phéophytine est mesuré avant immersion dans l'eau puis après 30 min, 1 h, 2 h, 4 h et 24 h d'immersion.

3.3.2 Protocole d'étude des cinétiques de bioaccumulation et de décontamination

Conditions d'exposition des bryophytes

Cette étude est menée dans la station expérimentale d'aquaculture de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

Les échantillons de *Fontinalis antipyretica* sont prélevés dans la Chézine, maintenus à l'humidité et conditionnés en brins (comportant un apex en bon état) de masse homogène (environ 3 g). Ces derniers sont lavés dans l'eau du milieu d'origine préalablement filtrée. Ils sont ensuite fixés à des fils lestés et accrochés à des barres maintenues sur les bacs (figure 27).

Ces dispositifs sont placés pendant 5 à 6 j dans des conditions similaires à celles de l'expérimentation proprement dite pour « acclimater » les fontinales.

Des bacs de 200 L permettent de disposer 10 brins par bac. Le rapport biomasse sur volume d'eau est donc de 30 g pour 200 L.

La température de l'eau est mesurée quotidiennement. L'eau utilisée provient du réseau de distribution d'eau potable de la ville et est passée sur charbon actif ; ceci lui permet de garder une teneur naturelle en cofacteurs minéraux et de ne plus contenir de polluants tels que des pesticides.

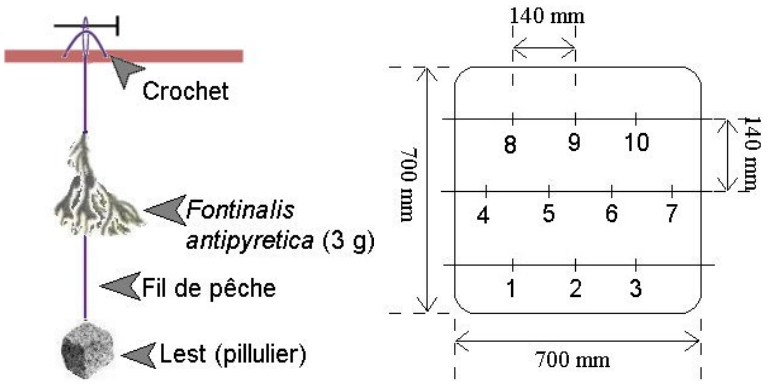


FIG. 25 – *Dispositif expérimental pour l'exposition des fontinales lors de l'étude de bioaccumulation.*

La lumière est fournie par un tube fluorescent de type Biolux®. Chaque bac dispose d'un tube néon situé environ 1,5 m au dessus de l'eau. Le local est isolé de la lumière extérieure par des bâches opaques. L'intensité de la lumière est d'environ 300 lux et le cycle nychtéméral est de 13 h de lumière pour 11 h d'obscurité.

Vérification de l'état physiologique des fontinales

L'état des fontinales est vérifié afin de déterminer si le contact avec le xénobiotique et l'effet de bac n'ont pas altéré les capacités physiologiques de la plante. Le rapport chlorophylle a sur phéophytine est mesuré sur un brin du dispositif prélevé. Il renseigne sur l'état de stress des plantes. En cas de stress anormalement élevé, l'état de la cellule apicale est observé au microscope pour déterminer toute toxicité aiguë due à l'antibiotique.

Protocole de mesure de la cinétique d'accumulation et de décontamination

Cette étude dure 25 j et nécessite dix bacs (figure 26) :

- Cinq bacs d'acclimatation dans lesquels les plantes séjournent au moins 5 j avant d'être utilisées pour l'expérimentation. Lorsque des fontinales sont prélevées dans ces bacs, elles sont immédiatement remplacées. Avant le début de l'étude, tous les bacs sont considérés comme bacs d'acclimatation.
- Deux bacs contenant 1 μg d'acide oxolinique, de fluméquine ou d'oxytétracycline par millilitre d'eau (bacs A et B).
- Deux autres bacs contenant l'antibiotique à la concentration de 0,1 μg/mL (bacs C et D).

– Un bac ne contenant pas d'acide oxolinique, de fluméquine ou d'oxytétracycline servant de témoin (bac T).

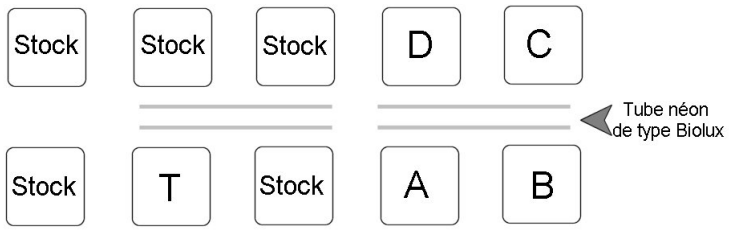


FIG. 26 – *Disposition des bacs pendant l'étude de bioaccumulation.*

Deux bulleurs assurent une teneur optimale en oxygène dissous et un brassage de l'eau. Une masse définie pour atteindre la concentration désirée d'acide oxolinique, de fluméquine ou d'oxytétracycline est dissoute dans 1 L d'eau du circuit puis versée dans le bac au premier jour de l'expérimentation. Pour chaque bac, l'eau est renouvelée tous les deux jours. L'antibiotique est ajouté dans les bacs après chaque changement d'eau jusqu'au dixième jour. Entre les jours 10 et 25, aucun antibiotique n'est ajouté après le changement d'eau. Les plantes sont prélevées aux jours 2, 4, 6, 10 pour l'étude de contamination et aux jours 11, 12, 13, 15, 20 et 25 pour l'étude de décontamination. Afin de préserver une biomasse constante dans les bacs, les fontinales prélevées sont remplacées par d'autres provenant du bac d'acclimatation.

Les échantillons prélevés pour les mesures du rapport chlorophylle a sur phéophytine sont congelés immédiatement. Les spécimens prélevés pour le dosage des antibiotiques sont lavés 30 s dans un bécher contenant de l'eau du circuit, congelés et analysés ultérieurement. Un prélèvement d'eau, une mesure de la luminosité, des relevés de la température minimale et maximale de la journée ainsi que du pH et de la teneur en oxygène sont effectués tous les jours (avant la chasse s'il y a lieu).

Les effluents sont passés sur charbon actif avant d'être rejetés à l'égout. Des prélèvements en aval de la cartouche de charbon actif sont effectués à chaque chasse pour contrôler la non-contamination de l'effluent rejeté dans l'environnement.

3.3.3 Protocole d'étude du mécanisme d'accumulation

L'objectif de ces essais est de déterminer la part relative due à l'absorption active et à l'absorption passive et/ou à l'adsorption de l'acide oxolinique, de l'oxytétracycline et de la fluméquine par *Fontinalis antipyretica*. La part due à l'adsorption active est évaluée par la différence d'accumulation des antibiotiques entre les plantes fraîches et mortes.

Conditions d'exposition des fontinales

Comme pour la détermination des facteurs de bioaccumulation, les fontinales sont prélevées dans la Chézine mais elles sont conditionnées en brins d'environ 3 et 6 g de masse homogène. Ces brins sont lavés dans l'eau de la Chézine préalablement filtrée puis fixés à des fils lestés et accrochés à des barres maintenues sur les bacs (figure 27).

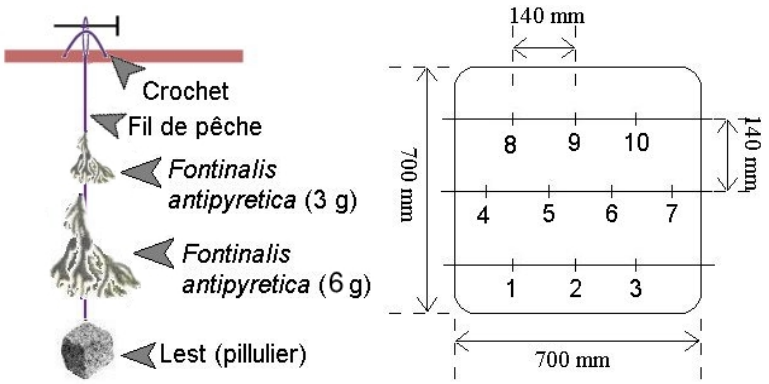
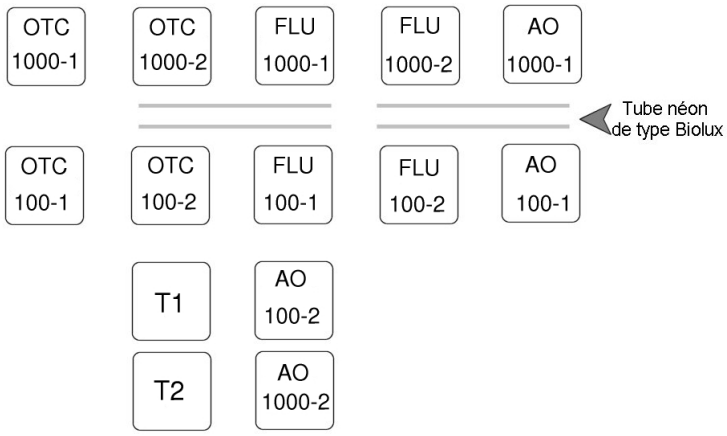


FIG. 27 – *Dispositif expérimental pour l'exposition des fontinales lors de l'étude de bioaccumulation.*

Les bacs, les conditions de température, de lumière et d'oxygénation sont les mêmes que pour les essais de bioaccumulation visant à déterminer les facteurs de bioaccumulation.

Pour chaque bac, l'eau est renouvelée tous les deux jours. Un bulleur assure une teneur optimale en oxygène dissout et un brassage de l'eau. Cette étude nécessite quatorze bacs répartis comme indiqué par la figure 28 et le tableau 40. Pour chaque bac la moitié des plantes utilisées est au préalable trempée 20 sec dans l'azote liquide. Lorsque les bacs contiennent un antibiotique, l'ajout de celui-ci est réalisé par dissolution dans 1 L d'eau du circuit. Un litre et demi sont ensuite prélevés dans le bac (après équilibre du niveau d'eau) puis le litre de supplémentation y est versé. Les plantes sont prélevées deux par deux aux jours 2, 4, 6, 8 et 10.

FIG. 28 – *Disposition des bacs pendant l'étude du mécanisme de bioaccumulation.*



TAB. 40 – *Répartition des quatorze bacs pour l'étude du mécanisme d'accumulation des antibiotiques par* Fontinalis antipyretica.

Bacs AO 100-1 et AO 100-2	0,1 μg/mL d'acide oxolinique
Bacs AO 1000-1 et AO 1000-2	1 μg/mL d'acide oxolinique
Bacs FLU 100-1 et FLU 100-2	0,1 μg/mL de fluméquine
Bacs FLU 1000-1 et FLU 1000-2	1 μg/mL de fluméquine
Bacs OTC 100-1 et OTC 100-2	0,1 μg/mL d'oxytétracycline
Bacs OTC 1000-1 et OTC 1000-2	1 μg/mL d'oxytétracycline
Bacs T1 et T2	témoins ne contenant pas d'antibiotique

Les spécimens prélevés pour le dosage des antibiotiques sont lavés 30 sec dans un bécher contenant de l'eau du circuit, congelés et analysés ultérieurement. Un prélèvement d'eau, une mesure de la luminosité, un relevé des températures minimales et maximales de la journée ainsi que du pH et de la teneur en oxygène sont effectués tous les jours (avant la chasse s'il y a lieu).

Les effluents sont passés sur charbon actif avant d'être rejetés à l'égout. Des prélevements en aval de la cartouche de charbon actif sont effectués à chaque chasse pour contrôler la non-contamination des effluents.

3.4 Résultats et discussion

3.4.1 Essais préliminaires : évolution du rapport chlorophylle a sur phéophytine en réponse à un stress environnemental

Des essais ont montré que la durée d'extraction de la chlorophylle par l'acétone importe peu sur la valeur moyenne obtenue pour le rapport chlorophylle a sur phéophytine. Par contre la variabilité des résultats diminue quand le temps d'extraction augmente. Le temps d'extraction est donc fixé à 1 h.

L'influence d'une congélation préalable à l'analyse a également été étudiée. Le but est de savoir si la congélation des échantillons modifie la valeur du rapport chlorophylle a sur phéophytine. Les résultats obtenus (figure 29) montrent qu'il n'y a pas de différence significative au risque de première espèce de 5 % entre la valeur obtenue pour un même échantillon analysé immédiatement et après une semaine de congélation. La congélation de la plante à -20 °C semble donc être assez rapide pour ne pas modifier significativement le rapport chlorophylle a sur phéophytine.

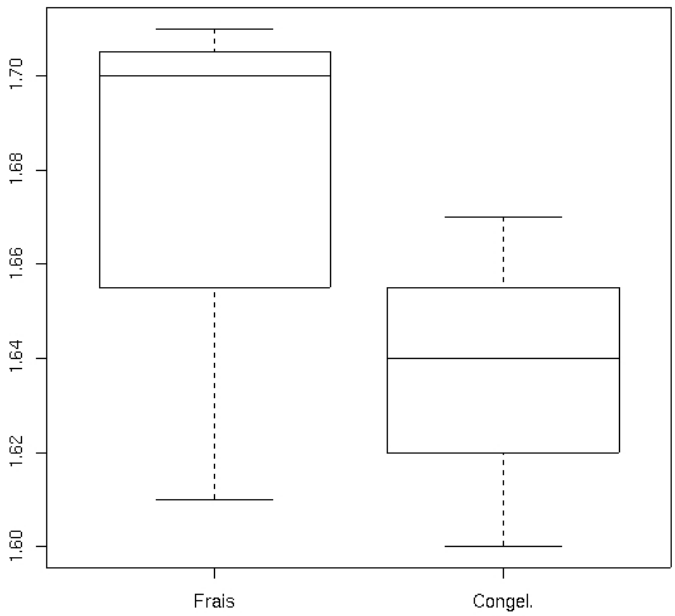


Fig. 29 – *Influence de la congélation sur le rapport chlorophylle a sur phéophytine.*

Détermination du seuil de stress

La phéophytine est le premier accepteur d'électron du photosystème. Si ce rapport diminue cela signifie que, la teneur en chlorophylle a diminue, la teneur en phéophytine augmente, ou les deux cas en même temps. Le phénomène est, dans les trois cas, dû à une altération de la fonction photosynthétique, donc de l'état physiologique de la plante. Ce rapport renseigne donc bien sur l'état de stress de la plante.

Dans la littérature, les valeurs du rapport chlorophylle a sur phéophytine sont comprises entre 1,50 et 1,74 dans des conditions normales et de 1,31 pour des plantes soumises à des concentrations toxiques en métaux (Lopez et Carballeira, 1990).

L'ensemble des valeurs obtenues lors de ces essais est utilisé pour calculer une première valeur moyenne du rapport chlorophylle a sur phéophytine. Les valeurs trop éloignées de cette moyenne sont écartées à l'aide du test de Dixon. Une nouvelle valeur moyenne est alors calculée ainsi qu'un intervalle unilatéral à droite au risque de première espèce de 5 %. La valeur de 1,5 ainsi obtenue est proche de celles obtenues par Lopez et Carballeira (1990).

Les plantes pour lesquelles la valeur du rapport chlorophylle a sur phéophytine est inférieure à 1,5 sont donc considérées stressées.

Influence des paramètres étudiés

Dans l'ensemble de notre étude, le rapport chlorophylle a sur phéophytine diminue quand les conditions environnementales se dégradent. Une période de 2 h semble être nécessaire dans tous les cas à stabiliser ce rapport. Cette période peut correspondre à un temps d'adaptation de la plante au nouveau milieu dans lequel elle est plongée.

L'influence de la lumière est difficile à étudier car c'est un paramètre qui a un effet sur une longue période. Il existe des plantes de lumière et des plantes d'ombre, qui ont besoin de moins de lumière. Chaque espèce possède une valeur de saturation (VS) caractéristique de sa capacité photosynthétique. Cette valeur correspond à la lumière nécessaire à l'obtention du plateau dans la figure 30. Cette valeur est d'environ 5000 lux pour une plante de lumière et 1000 lux pour une plante d'ombre. *Fontinalis antipyretica* est une plante qui vit sous la surface de l'eau dans des rivières passant en sous-bois : elle appartient donc à la famille des plantes d'ombre. La figure 31 indique le comportement de la photosynthèse en condition de faible éclairement. Le point de compensation (PC)

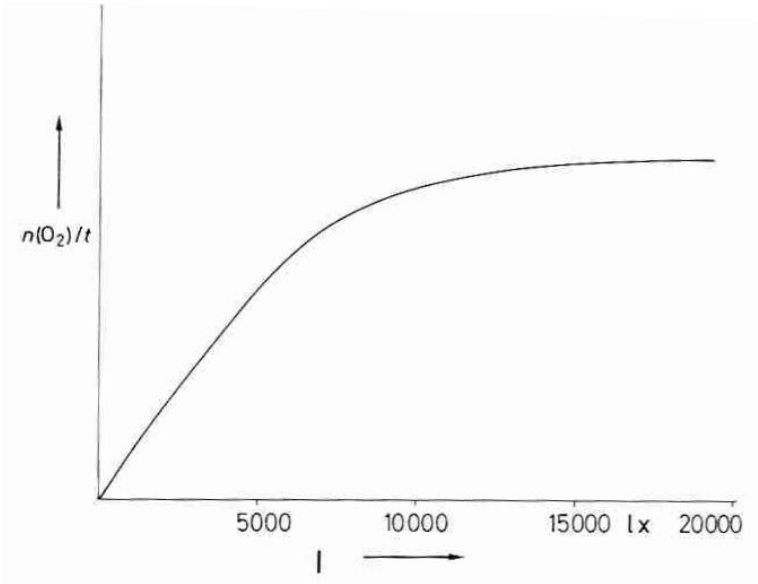


FIG. 30 – *Evolution de l'activité photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse (d'après Richter (1993)).*

est le point d'intersection de la courbe avec l'axe des abscisses. Il s'agit de l'intensité lumineuse pour laquelle la photosynthèse utilise une quantité de dioxyde de carbone égale à celle que la respiration de la plante produit. Les plantes d'ombre ont un bilan carboné positif pour de faibles intensités lumineuses et peuvent donc survivre dans ces conditions : une intensité lumineuse de 300 lux est donc suffisante à *Fontinalis antipyretica* pour maintenir un bilan carboné positif.

La température est un paramètre critique de l'état des plantes. En effet, la figure 32 montre bien que des températures trop élevées ou trop basses diminuent la valeur du rapport chlorophylle a sur phéophytine. Les conditions optimales semblent réunies pour des températures de l'ordre de 20 à 30 °C. Des températures de 4 °C provoquent une diminution du rapport jusqu'en dessous du seuil de stress mais la plante semble s'adapter car, après 24 h, le rapport chlorophylle a sur phéophytine remonte au-dessus de 1,5. Des plantes dans de l'eau à température supérieure aux températures optimales montrent un dépérissement rapide. Au bout de 24 h, les feuilles de la plante sont décolorées et le rapport n'est plus que de 1,2. Le fait que des températures élevées soient plus pénalisantes pour la plante que des températures faibles s'explique par des réactions enzymatiques intervenant dans la photosynthèse. Pour des températures trop élevées, ces mécanismes sont endommagés par la chaleur. Des adaptations sont par contre possibles pour des températures basses car les enzymes ne risquent pas d'être dénaturées par la température.

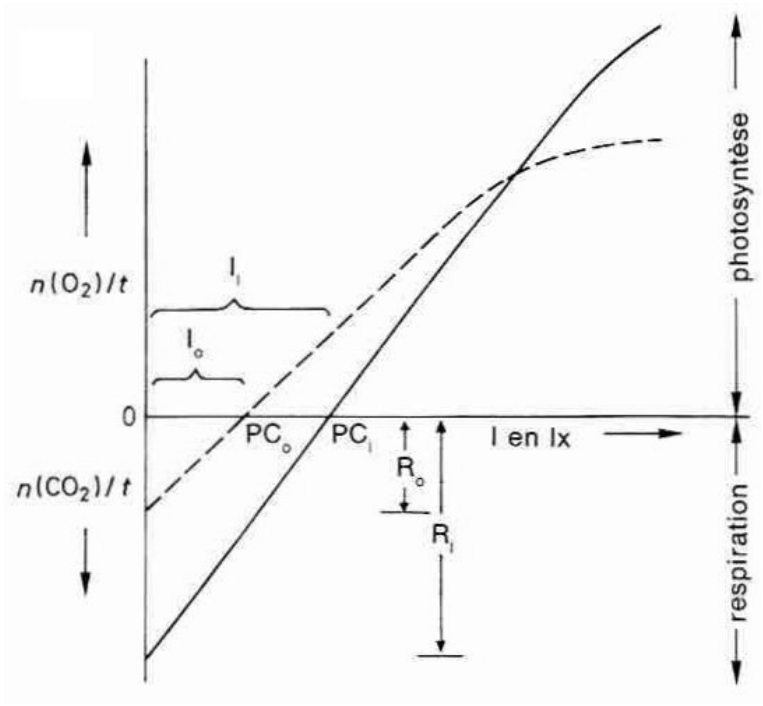


FIG. 31 – *Evolution du bilan carboné de plantes en fonction de la lumière en conditions de faible éclairement (d'après Richter (1993)).*

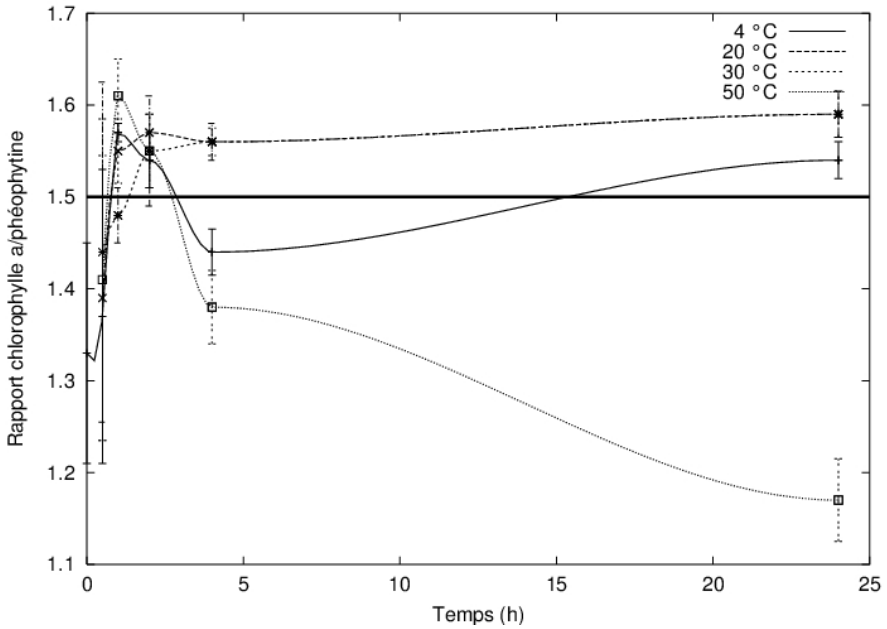


FIG. 32 – *Evolution du rapport chlorophylle a sur phéophytine en fonction du temps pour différentes températures de l'eau.*

Le pH de l'eau du milieu est également un facteur critique de l'état de stress des bryophytes (figure 33). En effet, les enzymes photosynthétiques possèdent un pH optimal de fonctionnement. Le pH d'une eau de rivière est généralement compris entre 7,5 et 9. Un pH de 9 ne modifie pas significativement la valeur du rapport chlorophylle a sur phéophytine alors qu'une eau à pH 7 provoque déjà un stress au bout de 24 h et qu'une eau trop acide (pH 4,4 dans notre étude) peut dénaturer les enzymes et conduire à un rapport chlorophylle a sur phéophytine très faible.

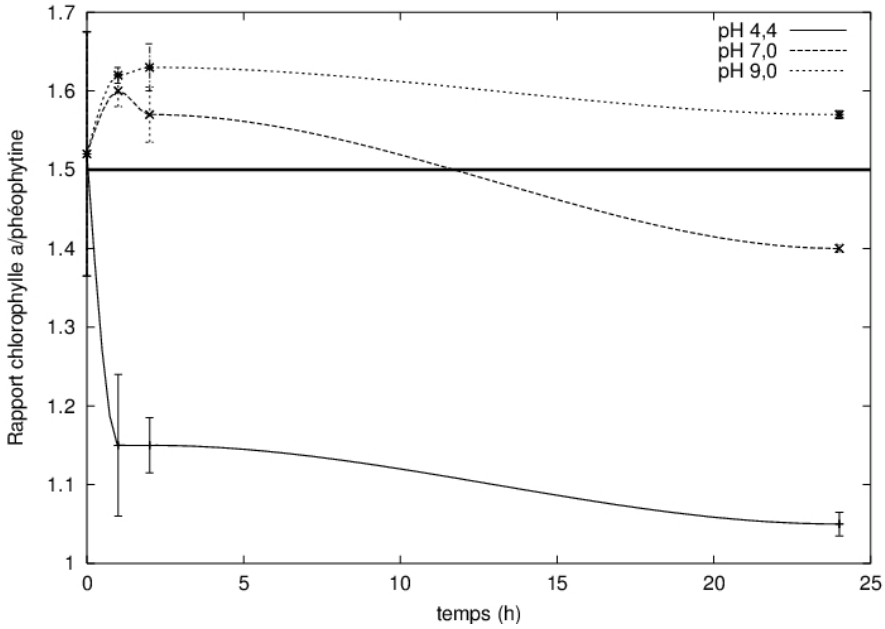


FIG. 33 – *Evolution du rapport chlorophylle a sur phéophytine en fonction du temps pour différentes valeurs du pH de l'eau.*

Le dernier paramètre étudié est la teneur en oxygène de l'eau. Ce paramètre ne semble pas influencer notablement l'état physiologique de *Fontinalis antipyretica.*

3.4.2 Protocole d'étude des cinétiques de bioaccumulation et de décontamination

Paramètres environnementaux

Les températures moyennes sont différentes pour chaque antibiotique. Du fait d'un grand nombre de bacs, les expérimentations n'ont pu être réalisées en même temps. La différence de température extérieure explique la différence de température dans

les bacs. La température moyenne dans les bacs était plus basse pour les essais avec l'oxytétracycline et la fluméquine que pour l'acide oxolinique (respectivement 12±1 °C, 12±1 °C et 18±2 °C). Le domaine de températures idéal pour *Fontinalis antipyretica* est situé entre +4 °C et +30 °C, les températures moyennes des expérimentations sont donc satisfaisantes pour les bryophytes.

Les pH moyens des trois expérimentations sont respectivement de 8,0±0,5, 8,3±0,2 et 7,8±0,2 pour l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline. Ces pH sont dans le domaine fixé par l'étude préliminaire (entre 7,5 et 9,0). La saturation de l'eau en oxygène était toujours supérieure à 100 %.

Les mesures de luminosité montrent des valeurs très proches de 300 lux, respectivement 331±33, 342±28 et 291±21 lux pour l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline. Ce seuil de luminosité de 300 lux est important car, au-dessus de cette valeur, le bilan carbonné de *Fontinalis antipyretica* est positif.

Sur la base de ces observations, il est possible de considérer que les brophytes sont dans des conditions favorables. L'observation des rapports chlorophylle a sur phéophytine confirme cette hypothèse pour l'acide oxolinique et la fluméquine avec des rapports respectifs de 1,65±0,13 et 1,71±0,13. Le rapport chlorophylle a sur phéophytine des bryophytes pour les essais avec l'oxytétracycline de 1,4±0,11 montre un état de stress de ces plantes. Un effet toxique de l'oxytétracycline peut être écarté car une analyse de variance montre que les rapports obtenus pour chaque bac sont homoscédastiques au risque de première espèce 5 % y compris pour le bac témoin ne contenant pas d'antibiotique. Les conditions d'exposition peuvent être mises en cause mais les rapports au premier jour d'expérimentation sont déjà en dessous de 1,5 (1,4±0,11) ce qui semble plutôt attester de bryophytes déjà stressés *in situ*.

L'analyse des quantités d'acide oxolinique, de fluméquine et d'oxytétracycline dans l'eau avant et après la cartouche de charbon actif montre que 99,99 % des antibiotiques sont retenus et donc que l'eau rejetée à l'égout ne contient plus que quelques traces d'antibiotique.

Période d'exposition

Au terme de la période d'exposition (jours 0 à 10), la concentration en acide oxolinique, fluméquine et oxytétracycline est plus élevée dans *Fontinalis antipyretica* que dans l'eau (figures 34, 35 et 36). L'oxytétracycline est bioaccumulée de façon plus intense

que l'acide oxolinique ou la fluméquine. Toutefois, le profil des courbes est très similaire pour les deux concentrations et les trois molécules.

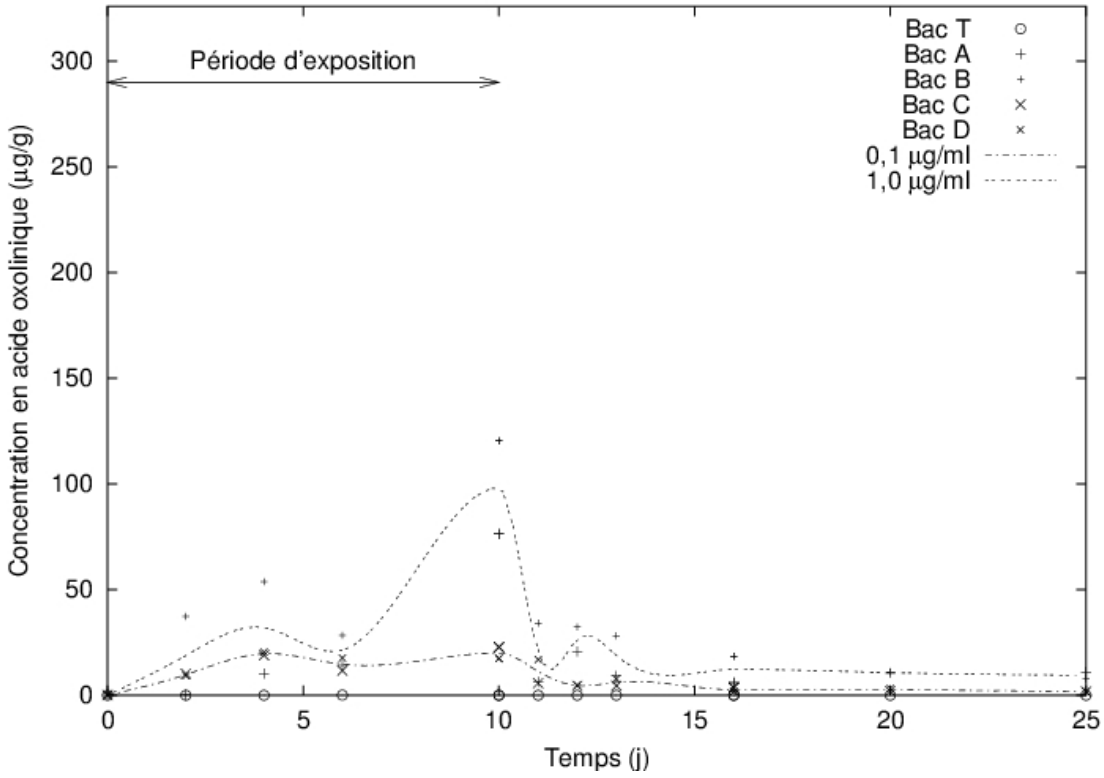


FIG. 34 – *Evolution de la concentration d'acide oxolinique dans* Fontinalis antipyretica *pendant l'expérimentation.*

La courbe de bioaccumulation peut être décrite par deux pics aux jours 4 et 10 séparés par une vallée. L'accumulation des antibiotiques par *Fontinalis antipyretica* n'est pas constante alors que la plante reste en contact permanent avec les trois molécules pendant la période d'exposition. Les méthodes analytiques décrites précédemment déterminent la concentration totale en antibiotique dans la plante ; dans ce cas, une diminution de la concentration en antibiotiques ne peut s'expliquer que par une dégradation. Si le mécanisme de bioaccumulation est celui décrit par la figure 37, alors l'adsorption et l'absorption peuvent être considérées séparément. Il est possible d'imaginer que le mécanisme d'absorption est caractérisé par une constante de vitesse k_1 et que les antibiotiques absorbés sont dégradés. Si les produits de dégradation sont stockés sous forme conjuguée dans les vacuoles, ce stockage peut alors être saturable. Ces hypothèses peuvent être décrites mathématiquement par la fonction $\Gamma_{(t)}$. La composante $\chi_{[0,b])}(t)$ de $\Gamma_{(t)}$ est une fonction caractéristique, c'est à dire que $\Gamma_{(t)}$ est égale à la constante de vitesse de dégradation k_4

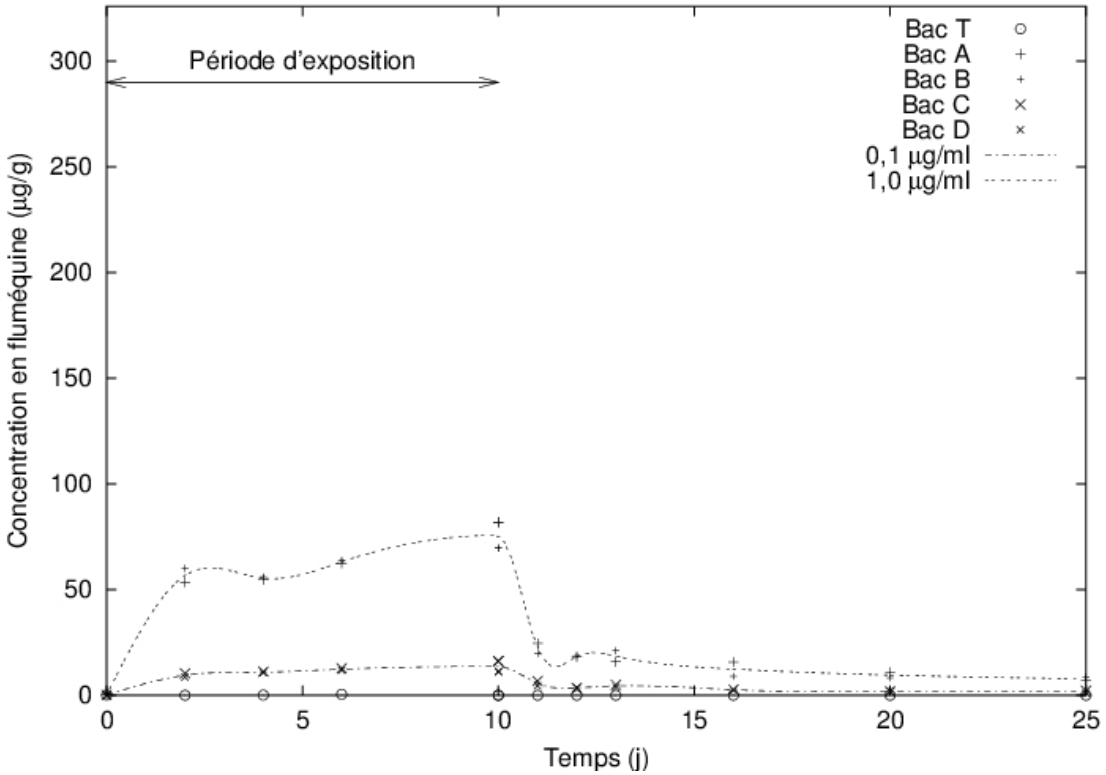


FIG. 35 – *Evolution de la concentration de fluméquine dans* Fontinalis antipyretica *pendant l'expérimentation.*

du premier jour jusqu'à saturation au temps b et que $\Gamma_{(t)}$ est égale à 0 après ce temps b. Suivant une cinétique du premier ordre, le mécanisme d'absorption peut être décrit par l'équation 3.1 où C_0 est la concentration initiale en antibiotiques dans l'eau.

$$C_{abs} = \frac{C_0 k_1}{\Gamma_{(t)} - k_1}(e^{-k_1 t} - e^{-\Gamma_{(t)} t}) \tag{3.1}$$

$$\Gamma_{(t)} = k_4 \times \chi_{[0,b]}(t) \tag{3.2}$$

Le mécanisme d'adsorption est ici considéré comme suivant le modèle de transfert de masse à site unique (OSMTM[3]) (Nzengung *et al.*, 1997). L'adsorption et la désorption suivant le modèle OSMTM sont représentées comme suit :

$$K_p C \underset{\epsilon}{\overset{\epsilon}{\rightleftharpoons}} S \tag{3.3}$$

où ϵ est le coefficient de transfert de masse (h^{-1}) et K_p le coefficient de partage à l'équilibre (mL/g). L'expression du transfert de masse est donné pour le modèle OSMTM

[3]OSMTM : one-site mass transfer model

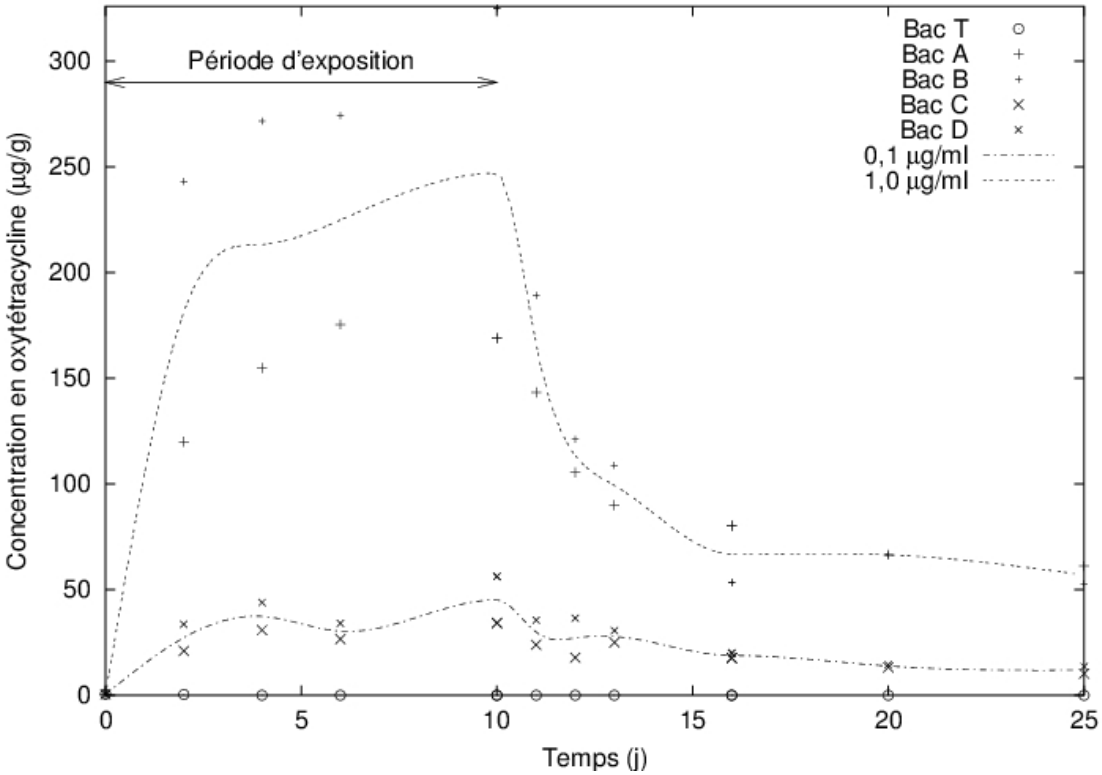


FIG. 36 – *Evolution de la concentration d'oxytétracycline dans* Fontinalis antipyretica *pendant l'expérimentation.*

par

$$\frac{V}{M}\frac{dC}{dt} = \epsilon(S - K_p C) \tag{3.4}$$

où M est la masse de bryophyte dans le bac (g), V le volume d'eau dans le bac (mL), et t le temps (h). A l'équilibre,

$$S_e = K_p C_e \tag{3.5}$$

La masse totale d'antibiotique adsorbé dans le bac (M_t) donnée par

$$M_t = MS + VC = VC_0 \tag{3.6}$$

où C_0 est la concentration initiale en solution (mg/l). L'équation 3.4 en terme de concentration en solution peut alors être décrite par

$$\frac{dC}{dt} = \epsilon\left[C_0 - \left(1 + \frac{K_p M}{V}\right)C\right] \tag{3.7}$$

qui s'intègre en

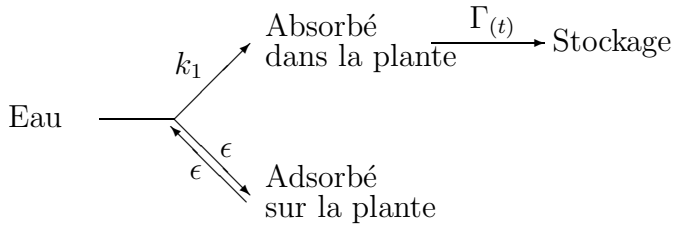


FIG. 37 – *Hypothèse de mécanisme d'accumulation de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline par* Fontinalis antipyretica.

$$C_{(t)} = C_e + [C_0 - C_e]e^{-\left(\frac{\epsilon}{\psi}\right)t} \tag{3.8}$$

où

$$C_e = \frac{C_0}{\left(1 + \frac{K_p M}{V}\right)} = \frac{M_t}{(V + MK_p)} \tag{3.9}$$

$$C_0 = \frac{M_t}{V} \tag{3.10}$$

$$\psi = \frac{C_e}{C_0} = \frac{1}{\left(1 + \frac{K_p M}{V}\right)} \tag{3.11}$$

où C_e est la concentration dans l'eau à l'équilibre (mg/mL) et S_e la concentration du bryophyte à l'équilibre (mg/g).

La concentration adsorbée peut alors s'écrire :

$$C_{ads(t)} = \frac{(C_0 - C_{(t)}) \times V}{M} \tag{3.12}$$

Les concentrations en acide oxolinique, fluméquine et oxytétracycline déterminées dans le bryophyte pendant l'expérimentation sont la somme des antibiotiques adsorbés et absorbés. La représentation graphique de ce modèle (figure 38) représente deux pics séparés par une vallée.

Le modèle proposé ici décrit mieux le phénomène de bioaccumulation que le modèle cinétique de premier ordre décrit par Gonçalves et Boaventura (1998) car il explique la diminution de concentration en antibiotique observée dans la plante au jour 4. La différence d'intensité d'accumulation entre l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline est expliquée par des variations de Kp ou $\frac{\epsilon}{\psi}$.

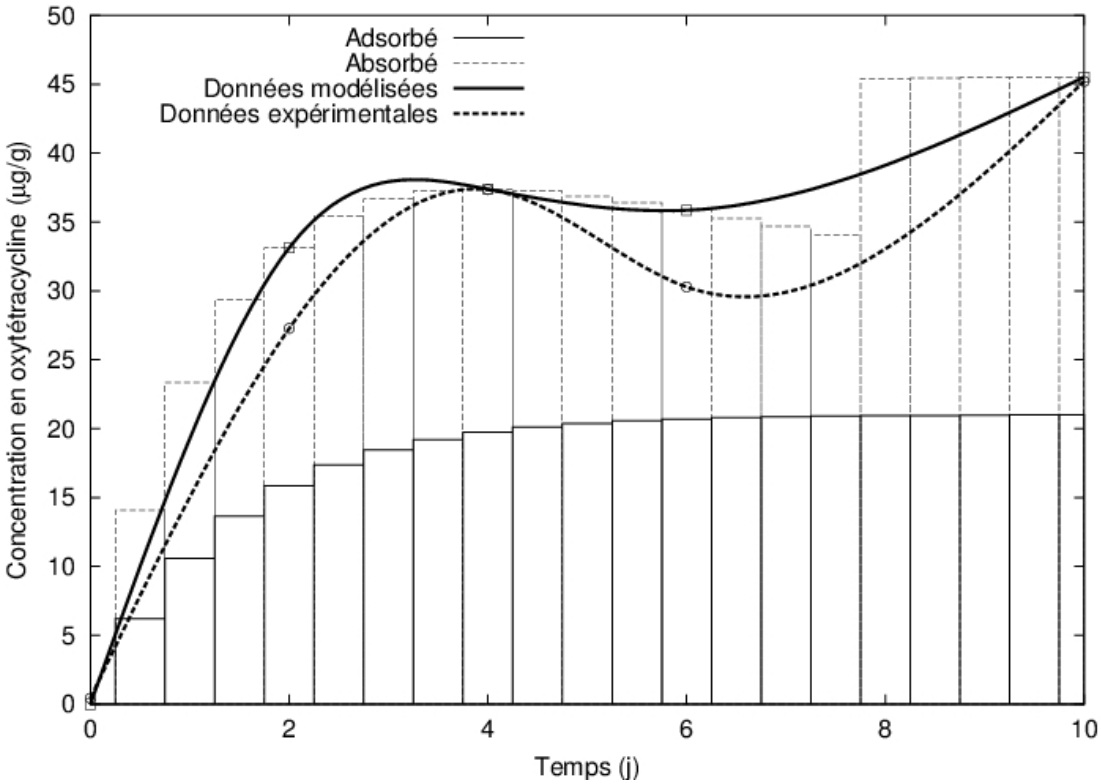


FIG. 38 – *Courbes obtenues par le modèle d'accumulation. Les symboles □ et ∘ représentent les temps d'échantillonnage. Les données expérimentales proviennent des essais de bioaccumulation de l'oxytétracycline à la concentration de 0,1 µg/g.*

Les facteurs de bioaccumulation (FBA) sont calculés en rapportant les concentrations en antibiotiques dans les végétaux à celles dans l'eau (tableau 41). La bioaccumulation est plus importante pour une concentration en solution de 0,1 μg/mL que pour celle de 1 μg/mL. Ceci peut être expliqué dans le modèle par une variation de la valeur ψ.

Les facteurs de bioaccumulation augmentent dans l'ordre fluméquine, acide oxolinique, oxytétracycline. Or, ces facteurs sont habituellement corrélés aux coefficients de partage octanol/eau des antibiotiques. Dans cette étude, l'opposé est observé comme le montre le tableau 42. Si les pH de l'eau au cours des trois expérimentations sont comparés aux pKa des antibiotiques (tableau 42), l'ordre des facteurs de bioaccumulation peut alors être expliqué par le niveau d'ionisation des molécules. En effet, plus les antibiotiques sont ionisés et plus ils sont accumulés par *Fontinalis antipyretica*. Il est donc possible de suggérer que la majeure partie de la fraction accumulée est la fraction ionisée.

Dans la littérature, les essais d'accumulation des trois antibiotiques étudiés ne sont

TAB. 41 – *Facteurs de bioaccumulation calculés au jour 10 de l'expérimentation. Ce facteur correspond à la concentration en antibiotique dans* Fontinalis antipyretica *rapportée à celle dans l'eau.*

Concentration	Acide oxolinique	Fluméquine	Oxytétracycline
0,1 μg/ml	200	140	450
1,0 μg/ml	100	75	250

TAB. 42 – *Niveaux d'ionisation et coefficients de partage octanol/eau k_{ow} de l'acide oxolinique (AO), de la fluméquine (FLU) et de l'oxytétracycline (OTC). Les niveaux d'ionisations sont calculés par la formule : $pKa = pH - log\frac{[A^-]}{[AH]}$.*

Antibiotique	k_{ow}	pH	pKa	Niveau d'ionisation
OA	47	7,8	6,9	89%
FLU	174	8,3	7,7	80%
OTC	2	8,0	3,3	100%

disponibles que dans l'environnement marin, seulement pour l'acide oxolinique et la fluméquine, et uniquement chez les mollusques bivalves. Les facteurs de bioaccumulation de l'acide oxolinique et de l'oxytétracycline chez la moule sont respectivement de 1 et 5 (Pouliquen *et al.*, 1992; Chevreuil *et al.*, 1996; Maruya *et al.*, 1997). Les résultats obtenus grâce à cette étude permettent une réelle amélioration des capacités de détection de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline dans l'environnement dulçaquicole.

TAB. 43 – *Facteurs de bioaccumulation (FBA) des métaux par* Fontinalis antipyretica *(ND signifie non disponible).*

	FBA				Temps d'ac-
Auteur	Cd	Pb	Zn	Cu	cumulation
Bruns *et al.* (1997)	17500	880	14390	5700	ND
Carballeira *et al.* (2001)	5	–	–	–	1 h
Gonçalves et Boaventura (1998)	–	–	–	30000	7 j
	–	–	–	40000	21 j
Siebert *et al.* (1996)	21	1896	7	17	ND

Comparés à ceux obtenus par *Fontinalis antipyretica* pour les métaux (tableau 43), les facteurs de bioaccumulation obtenus par cette étude sont bien inférieurs. Malgré la difficulté de comparer des études avec différents temps et conditions d'exposition, si un mécanisme d'absorption passive est pris en compte, alors la taille, mais également le niveau d'ionisation des antibiotiques peuvent expliquer des facteurs de bioaccumulation plus faibles pour des molécules plus grosses.

Période post-exposition

Le mécanisme de décontamination semble être le même pour tous les antibiotiques et aux deux concentrations. Il peut être divisé en deux parties (figures 34, 35 et 36), la première du jour 10 aux jours 12–13 étant caractérisée par une décontamination rapide en acide oxolinique, fluméquine et oxytétracycline. En considérant l'hypothèse d'un mécanisme de contamination en deux parties émise au paragraphe 3.4.2.0, cette décontamination rapide peut être due à la désorption de la fraction d'antibiotique adsorbée. Les mécanismes de désorption et de clairance peuvent alors être simplement décrits par la somme de deux fonctions exponentielles négatives

$$C = C'_{10}e^{-k'_1 t} + C''_{10}e^{-k'_2 t} \tag{3.13}$$

où C est la concentration dans le bryophyte, C'_{10} et C''_{10} sont respectivement les concentrations adsorbées et absorbées et k'_1 et k'_2 sont respectivement les constantes de désorption et de dégradation. Si $k'_1 > k'_2$, alors la figure 39 est obtenue.

Les calculs ont été réalisés sur les trois derniers points de la courbe (des jours 16 à 25). En considérant que la désorption est le principal mécanisme mis en jeu dans cette partie de la courbe, la cinétique est caractéristique d'une décontamination à long terme. Le modèle cinétique d'élimination mono-compartimental n'est pas utilisé à cause de la complexité du phénomène de décontamination. Dans ce cas, il est préférable d'utiliser un modèle non-compartimental. Les constantes les plus significatives d'un tel modèle cinétique sont la clairance totale (Cl_T) et le temps moyen de résidence (TMR). La clairance indique la capacité d'élimination de *Fontinalis antipyretica*, c'est la proportion de plante épurée chaque jour. Ce paramètre est normalement indépendant de la concentration initiale en antibiotique. Le temps moyen de résidence est le temps moyen durant lequel chaque molécule d'antibiotique est présente dans la plante.

Dans le tableau 44, les clairances sont environ huit fois plus importantes pour l'acide oxolinique et environ onze fois plus importantes pour la fluméquine que pour l'oxytétracycline et ne varient pas notablement avec la concentration. *Fontinalis antipyretica*

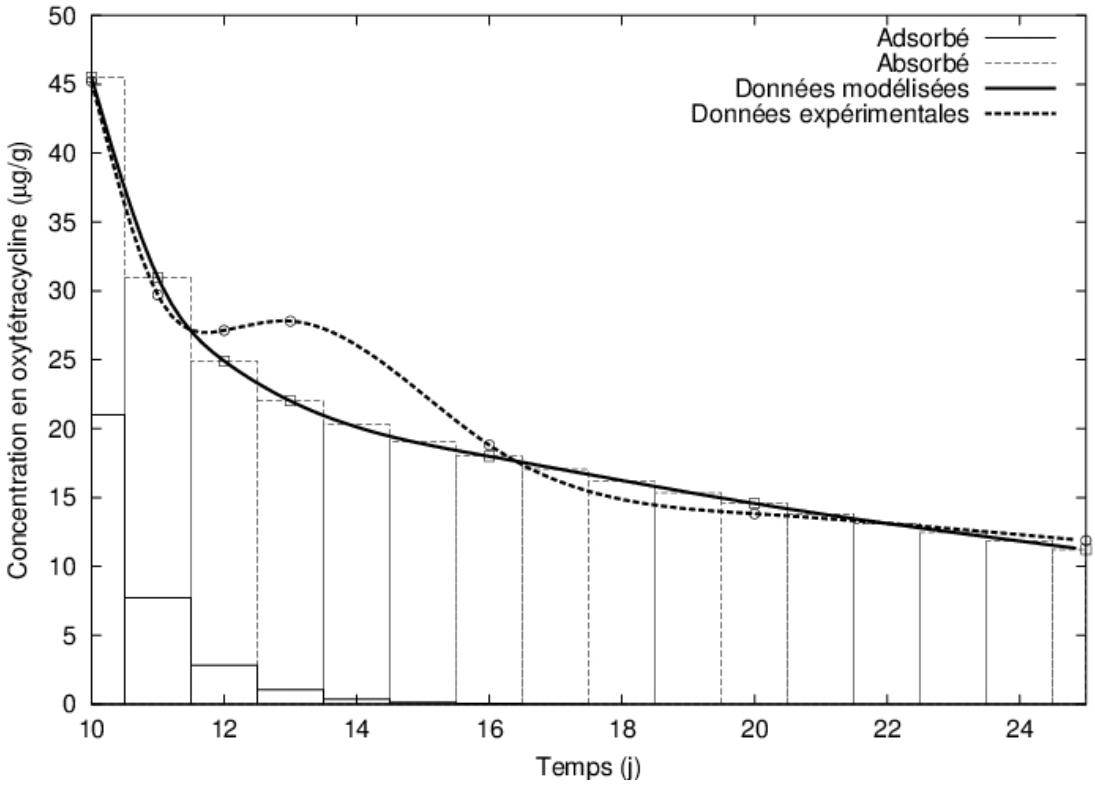


FIG. 39 – *Courbes obtenues par le modèle de décontamination. Les symboles □ et ∘ représentent les points d'échantillonnage. Les valeurs expérimentales sont obtenues à partir des essais sur l'oxytétracycline à 0,1 µg/g.*

élimine donc la fluméquine et l'acide oxolinique plus rapidement que l'oxytétracycline. Ces constantes d'élimination assez faibles indiquent une longue persistance des trois antibiotiques dans la plante. Ces longues persistances sont évaluées par les temps moyens de résidence. Ce paramètre est corrélé avec la concentration d'antibiotique dans l'eau. Les temps moyens de résidence sont similaires pour l'acide oxolinique et la fluméquine à la concentration de 0,1 µg/mL puis augmentent et diffèrent entre l'acide oxolinique et l'oxytétracycline à 1 µg/mL. La fluméquine est éliminée plus rapidement que les deux autres antibiotiques et son temps moyen de résidence reste constant pour les deux concentrations. Ces différences de temps moyens de résidence peuvent être dues à des distributions différentes dans la plante.

Aucun temps moyen de résidence n'était disponible pour la fluméquine dans la littérature. Les valeurs obtenues pour l'acide oxolinique et l'oxytétracycline peuvent cependant être comparées à celles obtenues par Pouliquen *et al.* (1996) dans les huîtres et les moules et à celles obtenues pour le cuivre pour *Fontinalis antipyretica* par Gonçalves et Boaven-

TAB. 44 – *Clairance (Cl_T) et temps moyen de résidence (TMR) calculés sur les trois derniers jours de l'expérimentation. Ces valeurs ont été calculées à l'aide d'un modèle non-compartimental.*

	Cl_T (ng/g/j)			TMR (j)		
Concentration	AO	FLU	OTC	AO	FLU	OTC
0,1 μg/ml	1,30	1,52	0,19	25	18	23
1 μg/ml	1,93	3,04	0,22	44	19	59

tura (1998) (tableau 45). La décontamination de l'acide oxolinique et de l'oxytétracycline est plus rapide dans les mollusques que dans *Fontinalis antipyretica*. La décontamination de l'acide oxolinique dans les mollusques est si rapide qu'aucun temps moyen de résidence n'a pu être précisément calculé. Les temps moyens de résidence obtenus dans *Fontinalis antipyretica* pour l'acide oxolinique et l'oxytétracycline sont proches de ceux obtenus pour le cuivre. Une décontamination lente signifie une longue persistance dans *Fontinalis antipyretica*, ceci est indispensable à l'utilisation de cette espèce comme bioaccumulateur pour réaliser un plan de surveillance sur le terrain.

TAB. 45 – *Temps moyens de résidences (TMR) obtenus dans la littérature.*

Auteur	Espèce	Molécule	TMR (j)
Pouliquen *et al.* (1996)	Huître	OA	<2
	Moule	OA	<2
	Huître	OTC	15
	Moule	OTC	8
Gonçalves et Boaventura (1998)	F. *antipyretica*	Cu	45

3.4.3 Protocole d'étude du mécanisme d'accumulation

L'intensité de l'accumulation est difficile à prendre en compte pour les plantes mortes car les méthodes de dosages n'ont été validées qu'à partir de plantes fraîches et leurs qualités pour le dosage des antibiotiques dans les plantes mortes ne sont pas connues. Seuls les profils des courbes seront donc discutés ici.

Les résultats obtenus pour les essais de bioaccumulation avec des plantes fraîches et mortes pour l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline sont décrits par les

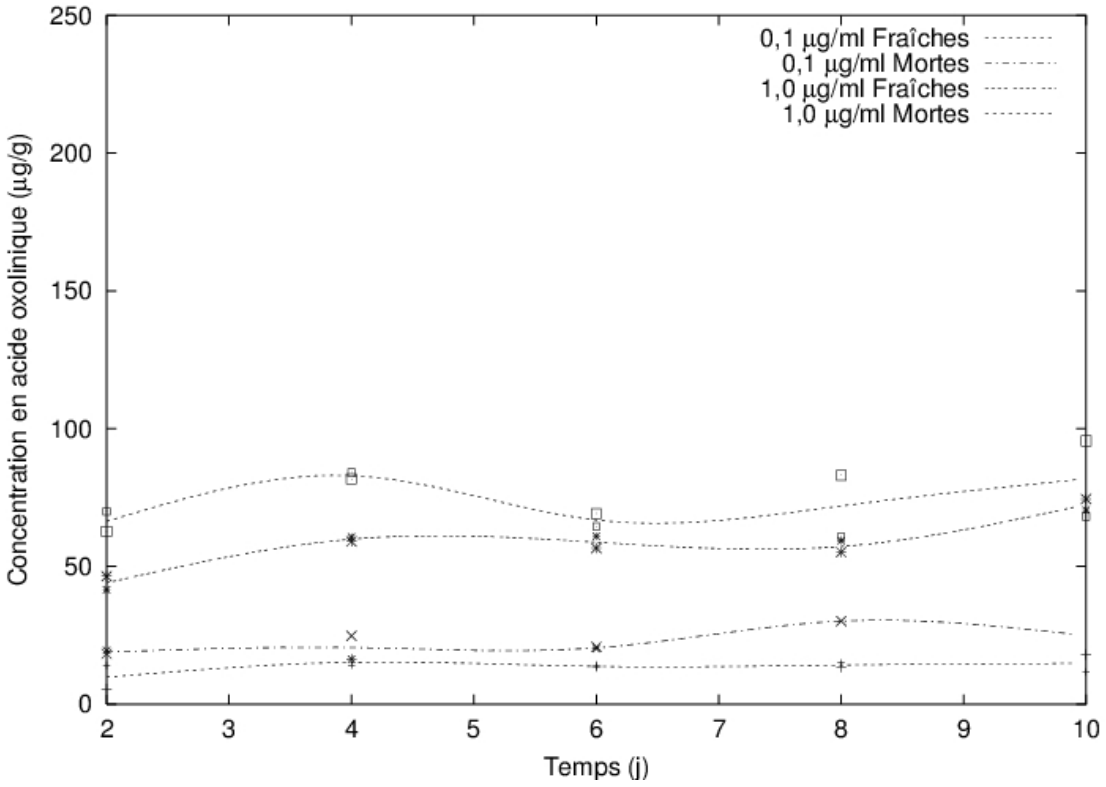


FIG. 40 – *Evolution de la concentration d'acide oxolinique dans* Fontinalis antipyretica *pendant l'expérimentation visant à déterminer le mécanisme d'accumulation.*

figures 40, 41 et 42. L'allure des courbes pour les bryophytes fraîches et mortes sont assez semblables excepté pour la fluméquine à 1 μg/mL. Une similitude dans l'allure des courbes signifie que les mécanismes d'accumulation pour les deux essais sont les mêmes. Il semble donc possible d'écarter une accumulation active de l'acide oxolinique et de l'oxytétracycline.

Dans le cas de l'expérimentation pour la fluméquine à 1 μg/mL, les profils de courbes montrent une augmentation de l'accumulation par la plante morte alors que l'accumulation par la plante fraîche tend vers un plateau. Cette différence de profil ne peut être due qu'à l'inactivation d'un mécanisme actif. En considérant le mécanisme d'accumulation décrit par la figure 37 et en excluant une erreur expérimentale, seule une inactivation du mécanisme de dégradation pourrait conduire à une telle différence de profil.

En comparant les profils obtenus ici à ceux obtenus aux figures 34, 35 et 36, les profils d'accumulation de l'acide oxolinique et de l'oxytétracycline sont bien similaires. Il s'agit bien de deux maxima séparés par une vallée. Les facteurs de bioaccumulation sont par

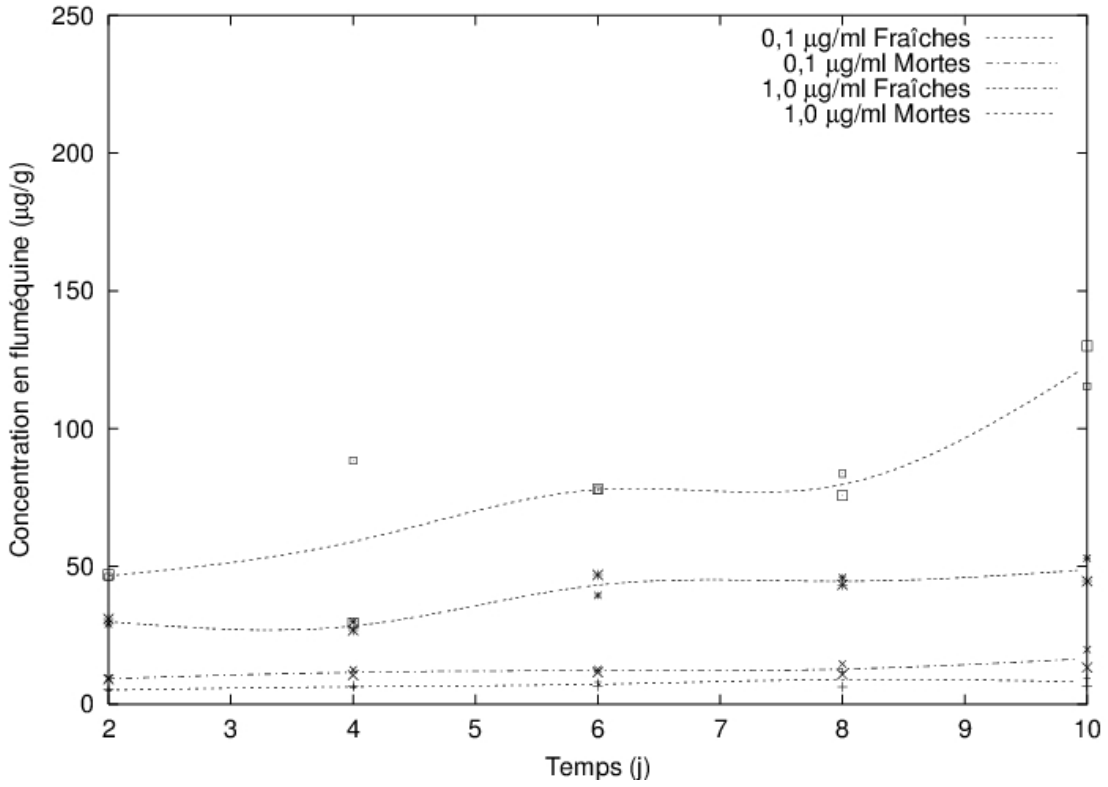


FIG. 41 – *Evolution de la concentration de fluméquine dans* Fontinalis antipyretica *pendant l'expérimentation visant à déterminer le mécanisme d'accumulation.*

contre inférieurs lors de cette deuxième expérimentation à ceux obtenus lors de la première (tableaux 41 et 46). Cette différence peut être attribuée à une augmentation de la biomasse dans les bacs lors de la deuxième expérimentation.

3.5 Conclusion

Cette étude a permis de déterminer un indicateur fiable de l'état de stress de *Fontinalis antipyretica* ainsi que les paramètres pouvant modifier directement cet état.

Fontinalis antipyretica peut désormais être considérée comme un organisme bioaccumulateur de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline, car les facteurs de bioaccumulation varient de 50 à 450 pour ces molécules. De plus l'élimination de ces antibiotiques est lente. Cette bryophyte possède donc toutes les qualités listées par Ramade (1992) pour être utilisée dans des études environnementales. Les modèles d'accumulation et de décontamination proposés décrivent bien les courbes expérimentales obtenues.

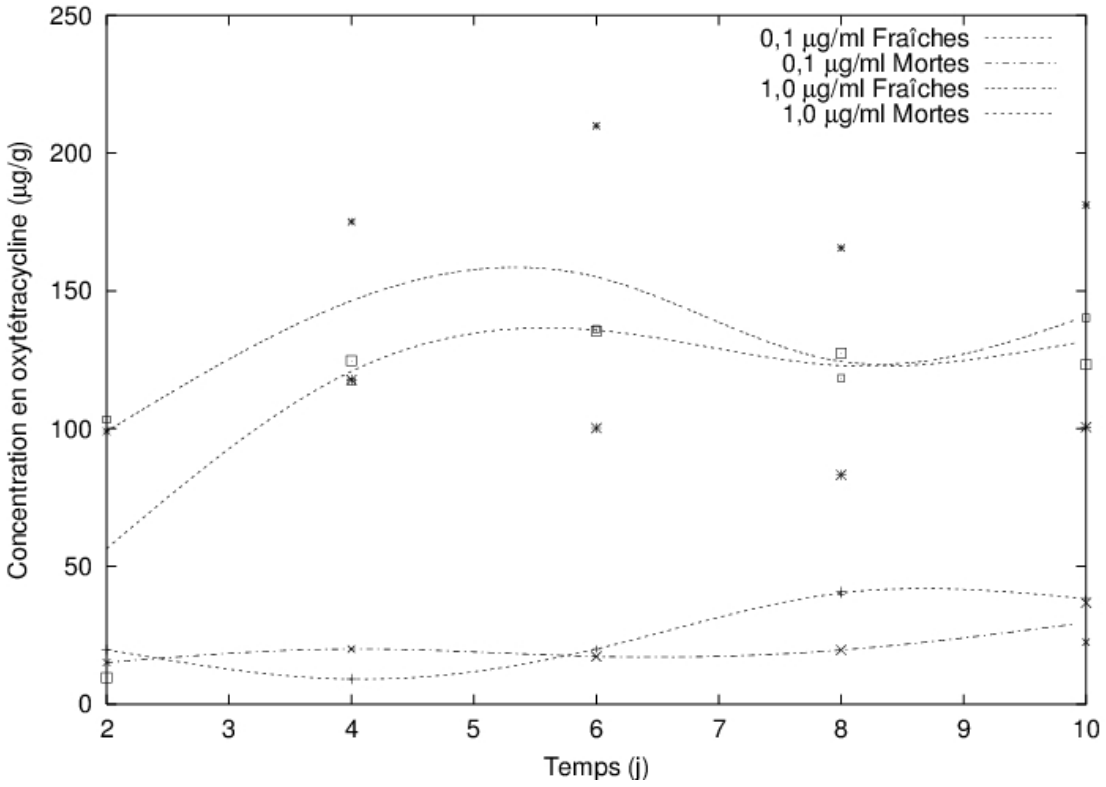


FIG. 42 – *Evolution de la concentration d'oxytétracycline dans* Fontinalis antipyretica *pendant l'expérimentation visant à déterminer le mécanisme d'accumulation.*

TAB. 46 – *Facteurs de bioaccumulation (FBA) calculés au jour 10 du protocole d'étude du mécanisme d'accumulation. Ce facteur correspond à la concentration en antibiotique dans* Fontinalis antipyretica *rapportée à celle dans l'eau.*

Concentration	Acide oxolinique	Fluméquine	Oxytétracycline
0,1 μg/ml	150	85	400
1,0 μg/ml	70	50	140

Le protocole visant à vérifier les hypothèses des mécanismes d'accumulation a permis de déterminer qu'aucun mécanisme actif n'était mis en jeu excepté dans le cas de la fluméquine à la concentration de 1 μg/mL où une inactivation de la dégradation est probable. Cette hypothèse doit cependant être vérifiée par des études complémentaires.

Quatrième partie

Etudes de terrain sur l'Elorn

L'objectif de cette étude est triple. Le premier est de valider sur le terrain les données obtenues expérimentalement. Le deuxième est de déterminer l'ampleur de la contamination en acide oxolinique, fluméquine et oxytétracycline d'un bassin versant supposé exposé. Le troisième est enfin de localiser les sources de contamination afin de savoir si elles sont liées aux élevages et, dans l'affirmative, si elles proviennent d'élevages piscicoles ou non.

1 Site d'étude

1.1 Présentation du fleuve

L'Elorn est un petit fleuve côtier du Finistère (France) qui prend sa source dans une tourbière des monts d'Arrée à 344 m d'altitude et rejoint la mer à Landerneau après un cours de 42 km. Il emprunte ensuite un vaste estuaire ou ria qui s'ouvre dans la rade de Brest au pont de Plougastel.

Son bassin versant de surface modeste (272 km^2), est constitué de roches cristallines, métamorphiques, schistes et grès, alternant des zones imperméables et des zones d'arènes granitiques perméables. Le climat est océanique procurant au cours d'eau un écoulement annuel assez régulier, l'étiage étant, en outre, soutenu par le réservoir du Drennec. Le débit moyen est de 2 à 4 m^3/s avec un maximum à 10 m^3/s. L'Elorn et le ruisseau du Mougau alimentent le lac du Drennec (110 ha).

Le cours peut être divisé en trois parties :
- Le cours supérieur chemine du Drennec à Sizun en suivant une vallée orientée est–ouest, sa pente moyenne est de 1,8 %.
- Le cours moyen (11 km) a une pente moyenne de 0,4 %, il prend une direction nord–nord–est, jusqu'à Landivisiau, il suit alors une vallée plus ouverte et plus fréquentée car longée par une route départementale.
- Le cours inférieur (16 km) a une pente moyenne de 0,2 % et prend une direction sud–ouest vers Landerneau, il présente une succession de radiers.

1.2 Activités humaines

1.2.1 Activités économiques

Une population d'environ 30000 habitants vit sur le bassin versant. Les principales activités économiques sont agricoles. L'élevage de bovins, porcins et poissons est présent tout au long du cours d'eau. Il existe également des élevages de chevaux sur la commune

de Landivisiau.

Quatre piscicultures sont présentes sur le cours d'eau :

- Pisciculture Saumon A.A.P.P.E.[4] du Launay
- Pisciculture Pont Ar Zal
- Pisciculture Ménaouen
- Pisciculture expérimentale S.E.M.I.I.[5]

1.2.2 Activités de loisirs

Les activités de loisirs sont assez développées. Outre la pêche à la truite et au saumon, un terrain de camping et une station de loisirs sont présents sur le lac du Drennec.

1.2.3 Traitement de l'eau

On ne compte pas moins de cinq stations d'épuration sur le cours de l'Elorn. La première se situe juste en aval de Sizun, la deuxième à Landivisiau, la troisième juste en amont de Landerneau et les deux dernières en aval de Landerneau. Une usine de traitement de l'eau se situe entre la Roche-Maurice et Landerneau.

2 Surveillance passive : utilisation d'échantillons autochtones

La surveillance passive fait appel à des échantillons présents de façon naturelle sur le site. Le suivi est réalisé aussi bien dans le temps que dans l'espace. Les stations de prélèvements sont réparties selon un transect longitudinal en fonction des sources potentielles de contamination (surveillance orientée). Le suivi dans le temps consiste à répéter les prélèvements à intervalle de temps réguliers.

La limite pratique de toute surveillance passive est l'absence d'échantillons ou l'impossibilité de prélever l'échantillon.

[4]AAPPE : Association Agréée de Pêche et de Pisciculture de l'Elorn
[5]SEMII : Station Expérimentale Mixte INRA/IFREMER

2.1 Objectif

L'objectif de cette étude est l'estimation spatiotemporelle des concentrations des deux familles d'antibiotiques, les quinolones et les tetracyclines, tout au long de l'Elorn (Finistère, France). Trois molécules sont identifiées et quantifiées (acide oxolinique et fluméquine pour les quinolones, oxytétracycline pour les tétracyclines) dans trois compartiments de la rivière (eau, sédiments et bryophytes) sur une période d'une année. ll ne s'agit pas de surveiller directement l'incidence des rejets mais plutôt de dégager des tendances générales au niveau du bassin et d'identifier les zones fortement contaminées au sein desquelles des études complémentaires pourront être ultérieurement réalisées.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Stations d'étude

Le choix des points de prélèvements est dicté par les objectifs de l'étude. Il s'agit d'étudier, du point de vue de la contamination en antibiotiques, l'effet des intrants anthropiques sur le milieu dulçaquicole. Les stations d'études avaient déjà été choisies par Jacques Haury, Professeur responsable de l'Unité Mixte de Recherche INRA/ENSAR « écologie aquatique », lors d'études sur les indices macrophytiques comme outils de diagnostic de la qualité de l'eau.

Les critères de sélection des points d'échantillonnages sont :
- un point à l'amont des rejets, si possible en station courante,
- un point à l'aval immédiat des rejets, dans une situation comparable à celle de l'amont,
- un point situé entre 500 m et 2 km à l'aval des rejets.

En pratique, la localisation et le nombre des stations (figure 43) correspondent aux caractéristiques du terrain, à une recherche plus ciblée autour de la SEMII, mais aussi à l'accessibilité de la rivière.

Au total 25 stations de prélèvement sont étudiées pour six sources de contamination potentielles que peuvent représenter les quatre piscicultures, la station d'épuration de Landivisiau et la station de potabilisation des eaux de Landerneau.

Les caractéristiques principales des stations d'étude sont résumées dans le tableau 47.

TAB. 47 – *Caractéristiques des stations d'étude de l'Elorn*

No	Station	Localisation	Larg. (m)	Prof. (cm)	Type	Luminosité
1	M3DR	Juste amont Drennec	4	25	PL	4
2	M2DR	Juste aval Drennec	10	10	PL	5
3	M1DR	Amont rejets SEMII	12	10	PL	5
4	VBDR	Aval rejets, rive gauche	4	20	PL	3
5	V0DR	Aval immédiat rejets	12	15	PC	5
6	V1DR	Plat lent amont fosse	12	25	PL	5
7	V1BDR	Plat lent et amont gué	15	30	PL/PC	4
8	V2DR	300 m aval gué	9	30	PC/RD	4
9	V3DR	800 m aval gué	7	30	RP	2
10	M2LY	600 m amont Launay	6	15	PC/RD	4
11	M1LY	400 m amont Launay	5	20	PC	2
12	V1LY	300 m aval Launay	6	25	PL/RP	3
13	V2LY	Sizun	7	40	PC	4
14	M1PM	Roz Ar Vilin	8	50	PC	4
15	V1PM	Bief aval Ménaouen	10	110	PR	5
16	V2PM	Pont aval Ménaouen	12	40	RD	4
17	M1PZ	200 m amont Pont Ar Zal	14	60	PL/PC	4
18	V1PZ	20 m aval Pont Ar Zal	13	40	RD/PC	5
19	V2PZ	400 m aval station d'épuration	9	50	PC	3
20	M1LI	100 m amont station d'épuration	8	40	RP	4
21	V1LI	200 m aval station d'épuration	13	50	PC	3
22	V2LI	1,5 km aval station d'épuration	13	50	RD/PC	4
23	PX	Pont-christ	15	40	RD/PC	4
24	RM	Aval Roche Maurice	12	50	PC/RP	5
25	MLD	Zone industrielle T.P.	13	40	PC	2

Légende : Luminosité : 1 très sombre → 5 très éclairé ; Type de Faciès : RD : radiers, RP : rapides, PC : plat courant, PL : plat lent, PR : profond.

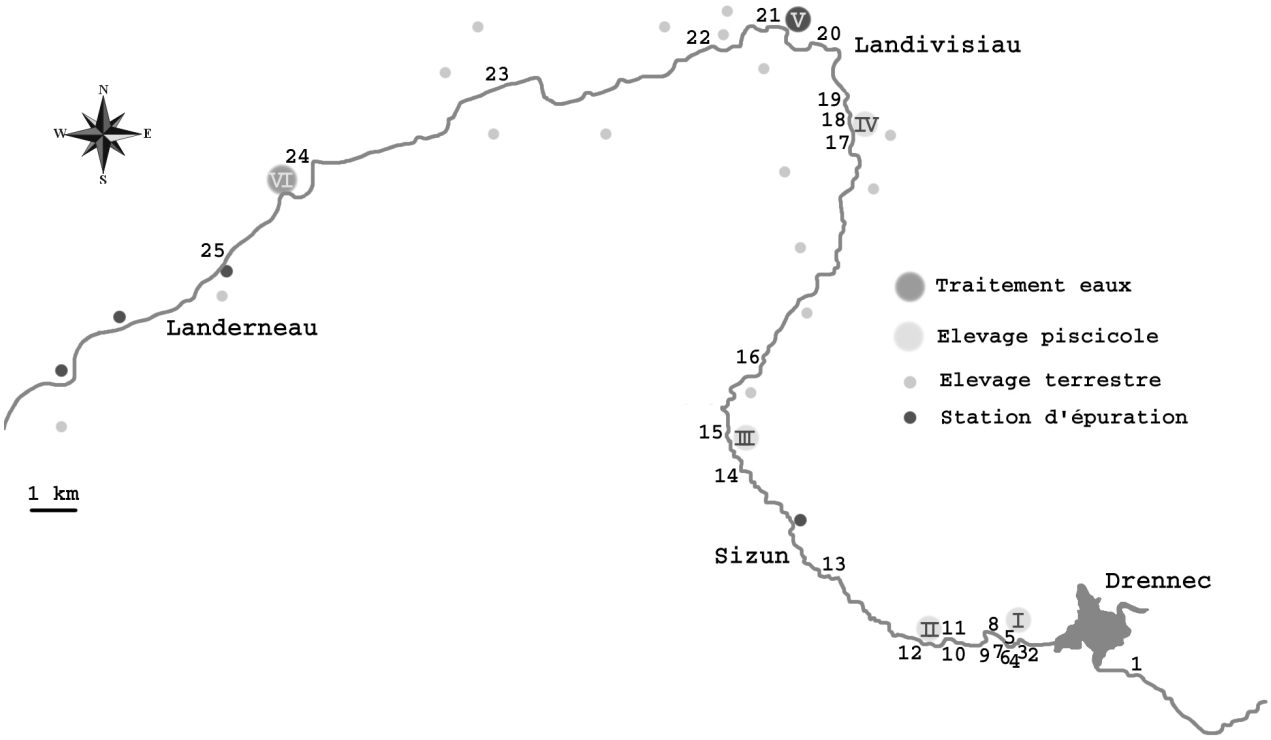


FIG. 43 – *Localisation des stations d'étude sur l'Elorn*

2.2.2 Périodes de prélèvement

Contrairement à beaucoup d'autres macrophytes, les mousses aquatiques sont présentes et peuvent être échantillonnées toute l'année. Toutefois, la collecte en période d'étiage prononcé est à éviter pour deux raisons essentielles : le risque de prélever des échantillons qui ont connu des périodes d'émersion et la mauvaise qualité des échantillons due à une température élevée de l'eau qui, bien souvent, favorise la formation d'un feutrage d'algues sur les touffes.

Afin d'appréhender les variations saisonnières, les prélèvements sont réalisés en automne (24 et 25 octobre 2000), en hiver (6 et 7 février 2001), au printemps (16 et 17 mai 2001) et en été (29 et 30 août 2001).

2.2.3 Echantillonnage

Bryophytes

Comme les capacités d'accumulation peuvent varier selon les espèces de macrophytes (Lopez et Carballeira, 1993), il est important de n'utiliser, autant que possible, que des

fontinales sur l'ensemble des stations d'étude. En cas d'absence de cette espèce, il est cependant possible d'en prélever d'autres. L'ordre de préférence des espèces de macrophytes s'établit comme suit :

1. *Fontinalis antipyretica* ou *Fontinalis squamosa*
2. *Leptodictyum riparium* ou *Hyocomium armoricum*
3. *Callitriche hamulata* ou *Ranunculus penicillatus*

Le choix des espèces est motivé par leur large répartition géographique et leur identification relativement aisée.

Il est nécessaire de prospecter minutieusement l'aire de prélèvement. Les touffes situées à faible profondeur sont susceptibles de subir des périodes d'émersion et ne sont donc pas prélevées. Le prélèvement s'effectue en tirant délicatement sur quelques brins de mousse afin de les extraire de la touffe sans la détruire entièrement. Cette précaution permet à la colonie de se reconstituer rapidement. Tout prélèvement dans le milieu naturel doit se faire avec le souci d'infliger une perturbation aussi faible que possible à l'écosystème.

Le prélèvement se poursuit jusqu'à obtention d'un échantillon brut de mousses légèrement tassées de la taille d'une sphère d'environ 7 cm de diamètre. Ce volume correspond à 20–30 g de poids frais essoré. En fin de journée, les échantillons sont nettoyés soigneusement, tout corps étranger est supprimé par lavage successif dans de l'eau. Le lavage est poursuivi jusqu'à ce que l'eau reste claire. Ils sont ensuite séchés, puis 2×2 g sont exactement pesés, mis en tubes et congelés à -20 °C. De même, 100 mg sont conservés dans un tube en verre et congelés en vue de la mesure du rapport chlorophylle a sur phéophytine.

Sédiments

Les sédiments sont prélevés à proximité du lieu d'échantillonnage des bryophytes. Seule la couche superficielle (2 cm) est prélevée. L'échantillonnage d'une vase est préférable à celle d'un sable comme cela est laissé supposer par l'étude expérimentale résumée dans le tableau 29 page 110. La masse prélevée est d'environ 100 g et l'eau de surface est éliminée après 5 min de décantation.

Les prélèvements de sédiment sont homogénéisés et répartis en classes en fonction de leur aspect. Ils sont arbitrairement classés en vase, vase sableuse ou sable puis congelés avant analyse. Du fait des différences analytiques observées, l'acide oxolinique,

la fluméquine et l'oxytétracycline sont dosés pour chaque classe de sédiment séparément.

Eau

Un volume de 25 mL d'eau est prélevé dans le courant environ 5 cm au dessus des sédiments. Les échantillons d'eau ne subissent pas de prétraitement.

2.3 Résultats et discussion

2.3.1 Analyse des données brutes

Profils longitudinaux

Les analyses effectuées n'ont montré aucune trace d'acide oxolinique, de fluméquine ou d'oxytétracycline détectable dans l'eau, et ce, pour toutes les stations et périodes de prélèvements. Les espèces de végétaux et types de sédiment prélevés sont répertoriés en annexe E.

Les concentrations maximales en acide oxolinique sont 110 ng/g dans le sédiment et 47 ng/g dans les bryophytes. Les deux prélèvements ont été réalisés au mois d'août respectivement pour les stations V1PM et M1LY. Sur les figures 44 et 45, les pisciculture de la SEMII et de Ménaouen semblent être les seules après lesquelles une augmentation notable de la concentration en acide oxolinique est relevée. Un faible gradient positif de concentration existe cependant d'amont en aval sur le profil longitudinal. Il est à noter également que pour les bryophytes prélevées au mois d'octobre, la station M3DR, en amont du barrage du Drennec, est contaminée en acide oxolinique.

Les concentrations en fluméquine sont de l'ordre de 2 μg/g à la fois dans les bryophytes et les sédiments pour la station V2PZ en octobre et la station V2LY en février respectivement (figures 46 et 47). Des concentrations élevées (supérieures à 500 ng/g) ont été déterminées dans le sédiment en aval des pisciculture de Launay (en février), de Ménaouen (en août), de Pont ar Zal (en août et octobre) et à Pont Christ (en octobre). Concernant les bryophytes, les points situés en aval des pisciculture de Launay (en octobre et février), de Ménaouen (en octobre et février) et de Pont Ar Zal (en octobre et mai) ainsi que celui situé à Pont Christ ont montré une contamination du milieu en fluméquine. Comme pour l'acide oxolinique, les bryophytes prélevées au point situé en amont de toute pisciculture (M3DR) contiennent de la fluméquine en concentration

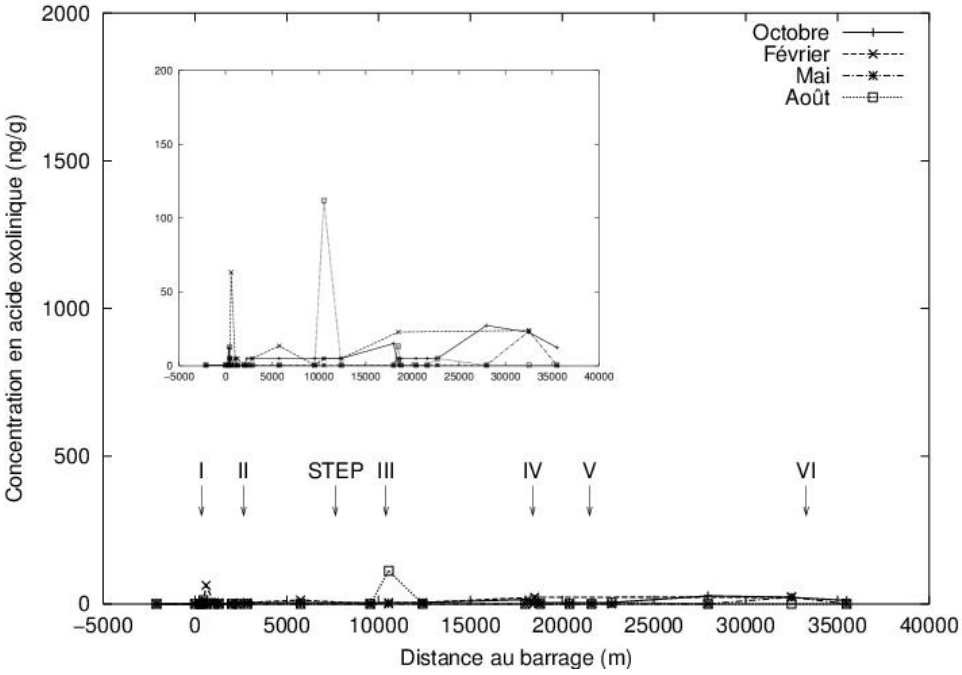


FIG. 44 – *Profil longitudinal de la concentration en acide oxolinique des sédiments prélevés le long de l'Elorn*

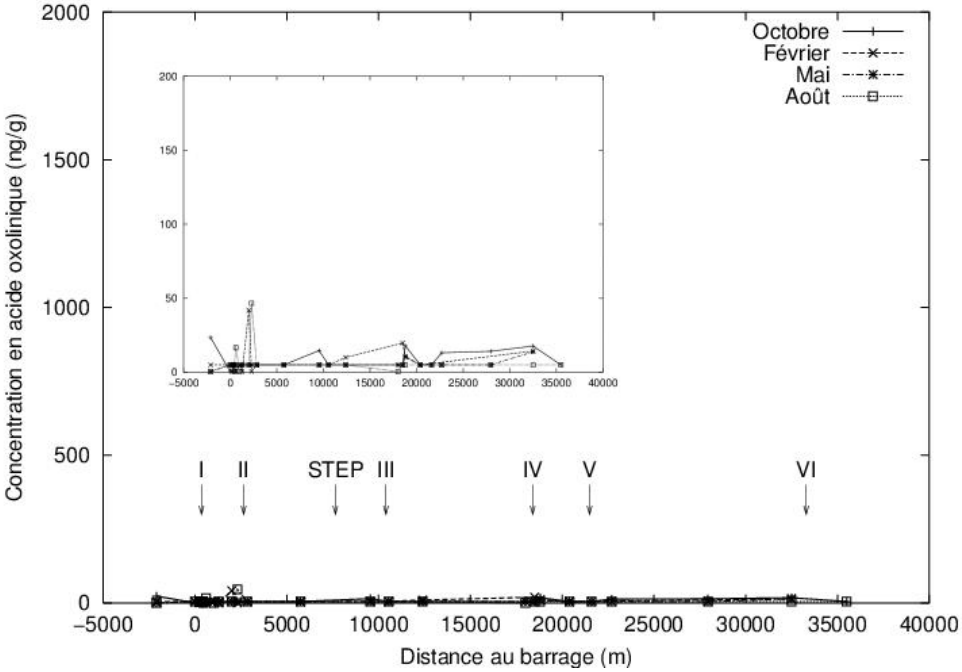


FIG. 45 – *Profil longitudinal de la concentration en acide oxolinique des bryophytes prélevés le long de l'Elorn*

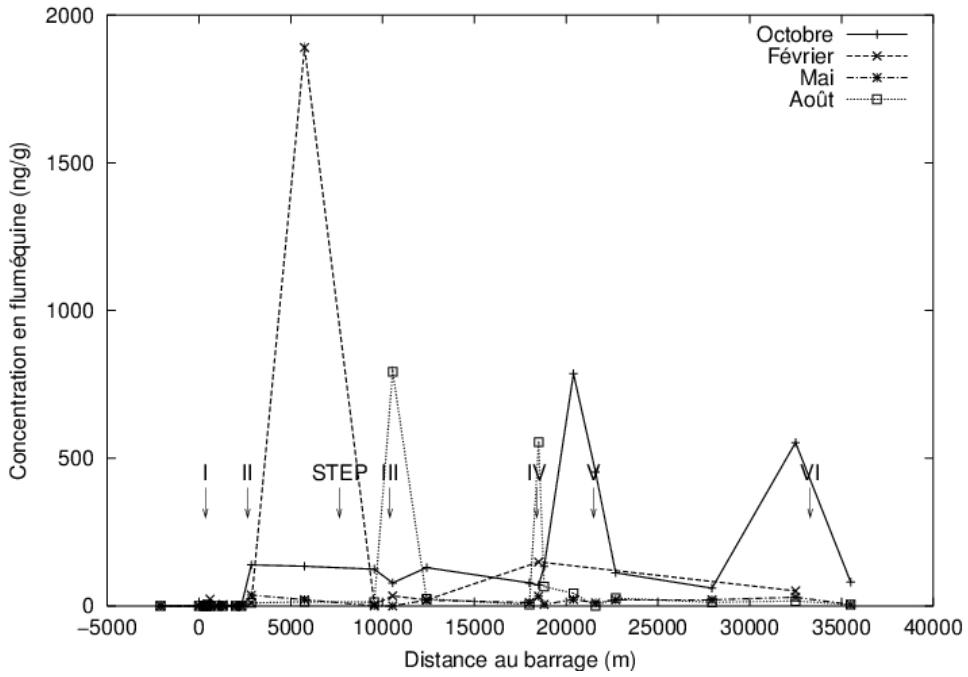


FIG. 46 – *Profil longitudinal de la concentration en fluméquine des sédiments prélevés le long de l'Elorn*

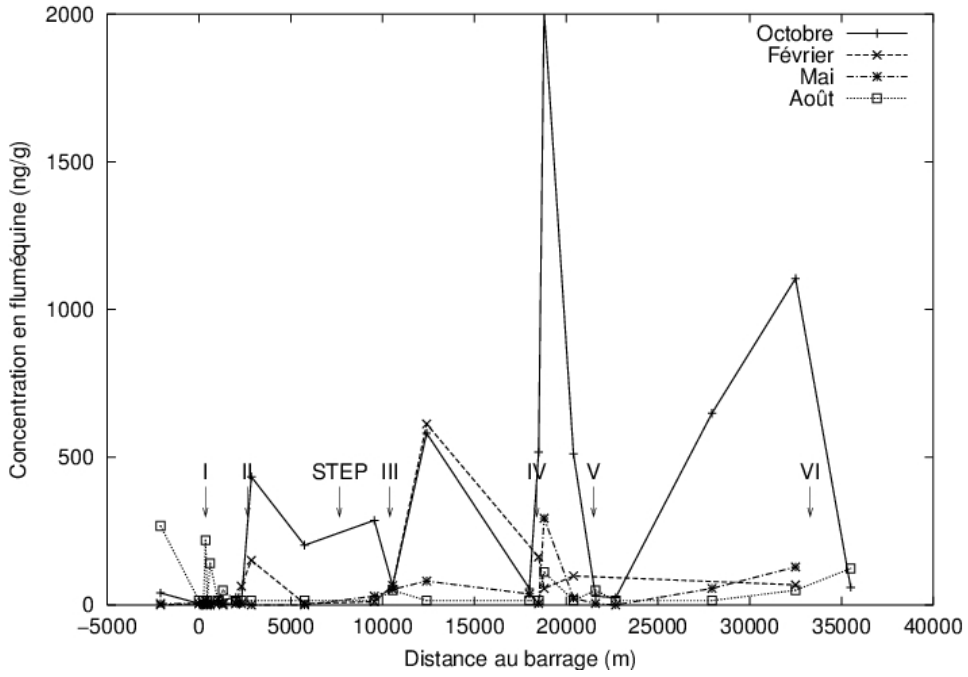


FIG. 47 – *Profil longitudinal de la concentration en fluméquine des bryophytes prélevés le long de l'Elorn*

quantifiable (40 ng/g).

L'intérêt de l'utilisation des bryophytes par rapport aux autres matrices dans les suivis environnementaux de contamination par l'oxytétracycline apparaît clairement en observant les figures 48 et 49. En effet, seules des concentrations ne dépassant pas 185 ng/g ont été relevées dans les sédiments pour les seuls points situés immédiatement en aval des piscicultures de Ménaouen (février et août) et de Pont Ar Zal (août). Les profils obtenus par l'analyse des bryophytes montrent une contamination de l'Elorn beaucoup plus importante que ne le laisse présager l'analyse des résultats obtenus dans les sédiments. Les concentrations dans les bryophytes atteignent 1,5 μg/g en février pour la station V1PM. Les bryophytes contenant le plus d'oxytétracycline ont été prélevées entre le barrage et la pisciculture de la SEMII et en aval de la pisciculture de Ménaouen. Les points de prélèvement situés en aval des élevages de Launay et, dans une moindre mesure, de Pont Ar Zal, sont également contaminés. Comme pour l'acide oxolinique et la fluméquine, les prélèvements effectués montrent une contamination de la zone de Pont Christ. Du point de vue temporel, les concentrations obtenues vont en décroissant de l'automne vers l'été.

Evaluation de l'impact des piscicultures

Malgré le manque de finesse de cette étude pour permettre de déterminer de façon certaine une source de contamination, il est intéressant de calculer la différence de concentration entre les points situés immédiatement en aval et en amont des stations d'étude. Dans le cas d'une différence positive, la station pourrait être considérée comme une source potentielle de contamination en antibiotiques.

Les résultats de cette différence sont représentés par la figure 50. La première constatation est une différence généralement positive pour les quatre piscicultures alors qu'elle est négative pour les stations d'épuration et de potabilisation de l'eau. Les seuls cas où cette différence est légèrement positive pour ces deux stations sont les prélèvements d'août pour la fluméquine et l'oxytétracycline.

La pisciculture expérimentale de la SEMII pourrait avoir utilisé de l'oxytétracycline en octobre 2000 et, à cette même période, la ferme aquacole de Launay pourrait avoir eu recours à un traitement à la fluméquine. Une différence de concentration positive est également visible au mois de février 2001 pour l'oxytétracycline et la fluméquine. Les prélèvements de sédiments montrent une différence positive des concentrations de fluméquine en août pour la pisciculture de Ménaouen. Contrairement aux deux piscicultures précédentes, cette différence est négative au mois d'octobre 2000 pour les

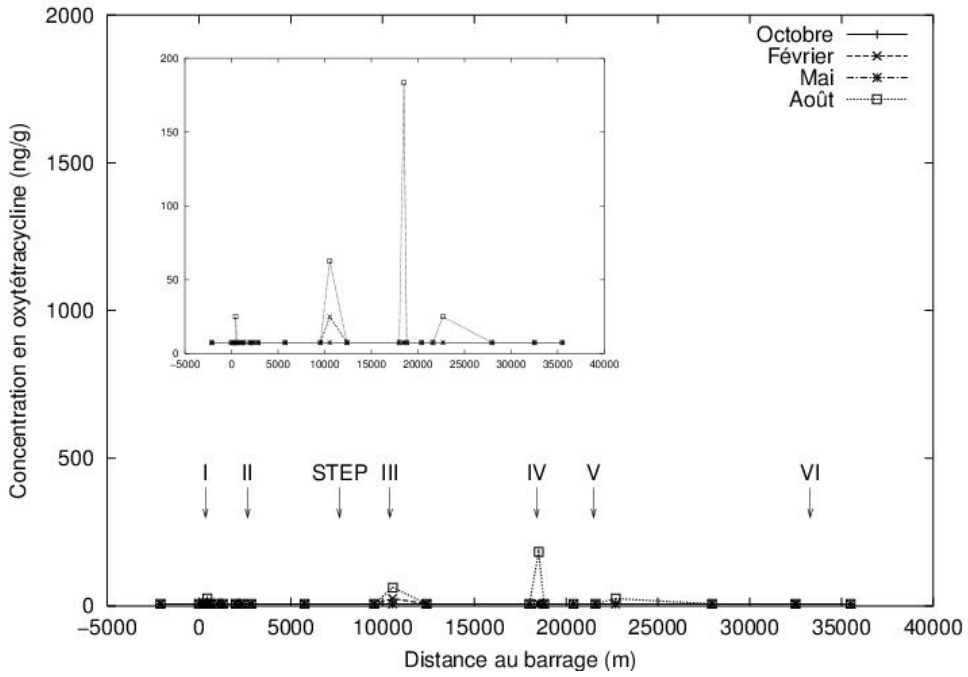


FIG. 48 – *Profil longitudinal de la concentration en oxytétracycline des sédiments prélevés le long de l'Elorn*

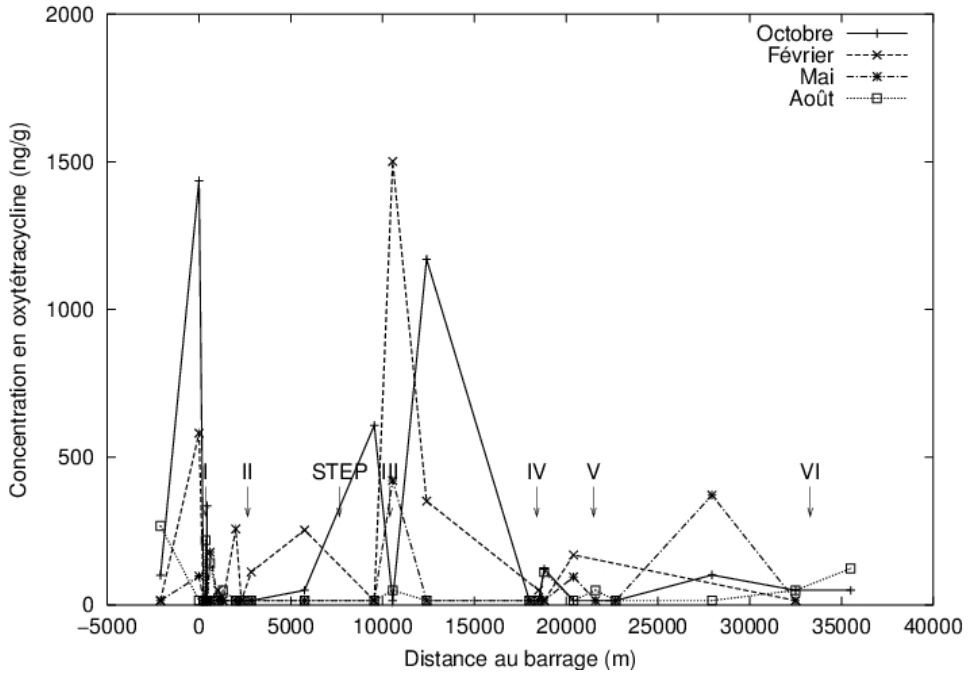


FIG. 49 – *Profil longitudinal de la concentration en oxytétracycline des bryophytes prélevés le long de l'Elorn*

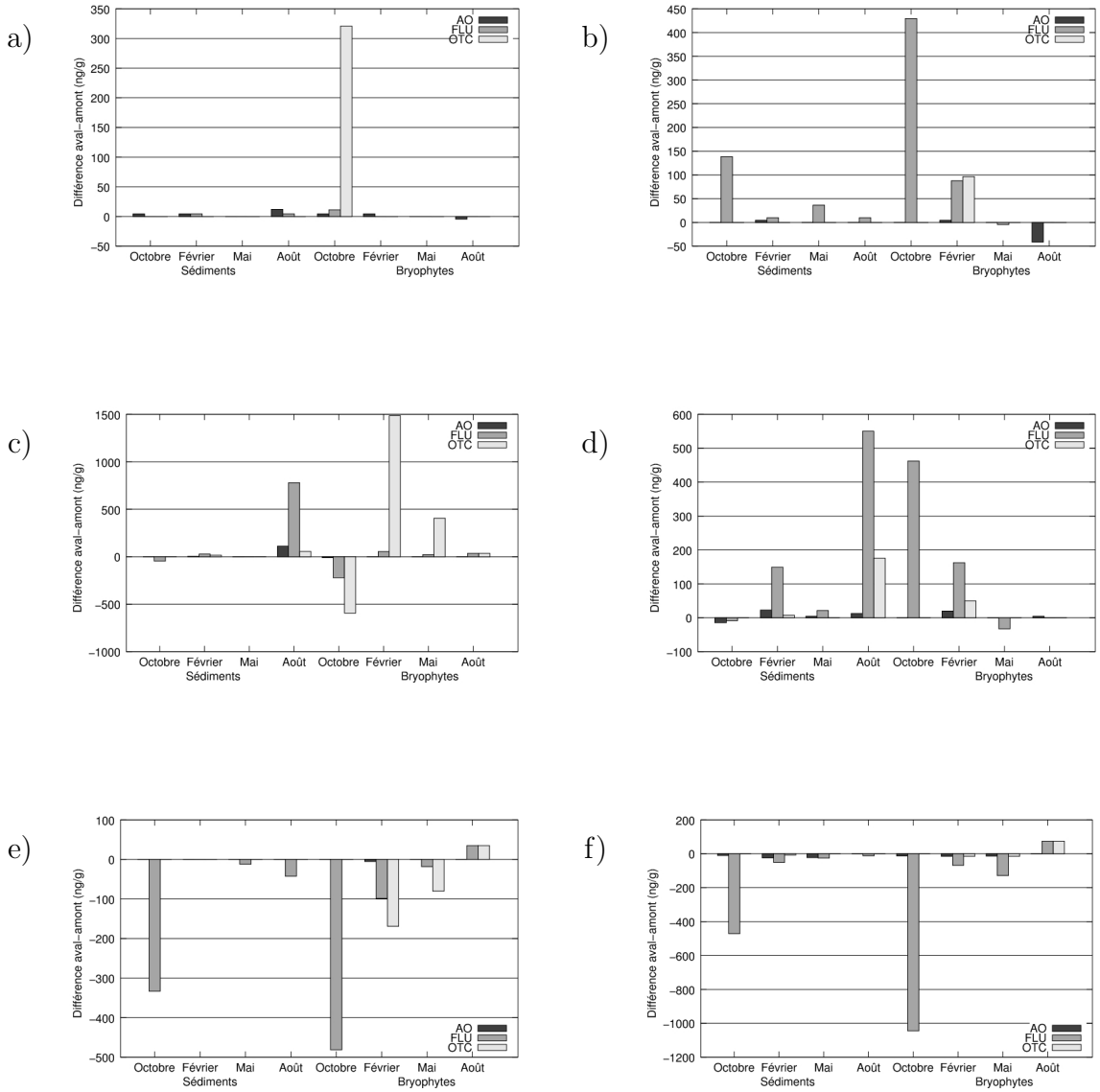


FIG. 50 – *Différences de concentration en acide oxolinique, fluméquine et oxytétracycline des échantillons prélevés en amont et en aval des piscicultures de la SEMII (a), de Launay (b), de Ménaouen (c), de Pont Ar Zal (d), des stations d'épuration de Landivisiau (e) et de potabilisation des eaux de Landerneau (f).*

bryophytes. Elle est, par contre, très positive dans ces plantes pour l'oxytétracycline en février et mai 2001. Les prélèvements effectués autour de la pisciculture de Pont Ar Zal montrent une nette contamination des sédiments en fluméquine et oxytétracycline en août, une contamination en fluméquine à la fois des bryophytes et des sédiments en

février et une forte contamination en fluméquine des bryophytes en octobre.

Ces résultats montrent que l'Elorn est contaminé par la fluméquine et l'oxytétracycline, et dans une moindre mesure, par l'acide oxolinique. L'intérêt de l'utilisation des bryophytes pour la surveillance de la contamination de l'environnement dulçaquicole par l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline a ici été prouvé. La différence dans les cinétiques de contamination et de décontamination ainsi qu'une possible différence de stabilité conduisent à des décalages saisonniers entre les pics de contamination des bryophytes et ceux des sédiments. En effet, les sédiments contaminés ont surtout été prélevés en août alors qu'octobre et février ont été les périodes pour lesquelles les bryophytes contenaient le plus d'antibiotiques. Cette relativement faible contamination des bryophytes en août peut être mise en relation avec la période d'étiage de l'Elorn.

Malgré le calcul des différences de concentrations des échantillons prélevés en amont et en aval des stations d'étude, il est difficile de conclure sur les sources de contamination. En effet, la part de contamination due aux piscicultures est difficile à différencier de celle due aux élevages d'animaux de rente terrestres dont les champs bordent l'Elorn. Cette contamination en antibiotiques de l'Elorn par les animaux terrestres pourrait expliquer la présence d'antibiotiques aux points de prélèvements situés en amont de toute pisciculture. L'absence de différence de concentration positive pour les deux dernières stations va également dans ce sens car ces stations sont situées en zone urbaine.

2.3.2 Analyse en composantes principales et analyse des correspondances multiples

Au vu du grand nombre de dosages (900), une analyse factorielle des correspondances multiples et une analyse en composantes principales ont été utilisées pour compléter l'interprétation des résultats. Les logiciels utilisés pour réaliser ces analyses sont SPAD et R. Quelques informations complémentaires sur les analyses statistiques multivariées sont disponibles en annexe F.

L'analyse factorielle des correspondances multiples permet d'étudier la répartition des antibiotiques dans le temps et dans les différents types de prélèvements (bryophytes et sédiments). Les variables utilisées sont le type de prélèvement, la date de prélèvement et la concentration en antibiotique.

Afin de réaliser l'analyse des correspondances multiples, la variable continue, que

représente la concentration en antibiotique, a dû être transformée en variable discrète. Les concentrations sont transformées en six catégories : inférieur à la limite de détection (InfLD <5 ng/g), traces (<10 ng/g et ⩾5 ng/g), concentrations très faibles (<50 ng/g et ⩾10 ng/g), faibles (<100 ng/g et ⩾50 ng/g), moyennes (<500 ng/g et ⩾100 ng/g) et fortes (⩾500 ng/g) pour l'acide oxolinique et la fluméquine. La catégorie « InfLD » devient <15 ng/g, la catégorie « traces » devient <50 ng/g et ⩾15 ng/g et la modalité « concentrations très faibles » est supprimée pour l'oxytétracycline.

L'analyse des correspondances multiples a pour objectif la mesure des corrélations en tre les différents facteurs du milieu et la concentration.

Analyse des correspondances multiples

La figure 51 est la représentation graphique de l'analyse des correspondances multiples pour l'acide oxolinique. Afin de visualiser la représentation des points sur le plan 1–2, les cosinus carrés ont été calculés. Une bonne représentation est obtenue ($\cos^2$ >0,7) pour tous les individus et toutes les variables sauf les stations M1PM, V1PM, VBDR et les concentrations moyennes.

L'inertie cumulée des deux premiers axes de 42,32 % indique que les conclusions obtenues à partir de cette analyse ne pourront être que partielles et assez peu représentatives de l'ensemble des données. Cette faible inertie montre également une forte hétérogénéité des données.

Seule la station V1PM (15) est dans la zone de « concentrations moyennes ». Ces deux modalités sont proches sur la représentation graphique de l'analyse des correspondances multiples mais sont mal représentées sur le plan 1–2.

Les stations PX (23), RM (23), V1PZ (18) et V2PZ (19) sont les plus proches de « concentrations très faibles ». Ces cinq modalités sont bien représentées dans le plan 1–2. Ceci indique donc que ces quatre stations sont globalement celles pour lesquelles le plus d'acide oxolinique a été retrouvé. La pisciculture de Pont Ar Zal pourrait donc rejeter de l'acide oxolinique dans l'Elorn.

Les modalités « sédiments » et « bryophytes » sont opposées sur les axes 1 et 2, indiquant une différence entre les résultats obtenus pour ces deux types de matrices. Il apparaît que les bryophytes sont proches de la modalité « traces », alors que les sédiments sont proches de « inférieur à la limite de détection ». Ceci indique que les bryophytes

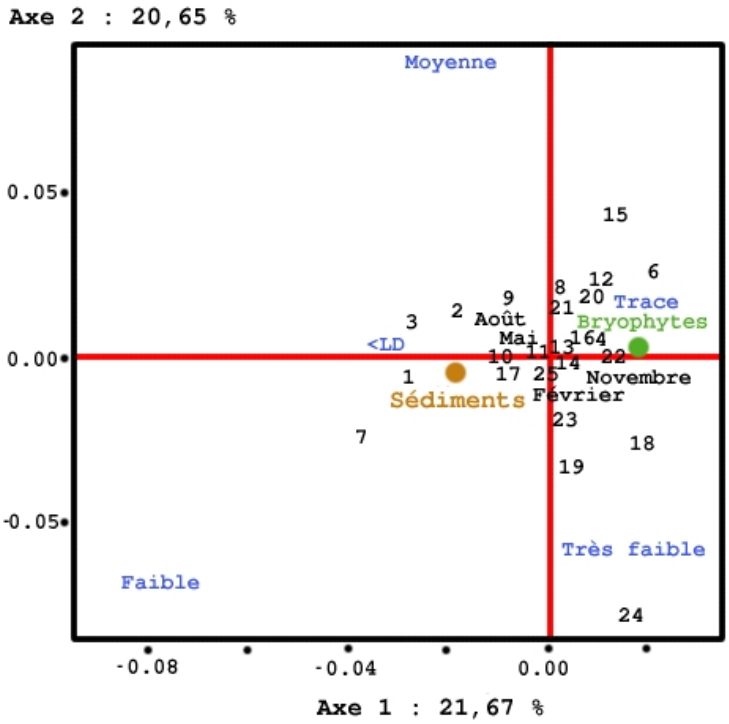


FIG. 51 – *Représentation graphique du plan 1–2 de l'analyse factorielle des correspondances multiples pour l'acide oxolinique.*

contiennent globalement plus d'acide oxolinique que les sédiments. De même les périodes de prélèvements « Août » et « Mai » sont opposées à « Novembre » et « Février » sur les axes 1 et 2. Toutes ces modalités sont bien représentées sur le plan 1–2 mais sont proches de l'origine, indiquant une faible part dans l'inertie totale du nuage de points.

L'inertie cumulée obtenue pour les deux premiers axes de l'analyse factorielle des correspondances multiples concernant la fluméquine (figure 52) est encore faible (43,15 %). Les concentrations sont environ 20 fois supérieures à celles en acide oxolinique. Comme précédemment, les modalités « sédiments » et « bryophytes » sont opposées sur les axes 1 et 2. Les bryophytes sont proches des modalités « traces » et « concentrations faibles » alors que les sédiments sont proches de la modalité « inférieur à la limite de détection » , la modalité « très faible » étant mal représentée sur le plan 1–2. Ceci tend donc une nouvelle fois à montrer que les bryophytes contiennent globalement plus de fluméquine que les sédiments. Les périodes de prélèvement sont mal représentées sur ce plan.

L'axe 1 sépare nettement les points de prélèvement situés en amont de la pisciculture de Launay de ceux situés en aval. Si la pisciculture de la SEMII est exclue, ceci indique

une nette séparation des points situés en amont de toute exploitation piscicole de ceux situés en aval.

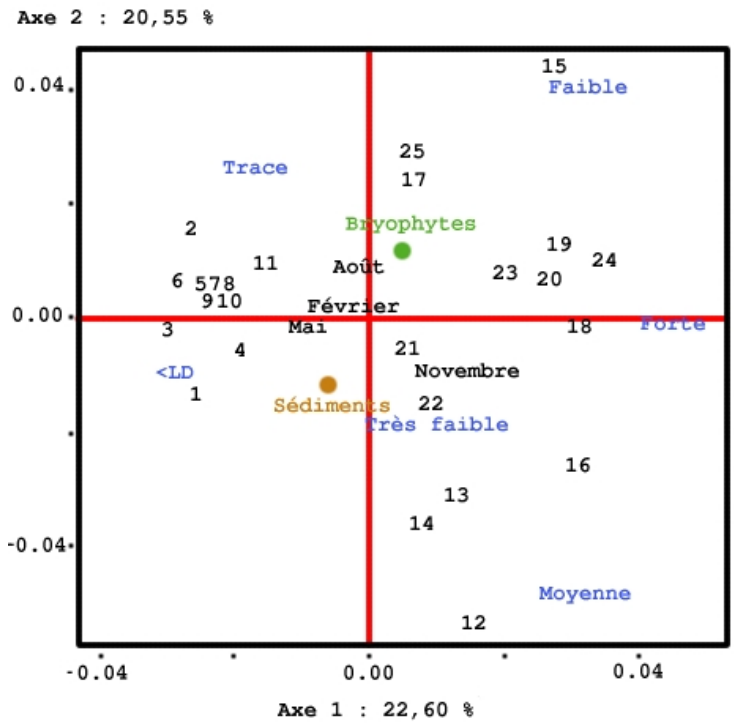


FIG. 52 – *Représentation graphique du plan 1–2 de l'analyse factorielle des correspondances multiples pour la fluméquine.*

L'analyse des correspondances multiples réalisée sur les données obtenues pour l'oxytétracycline (figure 53) ne permet d'obtenir que peu d'informations, compte tenu de la faible inertie cumulée des 2 premiers axes (40,58 %) et de la faible représentativité d'une grande partie des points sur le plan 1–2. L'opposition des prélèvements de bryophytes et de sédiments sur les axes 1 et 2 est encore observée et les sédiments sont très proches de la modalité « inférieur à la limite de détection » alors que les bryophytes sont proches de la modalité « traces » , la modalité « concentration moyenne » étant mal représentée sur ce plan.

Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales a été réalisée en intégrant les données obtenues par Jacques Haury en 1996. Les variables continues utilisées sont la distance du point au barrage, la concentration en antibiotique, la largeur, la profondeur, le taux de colmatage,

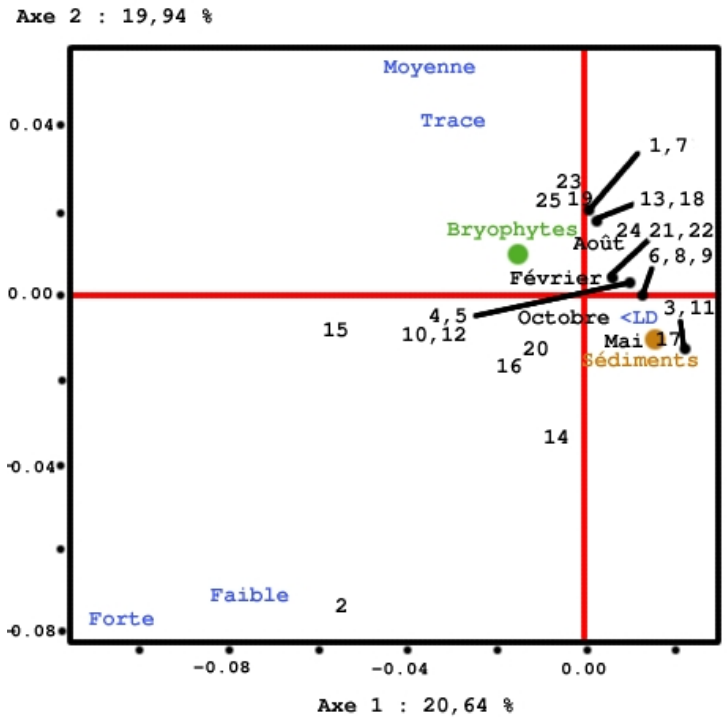


FIG. 53 – *Représentation graphique du plan 1–2 de l'analyse factorielle des correspondances multiples pour l'oxytétracycline.*

le taux d'argiles/limons, la conductivité de l'eau, le pH, les teneurs en nitrates, nitrites, ammonium, orthophosphates et l'indice macrophytique GIS. Les stations, les périodes de prélèvements, la nature de l'antibiotique dosé ainsi que le type de matrice dosée ont été ajoutés comme modalités illustratives, c'est-à-dire qu'elles n'interviennent pas dans le calcul des axes.

L'indice macrophytique GIS a été mis au point par le Groupement d'Intérêt Scientifique « Macrophytes des Eaux continentales » (Haury *et al.*, 1995). Une valeur basse de cet indice correspond à une augmentation de la trophie du cours d'eau, et donc à une dégradation du milieu.

Les corrélations entre la variable « concentration » et la distance par rapport à l'origine, la profondeur, les teneurs en argiles-limons, nitrites, ammonium et l'indice GIS sont significatives au risque de première espèce 5 % (tableau 48). La corrélation de la variable « concentration en antibiotique » avec la distance à l'origine indique une contamination globale par ces trois antibiotiques croissante au cours de l'Elorn. La corrélation négative entre la concentration et l'indice GIS montre que la qualité du milieu

TAB. 48 – *Corrélation entre la concentration et les autres variables continues utilisées pour l'analyse en composantes principales.*

Distance/Origine	0,10*
Largeur	0,03
Profondeur	0,14*
% Colmatage	0,06
% Argiles/Limons	0,11*
Conductivité	0,04
pH	0,03
Nitrites	0,11*
Nitrates	0,07
Ammonium	0,13*
Orthophosphates	0,03
Indice GIS	-0,10*

* Signicatif au risque 5 %

est plus faible pour les stations contaminées par les antibiotiques.

Bien que représentant 59,02 % de l'inertie du nuage de points, l'analyse du plan 1–2 n'apporte aucune information intéressante dans le cadre de cette étude car les périodes de prélèvement ainsi que la molécule et le type de prélèvements y sont très mal représentés (figure 54).

Le plan 1–4 ne représente, par contre, que 42,24 % de l'inertie totale du nuage de points mais la concentration est la variable représentant presque la totalité de la variabilité sur l'axe 4. De plus, les modalités « acide oxolinique », « fluméquine », « oxytétracycline », « octobre », « février », « mai », « août », « sédiments » et « bryophytes » sont très bien représentées dans ce plan (figure 55).

L'axe 4 indique la concentration, c'est-à-dire que plus une modalité est haute sur la figure 56, plus elle est corrélée à une concentration élevée. L'axe 1 est plutôt celui du niveau trophique. Plus une modalité est à gauche et plus l'environnement est dégradé. La figure 56 représente la position des modalités illustratives sur le plan 1–4. Les modalités correspondant aux périodes de prélèvements, aux antibiotiques et au type de prélèvement sont situées sur l'axe de l'origine de l'axe 1. Ceci est un artefact du calcul car ces modalités ont été ajoutées artificiellement à la matrice de données. Chaque modalité

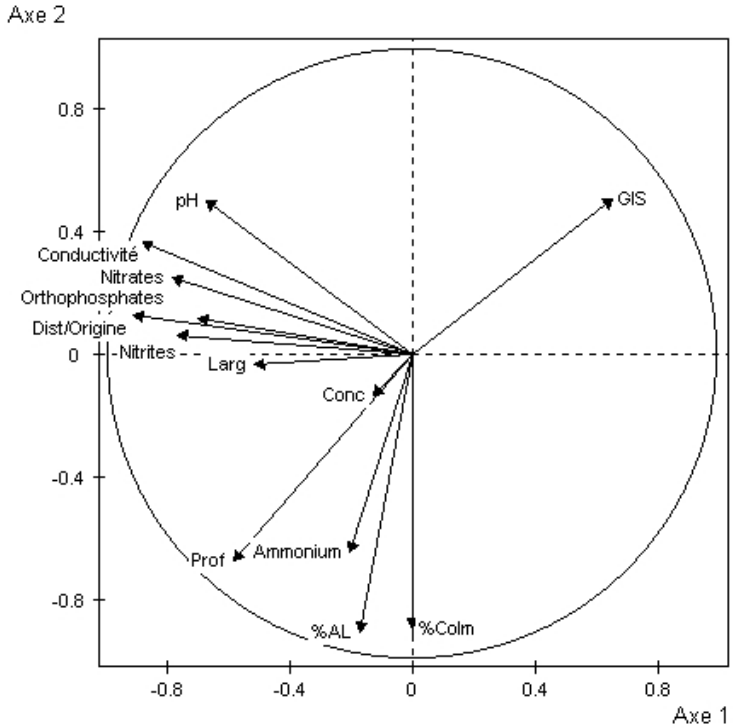


FIG. 54 – *Représentation graphique des variables continues sur le plan 1–2 de l'analyse en correspondances principales.*

est représentée uniformément et le même nombre de fois dans la matrice. Ceci a pour effet une position nulle sur l'axe 1. Ces modalités varient cependant sur l'axe 4. L'acide oxolinique, les sédiments et les prélèvements de mai sont en position négative indiquant que les prélèvements effectués pour ces modalités ont globalement des concentrations faibles en antibiotique. Les modalités « oxytétracycline », « février », « bryophytes », « fluméquine » et « novembre » sont, par contre, en position positive sur l'axe 4 ; elles indiquent que les prélèvements correspondant à ces modalités contiennent globalement plus d'antibiotique que les précédentes.

Un gradient de l'amont vers l'aval de l'Elorn est observé sur l'axe 1, indiquant une eutrophisation du cours d'eau dans ce sens. Les points RM (24), MLD (25), PX (23), V2LI (22) et V1LI (21), situés en zone urbaine, sont très nettement décalés vers la gauche par rapport au reste des stations.

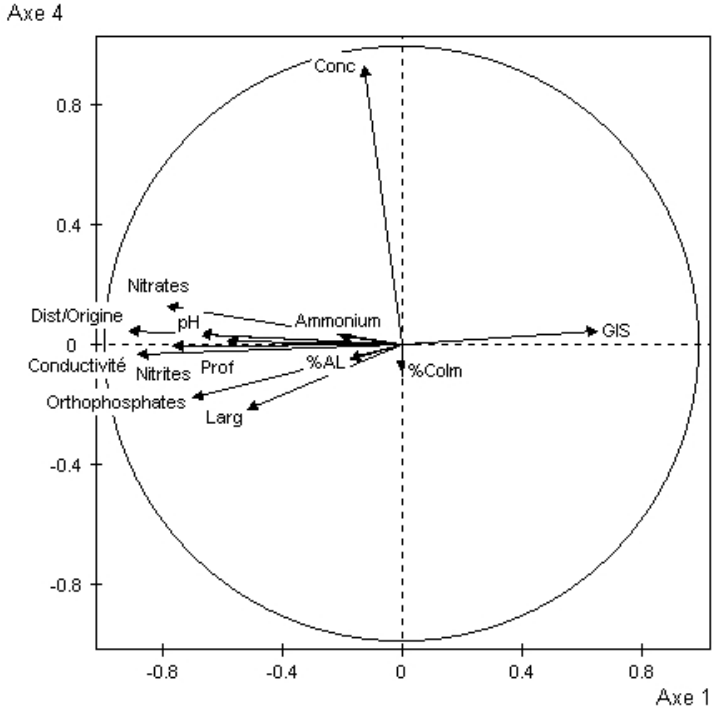


FIG. 55 – *Représentation graphique des variables continues sur le plan 1–4 de l'analyse en correspondances principales.*

2.4 Conclusion

A l'issue de cette campagne de surveillance passive, il est déjà possible de faire quelques observations :

- à moins de prélever au moment des rejets, l'eau ne permet pas de détecter la contamination de l'environnement par les antibiotiques,
- les bryophytes sont globalement de meilleurs indicateurs de contamination que les sédiments,
- l'acide oxolinique est un antibiotique beaucoup moins utilisé que l'oxytétracycline et la fluméquine, le long de l'Elorn,
- les piscicultures semblent avoir un impact sur la contamination de l'environnement par les antibiotiques mais une partie de cette contamination semble être due aux élevages d'animaux de rente terrestres. La part de contamination provenant de chaque type d'élevage ne peut pas être distinguée ici,
- la station d'épuration de Landivisiau et l'usine de traitement des eaux de Landerneau ne semblent pas avoir d'impact sur la contamination de l'environnement dulçaquicole par l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline,

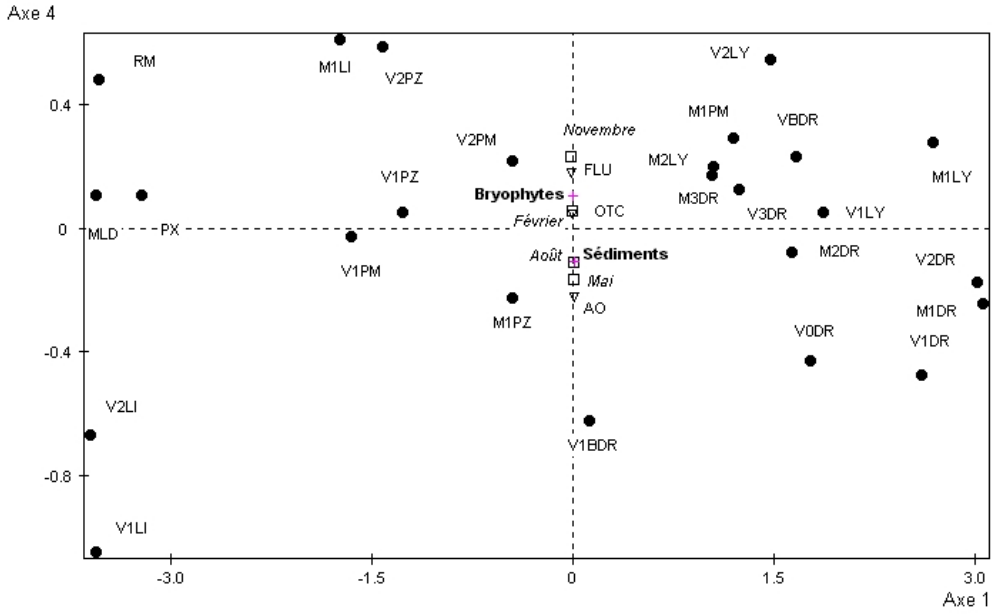


FIG. 56 – *Représentation graphique des modalités illustratives sur le plan 1–4 de l'analyse en correspondances principales.*

- il existe bien un effet saisonnier sur la contamination de l'environnement par les antibiotiques. Les prélèvements effectués en automne et en hiver contiennent plus d'antibiotiques que ceux effectués au printemps et en été. Cette différence provient sans doute des traitements par les antibiotiques plus fréquents à l'entrée puis pendant tout l'hiver, les traitements par les antibiotiques en piscicultures étant plutôt réalisés en été.
- un gradient négatif de qualité de l'eau est enfin observé d'amont en aval sur l'Elorn, avec une accélération du phénomène à l'approche de Landerneau.

3 Surveillance active : technique des transferts de mousses

La surveillance active consiste à introduire des organismes biomoniteurs aux différentes stations d'étude à partir d'un site de référence dépourvu de pollution. Comme pour la surveillance passive, un suivi peut être réalisé dans l'espace et/ou dans le temps.

La surveillance active présente quatre intérêts majeurs :

1. La méthode des transferts offre la possibilité d'étudier des sites dépourvus de populations de mousses, pour des raisons naturelles (substrat meuble, eau fortement échauffée en été) ou anthropiques (forte pollution, forte turbidité).
2. Les stations d'étude peuvent être choisies localement par rapport aux influences à évaluer sans la contrainte géographique liée à la présence de populations exploitables d'une espèce de mousses donnée.
3. La surveillance active est strictement limitée dans le temps, ce qui permet d'obtenir une information de la qualité actuelle d'un site sur une durée d'intégration parfaitement connue.
4. L'utilisation d'un matériel biologique homogène issu d'une station de référence unique élimine l'influence liée aux caractéristiques de différentes populations locales. Les informations obtenues sont donc strictement comparables.

3.1 Objectif

La méthode des mousses transférées est spécialement indiquée pour localiser les sources de contamination et en évaluer l'incidence sur le milieu. La démarche consiste à immerger des échantillons de *Fontinalis antipyretica* en amont et en aval de plusieurs stations de manière à étudier l'influence de ces stations sur la contamination en antibiotique du milieu.

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Récolte des mousses

Les mousses destinées au transfert sont prélevées dans la Chézine (Loire-Atlantique, France, 1°37'O,47°14'N) la veille du transfert. Elles sont lavées *in situ* en veillant particulièrement à ne pas endommager les touffes afin de ne pas gêner leur repousse.

Lors de cette campagne de surveillance active, seule *Fontinalis antipyretica* est utilisée. La biomasse nécessaire est fonction du nombre de stations d'étude. Le risque de perdre une partie des brins pendant la période d'exposition (maximum 30 %) est compensé de manière préventive en augmentant la masse à environ 30 à 35 g de poids frais par station d'étude.

3.2.2 Sacs d'exposition

Les mousses sont exposées dans des sacs confectionnés en filet coupe-vent d'une maille de 5 mm de côté. Le filet est découpé en bandes de 30×60 cm, replié et cousu de façon à obtenir des sacs carrés de 30 cm de coté. Une ouverture est ménagée de façon à pouvoir y introduire les bryophytes et des baguettes de PVC assurant le maintien de la forme du sac. Le sac est enfin fermé à l'aide d'un fil de fer plastifié.

3.2.3 Technique de transfert

Pour chacune des stations d'exposition, trois sacs contenant chacun 30 à 35 g de *Fontinalis antipyretica* sont immergés à environ 40 cm de la surface. Les trois sacs sont disposés séparément de façon à réduire les risques d'acte de malveillance.

Le sac doit, dans la mesure du possible, flotter librement dans la colonne d'eau. Le dispositif est fixé à l'aide d'un fil de pêche de forte résistance à un lest et à une racine ou une branche immergées.

La mise en œuvre de la technique des transferts exige une discrétion maximale pour prévenir tout acte de malveillance. Dans la mesure du possible, il faut rechercher des endroits à l'écart d'habitations ou de voies fortement fréquentées. Le dispositif d'exposition doit s'intégrer au mieux dans le paysage. Les éléments facilement repérables depuis la berge doivent être cachés par du matériel se trouvant sur place (blocs, bois, feuilles, etc.).

3.2.4 Période de transfert

Les périodes de traitement antibiotique dans les exploitations piscicoles sont généralement en été, lorsque la température de l'eau est la plus élevée. Les échantillons ont donc été disposés le 26 juillet 2002 et ont été retirés le 26 août 2002. Lors du retrait des dispositifs, ces derniers sont lavés vigoureusement dans l'eau du milieu.

3.2.5 Stations d'étude

L'étude porte sur cinq stations le long de l'Elorn :

- La pisciculture expérimentale de la SEMII
- La pisciculture du Launay
- La pisciculture de Ménaouen
- La pisciculture de Pont Ar Zal

– La station d'épuration située en aval de Landivisiau

Pour chaque station d'étude, il existe trois stations d'exposition situés 50 m en amont du rejet, dans le rejet et 50 m en aval du rejet excepté autour de la pisciculture de Ménaouen où le point situé en aval de la pisciculture n'a pu être installé.

3.2.6 Préparation des fontinales

Les bryophytes sont soigneusement lavées à l'eau courante puis séchées. Afin d'obtenir un échantillon le plus homogène possible, les trois sacs correspondant à chaque station d'exposition sont réunis et broyés dans l'azote liquide. Cette manipulation permet d'obtenir une poudre facilement homogénéisable.

3.3 Résultats et discussion

Sur les 42 sacs disposés sur l'Elorn, 33 ont pu être utilisés pour le dosage. Manquent :
– Trois sacs situés en aval de la pisciculture de la SEMII,
– Un sac en amont et deux sacs dans de rejet de la pisculture de Pont Ar Zal,
– Deux sacs en aval et un sac dans le rejet de la station d'épuration de Landivisiau.

Seules les stations d'exposition situées en aval des piscicultures de la SEMII et de Ménaouen ne pourront pas être exploitées car aucun sac n'est disponible.

Les données ont été transformées comme suit. Lorsque les concentrations sont inférieures à la limite de détection elles sont fixées à la moitié de celle-ci. La concentration correspondant à des traces est fixée à la moitié de la limite de quantification. Les concentrations des bryophytes en fluméquine sont obtenues par la méthode décrite paragraphe 4.2 page 44 en considérant les limites de détection et de quantification identiques à celles obtenues pour l'acide oxolinique.

Les concentrations d'acide oxolinique déterminées dans les bryophytes transférés sur l'Elorn sont faibles (figure 57). Des traces d'acide oxolinique ont été détectées dans les bryophytes disposés dans le rejet de la pisciculture de Ménaouen. Une si faible quantité d'antibiotique en absence de contamination en amont et en aval peut signifier que les sacs ont été déposés en toute fin de traitement ou ont été prélevés en tout début de traitement. La contamination des trois stations autour de la pisciculture de Pont Ar Zal signifie que la source de contamination est située en amont de cette exploitation et

donc provient d'une autre source qu'un élevage piscicole. Cette concentration d'acide oxolinique peut masquer l'éventuelle contamination de l'Elorn comme cela a été supposé lors de l'analyse du plan de surveillance passive. La contamination des trois points autour de la station d'épuration (STEP) de Landivisiau indique également une contamination par une autre source que la STEP.

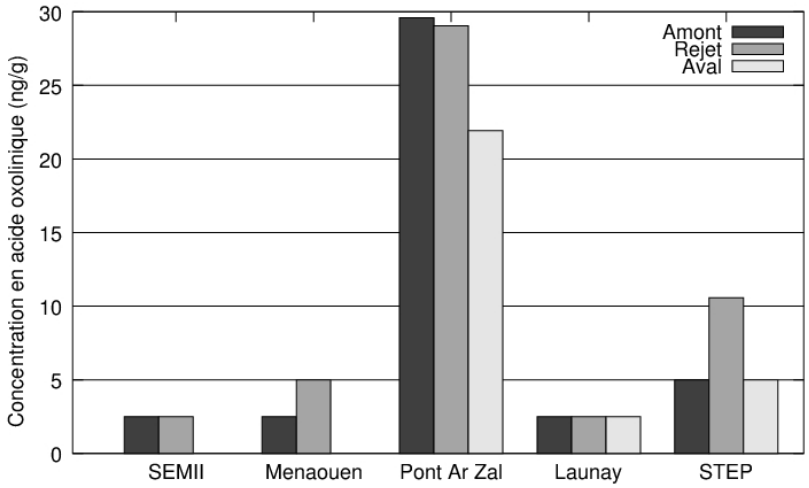


FIG. 57 – *Concentration en acide oxolinique des bryophytes utilisés dans le protocole de surveillance active. STEP : station d'épuration de Landivisiau.*

Les résultats obtenus pour la fluméquine apportent des informations intéressantes sur l'utilisation de cet antibiotique le long du cours de l'Elorn. Les bryophytes prélevées dans le site de référence contenaient environ 15 ng/g de fluméquine. Cette valeur initiale a été soustraite des concentrations obtenues. Ceci peut expliquer les concentrations négatives obtenues à la SEMII. En effet, si le site de référence est contaminé en fluméquine, une décontamination peut intervenir pendant le mois d'exposition, réduisant ainsi la quantité d'antibiotique présente dans la plante et créant donc une différence négative.

Comme pour l'acide oxolinique, la pisciculture de Ménaouen semble rejeter de la fluméquine (figure 58). On observe également une contamination de la zone de Pont Ar Zal, sans que la pisciculture puisse être mise en cause de façon évidente. Des traces de fluméquine ont été relevées dans les rejets de la pisciculture de Launay. Comme

pour la contamination de l'Elorn en acide oxolinique par la pisciculture de Ménaouen, les bryophytes ont pu être transplantées près de la pisciculture de Launay en fin de traitement ou prélevées en début. Cette étude a également permis de montrer une forte contamination en fluméquine dans les rejets de la station d'épuration de Landivisiau. Cette contamination n'avait pas été mise en évidence par le plan de surveillance passive.

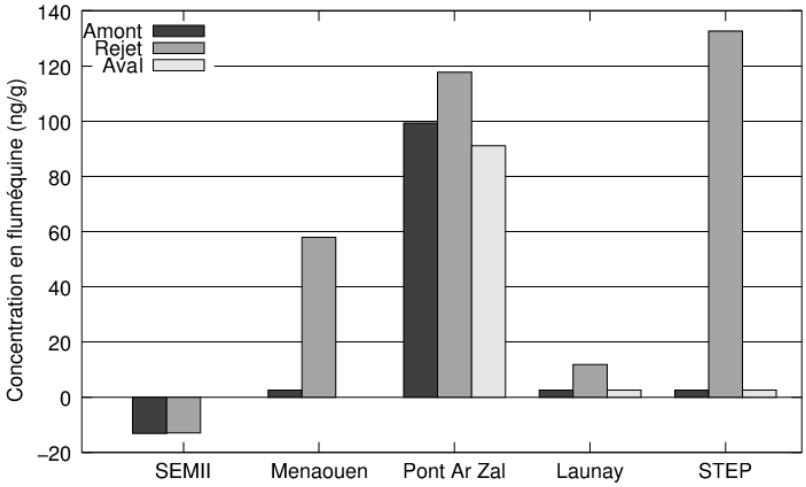


FIG. 58 – *Concentration en fluméquine des bryophytes utilisés dans le protocole de surveillance active. STEP : station d'épuration de Landivisiau.*

Les données fournies par cette étude (figure 59) permettent de montrer une forte concentration d'oxytétracycline dans les rejets de la pisciculture de la SEMII. La station expérimentale mixte INRA/IFREMER nous a informé de l'utilisation d'ActiTétra B® pendant la période d'exposition des mousses. L'ActiTétra B® est une poudre orale contenant 50 % d'oxytétracycline. Cette information permet donc de valider la pertinence du modèle bryophyte comme indicateur de contamination de l'environnement par l'oxytétracycline. L'analyse des bryophytes situées en aval du rejet aurait permis d'appréhender l'effet du facteur de dilution sur la contamination des bryophytes. Malheureusement ce point n'a pu être exploité car les sacs ont été retrouvés sur la berge.

La zone de Pont Ar Zal est également contaminée en oxytétracycline. Il existe donc une source de contamination en acide oxolinique, fluméquine et oxytétracycline en aval

de Ménaouen et en amont de Pont Ar Zal. La pisciculture de Launay semble également utiliser l'oxytétracycline.

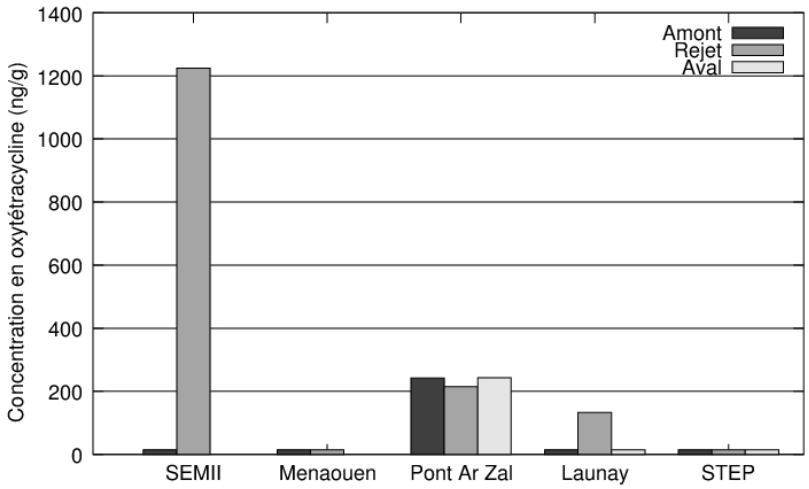


FIG. 59 – *Concentration en oxytétracycline des bryophytes utilisés dans le protocole de surveillance active. STEP : station d'épuration de Landivisiau.*

3.4 Conclusion

Cette étude confirme l'impact des piscicultures sur l'environnement dulçaquicole et l'impact d'autres sources de contamination, probablement des élevages d'animaux terrestres. La zone de Pont Ar Zal est contaminée par les trois antibiotiques, ce qui masque une éventuelle contribution de la pisciculture à cette contamination. Cette surveillance active permet de montrer que les molécules utilisées ne sont pas identiques d'une pisciculture à l'autre sur un même fleuve. Une contamination en rejet de station d'épuration de Landivisiau est également montrée alors qu'aucun impact de cette station d'étude n'a été relevé par le plan de surveillance passive.

Cette étude a également permis de valider le choix de *Fontinalis antipyretica* comme indicateur de contamination. En effet, l'utilisation d'oxytétracycline par la pisciculture de la SEMII au cours du mois d'août est confirmée par une forte concentration (1,2 μg/g)

dans les bryophytes disposées dans le rejet.

Les bryophytes situées en aval de la station d'épuration de Landivisiau ne sont pas contaminées en fluméquine alors qu'une forte concentration a été détectée dans le rejet. Le facteur de dilution doit donc jouer un rôle prépondérant dans la contamination des bryophytes. Ce facteur de dilution varie sans doute avec les caractéristiques topographiques du milieu et le débit du cours d'eau.

Un plan de surveillance active permet donc une analyse fine sur des différentiels de temps et d'espace contrôlés alors qu'un plan de surveillance passive permet une analyse globale d'observation de tendances.

Conclusion

Peu de données scientifiques existent sur le devenir des antibiotiques dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Compte tenu des dangers potentiels que représentent ces molécules et des quantités consommées, il était nécessaire d'étudier le devenir de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline entre les différents compartiments de l'environnement dulçaquicole. Cette étude devait également évaluer l'ampleur et les sources d'une éventuelle contamination de l'Elorn petit fleuve côtier du Finistère (France).

Le préliminaire à toute étude environnementale est de posséder les méthodes analytiques nécessaires au dosage des xénobiotiques dans les matrices considérées. Aucune méthode de dosage d'antibiotique dans des matrices dulçaquicoles n'était décrite auparavant. La première partie du travail a donc été consacrée à la mise au point et à la validation des méthodes de dosage des trois antibiotiques dans les sédiments et les bryophytes dulçaquicoles. Compte tenu de la composition extrêmement complexe de ces matrices, les méthodes ont nécessité des étapes d'extraction et de purification efficaces et originales complétées par une séparation chromatographique très performante. Cet effort d'originalité et de performance a conduit à la mise au point de nouveaux procédés tels que l'utilisation d'appariement d'ions dans l'étape de purification.

Les méthodes analytiques décrites, dans la deuxième partie de ce document, ont permis de mettre en évidence la grande stabilité de l'acide oxolinique et de la fluméquine dans l'eau et les sédiments par rapport à l'oxytétracycline. Des plans d'expériences visant à intégrer les paramètres physico-chimiques des sédiments dans les études d'adsorption, de désorption et de dégradation ont révélé que la matière organique et la nature des minéraux de la fraction argileuse influencent de façon importante ces mécanismes. Les résultats obtenus par ces plans d'expériences sont cependant incomplets et nécessitent des plans complémentaires afin de préciser l'effet de certains constituants du sédiment. De plus, la technique utilisée consistant à ajouter des composés organiques ou minéraux à une base sédimentaire naturelle a montré ses limites. En effet, les interactions entre les différents constituants sédimentaires sont telles qu'il semble difficile de reconstituer

in vitro une matrice synthétique ou semi-synthétique ayant des caractéristiques proches d'un sédiment naturel.

Les capacités de bioaccumulation du bryophyte *Fontinalis antipyretica* dans l'environnement dulçaquicole, connues pour les métaux, ont été expérimentalement démontrées pour l'acide oxolinique, la fluméquine et l'oxytétracycline. Cette mousse a donc un intérêt en tant qu'espèce sentinelle pour le suivi de la contamination environnementale par ces trois antibiotiques. Une modélisation des cinétiques de bioaccumulation et de décontamination dans *Fontinalis antipyretica* a été réalisée afin de proposer des explications physiologiques à ces phénomènes.

La dernière partie décrit des études de terrain sur l'Elorn. Le facteur de dilution dans l'eau est tel qu'aucune trace d'antibiotique n'y a été détectée lors de la surveillance passive, échelonnée sur un an. Il a été confirmé que le prélèvement de bryophytes permet une surveillance plus fine de la présence des antibiotiques dans l'environnement dulçaquicole, notamment l'oxytétracycline. En effet, une réelle contamination par cet antibiotique n'était pas détectable dans les prélèvements de sédiment, alors que des concentrations élevées ont été relevées dans les bryophytes, validant ainsi les résultats expérimentaux. Des analyses de données multivariées (analyse en composantes principales et analyse factorielle des correspondances multiples) ont mis en évidence une réelle contamination de l'Elorn en fluméquine, oxytétracycline et, dans une moindre mesure, en acide oxolinique. Cette contamination semble avoir une tendance saisonnière avec des concentrations plus élevées en automne et en hiver.

Afin de déterminer les sources de contamination en acide oxolinique, fluméquine et oxytétracycline sur l'Elorn, un plan de surveillance active a été réalisé. L'exposition de mousses transférées en amont, dans le rejet et en aval de quatre piscicultures et d'une station d'épuration a révélé une participation des piscicultures à la contamination de l'environnement par les trois antibiotiques mais a également mis en évidence la présence de fluméquine dans le rejet de la station d'épuration. Les concentrations élevées relevées dans certaines zones en amont, en aval et dans le rejet de certaines piscicultures montrent également une contribution d'autres types d'élevages à cette contamination.

La présence d'acide oxolinique, de fluméquine et d'oxytétracycline dans l'environnement dulçaquicole est donc une réalité. Compte tenu de la stabilité de ces antibiotiques dans l'eau, les sédiments, les bryophytes et des concentrations relevées sur le terrain, ils représentent un risque écotoxicologique potentiel. Les concentrations mesurées sont

souvent en-dessous des concentrations minimales inhibitrices généralement observées chez les bactéries pathogènes et environnementales. Cependant, une exposition longue voire un effet cumulatif entre les différents antibiotiques pourraient avoir un effet sur la flore bactérienne naturelle bien que ceci n'ait jamais été démontré.

Les cours d'eau, les lacs et les marais représentent moins de 1 % de la superficie du globe. L'eau douce est donc un bien précieux fournissant au moins 8 % de la production halieutique mondiale. Ces écosystèmes productifs sont exposés à la pression qui résulte des besoins d'une population humaine de plus en plus nombreuse. En France sur les 203,70 km^3/an d'eau renouvelable, 17,5 % étaient utilisés en 1999 pour l'industrie, l'usage domestique ou l'agriculture. La consommation d'eau par habitant a augmenté de 50 % de 1950 à 1990, et la consommation humaine des ressources disponibles en eau devrait augmenter par rapport à son niveau actuel de quelque 54 % à plus de 70 % d'ici l'an 2025 (FAO, 2000). Les experts prévoient une raréfaction de l'eau potable dans les décennies à venir. Ce type d'étude contribue à une meilleure connaissance des contaminants de l'environnement dulçaquicole et à l'établissement d'un état des lieux afin de permettre la gestion durable d'une ressource vitale pour l'Humanité.

Glossaire

Antibiotique : terme général désignant les substances organiques naturelles ou synthétiques capables à doses adéquates d'inhiber la croissance et la multiplication des certains micro-organismes ou de provoquer leur élimination.

Bactériostatique : se dit de n'importe quel agent physique ou chimique capable d'inhiber partiellement ou totalement la multiplication des micro-organismes, sans les tuer.

Bassin versant : territoire dont les eaux de ruissellement se concentrent dans un fleuve.

Bief : espace entre deux écluses sur un cours d'eau.

Bioaccumulation : capacité d'un organisme vivant de concentrer un xénobiotique à partir de son environnement.

Biocide : élément ou composé chimique présentant une toxicité plus ou moins marquée mais toujours significative pour une vaste gamme d'êtres vivants.

Bioconcentration : capacité d'un organisme vivant de concentrer un xénobiotique à partir de la chaîne alimentaire.

Biodégradation : phénomène généralement lié à l'action de micro-organismes des sols ou des eaux qui permettent la dégradation de xénobiotiques dans les milieux terrestres ou aquatiques.

Biodisponibilité (absolue) : fraction de la dose d'une substance administrée par une voie donnée qui atteint la circulation générale calculée par rapport à la même dose administrée par voie intravasculaire.

Bryophyte : embranchement du règne végétal auquel appartiennent les mousses et les hépatiques. A la différence des autres cormophytes, l'appareil végétatif est dépourvu de racines et de système vasculaire.

CE_{50} : Concentration d'un xénobiotique permettant d'observer une modification quelconque de la moitié des organismes étudiés.

Chromatographie : procédé technique qui rend possible, dans les mélanges, la séparation et la purification de substances minérales ou organiques en utilisant la différence de vitesse de migration des différentes substances sur ou à travers des supports convenablement choisis.

Clairance : constante définissant la partie de l'organisme totalement épurée par unité de temps.

CL_{50} : concentration d'un xénobiotique causant la mortalité de la moitié des organismes étudiés.

Coefficient de partage (entre le sédiment et l'eau) : rapport, à l'équilibre, des concentrations d'un xénobiotique dans le sédiment et l'eau.

Commensalisme : exploitation non parasitaire d'une espèce vivante par une autre espèce.

Compartiment : volume théorique de l'organisme ou de l'environnement, sans aucun support anatomique ou écologique, dans lequel le xénobiotique se répartit à tout instant de manière homogène.

DL_{50} : dose de xénobiotique causant la mortalité de la moitié des organismes étudiés.

Dulçaquicole : relatif aux eaux continentales douces.

Ecotoxicologie : science de l'étude des substances ayant un effet nocif sur l'environnement.

Endergonique : réaction chimique qui, pour se réaliser, nécessite un apport d'éner-

gie.

Etiage : niveau le plus bas atteint par un cours d'eau.

Eutrophisation : Accroissement anarchique de la quantité de matière nutritive d'un milieu, particulièrement d'un cours d'eau, qui permet la pullulation d'êtres vivants.

Exactitude : étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée, soit comme une valeur conventionnelle, soit comme une valeur de référence (standard international), et la valeur trouvée (valeur unique ou moyenne) obtenue en appliquant la procédure d'analyse.

Facteur de bioaccumulation : rapport entre les concentrations d'un xénobiotique dans un tissu végétal ou animal et le compartiment environnemental à partir duquel il est accumulé.

Fidélité : étroitesse de l'accord (coefficient de variation, degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites.

Fleuve : cours d'eau qui se jette dans la mer.

Fonction de réponse (courbe de calibration) : traduction, à l'intérieur d'un intervalle de dosage, de la relation existant entre la réponse (= signal) et la concentration ou la quantité en substance à analyser dans l'échantillon.

Homoscédasticité : absence de variation des erreurs aléatoires absolues (variances) en fonction de la grandeur de référence.

Hydrolyse : réaction chimique au cours de laquelle une liaison chimique est scindée par l'action de l'eau.

Intervalle de dosage : Région entre les niveaux supérieur et inférieur (ces valeurs incluses) pour laquelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à sa fidélité, son exactitude et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite.

Kaolinite : un des minéraux argileux les plus communs. Cette argile se forme par la

dégradation de minéraux cristallins (feldspaths). Sa densité de charge de surface est de 5×10^{-2} C/m^2 et sa capacité d'échange ionique de 0,023 méq/g, est relativement faible en comparaison avec d'autres argiles fréquemment rencontrées.

Kieselguhr : Diatomite pulvérulante.

Linéarité : capacité, à l'intérieur d'un intervalle de dosage, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration ou à la quantité en substance à analyser dans l'échantillon.

Macrophytes : terme désignant les végétaux de grande taille tant cryptogames que phanérogames, qui croissent dans la zone riparienne des écosystèmes aquatiques. Ils sont essentiellement représentés par des bryophytes, des characées et des angiospermes aquatiques.

Pharmacocinétique : science du devenir des médicaments dans l'organisme.

Pharmacophore : partie de la structure chimique d'une molécule nécessaire à procurer une activité thérapeutique.

Photodégradation (ou photolyse) : décomposition chimique sous l'action de la lumière, principalement les rayons ultra-violets.

Radier : dalle constituant le placher d'une fosse ou d'un canal.

Rendement d'extraction (absolu) : rapport des signaux mesurés, d'une part après traitement de l'échantillon supplémenté avec une quantité connue de la substance à analyser, d'autre part, après injection directe dans le système physico-chimique d'une gamme non biologique contenant une concentration équivalente de la substance à analyser dans le même solvant de reconstitution que l'échantillon supplémenté extrait.

Ria : Vallée fluviale envahie par la mer.

Sélectivité : Capacité à établir l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents.

Seuil de détection : plus petite concentration ou quantité de substance à examiner dans un échantillon pouvant être détectée mais non quantifiée comme une valeur exacte.

Seuil de quantification (inférieur) : plus petite concentration ou quantité de substance à examiner dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une exactitude définies.

Smectite : type minéralogique d'argiles, constituant majoritaire des sédiments dans les biotopes aquatiques continentaux ou littoraux. Elles présentent une capacité d'adsorption très élevée due à leur structure.

Spécificité : Capacité, d'une part à garantir que le signal mesuré provient de la seule substance à analyser, d'autre part à mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupement fonctionnel d'une ou plusieurs substances dans l'échantillon.

Temps de demi-vie : temps nécessaire pour que la concentration en xénobiotique décroisse d'une valeur quelconque à la moitié de cette valeur.

Temps moyen de résidence : temps moyen probable pendant lequel chacune des molécules de xénobiotique est susceptible de persister dans l'organisme ou le milieu.

Transect : coupe faite selon un plan virtuel perpendiculaire à la surface du sol selon laquelle a été réalisé un échantillonnage.

Trophique : qualifie tout ce qui concerne la circulation des nutriments dans les écosystèmes et de ce fait celle des aliments dans une zoocœnose.

Volume de distribution : volume virtuel nécessaire pour contenir la quantité de xénobiotique présente dans l'organisme, si ce xénobiotique se répartit de façon homogène à une concentration égale à la concentration plasmatique.

Xénobiotique : substance étrangère à l'organisme ou à l'environnement, qu'elle soit médicamenteuse, toxique ou autre.

Bibliographie

Abedini, S., Namdari, R., Law, F., 1998. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in rainbow trout and chinook salmon. Aquaculture 162 (1-2), 23–32.

Agasöster, T., Rasmussen, K., 1992. On-line dialysis, liquid chromatography and post-column reaction detection of oxytetracycline in salmon muscle extracts. J Pharmaceut Biomed 10 (5), 349–354.

Albert, A., 1953. Avidity of terramycin and auremycin for metallic cations. Nature , 172–201.

Albert, A., Rees, T., 1956. Avidity of the tetracyclines for the cations of metals. Nature 177, 433–434.

Albrechtsen, H., Smith, P., Nielsen, P., Christensen, T., 1997. Importance of sediment fines in laboratory studies on the degradation of organic chemicals in aquifers. Water Res 31 (9), 2287–2299.

Alcobendas, M., Lecomte, F., Castanet, J., Maunier, F., Maire, P., Holl, M., 1991. Technique de marquage en masse de civelles (*Anguilla anguilla* l.) par balnéation rapide dans le fluorochrome. application au marquage à la tétracycline de 500 kg de civelles. Bull Fr Pêche Piscic 321, 43–54.

Alderman, D., 1992. Chemotherapy in aquaculture : from theory to reality. Alderman, DJ., Michel, C., eds, Ch. Chemotherapy in the control of molluscan diseases. Paris : Office International des Epizooties, pp. 39–44.

Alvero, C., 1987. Antibiotic resistance of heterotrophic bacterial flora of two lakes. System Appl Microbiol 9, 169–172.

Andersen, S., Sandaa, R., 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. Appl Environ Microb 60 (3), 908–912.

Andrejak, M., Laurans, G., Orfila, J., 1988. Tetracyclines : pharmacology, microbiological data, current indications and complications. La Rev Prati 38 (8), 477–485.

Ankley, G., Benoit, D., Hoke, R., Leonard, E., West, C., Phipps, G., Mattson, V., Anderson, L., 1993. Development and evaluation of test methods for benthic invertebrates and sediments : Effects of flow rate and feeding on water quality and exposure conditions. Arch Environ Con Tox 25, 12–19.

Aoki, T., 1992. Chemotherapy in aquaculture : from theory to reality. Alderman, DJ., Michel, C., eds, Ch. Present and future problems concerning the development of resistance in aquaculture. Paris : Office International des Epizooties, 1, pp. 254–262.

Appelbaum, P., Hunter, P., 2000. The fluoroquinolone antibacterials : past, present and future perspectives. Int J Antimicrob Ag 16 (1), 5–15.

Archimbault, P., Ambroggi, G., Nicolas, S., 1988. Oxolinic acid in the trout : bioavalability and tissue residues. Ann Rech Vét 19, 39–43.

Austin, B., 1985. Antibiotic pollution from fish farms : effects on aquatic microflora. Microbiol Sci 2, 113–117.

Barker, S., Alvarez, R., 1993. Chemotherapy of rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*) and its effect on environmental bacteria. Dans : Sixth International Conference of the European Association of Fish Pathologists, Brest, France, September 5-10.

Barnes, A., Lewin, C., Hastings, T., Amyes, S., 1992. Chemotherapy in aquaculture : from theory to reality. Alderman, DJ., Michel, C., eds, Ch. Bactericidal activity of 4-quinolones, including flumequine, against *Aeromonas salmonicida*. Paris : Office International des Epizooties, pp. 326–332.

Barrat-Segretain, M., Bornette, H., Gudrun, C., 1999. Regeneration and colonization of aquatic plant fragments in relation to the disturbance frequency of their habitats. Arch Hydrobiol 145 No 1, 111–127.

Bavestrello, G., Cattaneo-Vietti, R., Cerrano, C., Sara, M., 1993. Rate of spiculogenesis in *Clathrina cerebrum*(*Porifera : Calicispongiae*) using tetracycline marking. J Mar Biol Ass UK 73, 457–460.

Belfiore, L., McCurdie, M., Das, P., 2001. Macromolecule-metal complexes : ligand field stabilization and thermophysical property modification. Polymer 42 (25), 09995–10006.

Bell, T., Lightner, D., 1992. Chemotherapy in aquaculture : from theory to reality. Alderman, DJ., Michel, C., eds, Ch. Current practices in shrimp culture : available treatments and their efficacity. Paris : Office International des Epizooties, pp. 45–57.

Berthe, F., 1994. Effet des antibiotiques à concentrations subinhibitrices chez les crevettes pénéides. Une hypothèse sur leurs modes d'action en élevage larvaire. Rec Méd Vét 170, 167–170.

Björklund, H., Bylund, G., 1990. Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Aquaculture 84, 363–372.

Björklund, H., Bylund, G., 1991. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*). Xenobiotica 21, 1511–1520.

Björklund, H., Eriksson, A., Bylund, G., 1992. Temperature-related absorption and excretion of oxolinic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 102, 17–27.

Black, W., Ferguson, H., Byrne, P., Claxton, M., 1991. Pharmacokinetic and tissue distribution study of oxytetracycline in rainbow trout following bolus intravenous administration. J Vet Pharmacol Therap 14, 351–358.

Blasiola, G., Dempster, R., Morales, P., 1980. Uptake studies of ampicillin, nitrofurazone and oxytetracycline in carp, *Cyprinus carpio*, with special reference to use of antibacterials in aquaria and notes on heparine as an anticoagulant. J Aquaricult 1, 1–5.

Boon, P., 1992. Antibiotic resistance of aquatic bacteria and its implications for limnological research. Aust J Mar Freshwater Res 43, 847–859.

Borcherding, J., Jantz, B., 1997. Valve movement response of the mussel *Dreissena polymorpha* - the influence of pH and turbidity on the acute toxicity of pentachlorophenol under laboratory and field conditions. Ecotoxicology 6, 153–165.

Bories, G., Louisot, P., 1998. Rapport concernant l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance en alimentation animale. Tech. rep., Ministère de l'agriculture. URL `http://www.agriculture.gouv.fr/medi/etud/rapp-Borris.do%c`

Boryslawskyj, M., Garrood, T., Stranger, M., Pearson, T., Woodhead, D., 1988. Role of lipid/water partitioning and membrane composition in the uptake of organochlorine pesticides into a freshwater mussel. Mar Environ Res 24, 57–61.

Bossuyt, R., Van Renterghem, R., Waes, G., 1976. Identification of antibiotic residues in milk by thin-layer chromatography. J Chromatogr 124 (1), 37–42.

Bowser, P., House, H., 1990. *In vitro* sensitivity of some fish pathogens to the quinolones nalidixic acid and oxolinic acid and the fluoroquinolone enrofloxacin. Bull Eur Ass Fish Pathol 10, 48–49.

Brown, S., 1996. Fluoroquinolones in animal health. J Vet Pharmacol Ther 19 (1), 1–14.

Bruns, I., Friese, K., Markert, B., Krauss, G., 1997. The use of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 2. Heavy metal accumulation and physiological reaction of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. in active biomonitoring in the river Elbe. Sci Total Environ 204 (2), 161–176.

Bryan, P., Stewart, J., 1993. Separation of tetracyclines by liquid chromatography with acidic mobile phases and polymeric columns. J Pharmaceut Biomed 11 (10), 971–976.

Buser, H., Muller, M., Theobald, N., 1998. Occurrence of the pharmaceutical drug clofibric acid and the herbicide mecoprop in various Swiss Lakes and in the North Sea. Environ Sci Technol 32 (1), 188–192.

Campeau, R., Gulli, L., Graves, J., 1996. Drug resistance in detroit river gram-negative bacilli. Microbios 88 (357), 205–212.

Capone, D., Weston, D., Miller, V., Shoemaker, C., 1996. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. Aquaculture 145 (1-4), 55–75.

Caporal-Gautier, J., Nivet, J., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu, J., Russotti, R., 1992a. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I. Méthodologie. S.T.P. Pharma Prat 2 (4), 205–226.

Caporal-Gautier, J., Nivet, J., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu, J., Russotti, R., 1992b. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. II. Exemples d'application. S.T.P. Pharma Prat 2 (4), 227–239.

Carballeira, A., Vazquez, M., Lopez, J., 2001. Biomonitoring of sporadic acidification of rivers on the basis of release of preloaded cadmium from the aquatic bryophyte *Fontinalis antipyretica* Hedw. Environ Pollut 111 (1), 95–106.

Carignan, G., Carrier, K., Sved, S., 1993. Assay of oxytetracycline residues in salmon muscle by liquid chromatography with ultraviolet detection. J AOAC Int 76 (2), 325–328.

Carson, M., Ngoh, M., Hadley, S., 1998. Confirmation of multiple tetracycline residues in milk and oxytetracycline in shrimp by liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. J Chromatogr B 712 (1-2), 113–128.

Chappell, G., Houglum, J., Kelley, W., 1986. Determination of oxytetracycline in premixes and veterinary products by liquid chromatography. J AOAC 69 (1), 28–30.

Chapuzet, E., Mercier, N., Bervoas-Martin, S., Boulanger, B., Chevalier, P., Chiap, P., Grandjean, D., Hubert, P., Lagorce, P., Lallier, M., Laparra, M., Laurentie, M., Nivet, J., 1997. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP. S.T.P. Pharma Prat 7 (3), 169–194.

Chapuzet, E., Mercier, N., Bervoas-Martin, S., Boulanger, B., Chevalier, P., Chiap, P., Grandjean, D., Hubert, P., Lagorce, P., Lallier, M., Laparra, M., Laurentie, M., Nivet, J., 1998. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : exemple

d'application de la stratégie de validation. rapport d'une commission SFSTP. S.T.P. Pharma Prat 8 (2), 81–107.

Chevreuil, M., Blanchard, M., Teil, M., Carru, A., Testard, P., Chesterikoff, A., 1996. Evaluation of the pollution by organochlorinated compounds (polychlorobiphenyls and pesticides) and metals (Cd, Cr, Cu and Pb) in the water and in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha pallas*) of the river Seine. Water Air Soil Poll 88, 371–381.

Choma, I., Grenda, D., Malinowska, I., Suprynowicz, Z., 1999. Determination of flumequine and doxycycline in milk by a simple thin-layer chromatographic method. J Chromatogr B 734, 7–14.

Chopra, I., Hawkey, P., Hinton, M., 1992. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. J Antimicrob Chemoth 29 (3), 245–277.

Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics : Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol R 65 (2), 232–260.

Claveri, B., Guérold, F., Pihan, J., 1995. Use of transplanted mosses and autochthonous liverworts to monitor trace metals in acidic and non-acidic headwater streams (Vosges mountains, France). Sci Total Environ Vol. 175, 235–244.

Cooke, M., 1976. Antibiotic resistance in coliform and faecal coliform bacteria from natural waters and effluents. NZ J Mar Freshwater Res 10, 391–397.

Cooper, A., Tarbin, J., Farrington, W., Shearer, G., 1998. Effects of extraction and spiking procedures on the determination of incurred residues of oxytetracycline in cattle kidney. Food Addit Contam 15 (6), 645–650.

Cornelissen, G., Hassell, K., van Noort, P., Kraaij, R., van Ekeren, P., Dijkema, C., de Jager, P., Govers, H., 2000. Slow desorption of PCBs and chlorobenzenes from soils and sediments : relations with sorbent and sorbate characteristics. Environ Poll 108 (1), 69–80.

Coyne, R., Hiney, M., Smith, P., 1997. Transient presence of oxytetracycline in blue mussels (*Mytilus edulis*) following its therapeutic use at a marine atlantic salmon farm. Aquaculture 149, 175–181.

Cravedi, J., Choubert, G., Delous, G., 1987. Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. Aquaculture 60, 133–141.

Croubels, S., Vermeersch, H., De Backer, P., Santos, M., Remon, J., Van Peteghem, C., 1998. Liquid chromatographic separation of doxycycline and 4-epidoxycycline in a tissue depletion study of doxycycline in turkeys. J Chromatogr B 708 (1-2), 145–152.

Crum, S., van Kammen-Polman, V., Leistra, M., 1999. Sorption of nine pesticides to three aquatic macrophytes. Arch Environ Con Tox 37, 310–316.

Delépée, R., 1998. Recherche d'une méthode d'analyse de l'oxytétracycline par CLHP-SDM — Application à son identification dans les sédiments marins. Rapport de DEA : Université de Nantes .

Dey, N., Bolton, E., 1978. Tetracycline as a bivalve shell marker. Proceed National Shellfish Assoc 68, 77.

Dhainaut-Courtois, N., Demuynck, S., Salzet-Raveillon, B., 1991. Mécanismes de détoxication chez les poissons et invertébrés marins. Oceanis : Toxicologie de l'environnement : effets biologiques des polluants utilises comme biomarqueurs des contaminations 19 No 4, 403–420.

Dixon, B., 1994. Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. J World Aquacult Soc 25 (1), 60–63.

Doi, A., Stoskopf, M., 2000. The kinetics of oxytetracycline degradation in deionized water under varying temperature, pH, light, substrate, and organic matter. J Aquat Anim Health 12 (3), 246–253.

Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M., Babut, M., Vasseur, P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquat Toxicol 39, 93–110.

Driscoll, S., Harkley, G., Landrum, P., 1997a. Accumulation and toxicokinetics of fluoranthene in sediment bioassays with freshwater amphipods. Environ Toxicol Chem 16 No 4, 742–753.

Driscoll, S., Landrum, P., Tigue, E., 1997b. Accumulation and toxicokinetics of fluoranthene in water-only exposures with freshwater amphipods. Environ Toxicol Chem 16 No 4, 754–761.

Du, W., Marshall, M., Xu, D., C.R., S., Wei, C., 1997. Retention of oxytetracycline residues in cooked channel catfish fillets. J Food Science 62 (1), 119–122.

Egeler, P., Römbke, J., Meller, M., Knacker, T., Franke, C., Studinger, G., R., N., 1997. Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35 No 4, 835–852.

Elema, M., Hoff, K., Kristensen, H., 1995. Bioavailability of flumequine after oral administration to atlantic salmon (*Salmo salar L.*). Aquaculture 136 (3-4), 209–219.

Elema, M., Hoff, K., Kristensen, H., 1996. Bioavailability of oxytetracycline from medicated feed administered to atlantic salmon (*Salmo salar* l.) in seawater. Aquaculture 143 (1), 7–14.

Ellis, A., 1991. Tissue residues of chemotherapeutants in fish. Bull Eur Ass Fish Pathol 11, 22–29.

Endo, T., Ogishima, K., Hayasaka, H., Kaneko, S., Ohshima, S., 1973. Application of oxolinic acid as a chemotherapeutic agent against infectious diseases in fishes. I. antibacterial activity, chemotherapeutic effects and pharmacokinetics of oxolinic acid in fishes. Bull Japan Soc Sci Fish 39, 165–171.

Endo, T., Onozawa, M., Hamaguchi, M., Kasuda, R., 1987a. Bioavailability of ultra-fine preparation of oxolinic acid by ayu. Nippon Suisan Gakk 53, 557–562.

Endo, T., Onozawa, M., Hamaguchi, M., Kasuda, R., 1987b. Enhanced bioavailability of oxolinic acid by ultra-fine size reduction in yellowtail. Nippon Suisan Gakk 53, 1711–1716.

Ervik, A., Thorsen, B., Eriksen, V., Lunestad, B., Samuelsen, O., 1994. Impact of administering antibacterial agents on wild fish and blue mussels *Mytilus edulis* in the vicinity of fish farms. Dis Aquat Org 18, 45–51.

FAO, 2000. The state of world fisheries and aquaculture. Electronic references.
URL `http://www.fao.org/DOCREP/003/X8002E/X8002E00.htm`

FEDESA, 1999. Antibiotics for animals - A FEDESA perspective on antibiotics, animal health and the resistance debate. Electronic references.
URL `http://www.fedesa.be/Antibio/Dossier9/Dossier9.pdf`

Ferreira, A., Cortesao, C., Castro, O., Vale, C., 1990. Accumulation of metals and organochlorines in tissues of the oyster *Crassostrea angulata* from the Sado estuary, Portugal. Sci Total Environ 97/98, 627–639.

Forbes, V., Forbes, T., 1997. Dietary absorption of sediment-bound fluoranthene by a deposit-feeding gastropod using the ^{14}C :^{51}Cr dual-labeling method. Environ Toxicol Chem 16 (5), 1002–1009.

Francis, R., Paul, L., Mulligan, K., 1992. Ageing of adult snapper (*Pagrus auratus*) from otolith annual ring counts : validation by tagging and oxytetracycline injection. Aust J Mar Freshwater Res 43, 1069–1089.

Furusawa, N., 1999. High-performance liquid chromatographic determination/identification of oxytetracycline and sulphadimidine in meat and eggs. Chromatographia 49 (7/8), 369–373.

Gage, J., 1992. Natural growth bands and growth variability in the sea urchin *Echinus esculentus* : results from tetracycline tagging. Mar Biol 114, 607–616.

Gagnon, C., Fisher, N., 1997. The bioavailability of sediment-bound Cd, Co, and Ag to the mussel *Mytilus edulis*. Can J Fish Aquat Sci 54, 147–156.

Garrison, A., Pope, J., Allen, F., 1976. In : Keth, c.h. (eds.), identification and analysis of organic pollutants in water. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI , pp. 517–566.

Gatsonis, C., Ageloudis, C., 1982. Quantitative determination of antibiotics by means of densitometry on TLC. Part 2 : Determination of tetracyclines. Die Pharmazie 37 (9), 649–650.

Giles, J., Hariharan, H., Heaney, S., 1994. A microbiological assay for determining sarafloxacin and oxolinic acid concentrations in atlantic salmon plasma. New Microbiologica 17 (2), 155–158.

Gonçalves, E., Boaventura, R., 1998. Uptake and release kinetics of copper by the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. Water Res 32 (4), 1305–1313.

Goni-Urriza, M., Capdepuy, M., Raymond, N., Quentin, C., Caumette, P., 1999. Impact of an urban effluent on the bacterial community structure in the Arga river (Spain), with special reference to culturable gram-negative rods. Can J Microbiol 45 (10), 826–832.

Grondel, J., Nouws, J., De Jong, M., Schutte, A., Driessens, F., 1987. Pharmacokinetics and distribution of oxytetracycline in carp, *Cyprinus carpio* L., following different routes of administration. J Fish Dis 10, 153–163.

Grondel, J., Nouws, J., Schutte, A., Driessens, F., 1989. Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and african catfish (*Clarias gariepinus*). J Vet Pharmacol Ther 12 (2), 157–162.

Hameed, P., Shahul, A., Mohan, R., 1990. Freshwater mussel, *Lamellidens marginalis* (Lamarck) (*mollusca* : *bivalvia* : *unionidae*) as an indicator of river pollution. Chem Ecol 4, 57–64.

Hamscher, G., Sczesny, S., Abu-Qare, A., Höpfer, H., Nau, H., 2000. Stoffe mit pharmakologischer wirkung eischließlich hormonell aktiver substanzen in der umwelt : nachweiss von tetracyklinen in güllegedüngten böden. Deut Tierrärztl Woch 107, 332–334.

Hansen, M., Ingebrigtsen, K., Hayton, W., Horsberg, T., 2001. Disposition of ^{14}C-flumequine in eel *Anguilla anguilla*, turbot *Scophthalmus maximus* and halibut *Hippoglossus hippoglossus* after oral and intravenous administration. Dis Aquat Organ 47 (3), 183–191.

Hansen, P., Lunestad, B., Samuelsen, O., 1992a. Chemotherapy in aquaculture : from theory to reality. Alderman, DJ., Michel, C., eds, Ch. Ecological effects of antibiotics and chemotherapeutants from fish farming. Paris : Office International des Epizooties, pp. 174–178.

Hansen, P., Lunestad, B., Samuelsen, O., 1992b. Effects of oxytetracycline, oxolinic acid and flumequine on bacteria in an artificial marine fish farm sediment. Can J Microbiol 28, 1307–1312.

Hare, L., 1992. Aquatic insects and trace metal : bioavalability, bioaccumulation, and toxicity. Crit Rev Toxicol 22, 327–369.

Harrison, L., Schuppan, D., Rohlfing, S., Hansen, A., Gerster, J., Hansen, C., Funk, M., Ober, R., 1986. Disposition of radiolabeled flumequine in rat and dog. Drug Metab Disp 14, 555–558.

Haug, T., Hals, P., 2000. Pharmacokinetics of oxytetracyline in arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) in freshwater at low temperature. Aquaculture 186 (3-4), 175–191.

Haury, J., Peltre, M., Muller, S., Tremolieres, M., Barbe, J., Dutartre, A., Guerlesquin, M., 1995. Des indices macrophytes pour estimer la qualité des cours d'eau : premières propositions du groupement d'intérêt scientifique "macrophytes des eaux continentales". Ann. A.N.P.P. Marqueurs biologiques de pollution, 21-22 septembre 1995, Chinon 243-253.

Heberer, T., Butz, S., Stan, H., 1995. Analysis of phenoxy carboxilic acids and other acidic compounds in tap, ground, surface and sewage water at the low ppt level. Int J Environ Anal Chem 58, 43–54.

Hektoen, H., Berge, J., Hormazabal, V., Yndestad, M., 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. Aquaculture 133 (3-4), 175–184.

Hernandez, M., Borrull, F., Calull, M., 2000. Determination of quinolones in plasma samples by capillary electrophoresis using solid-phase extraction. J Chromatogr B 742 (2), 255–265.

Hernandez-Arteseros, J., Barbosa, J., Compano, R., Prat, M., 2002. Analysis of quinolone residues in edible animal products. J Chromatogr A 945 (1-2), 1–24.

Hickey, C., Roper, D., Holland, P., T.M., T., 1995. Accumulation of organic contaminants in two sediment-dwelling shellfish with contrasting feeding modes : deposit- (*Macomona liliana*) and filter-feeding (*Austrovenus stutchburyi*). Arch Environ Con Tox 29, 221–231.

Hily, C., Le Bris, H., Majeed, S., Glémarec, M., 1985. Surcharge du milieu côtier en matière organique. Actes du 1er colloque d'océanographie côtière, Bordomer , 214–229.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. Sci Total Environ 225 (1-2), 109–118.

Hoke, R., Kosian, P., Ankley, G., Cotter, A., Vandermeiden, F., Phipps, G., Durhan, E., 1995. Check studies with *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* in support of the development of a sediment quality criterion for dieldrin. Environ Toxicol Chem 14 (3), 435–443.

Holt, M., Fox, K., Griessbach, E., Johnsen, S., Kinnunen, J., Lecloux, A., Murray-Smith, R., Peterson, D., Schroder, R., Silvani, M., Ten Berge, W., Toy, R., Feijtel, T., 2000. Monitoring, modelling and environmental exposure assessment of industrial chemicals in the aquatic environment. Chemosphere 41 (11), 1799–1808.

Hooper, D., 2002. Fluoroquinolone resistance among gram-positive cocci. Lancet Infect Dis 2 (9), 530–538.

Hooper, D., Nikaido, H., Drusano, G., Schnell, N., Hancock, R., Baquero, F., Verhoef, J., Moellering, R., Amyes, S., Barth, P., Acar, J., Proctor, R., 1998. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. Clin Infect Dis 27 Supplement 1, S54–S63.

Houglum, J., Larson, R., Mutchler, D., 1998. Assay of oxytetracycline in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection. J AOAC Int 81 (5), 919–922.

Hughes, V., Datta, N., 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' area. Nature 302, 725–726.

Husevag, B., Lunestad, B., Johannessen, P., Enger, O., Samuelsen, O., 1991. Simultaneous occurence of *Vibrio salmonicida* and antibiotic-resistant bacteria in sediments at abandoned aquaaculture sites. J Fish Dis 14, 631–640.

Hustvedt, S., Salte, R., 1991. Distribution and elimination of oxolinic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* walbaum) after a single rapid intravascular injection. Aquaculture 92, 297–303.

Hustvedt, S., Salte, R., 1992. Pharmacokinetics in farmed atlantic salmon. Alderman, DJ., Michel, C., eds, Ch. Ecological effects of antibiotics and chemotherapeutants from fish farming. Paris : Office International des Epizooties, pp. 428–436.

Ingerslev, F., Torang, L., Loke, M.-L., Halling-Sorensen, B., Nyholm, N., 2001. Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems. Chemosphere 44 (4), 865–872.

Ingersoll, C., Ankley, G., Benoit, D., Brunson, E., Burton, G., Hoke, R., Landrum, P., Norberg-King, T., Winger, P., 1995. Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates : a review of methods and applications. Environ Toxicol 14 (11), 1885–1894.

Ishida, N., 1990a. Comparison of biliary metabolites of oxolinic acid in seven species of teleosts. Nippon Suisan Gakk 56, 55–59.

Ishida, N., 1990b. Comparison of tissue level of oxolinic acid in fresh and sea water fishes after the oral administration. Nippon Suisan Gakk 56, 281–286.

Ishida, N., 1990c. Metabolites of oxolinic acid in rainbow trout *Salmo gairdneri*. Nippon Suisan Gakk 56, 159.

Ishida, N., 1992. Tissue levels of oxolinic acid after oral or intravascular administration freshwater and seawater rainbow trout. Aquaculture 102, 9–15.

Jacobsen, M., 1989. Withdrawal times of freshwater rainbow trout, *Salmo gairdneri* richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimethoprim. J Fish Dis 12, 29–36.

Jorgensen, S., Halling-Sorensen, B., 2000. Drugs in the environment. Chemosphere 40 (7), 691–699.

Joyce, D., Lyne, A., Robinson, I., 1984. The incidence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in water used on dairy farms. Dans : Woodbine, Malcolm, Butterworth, eds. Antimicrob Agric Proc In Symp Antibiot Agric Benefits Malefits, 4th Meeting 1983, London, UK.

Kaag, N., Foekema, E., Scholten, M., Van Straalen, N., 1997. Comparison of contaminant accumulation in three species of marine invertebrates with different feeding habits. Environ Toxicol Chem 16 No 5, 837–842.

Kasuga, Y., Sugitani, A., Tamada, F., Arai, M., Morikawa, S., 1984. Oxolinic acid residues in tissues of cultured rainbow trout and ayu fish. J Food Hyg Soc Jap 25, 512–516.

Keck, G., Martell, C., Gérard, J., 1984. Etude pharmacocinétique de l'oxytétracycline (OTC) chez la truite arc-en-ciel - Conséquences thérapeutiques et hygiéniques - Influence d'une enzyme protéolytique (Fradiase ND). Rev Méd Vét 135, 217–228.

Kerry, J., Hiney, M., Coyne, R., Cazabon, D., NicGabhainn, S., Smith, P., 1994. Frequency and distribution of resistance to oxytetracycline in micro-organisms isolated from marine fish farm sediments following therapeutic use of oxytetracycline. Aquaculture 123, 43–54.

Kerry, J., Hiney, M., Coyne, R., Smith, P., 1993a. Studies on the origin of oxytetracycline resistant bacteria in the sediment under fish cages. Dans : Sixth International Conference of the European Association of Fish Pathologists, Brest, France, September 5-10.

Kerry, J., Hiney, M., Gilroy, D., Rudden, S., Smith, P., 1993b. Fish feed as a source of oxytetracycline resistant bacteria in the sediments under fish cages. Dans : Sixth International Conference of the European Association of Fish Pathologists, Brest, France, September 5-10.

Kerry, J., Smith, P., 1993. Use of microcosms to study impact of oxytetracycline in marine sediments. Dans : Sixth International Conference of the European Association of Fish Pathologists, Brest, France, September 5-10.

Khan, N., Hendrix, C., Hoebus, J., Busson, R., Roets, E., Hoogmartens, J., 1992. Analysis of purified samples of oxytetracycline, 4-epi-oxytetracycline, α-apooxytetracycline and β-apooxytetracycline. Janssen Chimica Acta 10, 16–21.

Khan, N., Roets, E., Hoogmartens, J., Vanderhaeghe, H., 1987. Quantitative analysis of oxytetracycline and related substances by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 405, 229–245.

Kitts, D., Yu, C., R., A., Burt, H., Mc Erlane, K., 1992. Oxytetracycline degradation in thermally processed farmed salmon. J Agric Food Chem 40 (10), 1977–1981.

Klare, I., Heier, H., Claus, H., Bohme, G., Marin, S., Seltmann, G., Hakenbeck, R., Antanassova, V., Witte, W., 1995. *Enterococcus faecium* strains with vana-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.) 1 (3), 265–272.

Klinger, J., Brauch, H., 2000. Water quality of the rivers danube and its tributaries. Dans : Poster presented at the Annual Meeting of the German Society of Water Chemistry, Weimar, Proceedings.

Knapp, D., 1979. Handbook of analytical derivatization reactions. John Wiley & sons, New York.

Koenings, J., Lipton, J., McKay, P., 1986. Quantitative determination of oxytetracycline uptake and release by juvenile sockeye salmon. T Am Fish Soc 115, 621–629.

Kohn, K., 1961. Mediation of divalent metal ions in the binding of tetracycline to macromolecules. Nature 191, 1156–1158.

Kondo, F., Nagata, S., Tsai, C., Saitanu, K., 1994. Determination of pyridonecarboxylic acids in plasma by reverse-phase high-performance liquid chromatography. Microbios 77 (312), 181–189.

Kukkonen, J., Landrum, P., 1996. Distribution of organic carbon and organic xenobiotics among different particle-size fractions in sediments. Chemosphere 32 (6), 1063–1076.

Kummerer, K., 2001. Drugs in the environment : emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. Chemosphere 45 (6-7), 957–969.

Lang, C., 1997. Oligochaetes, organic sedimentation, and trophic state : how to assess the biological recovery of sediments in lakes ? Aquat Sci 59, 26–33.

Lawrence, M., Davies, N., Edwards, P., Taylor, M., Simkiss, K., 2000. Can adsorption isotherms predict sediment bioavailability ? Chemosphere 41 (7), 1091–1100.

Le Bris, H., 1988. Fonctionnement des écosystèmes benthiques côtiers au contact d'estuaires : la rade de Lorient et la baie de Vilaine. Rapport de Thèse : Université de Bretagne Occidentale .

Levy, S., 1984. L.E. Bryan (ed.), Antimicrobial drug resistance. Academic Press, Orlando, Fla, Ch. Resistance to the tertracyclines, pp. 191–240.

Levy, S., 1994. Balancing the drug-resistance equation. Trends in Microbiology 2 (10), 341–342.

Lewin, C., 1992. Chemotherapy in aquaculture : from theory to reality. Alderman, DJ., Michel, C., eds, Ch. Mechanisms of resistance development in aquatic organisms. Paris : Office International des Epizooties, pp. 288–301.

Lewin, C., Hastings, T., 1990. *In vitro* activities of oxolinic acid, ciprofloxacin and norfloxacin against *Aeromonas salmonicida*. J Fish Dis 13, 377–384.

Liang, Y., Simon, R., Denton, M., 1999. Utilization of a scientifically operated charge-coupled device detector for high-performance thin-layer chromatographic analysis of tetracyclines. Analyst 124 (11), 1577–1582.

Long, A., Hsieh, L., Malbrough, M., Short, C., Barker, S., 1990. Matrix solid phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline in catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue. J AOAC 73 (6), 864–867.

Lopez, J., Carballeira, A., 1990. A comparative study of pigment contents and response to stress in five species of aquatic bryophytes. Lindbergia 15, 188–193.

Lopez, J., Carballeira, A., 1993. Bioaccumulation and plant-water concentration ratios in five aquatic bryophytes. Hydrobiologia 263 (2), 95–107.

Lunestad, B., 1992. Chemotherapy in aquaculture : from theory to reality. Alderman, DJ., Michel, C., eds, Ch. Fate and effects of antibacterial agents in aquatic environments. Paris : Office International des Epizooties, pp. 152–161.

Lunestad, B., Hansen, P., Samuelsen, O., Ervik, A., 1993. Environmental effects of antibacterial agents from aquaculture. Dans : Haagsma N., Ruiter A., Czedik-Eysenberg P.B., eds. Conference on residues of veterinary drugs in food. Utrecht : Faculty of Veterinary Medecine.

Lunestad, B., Samuelsen, O., Fjelde, S., Ervik, A., 1995. Photostability of eight antibacterial agents in seawater. Aquaculture 134 (3-4), 217–225.

MacCormick, J., Fox, S., Smith, L., Bitler, B., Reichenthal, J., Origoni, V., 1957. Studies on the reversible epimerization occuring in the tetracycline family. the preparation, properties and proof of structure of some 4-epi-tetracyclines. J Am Chem Soc 79, 2849–2858.

MacCracken, A., Fidgeon, S., O'Brien, J., Anderson, D., 1976. An investigation of antibiotic and drug residues in fish. J Appl Bact 40, 61–66.

Maine, M., Duarte, M., Sune, N., 2001. Cadmium uptake by floating macrophytes. Water Res 35 (11), 2629–2634.

Mäkelä, T., Oikari, A., 1995. Pentachlorophenol accumulation in the freshwater mussels *Anodonta anatina* and *Pseudanodonta complanata*, and some physiological consequences of laboratory maintenance. Chemosphere 31 (7), 3651–3662.

Marking, L., Howe, G., Growther, J., 1988. Toxicity of erythromycin, oxytetracycline, and tetracycline administered to lake trout in water baths, by injection, or by feeding. Prog Fish Cult 50, 197–201.

Martens, R., Wetzstein, H., Zadrazil, F., Capelari, M., Hoffmann, P., Schmeer, N., 1996. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by wood-rotting fungi. Appl Environ Microb 62 (11), 4206–4209.

Martinez, E., Shimoda, W., 1988. Liquid chromatographic determination of tetracycline residues in animal feeds. J AOAC 71 (3), 477–480.

Martinsen, B., Horsberg, T., 1995. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin, and enrofloxacin, in atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater at 10 degrees C. Antimicrob Agents Ch 39 (5), 1059–1064.

Martinsen, B., Oppegaard, H., Wichstrom, R., Myhr, E., 1992. Temperature-dependent in vitro antimicrobial activity of four 4-quinolones and oxytetracycline against bacteria pathogenic to fish. Antimicrob Agents Ch 36 (8), 1738–1743.

Maruya, K., Risebrough, R., Horne, A., 1997. The bioaccumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by benthic invertebrates in an intertidal marsh. Environ Toxicol Chem 16 (6), 1087–1097.

McManus, P., Stockwell, V., 2001. Antibiotic use for plant disease management in the United States. Electronic references.
URL `http://www.planthealthprogress.org`

Meador, J., Adams, N., Casillas, E., Bolton, J., 1997. Comparative bioaccumulation of chlorinated hydrocarbons from sediment by two infaunal invertebrates. Arch Environ Con Tox 33, 388–400.

Mendoza-Diaz, G., Perez-Alonso, R., Moreno-Esparza, R., 1996. Stability constants of copper(II) mixed complexes with some 4-quinolone antibiotics and (N-N) donors. J Inorg Biochem 64 (3), 207–214.

Mersch, J., Reichard, M., 1998. In situ investigation of trace metal availability in industrial effluents using transplanted aquatic mosses. Arch Environ Con Tox 34, 336–342.

Metcalfe, J., Charlton, M., 1990. Freshwater mussels as biomonitors for organic industrial contaminants and pesticides in the St. Lawrence river. Sci Total Environ 97/98, 595–615.

Mevius, D., Breukink, H., Guelen, P., Jansen, T., De Greve, B., 1990. Pharmacokinetics, metabolism and renal clearance of flumequine in veal calves. J Vet Pharmacol Ther 13 (2), 159–169.

Michel, C., 1985. Problèmes théoriques et pratiques posés par l'antibiothérapie chez les poissons d'élevage. Le Point Vét 17, 333–341.

Midtvedt, T., Lingaas, E., 1992. Chemotherapy in aquaculture : from theory to reality. Alderman, DJ., Michel, C., eds, Ch. Putative public health risks of antibiotic resistance development in aquatic bacteria. Paris : Office International des Epizooties, pp. 302–314.

Migliore, L., Civitareale, C., Brambilla, G., di Delupis, G., 1997. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. Water Res 31 (7), 1801–1806.

Migliore, L., Cozzolino, S., Fiori, M., 2000. Phytotoxicity to and uptake of flumequine used in intensive aquaculture on the aquatic weed, *Lythrum salicaria* L. Chemosphere 40 (7), 741–750.

Mineo, H., Kaneko, S., Koizumi, I., Asida, K., Akahori, F., 1992. An analytical study of antibacterial residues in meat : the simultaneous determination of 23 antibiotics and 13 drugs using gas chromatography. Vet Hum Toxicol 34 (5), 393–397.

Miranda, C., Zemelman, R., 2002. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater chilean salmon farms. Sci Total Environ 293 (1-3), 207–218.

Miyazaki, T., Nakaushi, R., Kubota, S., 1984. Toxicological examinations of oxolinic acid and nalidixic acid in yellowtail. Bull Fac Fish Mie Univ 11, 15–26.

Montañés, J., Van Hattum, B., Deneer, J., 1995. Concentration of chlorpyrifos by the freshwater isopod *Asellus aquaticus* (L.) in outdoor experimental ditches. Environ Poll 88, 137–146.

Moutou, K., Braunbeck, T., Houlihan, D., 1997. Quantitative analysis of alterations in liver ultrastructure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after administration of the aquaculture antibacterials oxolinic acid and flumequine. Dis Aquat Org 29, 21–34.

Mulsow, S., Landrum, P., 1995. Bioaccumulation of DDT in a marine polychaete, the conveyor-belt deposit feeder *Heteromastus filiformis* (*claparede*). Chemosphere 31 (4), 3141–3152.

Murray, J., McGill, A., Hardy, R., 1987. Development of a method for the determination of oxytetracycline in trout. Food Addit Contam 5 (1), 77–83.

Naidong, W., Geelen, S., Roets, E., Hoogmartens, J., 1990. Assay and purity control of oxytetracycline and doxycycline by thin-layer chromatography – a comparison with liquid chromatography. J Pharmaceut Biomed 8 (8-12), 891–898.

Nebeker, A., Griffis, W., Wise, C., Hopkins, E., Barbitta, J., 1989. Survival, reproduction and bioconcentration in invertebrates and fish exposed to hexachlorobenzene. Environ Toxicol Chem 8, 601–611.

Neff, J., 1984. Bioaccumulation of organic micropolluants from sediments and suspended particulates by aquatic animals. Fresenius Z anal Chem 319, 132–136.

Nordlander, I., Johnsson, H., Osterdahl, B., 1987. Oxytetracycline residues in rainbow trout analysed by a rapid hplc method. Food Addit Contam 4 (3), 291–296.

Norpoth, K., Nehrkorn, A., Kirchner, M., Holsen, H., Teipel, H., 1973. Untersuchungen zur frage der löslichkeit und stabilität ovulationshemmender in wasser, abwässern und belkebtschlamm. Zbl Bakt Mikrobiol Hyg I Abt Orig 156, 500–511.

Nouws, J., Boon, J., Driessen, F., Menglers, M., Booms, G., Van Der Heijden, M., 1993. Residue depletion of oxytetracycline in european eel. Dans : Haagsma N., Ruiter A., Czedik-Eysenberg P.B., eds. Conference on residues of veterinary drugs in food. Utrecht : Faculty of Veterinary Medecine.

Nouws, J., Loeffen, G., Schouten, J., Van Egmond, H., Keukens, H., Stegeman, H., 1998. Testing of raw milk for tetracycline residues. J Dairy Sci 81 (9), 2341–2345.

Nouws, J., van Egmond, H., Loeffen, G., Schouten, J., Keukens, H., Smulders, I., Stegeman, H., 1999a. Suitability of the charm hvs and a microbiological multiplate system for detection of residues in raw milk at eu maximum residue levels. Vet Quart 21 (1), 21–27.

Nouws, J., van Egmond, H., Smulders, I., Loeffen, G., Schouten, J., Stegeman, H., 1999b. A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding eu maximum residue levels. International Dairy Journal 9 (2), 85–90.

Nygaard, K., Lunestad, B., Hektoen, H., Berge, J., Hormazabal, V., 1992. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. Aquaculture 104, 31–36.

Nzengung, V., Nkedi-Kizza, P., Jessup, R., Voudrias, E., 1997. Organic cosolvent effects on sorption kinetics of hydrophobic organic chemicals by organoclays. Environ Sci Technol 31 (5), 1470–1475.

OCDE, 1981. Adsorption/désorption. Ligne directrice 106 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques , 24.

OCDE, 1992. Biodégradabilité dans l'eau de mer. Ligne directrice 306 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques , 29.

Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, N., Uno, K., Yamada, M., Harada, K., Suzuki, M., 1987. Improvement of chemical analysis of antibiotics. XII. Simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey. J Chromatogr 400, 253–261.

Oka, H., Ito, Y., Matsumoto, H., 2000. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. J Chromatogr A 882 (1-2), 109–133.

Oka, H., Matsumoto, H., Uno, K., Harada, K., Kadowaki, S., Suzuki, M., 1985. Improvement of chemical analysis of antibiotics. VIII. Application of prepacked C18 cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver. J Chromatogr 325 (1), 265–274.

Oka, H., Uno, K., Harada, K., Suzuki, M., 1983. Evaluation of chemical analysis of antibiotics (2). use of a prepacked C-18 cartridge in extraction of tetracyclines. Yakugaku Zasshi 103 (5), 531–537.

Omer, A., Gad Kariem, E., Salama, R., 1981. Separation and semi-quantitative determination of tetracycline degradation products in tetracycline hydrochloride powders and capsules by thin-layer chromatography. J Chromatogr 205 (2), 486–489.

O'Reilly, A., Smith, P., 2001. Use of indirect conductimetry to establish predictive no effect concentrations of oxytetracycline and oxolinic acid in aquatic sediments. Aquaculture 196 (1-2), 13–26.

Oshima, Y., Kobayashi, K., Lumbanbatu, J., Ooie, K., Kawahara, Y., Imada, N., 1994. Effect of the drug-metabolizing enzyme activity induced by PCB on the duration of drugs in fish. Aquaculture 120, 25–31.

Ostapczuk, P., Burow, M., May, K., Mohl, C., Froning, M., Süß enbach, B., Waidmann, E., Emons, H., 1997. Mussels and algae as bioindicators for long-term tendencies of element pollution in marine ecosystems. Chemosphere 34 (9/10), 2049–2058.

Padilla, C., Vasquez, C., 1993. Plasmid-mediated antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from well water sediments and their transformation into *Escherichia coli*. Lett Appl Microbiol 27, 875–882.

Palmer, R., Kawai, K., Kusuda, R., 1992. *In vitro* activity of quinolone antibacterials against selected fish pathogens. Gyobyo Kenkyu 27, 131–142.

Pandey, S., Musarrat, J., 1993. Antibiotic resistant coliform bacteria in drinking water. J Environ Biol 14, 267–274.

Paterson, D., Mulazimoglu, L., Casellas, J., Ko, W., Goossens, H., Von Gottberg, A., Mohapatra, S., Trenholme, G., Klugman, K., *et al.*, M., 2000. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. Clin Infect Dis 30 (3), 473–478.

Pathak, S., Gautam, A., Gaur, A., Gopal, K., Ray, P., 1993. Incidence of transferable antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* in urban drinking water. J Environ Health Part A A28, 1445–1455.

Pedersen, T., Carlsen, B., 1991. Marking cod (*Gadus morhua* l.) juveniles with oxytetracycline incorporated into the feed. Fisheries Res 12, 57–64.

Pempkowiak, J., Kosakowska, A., 1998. Accumulation of cadmium by green algae *Chlorella vulgaris* in the presence of marine humic substances. Environ Int 24 (5/6), 583–588.

Pena, A., Carmona, A., Barbosa, A., Lino, C., Silveira, I., Castillo, B., 1998. Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection. J Pharmaceut Biomed 18, 839–845.

Pena, A. L. S., Lino, C. M., Silveira, I. N., 1999. Determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk by liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection. J AOAC Int 82, 55–60.

Peñuelas, J., 1984a. Pigment and morphological response to emersion and immersion of some aquatic and terrestrial mosses in NE Spain. J Bryol 13, 179–185.

Peñuelas, J., 1984b. Pigments of aquatic mosses of river Muga, NE Spain, and their response to water pollution. Lindbergia 13, 179–185.

Pergent, G., 1991. Les indicateurs écologiques de la qualité du milieu marin en Méditerranée. Oceanis : Toxicologie de l'environnement : effets biologiques des polluants utilises comme biomarqueurs des contaminations 18 (4), 341–350.

Peterson, S., Batley, G., Scammel, M., 1993. Tetracycline in antifouling paints. Mar Poll Bull 26, 96–100.

Pfenning, A., Munns, R., Turnipseed, S., Roybal, J., Holland, D., Long, A., Plakas, S., 1996. Determination and confirmation of identities of flumequine and nalidixic, oxolinic, and piromidic acids in salmon and shrimp. J AOAC Int 79 (5), 1227–1235.

Piddock, L., 1996. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medecine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy ? J Antimicrob Chemoth 38, 1–3.

Piddock, L., Johnson, M., Simjee, S., Pumbwe, L., 2002. Expression of efflux pump gene pmra in fluoroquinolone-resistant and -susceptible clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46 (3), 808–812.

Pinsuwan, S., Alvarez-Nùñez, F., Tabibi, E., Yalkowsky, S., 1999. Degradation kinetics of 4-dedimethylamino sancycline, a new anti-tumor agent, in aqueous solutions. Int J Pharm 181, 31–40.

Plakas, S., El Said, K., Musser, S., 2000. Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of flumequine in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture 187 (1-2), 1–14.

Poher, I., Blanc, G., 1998. Pharmacokinetics of a discontinuous absorption process of oxolinic acid in turbot, *Scophthalmus maximus*, after a single oral administration. Xenobiotica 28 (11), 1061–1073.

Poiger, T., Buser, H., Muller, M., 2001. Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake : pathway, field measurements, and mathematical modeling. Environ Toxicol Chem 20 (2), 256–263.

Porte, C., Albaigés, J., 1993. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans, and fishes. Arch Environ Con Tox 26, 273–281.

Pouliquen, H., Keita, D., Pinault, L., 1992. Determination of oxytetracycline in marine shellfish (*Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum* and *Scrobicularia plana*) by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. J Chromatogr 627 (1-2), 287–293.

Pouliquen, H., Le Bris, H., 1996. Sorption of oxolinic acid and oxytetracycline to marine sediments. Chemosphere 33 (5), 801–815.

Pouliquen, H., Le Bris, H., Buchet, V., Pinault, L., 1996. Comparative study on the contamination and decontamination of japanese oyster *Crassostrea gigas* and blue mussel *Mytilus edulis* by oxytetracycline and oxolinic acid. Mar Ecol Prog Ser 133, 143–148.

Pouliquen, H., Le Bris, H., Pinault, L., 1993. Experimental study of the decontamination kinetics of seawater polluted by oxytetracycline contained in effluent released from a fish-farm located in a salt-marsh. Aquaculture 112, 113–123.

Pouliquen, H., Le Bris, H., Pinault, L., 1994. HPLC determination of oxolinic acid and oxytetracycline in three types of marine sediments : analytical validation. Quim Anal 13 (1), 109–113.

Qiting, J., Xiheng, Z., 1988. Combination process of anaerobic digestion and ozonization technology for treating wastewater for antibiotics production. Water Treat 3, 285–291.

Rajendran, N., Tagore, J., Kasinathan, R., 1988. Heavy metal concentrations in oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston) of cuddalore backwaters, southeast coast of India. Indian J Mar Sci 17, 174–175.

Ramade, F., 1992. Précis décotoxicologie - le monitoring des polluants. Masson Paris , 173–215.

Rao, S., Dukta, B., Taylor, C., 1993. S.S. Rao (ed.), Particulate matter and aquatic contaminants. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA, Ch. Ecotoxicological implications of fluvial suspended particulates, pp. 157–167.

Rasmussen, B., Noller, H., Daubresse, G., Oliva, B., Misulovin, Z., Rothstein, D., Ellestad, G., Gluzman, Y., Tally, F., Chopra et, a., 1991. Molecular basis of tetracycline action : identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. Antimicrob Agents Ch 35 (11), 2306–2311.

Ravera, O., Riccardi, N., 1997. Biological monitoring with organisms accumulator of pollutants. Mar Chem 58, 313–318.

Reeders, H., de Vaate, A., 1992. Bioprocessing of polluted suspended matter from the water column by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). Hydrobiologia 239, 53–63.

Rice, D., Bianchi, T., Roper, E., 1986. Experimental studies of sediment reworking and growth of *Scolopos armiger* (*Orbiniidiae* : *Polychaeta*). Mar Ecol Prog Ser 30, 9–19.

Richter, G., 1993. Autotrophie des organismes végétaux. Dans : romandes, P. p. e. u. (Ed.), Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Lausanne, pp. 53–188.

Ridenhour, M., Fletcher, H., Mortensen, J., Daneo-Moore, L., 1996. A novel tetracycline-resistant determinant, *tet*(u), is encoded on the plasmid pKQ10 in *Enterococcus faecium*. Plasmid 35 (2), 71–80.

Roberts, M., 1996. Tetracycline resistance determinants : mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. FEMS Microbiol Rev 19 (1), 1–24.

Rodgers, C., Austin, B., 1983. Oxolinic acid for control of enteric redmouth disease in rainbow trout. Vet Rec 112 (4), 83.

Rogstad, A., Ellingsen, O., Syvertsen, C., 1993. Pharmacokinetics and bioavailability of flumequine and oxolinic acid after various routes of oral administration to atlantic salmon in seawater. Aquaculture 110, 207–220.

Rogstad, A., Hormazabal, V., Ellingsen, O., Rasmussen, K., 1991. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish. I. Absorption, distribution and accumulation in rainbow trout in freshwater. Aquaculture 96, 219–226.

Romvary, A., Simon, F., Acsné Kovavasics, L., Szakolczai, J., Szöke, I., 1991. Oxitetraciklinnel kezelt pontyok maradékanyag-vizsgalata (residues investigation in carps treated with oxytetracycline). Magyar Allatorvosok Lapja 46, 463–466.

Rosset, R., Caude, M., Jardy, A., 1991. Chromatographies en phases liquide et supercritique. Masson, Paris, Ch. XII. Chromatographie de paires d'ions., pp. 458–494.

Roy, S., Hänninen, O., 1995. Use of aquatic plants in ecotoxicology monitoring of organic pollutants : bioconcentration and biochemical responses,. Environ Toxicol 73, 97–109.

Roy, S., Sen, C., Hanninen, O., 1996. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons using 'moss bags' : bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in *Fontinalis antipyretica* Hedw. Chemosphere 32 (12), 2305–2315.

Salte, R., Liestol, K., 1983. Drug withdrawal from farmed fish. depletion of oxytetracycyline, sulfadiazine, and trimethophrim from muscular tissue of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Acta Vet Scand 24 (4), 418–430.

Salyers, A., Shoemaker, N., 1996. Resistance gene transfer in anaerobes : new insights, new problems. Clin Infect Dis 23 (1), S36–S43.

Samuelsen, O., Ervik, A., Pursell, L., Smith, P., 2000. Single-dose pharmacokinetic study of oxolinic acid and vetoquinol, an oxolinic acid ester, in atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater and in vitro antibacterial activity against *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 187 (3-4), 213–224.

Samuelsen, O., Lunestad, B., Husevag, B., Holleland, T., Ervik, A., 1992a. Residues of oxolinic acid in wild fauna following medication in fish farms. Dis Aquat Org 12, 111–119.

Samuelsen, O., Lunestad, B., Thorsen, B., Eriksen, V., Ervik, A., Solheim, E., 1993. Residues and effects of oxolinic acid in wild fauna following medication in fish farms. Dans : Haagsma N., Ruiter A., Czedik-Eysenberg P.B., eds. Conference on residues of veterinary drugs in food. Utrecht : Faculty of Veterinary Medecine.

Samuelsen, O., Torsvik, V., Ervik, A., 1992b. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance toward oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. Sci Total Environ 114, 25–36.

Sanchiz, C., Garcia-Carrascosa, A., Pastor, A., 2001. Relationships between sediment physico-chemical characteristics and heavy metal bioaccumulation in mediterranean soft-bottom macrophytes. Aquat Bot 69 (1), 63–73.

Sandaa, R., Torsvik, V., Goksoyr, J., 1992. Transferable drug resistance in bacteria from fish-farm sediments. Can J Microbiol 38, 1061–1065.

Scheytt, T., Heberer, T., Stan, H., 2000. Weigert, B., Steinberg, C., Brüggemann, R. (eds.), schriftenreihe wasserforschung e.V., vol 6 Chemische stressfaktoren in aquatischen systemen. Berlin, Ch. Vorkommen und verhalten von arzneimittelwirkstoffen im grundwasser. Schriftenreihe wasserforschung, pp. 13–22.

Schnappinger, D., Hillen, W., 1996. Tetracyclines : antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. Archives of Microbiology 165 (6), 359–369.

Schneider, I., Rubio, J., 1999. Sorption of heavy metal ions by the nonliving biomass of freshwater macrophytes. Environ Science Technol 33 (13), 2213–2217.

Schuytema, G., Krawczyk, D., Griffis, W., Nebeker, A., Robideaux, M., 1990. Hexachlorobenzene uptake by fathead minnows and macroinvertebrates in recirculating sediment/water systems. Arch Environ Con Tox 19, 1–9.

Scott, P., 1993. Aquaculture for veterinarians : fish husbandry and medecine. Pergamon Press Ldt, Oxford, England, Ch. Therapy in aquaculture, pp. 131–152.

Siebert, A., Bruns, I., Krauss, G., Miersch, J., Markert, B., 1996. The use of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metal. Sci Total Environ Vol 177, 137–144.

Snieszko, S., Friddle, S., Griffen, P., 1951. Successful treatment of ulcer disease in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) with terramycin. Science 113, 717–718.

Spanggaard, B., Jorgensen, F., Gram, L., Huss, H., 1993. Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark. Aquaculture 115, 195–207.

Speare, P., 1992. A technique for tetracycline injecting and tagging billfish. Bull Mar Sci 51, 197–203.

Speer, B., Shoemaker, N., Salyers, A., 1992. Bacterial resistance to tetracycline : mechanisms, transfer, and clinical significance. Clin Microbiol Rev 5 (4), 387–399.

Sposito, G., 1992. J. Buffle and H.P. van Leeuwen (eds.), Environmental particles. Vol. 1. Lewis Publishers Inc., Chelsea, Michigan, USA, Ch. Chracterization of particle size, pp. 291–314.

Stahl, E., 1969. Thin layer chromatography. A laboratory handbook. Springer-Verlag, Berlin.

Steffenak, I., Hormazabal, V., Yndestad, M., 1991. Reservoir of quinolone residues in fish. Food Addit Contam 8, 777–780.

Stewart, A., Malley, D., 1999. Effect of metal mixture (Cu, Zn, Pb, and Ni) on cadmium partitioning in littoral sediments and its accumulation by the freshwater macrophytes *Eriocaùlon septangulàre*. Environ Toxicol Chem 18 (3), 436–447.

Storey, A. W., Edward, D., 1989. The freshwater mussel, *Westralunio carteri* Iredale, as a biological monitor of organochlorine pesticides. Aust J Mar Freshwater Res 40, 587–593.

Stoskopf, M., 1988. Fish chemotherapeutics. Vet Clin North Amer Small Anim Pract 18, 331–348.

Szabo, A., Kovacs Nagy, M., Tomorkeny, E., 1978. Thin-layer chromatographic assay of tetracyclines. J Chromatogr A 151 (2), 256–258.

Szefer, P., Ikuta, K., Kushiyama, S., Szefer, K., Frelek, K., Geldon, J., 1997. Distribution and association of trace metals in soft tissue and byssus of *Mytilus edulis* from the east coast of Kyushu island, Japan. Arch Environ Con Tox 32, 184–190.

Tabak, H., Brunch, R., 1970. Steroid hormones as water pollutants I. Metabolism of natural and synthetic ovulation inhibiting hormones by micro-organisms of activated sludge and primary settled sludge. Develop Ind Microbiol 11, 367–376.

Takatsuki, K., 1991. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of oxolinic acid in fish using selected ion monitoring. J Chromatogr 538 (2), 259–267.

Takatsuki, K., 1992. Gas chromatographic–mass spectrometric determination of oxolinic, nalidixic, and piromidic acid in fish. J AOAC Int 75, 982–987.

Taylor, D., Chau, A., 1996. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. Antimicrob Agents Ch 40 (1), 1–5.

Ternes, T., 1998. Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. Water Res 32 (11), 3245–3260.

Thompson, R., Pick, E., Hall, F., Gwendy, E., 1999. Total Hg in water, sediment, and four species of aquatic macrophytes in the St. Lawrence river, near Cornwall, Ontario. J Great Lakes Res 25 (2), 294–304.

Thybaud, E., Caquet, T., 1991. Uptake and elimination of lindane by *Lymnaea palustris* (*Mollusca* : *Gastropoda*) : a pharmacokinetic approach. Ecotox Environ Safe 21, 365–376.

Tibbs, J., Elston, R., Dikey, R., Guarino, A., 1989. Studies on the accumulation of antibiotics in shellfish. Northwest Environ 5, 161–162.

Tjörnelund, J., Hansen, S., 1997. Use of metal complexation in non-aqueous capillary electrophoresis systems for the separation and improved detection of tetracyclines. J Chromatogr A 779 (1-2), 235–243.

Touraki, M., Rigas, P., Pergandas, P., Kastritsis, C., 1995. Determination of oxytetracycline in the live fish feed *Artemia* using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. J Chromatogr B 663, 167–171.

Tsuji, K., Robertson, J., 1973. Formation of trimethylsilyl derivatives of tetracyclines for separation and quantitation by gas-liquid chromatography. Anal Chem 45 (12), 2136–2140.

Turel, I., 2002. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. Coordin Chem Rev 232 (1-2), 27–47.

Ueda, T., Sadakane, S., Yamaoka, K., Nakagawa, M., Ishida, M., 1988. Bioaccumulation and metabolic fate of pyrazolate and its hydrolysates in guppies and short-necked clams. J Pestic Sci 13, 85–92.

Ueno, R., Aoki, T., 1995. A simplified determination of oxytetracycline in serum and muscle of cultured eel by high-performance liquid chromatography. Fish Pathol 30 (3), 239–240.

Ueno, R., Horiguchi, Y., Kubota, S., 1988a. Levels of oxolinic acid in cultured yellowtail after oral administration. Nippon Suisan Gakk 54, 479–484.

Ueno, R., Okumura, M., Horiguchi, Y., Kubota, S., 1988b. Levels of oxolinic acid in cultured rainbow trout and amaggo salmon after oral administration. Nippon Suisan Gakk 54, 485–489.

Ueno, R., Uno, K., Kubota, S., Horiguchi, Y., 1989. Determination of oxytetracycline in fish tissues by high performance liquid chromatography. Nippon Suisan Gakk 55 (7), 1273–1276.

Uno, S., Shiraishi, H., Hatakeyama, S., Otsuki, A., 1997. Uptake and depuration kinetics and BCFs of several pesticides in three species of shellfish (*Corbicula leana*, *Corbicula japonica*, and *Cipangopludina chinensis*) : comparison between field and laboratory experiment. Aquat Toxicol 39, 23–43.

Vanier, C., Planas, D., Sylvestre, M., 1999. Empirical relationships between polychlorinated biphenyls in sediments and submerged rooted macrophytes. Can J Fisheries Aquat Sci 56 (10), 1792–1800.

Vasquez, M., Lopez, J., Carballeira, A., 1999. Modification of the sequential elution technique for the extraction of heavy metals from bryophytes. Sci Total Environ 241 (1-3), 53–62.

Vaughan, S., Coyne, R., Smith, P., 1996. The critical importance of sample site in the determination of the frequency of oxytetracycline resistance in the effluent microflora of a fresh water fish farm. Aquaculture 139 (1-2), 47–54.

Vincent, C., Lawlor, A., Tipping, E., 2001. Accumulation of Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd and Pb by the bryophyte *Scapania undulata* in three upland waters of different pH. Environ Poll 114 (1), 93–100.

Vree, T., van Ewijk-Beneken Kolmer, E., Nouws, J., 1992. Direct-gradient high-performance liquid chromatographic analysis and preliminary pharmacokinetics of flumequine and flumequine acyl glucuronide in humans : effect of probenecid. J Chromatogr 579 (1), 131–141.

Walsh, J., Walker, L., Webber, J., 1992. Determination of tetracyclines in bovine and porcine muscle by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. J Chromatogr 596 (2), 211–216.

Wang, W., Lewis, M., 1997. Metal accumulation by aquatic macrophytes. CRC Lewis Publishers Boca Raton NY , Chap 13.

Wattel-Koekkoek, E., van Genuchten, P., Buurman, P., van Lagen, B., 2001. Amount and composition of clay-associated soil organic matter in a range of kaolinitic and smectitic soils. Geoderma 99 (1-2), 27–49.

Weigel, L., Anderson, G., Tenover, F., 2002. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Ch 46 (8), 2582–2587.

Weis, P., Weis, J., Couch, J., 1993. Histopathology and bioaccumulation in oysters *Crassostrea virginica* living on wood preserved with chromated copper arsenate. Dis Aquat Organ 17, 41–46.

West, C., Ankley, G., Nichols, J., Elonen, G., Nessa, D., 1997. Toxicity and bioaccumulation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in long-term tests with the freshwater benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Lumbricus variegatus*. Environ Toxicol Chem 16 (6), 1287–1294.

Winckler, C., Grafe, R., 2000. Characterisation and utilisation of waters from intensive animal production with regard to soil. Texte 44/00, Umweltbundesamt, Berlin.

Witte, W., 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora : Environment. Int J Antimicrob Ag 14 (4), 321–325.

Witte, W., Klare, I., 1995. Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* outside hospitals : a commentary. Microb Drug Resist 1 (3), 259–263.

Wollenberger, L., Halling-Sorensen, B., Kusk, K., 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. Chemosphere 40 (7), 723–730.

Wölwer-Rieck, U., Blankvoort, E., Haagsma, N., Büning-Pfaue, H., 1993. Residues of quinolones in fish and the effect of cooking on the residues in the fish. Dans : Haagsma N., Ruiter A., Czedik-Eysenberg P.B., eds. Conference on residues of veterinary drugs in food. Utrecht : Faculty of Veterinary Medecine.

Yamamoto, I., Nishimura, K., Suzuki, T., Tagaki, K., Yamada, H., Kondo, K., Murayama, M., 1997. Accumulation, transformation, and elimination of bis(tri-n-butyltin) oxide in red sea bream, *Pagrus major*, under laboratory conditions. J Agr Food Chem 45 (4), 1437–1446.

Zapata, M., 1988. Estimación de clorofila a y sus productos de alteración. Problemática metodológica y su aplicación a sistemes sedimentarios marinos .

Zhou, J., Rowland, S., Mantoura, R., Braven, J., 1994. The formation of humic coatings on mineral particles under simulated estuarine conditions - a mechanistic study. Water Res 28, 571–579.

Zhou, Q., Maurice, P., Cabaniss, S., 2001. Size fractionation upon adsorption of fulvic acid on goethite : equilibrium and kinetic studies. Geochim Cosmochim Ac 65 (5), 803–812.

Zuccato, E., Bagnatir, R., Fioretti, F., Natangeleo, M., Calamari, D., Fanelli, R., 2001. Kümmerer, K. (eds.), Parmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and

risks. Springer, Heidelberg, Ch. Environmental loads and detection of pharmaceuticals in Italy.

Annexes

Annexe A : Démarche qualité

Une démarche qualité doit garantir la qualité et la véracité du travail effectué par une traçabilité des résultats (figure 60). De plus, elle facilite la rédaction des publications et des différents documents. La qualité n'a pas ralenti le travail ou restreint la démarche scientifique, mais au contraire a permis de dégager rapidement des grands axes d'expérimentation, d'organiser le travail et d'évaluer des échéances.

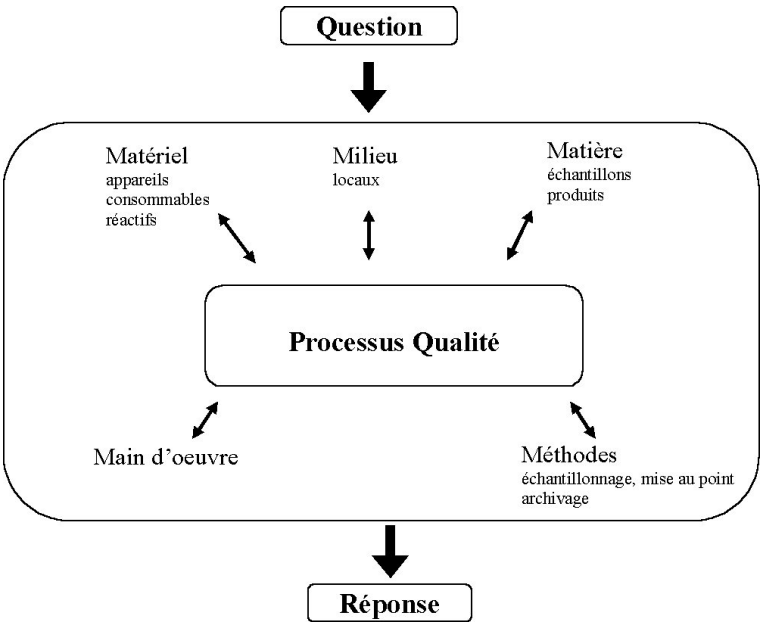


FIG. 60 – *Schéma d'intégration de la qualité dans une étude.*

Une ébauche de manuel qualité a été réalisée. Elle comprend des procédures relatives aux appareils, à la métrologie et à la gestion des produits et des consommables.

Du fait de la séparation géographique des laboratoires de l'UMR, la gestion des produits et des consommables a été informatisée. Une base de données « en ligne » sur

internet a nécessité la mise en place d'un serveur internet, d'un logiciel de gestion de base de données ainsi que la création d'une interface utilisateur simple et conviviale.

Un serveur internet Apache fonctionnant sous Linux a été mis en place (`http ://umrcae.vet-nantes.fr/BDD`, à l'ENVN en intranet). Le logiciel MySQL a également été installé ainsi que php3, langage permettant de piloter la base de données depuis internet. Il est à noter que tous ces logiciels sont gratuits et sous licence GPL[6].

[6]GPL (GNU General Public License) : logiciels libres. Les licences publiques générales garantissent la liberté de distribuer des copies des logiciels libres (et de facturer ce service), de recevoir les codes sources, de pouvoir modifier les logiciels ou en utiliser des éléments dans de nouveaux programmes libres. Les logiciels libres ne sont pas obligatoirement gratuits.

Annexe B : Rappels de cinetique

Les réactions de photodégradation, d'hydrolyse et de biodégradation de l'acide oxolinique, de la fluméquine et de l'oxytétracycline semblent être d'ordre 1 (Pinsuwan *et al.*, 1999; Ingerslev *et al.*, 2001). Si A est l'antibiotique et P son produit de dégradation, alors une cinétique d'ordre 1 peut s'écrire :

$$A \longrightarrow P$$

Si a est la concentration initiale en A ($a = [A]_0$) et que x est la quantité de A transformée au temps t ($x = \triangle[A]_t$) alors

$$[A]_t = (a - x) \ et \ [P]_t = x$$

La cinétique de dégradation peut alors s'écrire

$$-\frac{d(a-x)}{dt} = \frac{dx}{dt} = k_1(a-x) \tag{1}$$

d'où

$$\frac{dx}{(a-x)} = k_1 dt \tag{2}$$

En intégrant, on obtient

$$\int \frac{dx}{(a-x)} = k_1 \int dt \Rightarrow -\ln(a-x) = k_1 t + cte \tag{3}$$

à $t = 0$, $x = 0$ donc $cte = -\ln a$.

On obtient donc

$$\ln a - \ln(a-x) = \ln(\frac{a}{a-x}) = k_1 t \tag{4}$$

d'où

$$(a-x) = a\exp(-k_1 t) \tag{5}$$

Le temps de demi-vie est le temps pour lequel $x = \frac{1}{2}\ a$ donc $\frac{a}{a-x} = 2$ d'où

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k_1} \tag{6}$$

Annexe C : Méthode de dosage de l'aniline dans l'eau

1 Réactifs

Le méthanol provient de Carlo Erba (Milan, Italie) et l'acide perchlorique à 70 % de Prolabo (Paris, France). L'aniline et la benzylamine proviennent de Sigma (Saint Louis, MO, Etats Unis).

2 Appareillages

Le chromatographe (Waters Alliance 2690, Waters, Milford, MA, Etats Unis) contient une pompe permettant un gradient de solvant. La séparation est réalisée sur une cartouche Uptisphere HDO 50×2,1 mm et une précartouche 10×2,1 mm de porosités 3 μm (Interchim, Montluçon, France). La détection est assurée par un spectromètre de masse Quattro LC (Micromass, Manchester, Angleterre) équipé d'une interface de type electrospray.

3 Conditions chromatographiques

La phase mobile est composée d'acide acétique (1 % dans l'eau) et de méthanol. Le gradient de phase mobile est de celui indiqué dans le tableau 49.

Le débit est de 0,25 mL/min et 10 μL sont injectés.

Les conditions opératoires du spectromètre de masse ont été optimisées comme suit :

Tension de capillaire	3,50 kV	LM Res 1	15,0
Extracteur	16 nm	HM Res 1	15,0
Lentille radiofréquence	0,15	IEnergy 1	0,1
Température de la source	130 °C	Entrée	25
Température de désolvatation	350 °C	Dwell	0,4 sec
LM Res 2	15,0	Sortie	25
IEnergy 2	3,0	HM Res 2	15,0
		Multiplicateur	700

Transition	Collision (eV)	Tension de Cône (V)
94>77	20	30
94>51	30	30
108>91	10	10
108>65	30	10

TAB. 49 – *Gradient de solvant utilisé lors de la méthode de dosage de l'aniline dans l'eau.*

Temps (min)	Acide Acétique (%)	Méthanol (%)
0	99	1
3	99	1
8	50	50
10	99	1
20	99	1

4 Préparation des échantillons

Les échantillons d'eau sont acidifiés par 6 μL/mL d'acide perchlorique. De la benzylamine est ajoutée à la concentration de 500 ng/mL comme standard interne afin de s'affranchir des variations d'ionisation.

Dans ces conditions, 50 ng/mL d'aniline sont détectés et quantifiés dans l'eau douce et la méthode est linéaire de 50 ng/mL à 1 μg/mL.

Les chromatogrammes obtenus sont représentés figures 61 et 62.

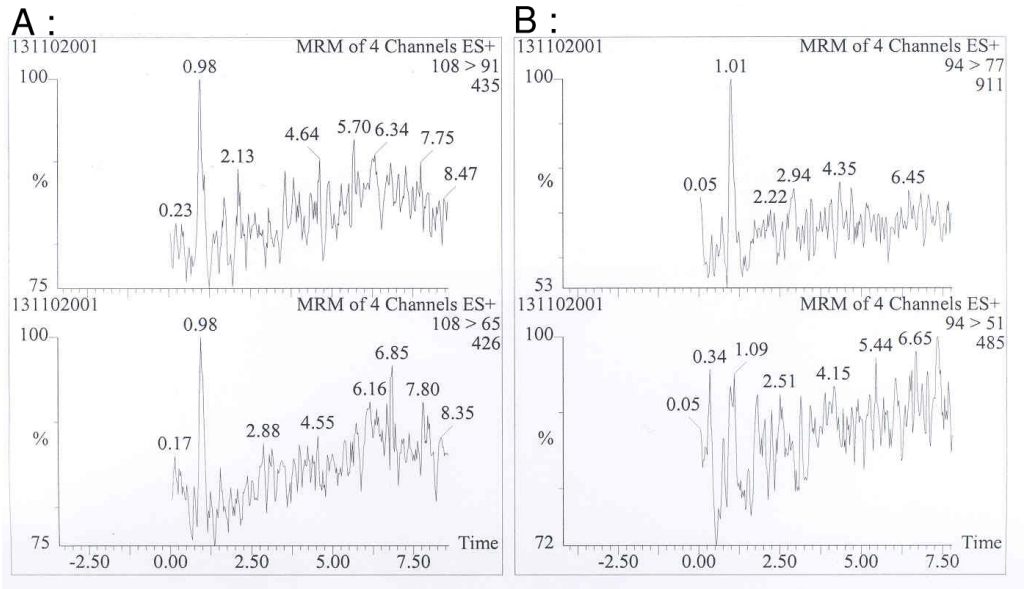


FIG. 61 – *Chromatogrammes d'un échantillon d'eau ne contenant ni d'aniline ni de benzylamine.*

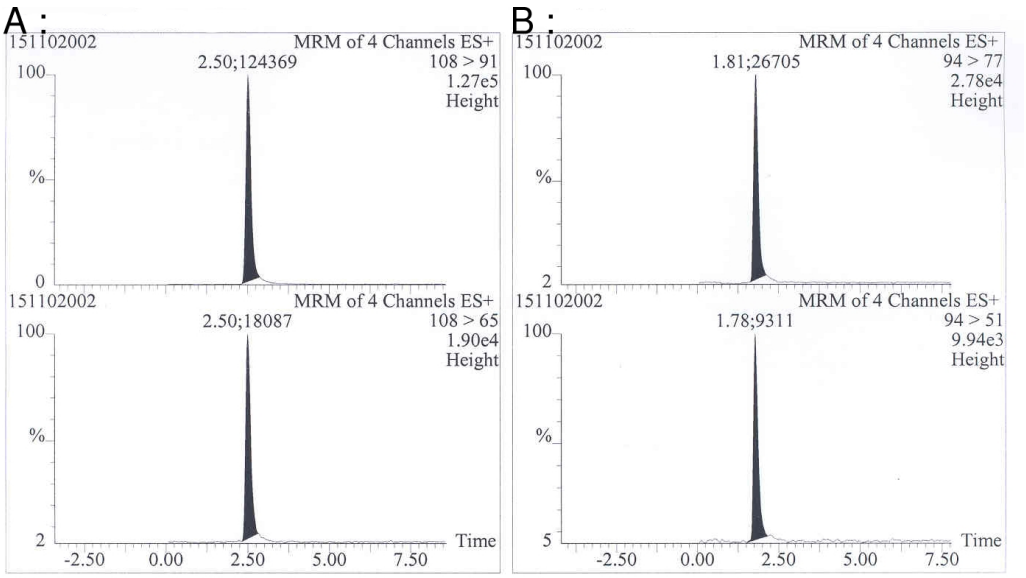


FIG. 62 – *Chromatogrammes d'un échantillon d'eau contenant 200 ng/mL d'aniline (B) et 500 ng/mL de benzylamine (A).*

Annexe D : Physiologie des macrophytes

Fontinalis antipyretica étant le bioaccumulateur choisi *a priori* pour cette étude, il convient de rappeler quelques notions de physiologie végétale.

1 Photosynthèse

La photosynthèse est un processus complexe au cours duquel les plantes contenant de la chlorophylle synthétisent de la matière organique à partir de dioxyde de carbone et d'eau.

$$6CO_2 + 12H_2O \xrightarrow[Chlorophylle]{Lumière} C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + 6O_2 \tag{7}$$

Cette réaction est endergonique ($\triangle G_m^o = +\ 2872\ kJ.mole^{-1}\ hexose$).

La chlorophylle a pour rôle de transformer l'énergie électromagnétique des photons en énergie chimique.

Si les éléments structurels cellulaires sont altérés ou si des parties importantes en sont retirées (par exemple des pigments), ils perdent alors leur activité biochimique. Il y a donc une étroite interdépendance entre structure et fonction.

Des complexes pigments–protéines peuvent être isolés des cellules photosynthétiquement actives. Ils sont liés à des structures particulières, les thylakoïdes. Les thylakoïdes des macrophytes sont des systèmes de membrane arrangés à l'intérieur des chloroplastes (organes de la photosynthèse de type grana chez les macrophytes). Les pigments sont en général synthétisés pendant la néogénèse des thylakoïdes par invagination de la membrane cytoplasmique. Dans de nombreux cas cette synthèse ne dépend ni de l'intensité, ni de la durée d'éclairement. Tous les pigments de la photosynthèse se retrouvent rassemblés dans les chloroplastes. En temps qu'espaces de réaction autonomes, les organelles sont sépa-

rées du cytosol par une double membrane. Elles contiennent une substance fondamentale nommée stroma dans laquelle les thylakoïdes sont enrobés.

2 Pigments photosynthétiques

Chez les macrophytes seules deux familles de pigments sont présentes : les caroténoïdes et les chlorophylles.

2.1 Caroténoïdes

Les pigments jaunes à rouges du groupe des caroténoïdes sont constitués d'une longue chaîne aliphatique formée de 8 unités d'isoprène contenant 40 atomes de carbone (figure 63). Ces pigments insolubles dans l'eau et très lipophiles sont divisés en carotènes (chaînes aliphatiques insaturées) et xanthophylles (dérivés oxygénés des premiers).

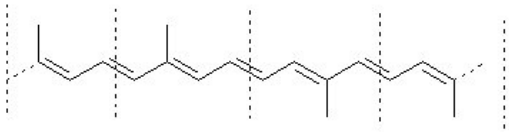


FIG. 63 – *Structure d'un caroténoïde.*

2.2 Chlorophylles

Les chlorophylles sont, dans le cas des macrophytes, les pigments les plus importants de la photosynthèse. La chaîne phytol leur confère un caractère hydrophobe et le cycle cyclopentanone leur confère un caractère hydrophile (figure 64). Elles fluorescent en absorbant de la lumière bleue et en émettant 30 % de l'intensité absorbée en lumière rouge. De plus la chlorophylle perd toute fluorescence en solution colloïdale. Cette fluorescence *in vivo* provient de complexes avec des protéines.

En présence d'un acide il y a déplacement de la couleur vers le vert olive et brun. Il y a alors formation par hydrolyse de phéophytine, le dérivé de la chlorophylle dépourvu de magnésium.

3 Réactions lumineuses

Pour assurer une efficacité optimale à la lumière visible, il faut au moins deux réactions photochimiques. Il existe deux systèmes photosynthétiques en synergie composés des

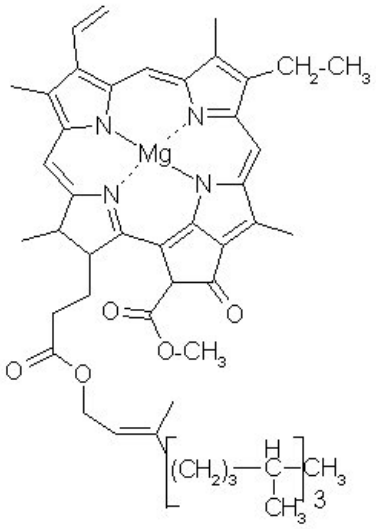


FIG. 64 – *Structure de la chlorophylle a. La phéophytine a correspond à la même structure sans l'atome de magnésium.*

pigments primaires et des pigments accessoires.

Les deux réactions lumineuses sont photodépendantes. Les photosystèmes I et II sont composés de protéines associées à des pigments. Chaque photosystème est constitué d'une antenne collectrice et d'un centre réactionnel, également appelé complexe central. L'énergie du rayonnement absorbé est transférée de l'antenne vers le centre réactionnel où elle excite si fortement une forme spécifique de chlorophylle a qu'un électron riche en énergie est émis et transféré à un accepteur primaire voisin : la phéophytine. De là, l'électron passe dans une chaîne de transport d'électrons et sert finalement à la formation d'un équivalent stable de réduction sous forme de NADPH+H^+ (figure 65). Une partie des catalyseurs rédox sont assemblés au sein d'un autre complexe membranaire nommé complexe cytochrome b_6/f. Des catalyseurs rédox sont mobiles et assurent le transfert directionnel des électrons d'un complexe à l'autre jusqu'au $NADP^+$. L'énergie rédox libérée permet aux protons de traverser la membrane du thylakoïde. Le gradient transmembranaire créé est à la base de la production d'un "équivalent d'énergie" sous forme d'ATP par le complexe CF_1/CF_0 (ou complexe ATP-synthétase)(figure 66).

3.1 Photosystème II et seconde réaction lumineuse

Le photosystème II est à la source du flux photosynthétique des électrons. Il est formé d'un système collecteur de lumière (antenne collectrice) et d'un complexe central portant un centre réactionnel, accompagné d'un complexe d'oxydation de l'eau.

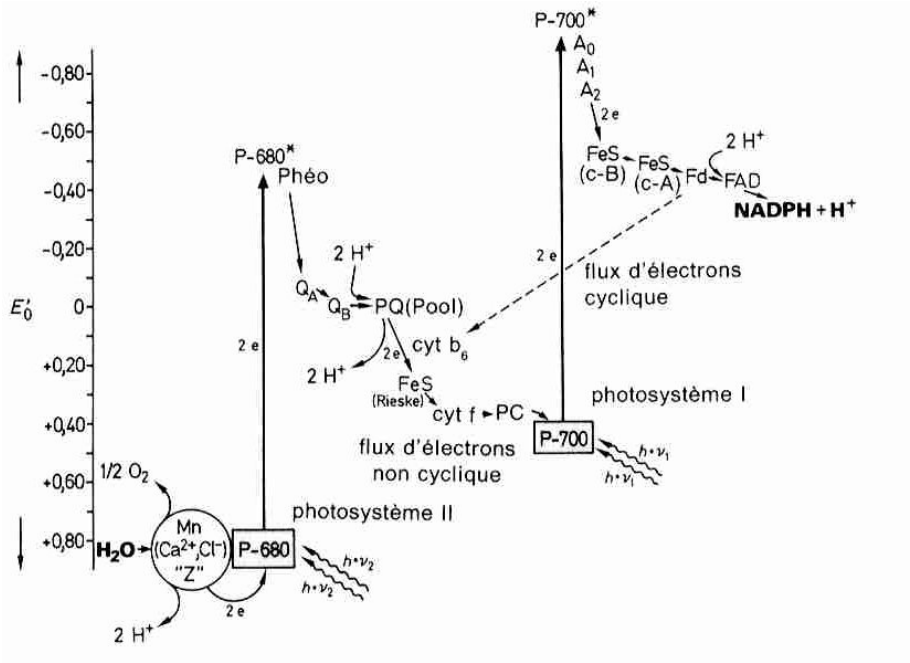


FIG. 65 – *Schéma en zigzag du transport photosynthétique des électrons, de l'eau au NADP ; les systèmes rédox sont ordonnés selon leur potentiel.*
cyt cytochrome ; Fd ferrédoxine ; FeS centre fer-soufre ; PQ plastaquinone ; PC plastocyanine ; Phéo phéophytine ; c-A centre A ; c-B centre B.

C'est le complexe de liaison des chlorophylles-a,b-protéines, le LHCP II[7] qui domine le système de l'antenne collectrice avec un tiers des protéines membranaires et la moitié de la chlorophylle. Le LHCP est constitué de quatre complexes chlorophylles-protéines différents : LHCP IIa-d, le LHCP IIb étant le plus important. Le centre réactionnel photochimique du complexe central du photosystème II est formé par le pigment 680 (P680), une forme de chlorophylle a, lié à deux polypeptides intégrés à la membrane, D1 et D2.

Puis, viennent en second lieu d'autres molécules de chlorophylle a, deux molécules de phéophytine a, une molécule de β-carotène ainsi que deux molécules de plastoquinone Q_A et Q_B.

[7]light harvesting chlorophyll-a,b-protein complex

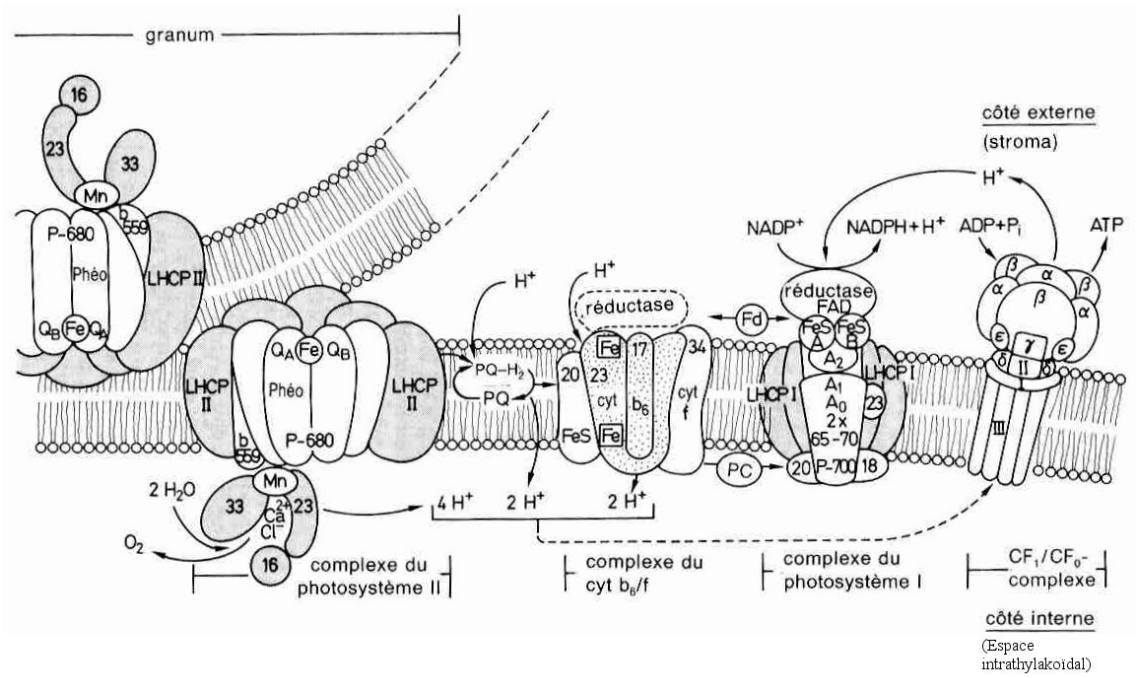


FIG. 66 – *Modèle représentant la structure de la membrane thylakoïdale, avec les éléments participant au transport photosynthétique des électrons, les complexes membranaires, y compris les systèmes rédox (d'après Richter (1993)).*

3.2 Photosystème I et première réaction lumineuse

Le système collecteur de lumière du photosystème I devrait travailler comme celui du photosystème II d'après le principe suivant : absorption des radiations, transmission à la chlorophylle a photochimiquement active (P-700) du centre réactionnel du photosystème I. A l'état fondamental, P-700 a un potentiel de +0,46 V, à l'état excité de –0,9 V au moins. Il est donc si faible qu'un électron riche en énergie peut être transmis à un récepteur d'électrons adéquat.

Annexe E : Espèces de végétaux et types de sédiment prélevés sur l'Elorn

Tab. 50 – *Végétaux prélevés sur l'Elorn.*

Station	Octobre 2000	Février 2001	Mai 2001	Août 2001
M3DR	*Hyocomium armoricum*	*Hyocomium armoricum*	*Hyocomium armoricum*	*Hyocomium armoricum*
M2DR	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*
M1DR	*Callitriche hamulata*	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*	*Hyocomium armoricum*
VBDR	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*	*Hyocomium armoricum*	*Hyocomium armoricum*
V0DR	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*
V1DR	*Callitriche hamulata*	*Ranunculus penicillatus*	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*
V1BDR	*Callitriche hamulata*	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*	*Hyocomium armoricum*
V2DR	*Callitriche hamulata*	*Leptodictyum riparium*	*Leptodictyum riparium*	*Fontinalis squamosa*
V3DR	*Hyocomium armoricum*	*Ranunculus penicillatus*	*Fontinalis antipyretica*	*Hyocomium armoricum*
M2LY	*Hyocomium armoricum*	*Leptodictyum riparium*	*Fontinalis antipyretica*	*Hyocomium armoricum*
M1LY	*Ranunculus penicillatus*	*Ranunculus penicillatus*	*Fontinalis antipyretica*	*Hyocomium armoricum*
V1LY	*Leptodictyum riparium*	*Leptodictyum riparium*	*Ranunculus penicillatus*	*Leptodictyum riparium*
V2LY	*Ranunculus penicillatus*	*Ranunculus penicillatus*	*Ranunculus penicillatus*	*Fontinalis antipyretica*
M1PM	*Fontinalis antipyretica*	*Ranunculus penicillatus*	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*
V1PM	*Ranunculus penicillatus*	*Leptodictyum riparium*	*Leptodictyum riparium*	*Leptodictyum riparium*
V2PM	*Fontinalis antipyretica*	*Hyocomium armoricum*	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*
M1PZ	*Callitriche hamulata*	—	*Fontinalis Squamosa*	*Ranunculus penicillatus*
V1PZ	*Leptodictyum riparium*	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*
V2PZ	*Fontinalis antipyretica*	*Leptodictyum riparium*	*Leptodictyum riparium*	*Fontinalis antipyretica*
M1LI	*Ranunculus penicillatus*	*Leptodictyum riparium*	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*
V1LI	*Ranunculus penicillatus*	—	*Ranunculus penicillatus*	*Fontinalis antipyretica*
V2LI	*Callitriche hamulata*	—	*Ranunculus penicillatus*	*Fontinalis antipyretica*
PX	*Fontinalis squamosa*	—	*Fontinalis Squamosa*	*Fontinalis antipyretica*
RM	*Hyocomium armoricum*	*Leptodictyum riparium*	*Fontinalis antipyretica*	*Fontinalis antipyretica*
MLD	*Ranunculus penicillatus*	—	—	*Fontinalis antipyretica*

Tab. 51 – *Sédiments prélevés sur l'Elorn.*

Station	Octobre 2000	Février 2001	Mai 2001	Août 2001
M3DR	Sable	Sable	Sable	Sable
M2DR	Sable	Vase	Sable	Sable
M1DR	Vase sableuse	Vase sableuse	Sable	Vase sableuse
VBDR	Sable	Vase sableuse	Vase sableuse	Vase sableuse
V0DR	Vase sableuse	Vase sableuse	Vase sableuse	Sable
V1DR	Vase	Sable	Sable	Vase sableuse
V1BDR	Vase sableuse	Vase	Vase sableuse	Vase sableuse
V2DR	Vase sableuse	Sable	Sable	Sable
V3DR	Vase sableuse	Vase sableuse	Vase sableuse	Sable
M2LY	Sable	Sable	Vase sableuse	Vase sableuse
M1LY	Vase sableuse	Sable	Vase sableuse	Vase sableuse
V1LY	Vase sableuse	Vase sableuse	Sable	Vase
V2LY	Vase sableuse	Vase	Sable	Sable
M1PM	Sable	Sable	Vase sableuse	Vase sableuse
V1PM	Sable	Vase	Vase sableuse	Vase
V2PM	Vase sableuse	Vase sableuse	Vase sableuse	Vase sableuse
M1PZ	Vase	—	Vase	Vase
V1PZ	Sable	Vase	Vase	Vase
V2PZ	Vase	—	Vase	Sable
M1LI	Vase sableuse	—	Vase sableuse	Sable
V1LI	Vase sableuse	—	Vase sableuse	Sable
V2LI	Sable	—	Vase sableuse	Vase sableuse
PX	Vase	—	Vase	Sable
RM	Vase	Vase	Vase sableuse	Vase sableuse
MLD	Vase	—	Vase	Vase

Annexe F : Analyse en composantes principales et analyse des correspondances multiples

L'analyse en composantes principales est une méthode factorielle car la réduction du nombre des caractères ne se fait pas par une simple sélection de certains d'entre eux, mais par la construction de nouveaux caractères synthétiques obtenus en combinant les caractères initiaux au moyen des « facteurs ». C'est une méthode linéaire car il s'agit de combinaisons linéaires.

La spécificité de l'analyse en composantes principales est qu'elle traite exclusivement de caractères numériques jouant tous le même rôle. L'utilisation des notions de combinaison linéaire, de distance, de projection conduit alors à raisonner selon le modèle suivant : on considère que les individus et les caractères sont des éléments de 2 espaces vectoriels euclidiens à p et n dimensions respectivements. Les outils mathématiques utilisés sont donc ceux de l'algèbre linéaire et du calcul matriciel.

L'analyse factorielle des correspondances a pour but l'étude des tableaux de contigences pour faire ressortir les traits principaux des dépendances entre facteurs. Cette analyse s'effectue sur des variables qualitatives. Les tableaux de contingence sont transformés en profils de lignes (proportion de chaque caractère par rapport à l'ensemble de l'effectif de ce caractère). Les distances entre chaque ligne sont ensuite pondérées par l'effectif de chaque caractère, cette distance est appelée distance du χ^2. On réalise enfin une analyse en composantes principales de ce tableau.

La représentation graphique usuelle favorise une interprétation aisée des résultats.

Chaque axe représente une partie de l'inertie[8] du nuage de points représentée par le tableau de distances du χ^2. A condition qu'ils soient bien représentés sur le graphique (voir les cosinus carrés), on peut interpréter la proximité entre deux modalités d'un même caractère comme étant une similitude de profil (distance du χ^2 faible).

Pour interpréter correctement les graphiques, il faut tenir compte, d'une part de la proximité entre points et plans principaux, d'autre part du rôle joué par chaque point dans la détermination d'un axe. Les données étant qualitatives, on n'utilise pas les corrélations entre caractères et axes principaux mais les contributions.

[8]L'inertie d'un nuage de points est la moyenne des carrés des distances des points au centre de gravité, c'est-à-dire l'origine. Cette quantité caractéristique du nuage mesure d'une certaine manière l'éloignement des points par rapport à leur centre de gravité, c'est-à-dire la dispersion globale du nuage

Annexe G : Liste des publications

1 Publications parues

- **Delépée R**, Maume D, Le Bizec B, Pouliquen H. Prelimiray assays to elucidate the structure of oxytetracycline's degradation products in sediments. Determination of natural tetracyclines by high-performance liquid chromatography-fast atom bombardment mass spectrometry. J Chromatogr B 748 (2) (2000) 369-381.
- **Delépée R**, Pouliquen H. Determination of oxolinic acid in the bryophyte *Fontinalis antipyretica* by liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr B 775 (1) (2002) 89-95.
- **Delépée R**, Pouliquen H. Ion-paired solid phase extraction as a sample preparation strategy for the high performance chromatographic determination of oxytetracycline in the bryophyte *Fontinalis antipyretica*. Anal Chim Acta 475 (1-3) (2003) 117-123.
- **Delépée R**, Pouliquen H, Le Bris H. The freshwater moss *Fontinalis antipyretica* bioaccumulates oxolinic acid. Rev Med Vet (2002) 679-680.
- **Delépée R**, Pouliquen H, Le Bris H. *Fontinalis antipyretica* bioaccumulates oxytetracycline, flumequine and oxolinic acid in the freshwater environment. Sci Total Environ *Accpetée pour publication.*

2 Communication orale

- **Delépée R**. Etude du devenir dans l'environnement dulçaquicole de l'acide oxolinique et de l'oxytétracycline, antibactériens à usage piscicole. Journée des doctorants, Nantes 2001.

3 Communications affichées

- **Delépée R**, Gaillard S, Pouliquen H, Le Bris H. The freshwater moss *Fontinalis antipyretica* bioaccumulates oxolinic acid. Bordeaux Aquaculture, Bordeaux 2001.
- **Delépée R**, Pouliquen H, Le Bris H. Le bryophyte Fontinalis antipyretica : un végétal utile pour l'étude de la contamination de l'environnement dulçaquicole en acide oxolinique, fluméquine et oxytétracycline. Journée des doctorants, Nantes 2002.
- **Delépée R**, Pouliquen H, Le Bris H. Environmental spatio-temporal monitoring of oxolinic acid, flumequine and oxytetracycline in a coastal river. Bordeaux Aquaculture, Bordeaux 2002.

Devenir dans l'environnement dulçaquicole de l'oxytéracycline, l'acide oxolinique et la fluméquine, antibiotiques utilisés en thérapeutique piscicole

Sur les 10500 t d'antibiotiques consommés en Europe chaque année, la moitié sont à usage vétérinaire. Ceux utilisés en pisciculture dulçaquicole sont généralement administrés aux poissons via un aliment distribué directement dans les bassins d'élevage. Leur devenir et leurs effets dans l'environnement aquatique notamment pour l'acide oxolinique (AO), la fluméquine (FLU) et l'oxytétracycline (OTC) suscitent donc un intérêt grandissant.

L'objectif de cette thèse est d'étudier le devenir de ces trois antibiotiques dans l'eau, les sédiments et les bryophytes dulçaquicoles. La démarche a été de mettre au point et de valider des méthodes de dosage originales, sensibles, fidèles et précises dans les sédiments et les bryophytes afin de réaliser des études expérimentales finalement validées sur le terrain.

Les études de stabilité dans l'eau indiquent que l'AO et la FLU ne sont pas sensibles aux phénomènes d'hydrolyse et de biodégradation et sont peu sensibles à la lumière alors que l'OTC est biodégradable, photosensible et hydrolysable.

Une approche intégrant les caractéristiques physico-chimiques sédimentaires met en évidence l'influence de la fraction organique et de la nature minérale de la fraction argileuse des sédiments sur les phénomènes d'adsorption, de désorption et de dégradation de ces antibiotiques.

Expérimentalement, *Fontinalis antipyretica* s'est révélé être un excellent bioaccumulateur des trois antibiotiques. Des études sur l'Elorn (Finistère, France) montrent son intérêt comme espèce sentinelle, notamment pour l'OTC. Des concentrations élevées en FLU, OTC et plus faibles en AO sont relevées à la fois dans les bryophytes et les sédiments. L'utilisation de mousses transférées a prouvé que cette contamination de l'environnement ne provient pas seulement des piscicultures.

La stabilité et les concentrations des trois antibiotiques dans l'environnement dulçaquicole posent donc de réelles interrogations quant au risque écotoxicologique qu'ils représentent.

Mots-clés : écotoxicologie, antibiotiques, acide oxolinique, fluméquine oxytétracycline, sédiments, eau, bryophytes.

Fate in the freshwater environment of oxytetracycline, oxolinic acid and flumequine, antibiotics used in fish farming

About half of the 10500 t of antibiotics consumed per year in Europe are used in veterinary medicine. In fish farming, they are usually administered to fish directly in the water as medicated feed. The fate and effects of antibiotics, and particularly oxolinic acid (OA), flumequine (FLU) and oxytetracycline (OTC), in the freshwater environment is causing increasing concern.

The aim of this thesis is to study the fate of these antibiotics in the water, sediments and bryophytes of freshwater. The way to reach this goal was to develop original and reliable analytical methods in sediments and bryophytes which could then be used in experimental studies validated through field work.

Stability studies in water showed that OA and FLU were not hydrolysed or biodegraded, but were slowly photodegraded, whereas OTC was biodegraded, hydrolysed and photodegraded.

The physico-chemical properties of sediments were integrated in a study that showed the importance of organic matter, but also mineral composition of clays on antibiotics adsorption, desorption and degradation.

Fontinalis antipyretica was found to be a good bioaccumulator of these three antibiotics. Field studies showed the interest of this moss in environmental monitoring, particularly for OTC. High concentrations for OTC, FLU and lower for OA were found in both bryophytes and sediments. The use of moss-bags revealed that environmental contamination was not only due to fish farms.

The question of ecotoxicological risk is posed by the stability and the concentrations of OA, FLU and OTC in the freshwater environment.

Keywords : ecotoxicology, antibiotics, oxolinic acid, flumequine, oxytetracycline, sediments, water, bryophytes.