



**HAL**  
open science

# Les médicaments dans les eaux : présence et impact écotoxicologique. Exemple de trois molécules : ibuprofène, carbamazépine et ethinyl-estradiol

Olivier Bazard

## ► To cite this version:

Olivier Bazard. Les médicaments dans les eaux : présence et impact écotoxicologique. Exemple de trois molécules : ibuprofène, carbamazépine et ethinyl-estradiol. Sciences pharmaceutiques. 2011. hal-01739057

**HAL Id: hal-01739057**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01739057>**

Submitted on 20 Mar 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 1**

**2011**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement

Le vendredi 1<sup>er</sup> Avril 2011

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par **Olivier BAZARD**

né le 20 Novembre 1985 à Nancy (54)

---

**LES MEDICAMENTS DANS LES EAUX : PRESENCE ET  
IMPACT ECOTOXICOLOGIQUE.  
EXEMPLE DE TROIS MOLECULES : IBUPROFENE,  
CARBAMAZEPINE ET ETHINYL-ESTRADIOL**

---

**Membres du Jury**

Président :	M. Jean-Claude BLOCK	Professeur
Juges :	M. Dominique DECOLIN	Maître de conférences
	Mme Patricia GUIRLINGER	Docteur en pharmacie
	Mme Isabelle HASSLER	Docteur en pharmacie

**UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2010-2011**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Bertrand RIHN

**Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Mobilité ERASMUS et Communication**

Francine KEDZIEREWICZ

**Hygiène Sécurité**

Laurent DIEZ

**Responsable de la filière Officine :**

Francine PAULUS

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD,  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement :  
Pharmaceutique Hospitalier**

Jean-Michel SIMON

**DOYEN HONORAIRE**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES  
HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANT HONORAIRE**

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

## ENSEIGNANTS

### PROFESSEURS

Gilles AULAGNER .....	Pharmacie clinique
Alain BAGREL .....	Biochimie
Jean-Claude BLOCK .....	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE .....	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL .....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER .....	Microbiologie environnementale
Max HENRY .....	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU .....	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE .....	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR .....	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER .....	Biochimie
Pierre LEROY .....	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT .....	Pharmacie galénique
Alain MARSURA .....	Chimie thérapeutique
Patrick MENU .....	Physiologie
Jean-Louis MERLIN .....	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS .....	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN .....	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON .....	Economie de la santé, législation pharmaceutique

### MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS .....	Parasitologie
Mariette BEAUD .....	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT .....	Communication et santé
Isabelle BERTRAND .....	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN .....	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX .....	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER .....	Chimie Physique
Cédric BOURA .....	Physiologie
Igor CLAROT .....	Chimie analytique
Joël COULON .....	Biochimie
Sébastien DADE .....	Bio-informatique
Dominique DECOLIN .....	Chimie analytique
Roudayna DIAB .....	Nanotechnologies pharmaceutiques
Béatrice DEMORE .....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU .....	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY .....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS .....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL .....	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE .....	Hématologie - Génie Biologique
Adil FAIZ .....	Biophysique-acoustique
Luc FERRARI .....	Toxicologie
Caroline GAUCHER DI STASIO .....	Expertise biopharmacologique
Stéphane GIBAUD .....	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT .....	Chimie organique

Frédéric JORAND .....	Santé et environnement
Olivier JOUBERT .....	Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ .....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT .....	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI .....	Hématologie biologique
Christophe MERLIN .....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU .....	Pharmacognosie
Maxime MOURER .....	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS .....	Informatique
Christine PERDICAKIS .....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO .....	Pharmacologie
Virginie PICHON .....	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER .....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY .....	Santé publique
Gabriel TROCKLE .....	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER .....	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIYOU .....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI .....	Pharmacie galénique

### **ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES**

Marie SOCHA.....	Pharmacie clinique
Julien PERRIN .....	Hématologie

### **PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER .....	Sémiologie
--------------------------	------------

### **PROFESSEUR AGREGE**

Christophe COCHAUD .....	Anglais
--------------------------	---------

### **Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois (Pharmacie - Odontologie)**

Anne-Pascale PARRET.....	Directeur
--------------------------	-----------

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je** jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

**D'** honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que** les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que** je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».



**A mon Président et Directeur de thèse,**

**Monsieur Jean Claude BLOCK,**

Professeur en microbiologie, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement

Pour l'honneur que vous me faites en dirigeant et en présidant cette thèse, pour votre disponibilité et vos précieux conseils, pour votre soutien ainsi que votre patience. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

**A mes juges,**

**Monsieur Dominique DECOLIN,**

Maître de conférences en chimie analytique à la faculté de pharmacie de Nancy

Merci pour ta disponibilité ainsi que pour la bonne ambiance que tu apportes lors des travaux dirigés. Tu as accepté de juger cette thèse avec la spontanéité et la sympathie que je te connais, j'en suis profondément touché.

**Madame Patricia GUIRLINGER,**

Docteur en Pharmacie et maître de stage

Je tiens à vous remercier de m'avoir accueilli dans votre officine lors de mes différents stages et pour m'avoir formé au métier de pharmacien. Ainsi que pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger cette thèse.

**Madame Isabelle HASSLER,**

Docteur en Pharmacie, C.H. Ravenel

Merci pour tes conseils, ta gentillesse et ta bonne humeur dont j'ai pu profiter pendant mon stage de 5<sup>ème</sup> année. C'est en discutant tous les deux qu'est venue l'idée de ce sujet de thèse, je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

# Remerciements

A ...

Ma famille :

Mes parents, merci pour votre gentillesse, votre soutien et l'amour que vous m'apportez !

Mes frères et sœur, pour toutes les singeries faites et celles qu'il reste à faire...

Ma fiancée, pour tous les moments de bonheur que l'on vit ensemble

Aux papis et mamies, pour votre gentillesse

Toute ma famille, de Dompaigne, Bar-le-Duc, Toulouse et ailleurs

Ma future belle-famille, de Toul comme de Tours, pour m'avoir accepté malgré toutes les blagues que je peux raconter !

Mes amis :

François et Séb, potes de longue date

Mitch, Peter et Bobman, les délires dès la première année !

Charlotte, chef binôme, maître dans l'optimisation du temps en T.D. !

Bat', Pierre, Arnaud et Stéphane, le gang des bosseurs du groupe 1

Les zumpatisch Brüder, Bambou, Gourou et Nixou, amis bikers

Boulette et Maxou, Clem et Mat, Les grecs, Lisa, Lucile, Yannick et Roulo, Souad et Doudou, Justine-sa-copine et Nico, Coralie, amis de la fac

L'équipe de la pharmacie Lambinet : Martine, Agnès, Sabrina, Bastien et Bryan pour votre accueil chaleureux

L'équipe de la pharmacie Hommell : Constance et Jean-Jacques, Magalie, Solange, Christine, Mariane, Alex, Isa, Arnaud et Germain pour votre sympathie

L'équipe de la pharmacie du C.H. Ravenel : Le chef, Isa, Nozah, Anne-so, Le p'tit, Dédé, Martine, Armelle, Gérard pour les bons souvenirs

# SOMMAIRE

1. Introduction .....	1
2. Sources et voies d'accès dans l'environnement .....	4
3. Trois molécules étudiées .....	7
3.1. Indications .....	7
3.2. Pharmacocinétique .....	8
3.2.1. L'ibuprofène.....	8
a. Absorption .....	8
b. Distribution.....	8
c. Métabolisation .....	8
d. Elimination .....	8
3.2.2. La carbamazépine.....	9
a. Absorption .....	9
b. Distribution.....	9
c. Métabolisation .....	9
d. Elimination .....	9
3.2.3. L'éthinyl-estradiol.....	9
a. Absorption .....	9
b. Distribution.....	9
c. Métabolisation .....	9
d. Elimination .....	10
3.3. Caractéristiques physico-chimiques .....	10
3.3.1. Le numéro CAS.....	10
3.3.2. La solubilité.....	10
3.3.3. Le pKa.....	10
3.3.4. Le LogK <sub>ow</sub> .....	12
3.3.5. La constante de Henry .....	12
4. Méthodes analytiques .....	13
4.1. L'extraction .....	13
4.2. Techniques d'analyse proprement dites .....	16
5. Concentrations dans l'environnement des trois molécules étudiées .....	17
5.1. Les eaux usées .....	17
5.2. Les eaux de surface .....	20

5.3. Les eaux souterraines .....	22
5.4. L'eau potable.....	22
5.5. Les sédiments .....	22
6. Devenir et dégradation dans l'environnement .....	23
6.1. Devenir et dégradation dans l'eau .....	24
6.1.1. L'ibuprofène.....	24
6.1.2. La carbamazépine.....	25
6.1.3. L'éthinyl-estradiol.....	26
6.2. Devenir et dégradation dans les sols .....	26
6.2.1. L'ibuprofène.....	26
6.2.2. La carbamazépine.....	27
6.2.3. L'éthinyl-estradiol.....	27
7. Toxicité et impact environnemental de l'ibuprofène, la carbamazépine et l'éthinyl-estradiol sur la faune aquatique.....	28
7.1. Toxicité aiguë.....	29
7.2. Toxicité subchronique .....	35
7.3. Toxicité chronique.....	39
7.4. Particularité de l'éthinyl-estradiol sur les espèces aquatiques .....	44
8. Conclusion.....	46
9. Bibliographie.....	48
10. Annexes.....	55

## TABLE DES FIGURES

Figure 1.1 : Nombre de publications obtenu lors de la recherche "PPCPs dans l'eau" en novembre 2010 dans la base de données SCOPUS.....	2
Figure 1.2 : Relation dose-effet pour les antibiotiques (D'après Davies <i>et al.</i> , 2006).....	3
Figure 4.1 : Illustration des principales étapes d'une extraction liquide/solide sur cartouche (Jones-Lepp, 2009).....	14
Figure 4.2 : Formation du « polymère modèle » par technique MIP (Jones-Lepp, 2009).....	15
Figure 5.1 : Concentrations d'ibuprofène relevées dans les eaux .....	18
Figure 5.2 : Concentrations de carbamazépine relevées dans les eaux .....	18
Figure 5.3 : Concentrations d'éthinyl-estradiol relevées dans les eaux .....	18
Figure 6.1 : Spectre d'absorption de la carbamazépine entre 200 et 500 nm (Tusneda <i>et al.</i> , 2002).....	25
Figure 7.1 : Effets de l'ibuprofène sur l'activité des COX des moules (Gagné <i>et al.</i> , 2005)....	32
Figure 7.2 : Effets de la carbamazépine sur l'activité immunitaire des hémocytes issus de <i>E. complanata</i> (Gagné <i>et al.</i> , 2006).....	32
Figure 7.3 : Peroxydation lipidique des hépatocytes après exposition à la carbamazépine pendant 48 heures pour des concentrations situées entre 0 et 1 mM (Gagné <i>et al.</i> , 2006b) .....	33
Figure 7.4 : Nombre d'Hydra à chaque "score de morphologie" et taux d'ingestion pour différentes concentrations d'ibuprofène et de carbamazépine. C : témoin, CS : témoin avec solvant (Quinn <i>et al.</i> , 2008b).....	35
Figure 7.5 : Nombre de descendants en relation avec la taille du corps de la mère <i>Daphnia pulex</i> dans une solution de carbamazépine à 1 µg/L (Lurling <i>et al.</i> , 2006) .....	36
Figure 7.6 : Taux de croissance de la population (barres noires) et âge de première reproduction de <i>Daphnia pulex</i> (barres grises) en présence de carbamazépine à différentes concentrations (Lurling <i>et al.</i> , 2006).....	37
Figure 7.7 : Nombre de vers <i>Lumbriculus variegatus</i> au 28 <sup>e</sup> jour d'exposition à la carbamazépine (C : témoin) (Oetken <i>et al.</i> , 2005) .....	38
Figure 7.8 : Photographies de biofilms exposés pendant huit semaines à la carbamazépine (B) et à l'ibuprofène (C) ; A : témoin (Lawrence <i>et al.</i> , 2005) .....	40
Figure 7.9 : Résultats obtenus après analyses des photographies illustrant les effets des composés médicamenteux sur les biofilms : (A) volume pour chaque composant, (B) épaisseur du biofilm, (C) répartition de chaque composant (Lawrence <i>et al.</i> , 2005) .....	41
Figure 7.10 : Taux de cellules vivantes par rapport aux cellules mortes dans les biofilms (Lawrence <i>et al.</i> , 2005) .....	41
Figure 7.11 : Résultats de l'analyse par méthode FISH renseignant sur la composition des biofilms (Lawrence <i>et al.</i> , 2005) .....	42

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Consommation des médicaments au cours des dernières années en France (Comptes nationaux de la santé, 2007) .....	1
Tableau 1.2 : Évolution de la consommation de médicaments en France (hors hôpital), en nombre d'unités (source : GERS) .....	2
Tableau 2.1 : Pourcentage d'élimination des composés pharmaceutiques sélectionnés dans les stations d'épuration.....	5
Tableau 3.1 : Caractéristiques physico-chimiques des trois molécules sélectionnées.....	11
Tableau 5.1 : Comparaison entre PEC et moyennes des concentrations observées des annexes 1, 2 et 3.....	20
Tableau 5.2 : Consommation d'éthinyl-estradiol en mg/femme/an dans quatre pays Européens .....	20
Tableau 6.1 : Demi-vie des trois médicaments dans l'environnement .....	23
Tableau 7.1 : Classification des toxiques selon la Directive 93/67/EEC .....	29
Tableau 7.2 : Observation des effets toxiques aigus de l'ibuprofène et de la carbamazépine sur cinq espèces aquatiques.....	30
Tableau 7.3 : LC <sub>50</sub> de l'ibuprofène et de la carbamazépine sur trois espèces aquatiques.....	30
Tableau 7.4 : Métabolisme oxydatif produit par les hépatocytes de truite en présence d'ibuprofène et de carbamazépine pendant 60 minutes (Gagné et al., 2006b) .....	33
Tableau 7.5 : Score et observation de la toxicité des médicaments sur <i>Hydra attenuata</i> (Quinn et al., 2008b).....	34
Tableau 7.6 : Expériences et résultats lors d'une exposition subchronique à la carbamazépine .....	36
Tableau 7.7 : Développement de <i>Chironomus riparius</i> après 28 jours d'exposition à la carbamazépine (Oetken et al., 2005).....	38
Tableau 7.8 : CMEQ de <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Pimephales promelas</i> et <i>Oryzias latipes</i> exposés à l'EE2 .....	44

# 1. Introduction

La problématique environnementale concernant les médicaments est liée au fait qu'ils sont développés pour avoir des effets sur le vivant et qu'ils sont rejetés même en faible quantité dans l'environnement. En effet ces molécules sont nécessairement absorbables, hydrosolubles ou liposolubles et plus ou moins persistantes dans l'organisme afin de produire un effet (Halling-Sorensen *et al.*, 1998). Elles peuvent être éliminées via les urines à plus de 80 % sans transformation (Dorosz, 2008). Ainsi plusieurs questions se posent quant à un possible impact environnemental sur la faune et la flore.

Les médicaments sont regroupés sous le sigle PPCPs (ou Pharmaceuticals and Personal Care Products). Ce sigle se réfère à tout produit utilisé par les particuliers pour la santé, pour des raisons cosmétiques ou par l'agro-industrie pour stimuler la croissance ou la santé du bétail. Les PPCPs comprennent une collection variée de milliers de substances chimiques, y compris les médicaments sur ordonnance et en vente libre.

Parmi ces produits, les médicaments constituent un groupe important et diversifié de composés organiques utilisés en grande quantité à travers le monde (Kummerer, 2001). Dans les pays développés, la consommation de médicaments progresse chaque année au moins depuis 1980 (Tableaux 1.1 et 1.2). La diminution du nombre d'unités consommées enregistrée en France entre 2005 et 2009 (Tableau 1.2) s'explique par l'arrivée sur le marché des conditionnements trimestriels suite au décret d'application du JO paru le 16 décembre 2004.

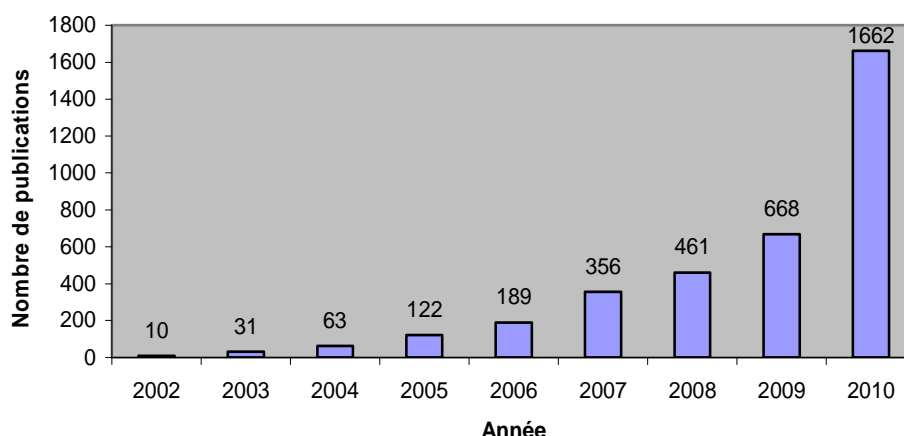
**Tableau 1.1 : Consommation des médicaments au cours des dernières années en France (Comptes nationaux de la santé, 2007)**

Année	Consommation de médicaments en M€ (hors hospitaliers)	Consommation par personne et par an (en €)
1980	5 136	95
1985	9 787	177
1990	14 654	258
1995	19 258	331
2000	25 069	414
2005	31 463	500
2006	31 942	504

**Tableau 1.2 : Évolution de la consommation de médicaments en France (hors hôpital), en nombre d'unités (source : GERS)**

Année	Nombre d'unités (millions)
1990	2712
1995	1959
2000	3010
2005	3125
2009	3023

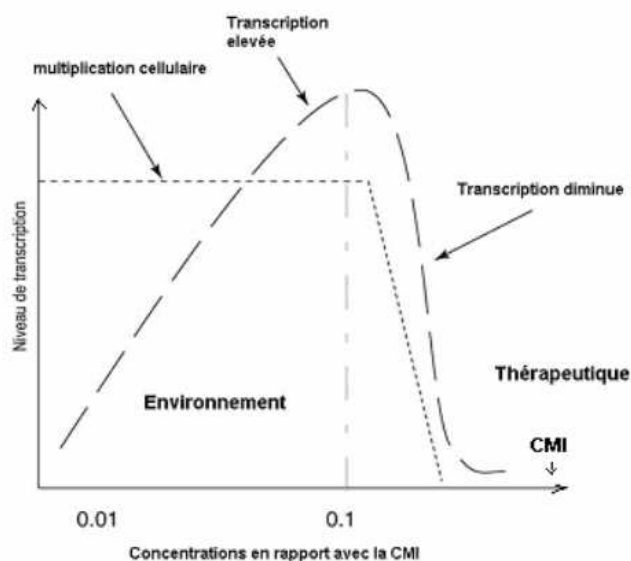
Le sujet des PPCPs dans l'eau est largement étudié depuis quelques années comme le prouve un nombre croissant de publications (Figure 1.1). La plupart des analyses réalisées dans des pays européens rapportent des concentrations variables d'une étude à l'autre pour des molécules identiques. Ces différences se justifient par des prescriptions différentes selon les pays ou régions, des structures de réseaux d'égouts différentes et du choix parmi les méthodes analytiques.



**Figure 1.1 : Nombre de publications obtenu lors de la recherche "PPCPs dans l'eau" en novembre 2010 dans la base de données SCOPUS**

Les concentrations des PPCPs relevées dans l'environnement sont bien plus faibles que celles dictées par la posologie usuelle. Ce n'est que ces dix dernières années que la communauté scientifique s'est penchée sur les effets des antibiotiques en concentrations sub-thérapeutiques. Il est apparu que de nombreuses molécules antibiotiques présentent un effet hormétique, à savoir un effet inhibiteur à concentration thérapeutique et un effet stimulateur pour des concentrations inférieures à la concentration minimale inhibitrice ou CMI (Figure 1.2). Ces effets stimulateurs sont variables d'une molécule à l'autre (Davies *et al.*, 2006).





**Figure 1.2 : Relation dose-effet pour les antibiotiques (D'après Davies *et al.*, 2006)**

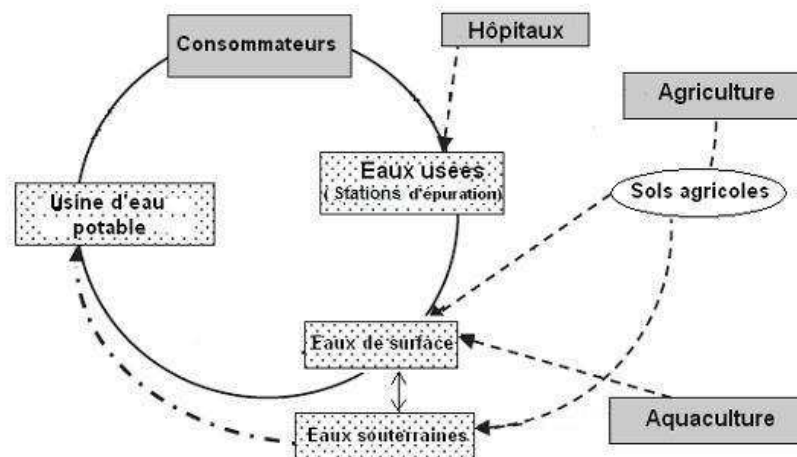
A titre d'exemple, des oestrogènes retrouvés dans l'eau ont un effet sur la faune aquatique et en particulier les poissons de rivières qui montrent des perturbations du développement sexuel, de la croissance et de la reproduction (Schulte-Oehlmann *et al.*, 2004 ; Carlsson *et al.*, 2006). Ceci exige des données pertinentes sur l'exposition et les effets sur les organismes vivants aquatiques.

Trois molécules chimiquement différentes ont été retenues pour la réalisation de ce travail : **l'ibuprofène**, anti-inflammatoire disponible sans ordonnance sur conseil du pharmacien mais également présent sur de nombreuses prescriptions médicales ; **la carbamazépine**, médicament très rencontré sur les ordonnances, de nombreuses publications communiquent sur cette molécule dans les eaux ; et **l'éthinyl-estradiol**, actuellement toutes les pilules oestroprogestatives commercialisées utilisent comme oestrogène l'éthinyl-estradiol à des doses variant de 15 µg à 50 µg par comprimé.

Après avoir décrit les sources et les voies d'accès des médicaments dans l'environnement, ce travail présente les détails concernant la pharmacocinétique et les caractéristiques physico-chimiques de ces trois molécules retenues. Puis nous avons cherché des réponses à quatre questions : quelles sont les concentrations dans l'environnement de ces trois molécules sélectionnées ? Quel est leur devenir dans l'environnement ? Quelles sont les dégradations possibles ? Et enfin quelle est la toxicité de ces trois molécules sur la faune et la flore aquatique ?

## 2. Sources et voies d'accès dans l'environnement

Les quatre sources des médicaments ou leurs métabolites dans l'environnement sont indiquées dans la Figure 2.1 (cases grises). Les rejets directs dans les eaux lors de la fabrication par les industries sont considérés comme négligeables étant donné que l'objectif du fabricant est évidemment d'en perdre le moins possible. L'aquaculture entraîne des rejets directement dans les eaux de surface. Dans les exploitations agricoles, les animaux excrètent des médicaments via leurs urines et selles. Ces excréments répandus sur le sol contaminent les eaux de surface et les eaux souterraines par ruissellement à la suite de pluies. Mais les médicaments peuvent aussi se retrouver sur le sol lors du traitement des cultures (Boxall *et al.*, 2003). La voie principale d'accès dans l'environnement se fait par les eaux du réseau urbain lors d'un usage domestique des médicaments ou par les hôpitaux. A la suite d'un traitement, un médicament est éliminé dans les urines ou dans les selles comme un mélange de molécules non modifiées, métabolisées par hydroxylation ou déméthylation et conjuguées par transfert d'un groupement sur la molécule. Ce mélange passe par les eaux usées circulant dans les égouts pour rejoindre les stations d'épuration. De plus, 35 % des médicaments non consommés qui ne sont pas remis au pharmacien afin de suivre la voie de destruction par « cyclamed » sont éliminés dans les toilettes ou les lavabos par le consommateur (Bound *et al.*, 2006) et rejoignent les eaux usées.



**Figure 2.1 : Sources et devenir des résidus médicamenteux dans l'eau (adapté de Ellis, 2006)**

Les eaux usées sont acheminées aux stations d'épuration de la commune. L'élimination des composés pharmaceutiques dépend des installations des stations

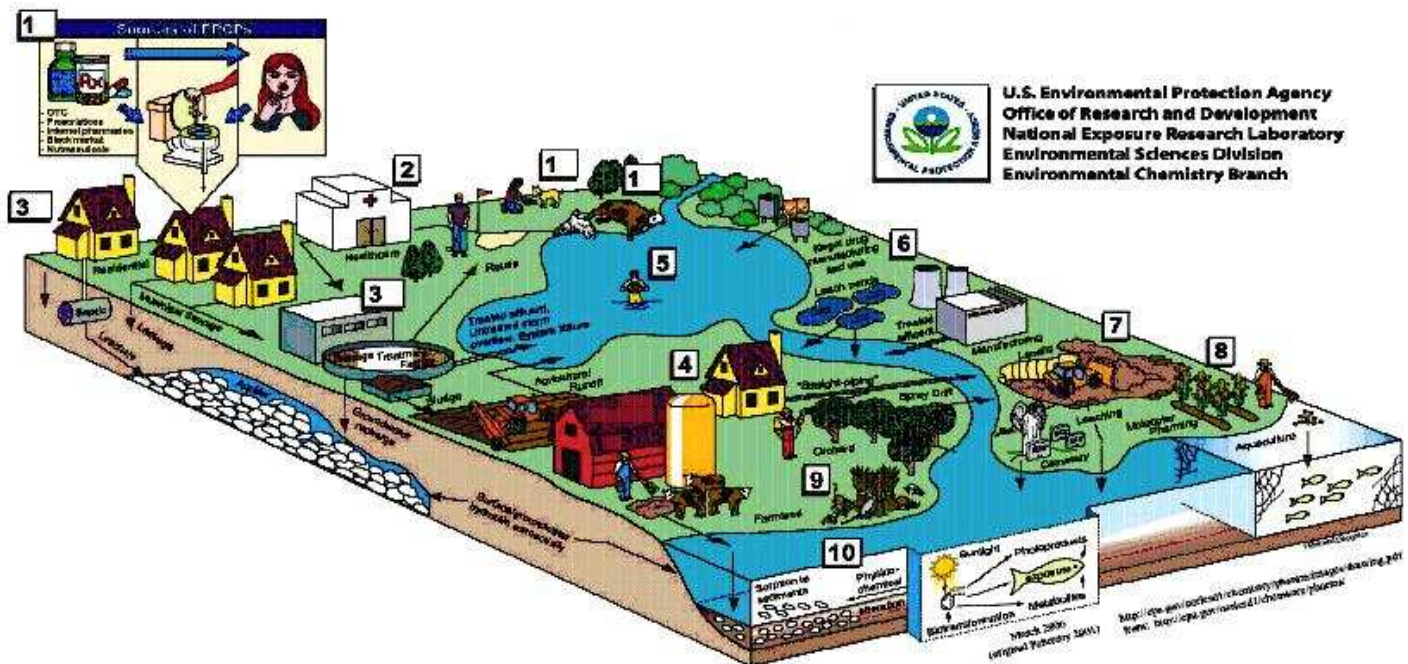
d'épuration. Par exemple entre 14 et 44 % de l'ibuprofène est éliminé lors de la filtration biologique des eaux usées (Tableau 2.1), alors qu'avec le procédé des boues activées l'élimination se situe entre 80 et 100 % (Kanda *et al.*, 2003). Le devenir de certains composés pharmaceutiques dans les procédés de traitement des eaux urbaines a été examiné dans le projet européen POSEIDON (2001-2004). Il s'agit d'un programme de recherches mené par le CIRSEE (Centre International de Recherche Sur l'Eau et l'Environnement) concernant l'évaluation des technologies de traitement des composés pharmaceutiques et produits d'hygiène dans les eaux usées et potables, car plusieurs facteurs entrent en jeu dans l'efficacité du traitement de dépollution comme le temps de séjour, la biomasse et le type d'écoulement à l'intérieur de l'installation (Alighardashi *et al.*, 2008). Le temps moyen de transport de l'eau usée depuis les égouts jusqu'aux stations peut intervenir, ainsi que l'activité des bactéries (Johnson *et al.*, 2000), le volume de pluie et la température aussi (Ternes, 1998 ; Ternes, 2001). Ainsi les effluents sortants peuvent contenir des résidus médicamenteux (Daughton et Ternes, 1999), ces résidus sont ensuite dilués dans les eaux de surface.

**Tableau 2.1 : Pourcentage d'élimination des composés pharmaceutiques sélectionnés dans les stations d'épuration**

Médicament	Pourcentage d'élimination par la station d'épuration	Procédé	Source
Ibuprofène	99	Boues activées	Kreuzinger <i>et al.</i> , 2004
	90	Boues activées	Ternes 1998
	80-100	Boues activées	Kenda <i>et al.</i> , 2003
	60-70	Boues activées	Carballa <i>et al.</i> , 2004
	65	Filtre biologique	Rodriguez <i>et al.</i> , 2003
	14-44	Filtre biologique	Kanda <i>et al.</i> , 2003
Carbamazépine	10	Boues activées	Kreuzinger <i>et al.</i> , 2004
	7	Boues activées	Ternes 1998
Ethinyl-estradiol	78	Boues activées	Ternes <i>et al.</i> , 1999
	64	Filtre biologique	Ternes <i>et al.</i> , 1999

Les usines d'eau potable puisent dans les eaux de surface et les eaux souterraines (Figure 2.1), il en résulte que des résidus apparaissent parfois dans les eaux de distribution publique (Heberer, 2002).

La Figure 2.2 résume les origines et le devenir des PPCPs dans l'environnement.



**Figure 2.2: Origines et devenir des PPCPs dans l'environnement (D'après Daughton, USEPA, 2001)**

1. Consommation de médicaments par les ménages (humains, animaux domestiques)
2. Consommation de médicaments par les hôpitaux
3. Fosses septiques, réseau d'égouts et station d'épuration
4. Utilisation des boues d'épandage
5. Rejet direct dans les eaux de surface lors de bains, natation
6. Industries pharmaceutiques et industries clandestines
7. Fuites de décharges
8. Aquaculture
9. Agents antiparasitaires
10. Transport et devenir dans l'environnement.

### 3. Trois molécules étudiées

Dans ce travail, trois molécules ont été sélectionnées du fait de leur grande utilisation : l'ibuprofène (IBU), la carbamazépine (CBZ) et l'éthinyl-estradiol (EE2). Les indications, la pharmacocinétique et leurs propriétés physico-chimiques sont rappelées dans les paragraphes ci-dessous.

#### 3.1. Indications

L'**ibuprofène** est un anti-inflammatoire non stéroïdien (ou AINS) du groupe des acides arylcarboxyliques qui inhibe la synthèse des prostaglandines. Il est commercialisé pour son effet antalgique et antipyrétique mais il a également une activité anti-inflammatoire par inhibition des cyclooxygénases. La posologie usuelle est de 1200 mg/jour en trois prises aux repas, pendant quelques jours lors d'un symptôme aigu. Les comprimés contiennent 100, 200 ou 400 mg de principe actif. Ce médicament est commercialisé sous diverses dénominations commerciales : ADVIL<sup>®</sup>, NUROFEN<sup>®</sup>, SPIFEN<sup>®</sup>, ... et IBUPROFENE pour les génériques.

La **carbamazépine** est un antiépileptique utilisé dans les épilepsies partielles et les crises tonico-cloniques généralisées, elle a un effet antalgique dans certaines douleurs et un effet thymorégulateur et antimaniaque. Pour traiter l'épilepsie, la dose initiale recommandée est de 400 mg/jour chez l'adulte et l'adolescent, de 200 mg/jour chez l'enfant de plus de 6 ans ou 100 mg/jour chez l'enfant de moins de 6 ans. Cette dose est administrée en deux prises initialement et elle est augmentée par paliers de trois à sept jours jusqu'à obtention de la réponse désirée. Contrairement à l'ibuprofène, ce médicament est pris au long court. Il est commercialisé sous le nom TEGRETOL<sup>®</sup> ou CARBAMAZEPINE.

L'**éthinyl-estradiol** est un contraceptif hormonal entraînant un blocage de l'ovulation, un épaissement de la glaire cervicale qui devient imperméable aux spermatozoïdes et une atrophie de l'endomètre. Cette molécule est présente dans la pilule oestroprogestative. C'est actuellement la méthode de contraception la plus répandue en France, utilisée par plus de 3 millions de femmes (Dorosz 2007). Elle est reconnue comme l'une des plus fiables avec un taux d'échec sur un an de 0,1% (Dorosz 2007). Les dosages actuels varient entre 20 et 50 µg d'éthinyl-estradiol par comprimé, la posologie étant d'un comprimé par jour, avec une fenêtre thérapeutique de sept jours après vingt et un jours de prise.

## 3.2. Pharmacocinétique

La pharmacocinétique d'une molécule renseigne sur son devenir dans l'organisme. On peut distinguer schématiquement quatre étapes dans la pharmacocinétique d'un médicament : l'absorption qui est le passage dans la circulation systémique ; la distribution, fixation plus ou moins forte de la molécule aux protéines plasmatiques ; la métabolisation, transformation du médicament par le système enzymatique de l'organisme et enfin l'élimination. En pharmacocinétique descriptive, on note ce processus « ADME » (Absorption-Distribution-Métabolisation-Elimination). Ces quatre étapes sont précisées ci-dessous pour chacune des trois molécules et ont pour source le site de la BIAM (Banque d'Informations Automatisée sur les Médicaments) géré par la société VIDAL.

### 3.2.1. L'ibuprofène

#### a. Absorption

Après administration par voie orale d'un comprimé contenant de l'ibuprofène, la concentration sérique maximale est atteinte en 90 minutes environ. L'alimentation peut retarder cette absorption.

#### b. Distribution

La fixation de l'ibuprofène aux protéines plasmatiques est de 99 %. Cette molécule possède un faible volume de distribution.

#### c. Métabolisation

L'ibuprofène subit une importante bioconversion énantiomérique. Il est largement métabolisé (90 % de la dose) au niveau hépatique en composés inactifs par hydroxylation ou oxydation de la chaîne isobutyle puis il y a formation de dérivés conjugués.

Le cytochrome P450 2C9 ou CYP2C9 est le principal cytochrome impliqué, le CYP2C8 jouerait un rôle moindre. Il existe un polymorphisme génétique de ces deux cytochromes, à l'origine d'une variabilité de l'élimination de l'ibuprofène selon les sujets. Les allèles \*3 de ces deux cytochromes sont notamment à l'origine d'une réduction de la clairance qui peut être importante. Ces « métaboliseurs lents » représenteraient 8 % de la population (Garcia-Martin *et al.*, 2004).

#### d. Elimination

L'élimination est essentiellement urinaire. Elle est totale en 24 heures, à raison de 10 % sous forme inchangée et de 90 % sous forme de métabolites inactifs, essentiellement glucuroconjugués (Dorosz 2007).

### **3.2.2. La carbamazépine**

#### **a. Absorption**

La résorption digestive est lente. Le pic plasmatique est atteint dans les 12 heures suivant l'administration d'une dose unique en comprimé.

#### **b. Distribution**

Le taux de liaison de la carbamazépine aux protéines plasmatiques est de 70 à 80 %. La carbamazépine traverse facilement la barrière hémato-encéphalique et les autres membranes. Elle est ainsi rapidement distribuée aux différents organes et tissus (Lévy *et al.*, 2002).

#### **c. Métabolisation**

Le métabolisme est hépatique par le CYP3A4 en dérivé époxydé actif à 97-98 % (10,11-époxy-carbamazépine).

#### **d. Elimination**

Seul 1 % environ de la dose administrée est excrété dans l'urine sous forme inchangée. La demi-vie d'élimination est de 8 à 24 heures (Dorosz, 2007).

### **3.2.3. L'éthinyl-estradiol**

#### **a. Absorption**

L'éthinyl-estradiol est rapidement résorbé par le tractus gastro-intestinal, la biodisponibilité par voie orale est voisine de 45 %. Le pic plasmatique est situé entre 60 à 160 picogrammes/ml, une heure après une prise orale de 30 microgrammes, la variabilité interindividuelle étant importante.

#### **b. Distribution**

La distribution est rapide dans les tissus ainsi 30 % de la dose absorbée est fixée par les tissus adipeux en une heure. La liaison aux protéines plasmatiques est de 97 % à 98 %. Pour cette molécule, il y a existence d'un cycle entéro-hépatique. La bile excrétée contenant la molécule, souvent sous forme d'un dérivé conjugué, est déversée au niveau duodénal. Les substances conjuguées peuvent subir une hydrolyse et redonner naissance à la molécule initiale. L'éthinyl-estradiol est alors à nouveau résorbé et rejoint la circulation générale.

#### **c. Métabolisation**

L'éthinyl-estradiol est principalement métabolisé au niveau du foie par hydroxylation puis glucuroconjugaison.

#### d. Elimination

30 % à 55 % de la dose administrée sont éliminés par les urines sous forme sulfo- ou glucuroconjuguée et 30 % par les fèces sous forme de métabolite. La demi-vie d'élimination est d'environ 7 heures.

### 3.3. Caractéristiques physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques des molécules sont présentées dans le Tableau 3.1. Ces caractéristiques sont intéressantes pour comprendre la stabilité et la persistance des médicaments dans l'environnement.

#### 3.3.1. Le numéro CAS

Le numéro C.A.S. (Chemical Abstract Service) est un identifiant déterminé par informatique. L'algorithme identifie les diagrammes structurels et alloue automatiquement un numéro CAS unique à chaque entité chimique (molécule, mélange d'isomères, produit industriel). Ce numéro se divise en trois parties, séparées par des tirets. Par exemple 15687-27-1 pour l'ibuprofène.

Compte tenu de la complexité de la nomenclature chimique et la possibilité de désigner une substance par plusieurs noms, le numéro CAS permet d'identifier les espèces chimiques sans aucune ambiguïté. On peut trouver le numéro CAS de chaque molécule sur le site internet de l'American Chemical Society.

#### 3.3.2. La solubilité

Elle détermine la capacité d'un composé à se dissoudre dans un solvant liquide. Ici on compare les molécules par la solubilité dans l'eau à la température de 25°C ou 27°C concernant l'éthinyl-estradiol.

L'ibuprofène est la molécule la plus soluble des trois sélectionnées avec une solubilité dans l'eau à 25°C de 21 mg/L et l'éthinyl-estradiol la plus faible avec une solubilité dans les mêmes conditions de 11,3 mg/L.

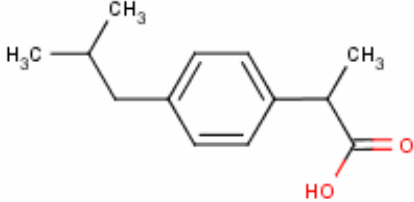
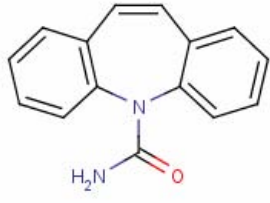
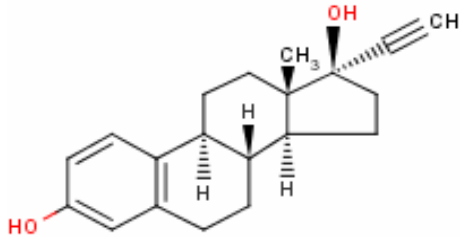
#### 3.3.3. Le pKa

Il s'agit de l'indication de la constante d'acidité  $K_a$  d'un équilibre acido-basique, avec  $pK_a = -\log K_a$ . Elle détermine la capacité d'un acide à libérer son proton.

On utilise généralement le pKa plutôt que le  $K_a$  pour déterminer la force d'un acide. Plus l'acide est fort plus le pKa est petit. Ainsi à 20°C, on peut classer les trois molécules :



**Tableau 3.1 : Caractéristiques physico-chimiques des trois molécules sélectionnées**

<b>Ibuprofène</b>					
CAS	Indication	Solubilité dans l'eau (mg.l <sup>-1</sup> ) à 25°C	pKa (20°C)	LogK <sub>OW</sub>	Constante de Henry (atm m <sup>3</sup> /mole) à 25°C
15687-27-1	Anti-inflammatoire	21	4,52	(3,5 <sup>1</sup> ) 3,97 <sup>2</sup>	1,5.10 <sup>-7</sup>
		(Yalkowsky et Dannenfelser, 1992)	(Rafols <i>et al.</i> , 1997)	( <sup>1</sup> Stuer-Lauridsen <i>et al.</i> , 2000 <sup>2</sup> Avdeef <i>et al.</i> , 1998)	( <a href="http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus">http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus</a> )
		C13-H18-O2	Masse molaire = 206,28 g.mol <sup>-1</sup>		
					
( <a href="http://www.nlm.nih.gov">http://www.nlm.nih.gov</a> )					
<b>Carbamazépine</b>					
CAS	Indication	Solubilité dans l'eau (mg.l <sup>-1</sup> ) à 25°C	pKa (20°C)	LogK <sub>OW</sub>	Constante de Henry (atm m <sup>3</sup> /mole) à 25°C
298-46-4	Anti-épileptique	17,66	14,0	2,25	1,08. 10 <sup>-10</sup>
		(Meylan <i>et al.</i> , 1996)	(Scheytt <i>et al.</i> , 2005)	(Syracuse Science Center, 2002)	( <a href="http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus">http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus</a> )
		C15-H12-N2-O	Masse molaire = 236,27 g.mol <sup>-1</sup>		
					
( <a href="http://www.nlm.nih.gov">http://www.nlm.nih.gov</a> )					
<b>Ethinyl-estradiol</b>					
CAS	Indication	Solubilité dans l'eau (mg.l <sup>-1</sup> ) à 27°C	pKa (20°C)	LogK <sub>OW</sub>	Constante de Henry (atm m <sup>3</sup> /mole) à 25°C
57-63-6	Contraceptif	11,3	10,5	3,67	7,94. 10 <sup>-12</sup>
		(Kuster <i>et al.</i> , 2004)	( <a href="http://ibmlc2.chem.u ga.edu/sparc">http://ibmlc2.chem.u ga.edu/sparc</a> )	(Syracuse Science Center, 2005)	( <a href="http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus">http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus</a> )
		C20-H24-O2	Masse molaire = 296,41 g.mol <sup>-1</sup>		
					
( <a href="http://www.nlm.nih.gov">http://www.nlm.nih.gov</a> )					

l'ibuprofène est l'acide le plus fort (pKa=4,52), puis l'éthinyl-estradiol (pKa=10,5) et enfin la carbamazépine (pKa=17,66).

### 3.3.4. Le LogK<sub>ow</sub>

Le logK<sub>ow</sub> représente le coefficient de partage du produit chimique entre les deux phases octanol/eau ou « octanol/water » et reflète la solubilité de composés chimiques dans deux solvants. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule. En effet, si logK<sub>ow</sub> est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère lipophile, et inversement. Une valeur de logK<sub>ow</sub> = 0 signifie que la molécule se répartit de manière égale entre les deux phases, ainsi sa concentration dans l'octanol sera égale à sa concentration dans l'eau.

Par conséquent, il est possible de classer ces molécules par solubilité croissante dans l'octanol : carbamazépine < éthinyl-estradiol < ibuprofène, les logs K<sub>ow</sub> respectifs sont 2,25, 3,67 et 3,97.

### 3.3.5. La constante de Henry

La Loi de Henry, formulée en 1803 par William Henry, énonce : « À température constante et à saturation, la quantité de gaz dissous dans un liquide est proportionnelle à la pression partielle qu'exerce ce gaz sur le liquide ». Autrement dit, la concentration maximale d'un gaz en solution, en équilibre avec une atmosphère contenant ce gaz, est proportionnelle à la pression partielle de ce gaz en ce point.

Par exemple, en un point où la pression est le double de la pression atmosphérique (c'est le cas dans l'eau à 10,3 m de profondeur), chaque gaz de l'air pourra se dissoudre deux fois mieux qu'en surface.

Le partage d'une substance entre la phase gazeuse et la phase aqueuse d'un système à deux phases à l'équilibre est exprimé par la constante de Henry ou « coefficient de répartition air/eau ». Ainsi plus la constante de Henry (H<sub>i</sub>) d'une substance a une valeur élevée, plus cette substance est « volatile » dans une solution aqueuse et plus il est facile de l'extraire de l'eau ou d'un sol humide insaturé (<http://www.bafu.admin.ch/chloronet>).

La loi de Henry est représentée par la formule : 
$$x_i = \frac{P_i}{H_i}$$

Avec :

$x_i$  : fraction molaire du gaz "i". C'est le rapport du nombre de moles de gaz "i" au nombre total de moles de la solution.

$p_i$  : pression partielle du gaz "i" dans la phase gazeuse égale au produit de la pression totale de la phase gazeuse par la fraction représentative de la composition volumique (ou molaire).

$H_i$  : Constante de Henry du gaz "i". Cette constante est fonction de la température.

Parmi ces trois molécules, l'ibuprofène possède la constante de Henry la plus élevée ( $1,5 \cdot 10^{-7}$  atm m<sup>3</sup>/mole à 25°C), ainsi celui-ci sera plus volatile que la carbamazépine et que l'éthinyl-estradiol ( $H_i = 1,08 \cdot 10^{-10}$  et  $7,94 \cdot 10^{-12}$  respectivement).

## 4. Méthodes analytiques

Le défi auquel la communauté scientifique doit faire face est le développement de méthodes d'analyses normalisées et fiables permettant la comparaison entre les résultats dans le monde entier (Jones-Lepp, 2009). Etant donné qu'il existe des centaines de médicaments appartenant à une grande variété de groupes chimiques, les chimistes analystes peuvent rencontrer des difficultés pour mesurer la concentration de composés sélectionnés. Une gamme de méthode d'analyse doit être mise en œuvre. Du fait que les concentrations de ces composés dans l'environnement sont de l'ordre du micro ou du nanogramme, la méthode d'analyse doit être rigoureuse. A titre d'exemple, dans le cadre du projet européen Poséidon, afin de mesurer la concentration de huit médicaments, cinq méthodes différentes ont été utilisées (Bruchet *et al.*, 2005).

Deux étapes importantes sont à considérer : l'extraction puis l'analyse proprement dite.

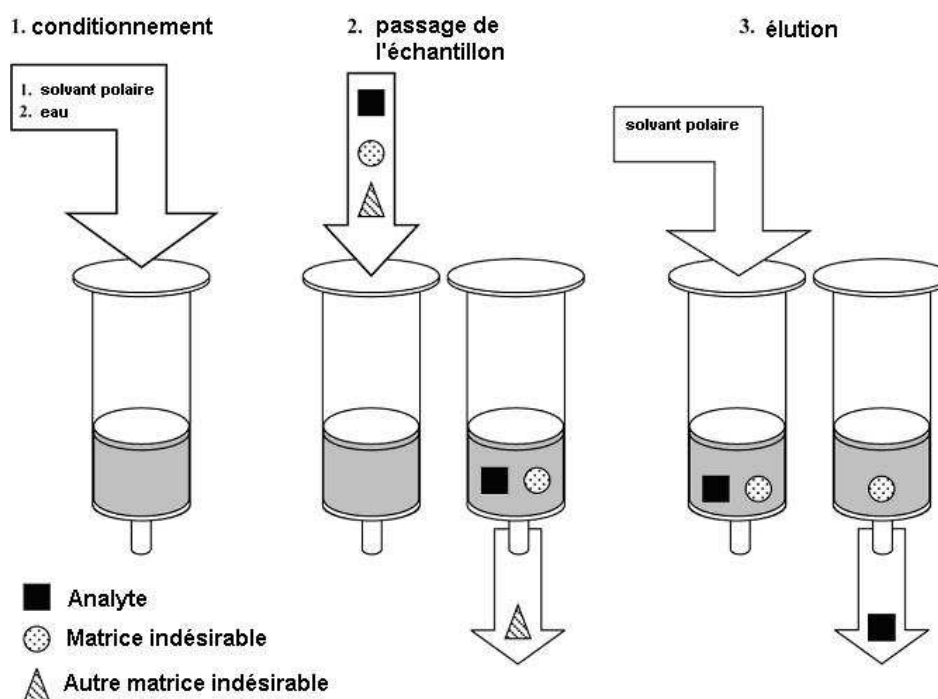
### 4.1. L'extraction

Plus un échantillon est complexe et plus la préparation de l'échantillon qui précède l'analyse doit être poussée. Si une simple dilution peut parfois être suffisante, les matrices qui nous intéressent dans ce travail nécessitent toujours de mettre en œuvre une extraction plus ou moins élaborée.

Classiquement, les techniques d'extraction se divisent en deux grands groupes : extraction liquide/liquide et extraction liquide/solide.

L'extraction liquide/liquide est basée sur le partage d'un composé entre deux solvants non miscibles.

L'extraction liquide/solide met en jeu un solvant et une matrice solide qui, le plus souvent, se présente sous forme de minces disques plats (47 et 90 mm) ou de petites cartouches cylindriques (volume généralement < 6 mL). La figure 4.1 est une illustration des principales étapes d'une extraction liquide/solide sur cartouche. En pratique l'échantillon passe à travers la cartouche à un débit d'environ 7 à 10 mL/min, généralement en utilisant l'écoulement par gravité, le vide ou à l'aide de la poussée d'une seringue. Après lavage, la molécule est ensuite éluée hors de la cartouche à l'aide de différents solvants.



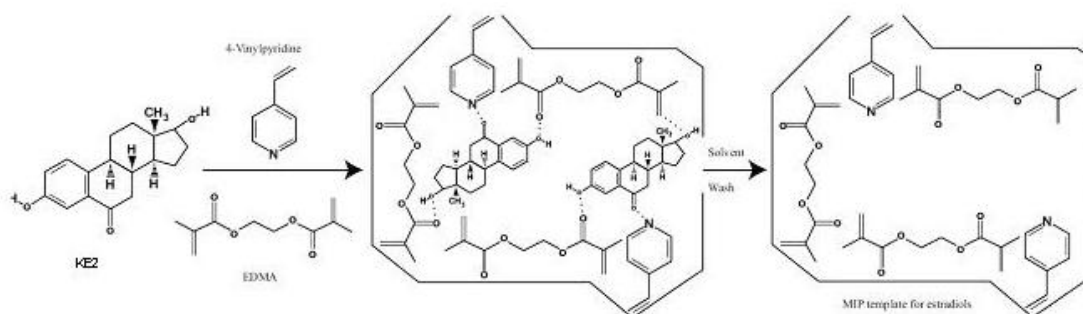
**Figure 4.1 : Illustration des principales étapes d'une extraction liquide/solide sur cartouche (Jones-Lepp, 2009)**

Différentes propriétés physicochimiques peuvent être mises en œuvre au niveau de l'extraction liquide/solide : l'adsorption, le partage, l'échange d'ions et l'exclusion.

La technique mise en œuvre pour la recherche des médicaments dans les eaux dépend de la nature de l'échantillon à partir de laquelle cette recherche est réalisée.

**Dans le cas d'un échantillon aqueux**, les techniques les plus utilisées sont l'extraction liquide/solide de partage sur cartouches HLB (hydrophobic lipophilic balanced) ou C18 classique, ainsi que l'extraction par échange d'ions sur cartouches échangeuses d'anions ou de cations. Lorsque plusieurs cartouches sont associées, on parlera alors de *tandem-extraction*.

En dehors de ces techniques, on relève dans la littérature une technique très élaborée qui est la technique MIP (molecularly imprinted polymers) (Jones-Lepp, 2009). Cette technique fait appel à une résine en polymères faite sur mesure avec une spécificité pour un seul composé ou pour une classe de composés (Figure 4.2). Le modèle créé permet à la molécule cible de se fixer. L'inconvénient de cette technique est qu'il est difficile de supprimer complètement les molécules qui ont servi à créer le modèle. Ceci est particulièrement problématique pour les composés pharmaceutiques dans l'eau qui sont présent à une concentration de l'ordre du microgramme par litre. La quantification précise est donc difficile. Pour résoudre cette difficulté, Watabe *et al.* (2006) ont réalisé un modèle MIP en utilisant un analogue de structure de la molécule à extraire qui a un profil chromatographique différent. Par exemple, pour extraire l'éthinyl-estradiol l'analogue choisi est le 6-ketoestradiol.



**Figure 4.2 : Formation du « polymère modèle » par technique MIP (Jones-Lepp, 2009)**

Une autre méthode qui est encore utilisée et qui est plus simple est l'ultra-sonication. Une petite quantité d'échantillon est placée dans un récipient auquel on ajoute le solvant. Le récipient est soumis aux ultrasons pendant quelques minutes et le surnageant est ensuite soumis à une extraction liquide/solide.

**Dans le cas d'un échantillon solide (vers, poissons, plantes...)**, la technique la plus utilisée est la technique PLE (pressurized liquid extraction) (Jones-Lepp, 2009). qui consiste à utiliser

des solvants sous haute pression et à température élevée pour favoriser l'extraction de composés organiques à partir de ces matrices solides. Après avoir séché, pulvérisé et homogénéisé l'échantillon, une fraction de celui-ci, de l'ordre de 2 g, est mélangée à une quantité double d'une matrice inerte telle que de la terre de diatomée. L'ensemble est placé dans une cellule d'extraction en acier et est extrait en utilisant le solvant ainsi que la pression et la température appropriés. L'extrait obtenu peut ensuite éventuellement subir un nettoyage supplémentaire sur une cartouche d'extraction.

Autre technique citée par Jones-Lepp, la MAE (microwaved-assisted Extraction), qui utilise les micro-ondes à 2450 MHz, un solvant et une matrice solide (sol, sédiments). Le but est de chauffer l'eau de la matrice. Il se forme des bulles de gaz sous pression et ceci induit la destruction de la matrice, les fragments interagissent alors avec le solvant. Deux types de MAE sont disponibles : des récipients fermés à pression et température contrôlées, appelés pression-MAE (PMAE) et des récipients ouverts à pression atmosphérique, appelés focus-MAE (FMAE). Au niveau de cette méthode, il peut y avoir des différences lors de la manipulation. Par exemple Liu *et al.* (2004) ne sèchent pas les échantillons avant extraction, alors que Cueva-Mestanza *et al.* (2008) les sèchent.

## **4.2. Techniques d'analyse proprement dites**

Les techniques d'analyse les plus utilisées sont les techniques chromatographiques (gazeuse ou liquide) couplées à une détection par spectrométrie de masse.

La GC-MS est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse (CPG, ou GC pour Gaz Chromatography) à la spectrométrie de masse (MS pour Mass Spectrometry) afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances.

Une unité GC-MS est ainsi composée de deux blocs principaux : un chromatographe en phase gazeuse et un spectromètre de masse. Le chromatographe en phase gazeuse utilise une colonne capillaire. Les paramètres dépendent des dimensions de la colonne : longueur, diamètre et épaisseur du film ainsi que des propriétés de la phase. Le long de la colonne, les différentes molécules de l'échantillon se séparent selon leurs propriétés chimiques. Les molécules ont différents temps de rétention pour éluer du chromatographe, ce qui permet au spectromètre de masse en aval de détecter les molécules ionisées séparément.

La LC-MS est la chromatographie en phase liquide (CPL, ou LC pour Liquid Chromatography) couplée au spectromètre de masse. Ce type de chromatographie repose sur la séparation de composés entraînés par une phase mobile liquide à travers un solide représentant la phase stationnaire. La séparation s'opère par interactions chimiques ou physiques des analytes entre la phase mobile et la phase stationnaire. Les molécules sortent de la colonne à différents temps de rétention et sont détectées par spectrométrie de masse.

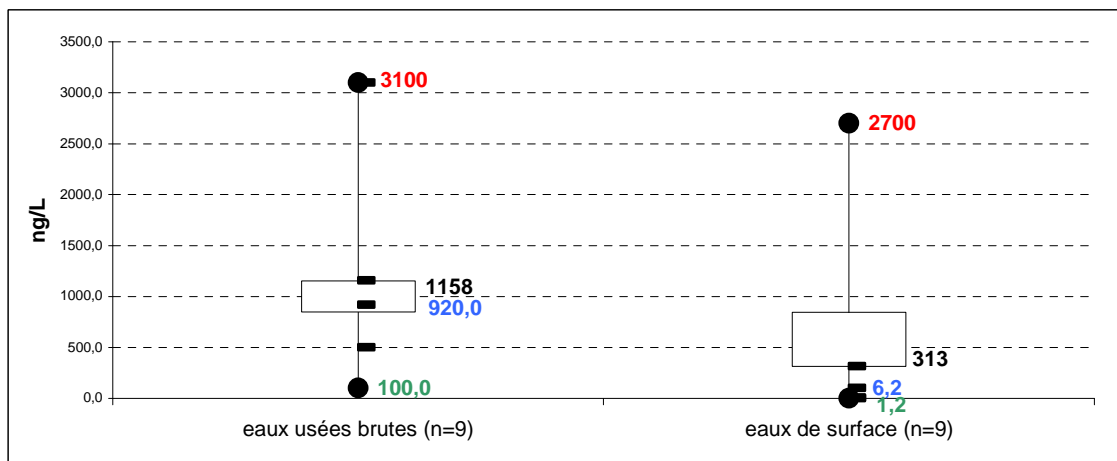
## **5. Concentrations dans l'environnement des trois molécules étudiées**

Les concentrations relevées dans l'environnement varient considérablement d'un site à l'autre. Les concentrations retrouvées dans la littérature sont regroupées dans les annexes 1, 2 et 3. L'analyse des données publiées est présentée sous forme de trois graphiques. Pour chaque molécule étudiée un graphique rapporte le minimum en vert, le maximum en rouge, la médiane en bleu et la moyenne en noir. Ils permettent de visualiser les données dans leur ensemble. La Figure 5.1 montre les concentrations d'ibuprofène trouvées dans les eaux usées non traitées et les eaux de surface. La Figure 5.2 renseigne sur les concentrations de carbamazépine dans les eaux usées non traitées, les eaux de surface, les eaux souterraines et l'eau potable. Enfin la Figure 5.3 indique les concentrations d'éthinyl-estradiol relevées dans les eaux usées, les eaux de surface et l'eau potable.

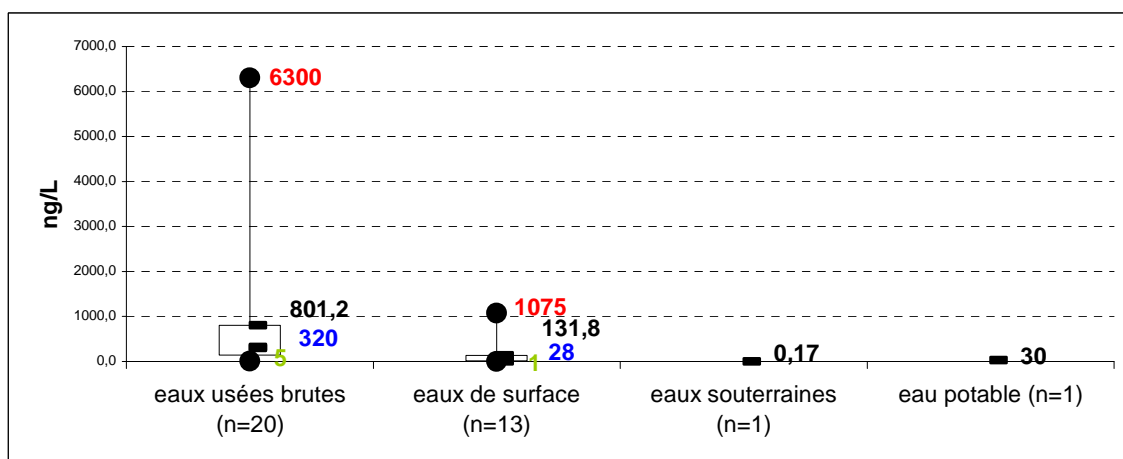
### **5.1. Les eaux usées**

Dans les eaux usées, les concentrations des trois composés pharmaceutiques sont élevées. Pour l'ibuprofène, les valeurs vont de 100 (Gagné *et al.*, 2006a) à 3100 ng/L (Ashton *et al.*, 2004). La moyenne se situant à 1158 ng/L (Figure 5.1). Pour la carbamazépine, la moyenne des concentrations retrouvées est de 801 ng/L. Le minimum est de 5 ng/L (Leclercq *et al.*, 2009) et le maximum à 6300 ng/L (Ternes, 1998). Concernant l'éthinyl-estradiol, les concentrations retrouvées vont de 3 ng/L (Baronti *et al.*, 2000) à 17 ng/L (Stumpf *et al.*, 1999), avec une moyenne proche de 11 ng/L.

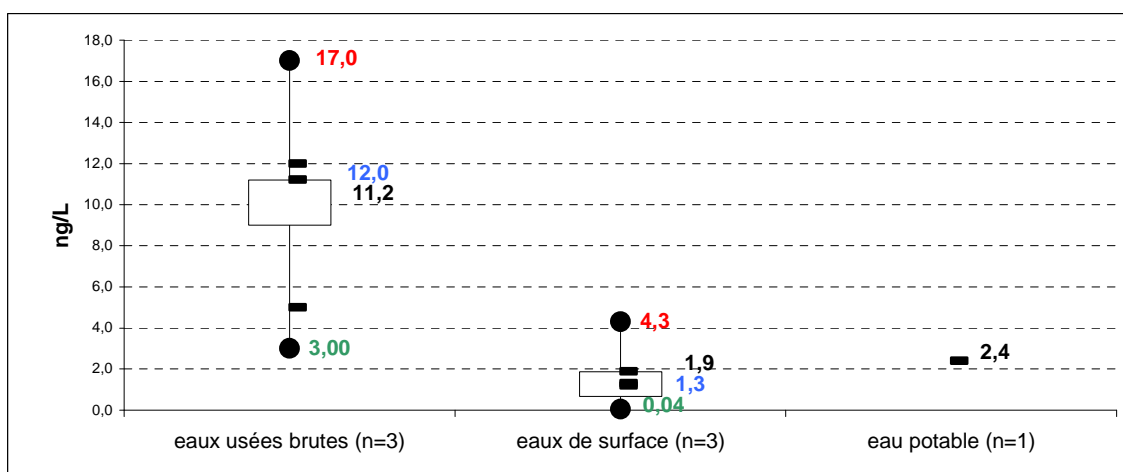
Des scientifiques ont tenté de développer des modèles pour prédire les concentrations en médicaments dans les eaux usées. Ce calcul peut-il prédire les concentrations avec exactitude ? La méthode est-elle reproductible ? Qu'en est-il des résultats en les comparant avec les concentrations relevées dans la littérature ? Et quel est l'intérêt d'un tel calcul ?



**Figure 5.1 : Concentrations d'ibuprofène relevées dans les eaux**



**Figure 5.2 : Concentrations de carbamazépine relevées dans les eaux**



**Figure 5.3 : Concentrations d'éthinyl-estradiol relevées dans les eaux**



Les scientifiques parlent de concentrations environnementales prévisibles, désignées par l'acronyme PEC pour Predicted Environmental Concentrations. Il s'agit d'une approche modèle par rapport à une approche mesurée. Les PEC sont calculées à partir de formules élaborées à l'aide d'hypothèses. Enfin les résultats sont comparés aux concentrations relevées lors de prélèvements.

Les concentrations environnementales prévisibles de plusieurs molécules ont été calculées dans une étude réalisée par Carballa *et al.* (2008). Ces concentrations sont obtenues à partir de la consommation annuelle de médicaments par habitant en Espagne, par le nombre d'habitant desservi par chaque station d'épuration, et par le débit moyen traité par ces stations. Un facteur noté  $f$  est inséré, il permet de prendre en compte les composés apparentés arrivant dans les eaux usées. Comme les médicaments sont excrétés soit sous forme inchangée, soit partiellement ou complètement métabolisés, soit conjugués (glucuro- et sulfo-conjugaisons), les valeurs de  $f$  sont assez variables. Par exemple, l'excrétion sous forme inchangée de la carbamazépine s'étend de 1 à 31 % (Daughton et Ternes, 1999 ; Khan et Ongerth, 2004) et de 0 à 30 % sous forme conjuguée (Ternes et Joss, 2006). Pour l'ibuprofène, l'excrétion est comprise entre 1 et 10 % (Zuccato *et al.*, 2005) sous forme inchangée et entre 5 et 17 % sous forme métabolisée (Khan et Ongerth, 2004). Ceci entraîne alors une incidence sur le calcul des PEC. Pour l'éthinyl-estradiol, la fraction inchangée excrétée est de 40 %, il n'y a pas de variation de ce pourcentage.

$$PEC = \frac{I \cdot P \cdot f}{Q \cdot 365}$$

Avec :

I : consommation annuelle en mg/habitant,

P : nombre d'habitants reliés à chaque station d'épuration,

$f$  : facteur permettant de prendre en compte les composés apparentés,

Q : quantité d'eau moyenne en m<sup>3</sup> par jour.

La limite de ce calcul est que l'on ne tient pas compte des modifications occasionnées par le transport dans le réseau des eaux usées. Ici, les transformations possibles comme l'adsorption ou la dégradation n'entrent pas en considération.

Dans le Tableau 5.1, la comparaison entre les concentrations prédictives calculées et les concentrations moyennes dans les eaux usées brutes de la littérature nous indique que pour la carbamazépine et l'ibuprofène les valeurs prédites sont proches de celles mesurées.

Or concernant l'éthinyl-estradiol la moyenne des prélèvements communiqués dans les publications est amplement supérieure à la PEC, environ 20 fois plus.

**Tableau 5.1 : Comparaison entre PEC et moyennes des concentrations observées des annexes 1, 2 et 3**

	<b>Ibuprofène</b>	<b>Carbamazépine</b>	<b>Ethinyl-estradiol</b>
<b>PEC (Carbella <i>et al.</i>, 2008)</b>	1830-8235 ng/L	22-1350 ng/L	0,5 ng/L
<b>Concentrations moyennes dans les eaux usées brutes</b>	1158 ng/L	801 ng/L	11,2 ng/L

Cela aurait pu s'expliquer par une moindre consommation des œstrogènes de synthèse par les espagnoles. Mais les enquêtes montrent qu'en Espagne la consommation est semblable à celle des autres pays européens (Tableau 5.2).

**Tableau 5.2 : Consommation d'éthinyl-estradiol en mg/femme/an dans quatre pays Européens**

	<b>Allemagne</b> <i>Alder et al.</i> , 2006	<b>Pologne</b> <i>Alder et al.</i> , 2006	<b>Autriche</b> <i>Kreuzinger et al.</i> , 2004	<b>Espagne</b> <i>Carbella et al.</i> , 2008
<b>Ethinyl-estradiol (mg/personne/an)</b>	0,58	0,21	0,50	0,30

Toutefois, le calcul des PEC dépend fortement des hypothèses du modèle utilisé. Ainsi il n'est pas surprenant que des sous-estimations ou des surestimations soient observées. D'autre part, les mesures réalisées dans l'environnement sont influencées par la précision de la méthode d'analyse et par l'échantillon choisi. Par conséquent, bien que le calcul des concentrations prédites ne remplace pas les mesures, il est un outil utile pour définir les composés qui peuvent être à surveiller.

## **5.2. Les eaux de surface**

Les eaux de surface comprennent les eaux courantes (rivières, canaux) et les eaux stagnantes ou plans d'eau (lacs, retenues de barrage, étangs...). Les cours d'eau d'une longueur supérieure à 1 km représentent, en France métropolitaine, un linéaire de 525 000 km. Les trois quarts sont de petits ou très petits cours d'eau. Outre les zones humides, les eaux stagnantes sont constituées d'étangs et de lacs naturels ainsi que des retenues de barrages. On trouve également des étangs d'eau saumâtre, en relation directe ou non avec la mer. Il existe près de

34 000 plans d'eau douce, dont 535 ont une superficie supérieure à cinquante hectares (Source : ministère chargé de l'environnement, direction de l'eau, 2009).

Dans les eaux de surface, la carbamazépine est retrouvée entre 1 ng/L (Lissemer *et al.*, 2006) et 1 µg/L (Heberer *et al.*, 2002), avec une moyenne de 132 ng/L pour les différents prélèvements observés (Figure 5.2). Entre 0,04 (Baronti *et al.*, 2000) et 4,3 ng/L (Stumpf *et al.*, 1999) pour l'éthinyl-estradiol. La moyenne étant de 1,9 ng/L. Et de 1,2 ng/L (Loos *et al.*, 2007) à 2,7 µg/L (Ternes, 2007 ; Kümmerer, 2008) pour l'ibuprofène. On obtient une moyenne d'environ 313 ng/L.

Pour prédire les concentrations de résidus médicamenteux dans l'eau, Kim *et al.* (2007) utilisent les concentrations environnementales prévisibles. Les auteurs calculent le PEC, ils évaluent la concentration de carbamazépine dans l'eau en Corée d'après la consommation annuelle. Pour formuler l'équation, il a fallu poser certaines hypothèses :

- la totalité des produits pharmaceutiques fabriqués ont été vendus la même année,
- ils ont tous circulé par l'intermédiaire du réseau d'égout,
- il y a formation de peu de métabolites chez les humains,
- l'élimination est négligeable par les systèmes de traitement des eaux usées,
- les médicaments sont utilisés uniformément dans le temps et l'espace.

Ainsi la concentration de carbamazépine dans l'eau a été calculée grâce à l'équation suivante :

$$PEC = \frac{A \cdot (100 - R)}{365 \cdot P \cdot V \cdot D \cdot 100} \cdot 10^9$$

Avec :

A : quantité de principe actif fabriqué par an (en kg/an)

R : taux d'élimination de la molécule par les stations d'épuration

P : population de Corée (env. 48 000 000 en 2005, Korea National Statistical Office)

V : volume d'eau usée produite par habitant

(calculé à partir du volume annuel d'eau usée passant par les stations d'épuration, rapport annuel du Ministère de l'Environnement de Corée)

D : facteur de dilution. Par défaut, la valeur 10 a été appliquée.

Le résultat obtenu est 1400 ng/L de carbamazépine dans les eaux de surface. Cette valeur est plus élevée que celles mesurées dans la littérature. D'après la Figure 5.2, la concentration moyenne de carbamazépine dans les eaux de surface est dix fois plus faible que la PEC obtenue. Cette différence importante montre les limites de certaines hypothèses. En effet, les médicaments vendus n'ont sûrement pas tous été consommés la même année. De plus, le volume d'eau usée produit par un habitant et par an ne peut pas être représentatif si tous les habitants ne sont pas reliés au réseau de collecte de la ville.

### **5.3. Les eaux souterraines**

Une seule publication rapporte des mesures de carbamazépine dans les eaux souterraines (Godfrey *et al.*, 2007). Dans des forages situés entre 5 et 20 mètres de profondeur une concentration moyenne de 0,17 ng/L a été retrouvée.

### **5.4. L'eau potable**

L'eau potable est définie comme une eau propre à la consommation humaine selon la directive européenne n°98/83/CE du 03/11/1998. Cette directive ne prend pas en compte les résidus médicamenteux. Cependant, il est possible d'y retrouver des résidus médicamenteux. A titre d'exemple, un prélèvement révèle 30 ng/L de carbamazépine (Ternes, 2001), un autre 2,4 ng/L d'éthinyl-estradiol (Adler *et al.*, 2001) et des traces d'ibuprofène ont été retrouvées par Heberer (2002).

### **5.5. Les sédiments**

Les sédiments sont formés de particules minérales et biologiques soumis à la gravité qui se déposent au fond des cours d'eau. Sur 44 sédiments étudiés lors de prélèvements sur le même site, Furlong *et al.* (2004) ont retrouvé de la carbamazépine dans 32 de ceux-ci. La concentration moyenne obtenue est de 4,1 mg/kg.

Dans l'étude de Braga *et al.* (2005), une concentration d'éthinyl-estradiol comprise entre 0,05 et 0,5 ng/g a été observée pour quatre sédiments prélevés à sept kilomètres des côtes de Sydney.

## 6. Devenir et dégradation dans l'environnement

Le devenir des médicaments dans l'eau est fonction d'une part des caractéristiques physico-chimiques de chaque molécule, comme la solubilité dans l'eau, la constante d'acidité de l'équilibre acido-basique (pKa), la constante de la loi de Henry et le coefficient de partage octanol-eau ( $K_{ow}$ ). D'autre part le devenir des médicaments est fonction des conditions du milieu. Dans l'eau la température, le pH, la présence de cations, le potentiel d'oxydoréduction, la présence de matières en suspension et de matières organiques entrent en jeu. Notons que les caractéristiques des molécules sont fixes tandis que celles du milieu sont variables. Tout ceci gouverne la stabilité des molécules dans l'environnement.

Le tableau 6.1 rapporte les demi-vies des médicaments dans l'eau de surface, les sols et les sédiments. La demi-vie indique la durée au bout de laquelle la quantité de molécules est diminuée de moitié en considérant que la loi de disparition suit une cinétique d'ordre 1.

**Tableau 6.1 : Demi-vie des trois médicaments dans l'environnement**

<sup>1</sup> USEPA, 2000 <sup>2</sup> Ying et Kookana, 2005 <sup>3</sup> Ying *et al.*, 2003 <sup>4</sup> Hanselman *et al.*, 2003 <sup>5</sup> Zukoska *et al.*, 2005 <sup>6</sup> Halling-Sorensen *et al.*, 2005 <sup>7</sup> Buser *et al.*, 1999 <sup>8</sup> Ashton *et al.*, 2004 <sup>9</sup> Thiele-Bruhn, 2003 <sup>10</sup> Kuster *et al.*, 2004 <sup>12</sup> Andreozzi *et al.*, 2002 <sup>13</sup> Andreozzi *et al.*, 2003 <sup>14</sup> Tixier *et al.*, 2003

Milieux	Temps de demi-vie		
	Ibuprofène	Carbamazépine	Ethinyl-estradiol
Eaux de surface	1 jour <sup>8,9</sup> 15 jours <sup>1</sup> 20 jours <sup>6,7</sup> 50 jours <sup>13</sup>	75 jours <sup>12</sup> 63 jours <sup>14</sup> > 100 jours <sup>13</sup>	46 jours <sup>10</sup> 60 jours <sup>5</sup> 81 jours <sup>3</sup>
Sols	30 jours <sup>1</sup>	/	4,5 jours <sup>2</sup> 60 jours <sup>5</sup> 120 jours <sup>1</sup>
Sédiments	135 jours <sup>1</sup>	/	240 jours <sup>4</sup> 540 jours <sup>1</sup>

Dans les eaux de surface, l'ibuprofène possède le temps de demi-vie le plus court entre 1 (Ashton *et al.*, 2004) et 50 jours (Andreozzi *et al.*, 2003). La demi-vie de la carbamazépine est située entre 63 (Andreozzi *et al.*, 2002) et plus de 100 jours (Andreozzi *et al.*, 2003). Et

l'éthinyl-estradiol a un temps de demi-vie de 46 (Kuster *et al.*, 2004) à 81 jours (Ying *et al.*, 2003). Dans les sols, l'ibuprofène a un temps de demi-vie de 30 jours (USEPA, 2000) et l'éthinyl-estradiol entre 4 (Ying KooKana, 2005) et 120 jours (USEPA, 2000). Dans les sédiments, la demi-vie de l'ibuprofène est observée à 135 jours (USEPA, 2000) et celle de l'éthinyl-estradiol entre 240 (Hanselman *et al.*, 2003) et 540 jours (USEPA, 2000). Concernant la carbamazépine dans les sols ou les sédiments, aucune donnée ne semble disponible dans la littérature à ce jour.

## **6.1. Devenir et dégradation dans l'eau**

Dans l'eau, en plus des propriétés physico-chimiques propres à chaque molécule, les caractéristiques du milieu jouent un rôle dans leur devenir. Les médicaments sont soumis à différents mécanismes de dégradation comme l'hydrolyse, la photolyse et la biodégradation. L'hydrolyse est la dégradation par l'eau d'une substance, la photolyse est définie par l'interaction entre les photons issus de la lumière et la molécule cible, enfin la biodégradation est la décomposition de la molécule par les micro-organismes comme les bactéries, les algues ou les champignons.

### **6.1.1. L'ibuprofène**

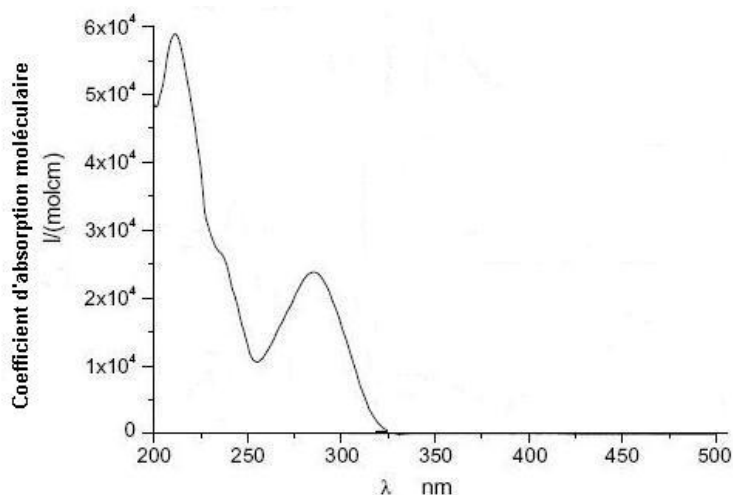
L'ibuprofène a une faible solubilité dans l'eau (21 mg/L) (Yalkowsky et Dannenfelser, 1992). Son coefficient de partage octanol-eau est élevé (Kow=3,97) (Avdeef *et al.*, 1998). Ainsi cet AINS est lipophile. Son pKa est de 4,52 (Rafols *et al.*, 1997), par conséquent dans une eau de pH supérieur à 5 il est sous forme ionique chargé négativement. Il s'agit d'un acide faible.

Malgré son potentiel d'adsorption aux particules solides (Scheytt *et al.*, 2005), la fonction carboxylique de l'ibuprofène limite grandement son adsorption aux matières en suspension dans les eaux naturelles. Ainsi l'adsorption joue un rôle mineur dans l'élimination de l'ibuprofène des eaux naturelles (Fent *et al.*, 2006). C'est la biodégradation aérobie et anaérobie par des microorganismes qui semble le principal facteur d'élimination du médicament dans le milieu aquatique (Ternes 1998 ; Buser *et al.*, 1999 ; Winkler *et al.*, 2001 ; Zuccato *et al.*, 2005 ; Fent *et al.*, 2006). Ces auteurs ont aussi étudié la dégradation abiotique de l'ibuprofène sur colonne d'eau et ont conclu que ces processus comme l'hydrolyse et la photolyse contribuent peu à l'élimination de ce composé.

Selon l'étude de Kim et Tanaka (2009), deux AINS arylcarboxyliques, le kétoprofène et le diclofénac ayant une structure proche de l'ibuprofène, sont dégradés à près de 100 % suite à l'exposition sous une lampe UV émettant à des longueurs d'onde de 254 et 185 nm. Toutefois, ces longueurs d'onde représentent les UV-C qui sont entièrement filtrés par l'ozoneosphère. Cette expérience ne permet pas de conclure sur la dégradation naturelle de l'ibuprofène mais peut être utile pour le traitement des eaux.

### 6.1.2. La carbamazépine

Les temps de demi-vie observés dans le Tableau 6.1 indiquent que la carbamazépine persiste dans le milieu aquatique. Cette molécule ne subirait-elle pas la dégradation par photolyse ? Son spectre d'absorption s'étend entre 200 et 325 nm (Figure 6.1).



**Figure 6.1 : Spectre d'absorption de la carbamazépine entre 200 et 500 nm (Tusneda *et al.*, 2002)**

Dans l'étude de Kim et Tanaka (2009), la carbamazépine est détruite à hauteur de 40 % avec des lampes à UV-C de longueurs d'onde  $\lambda = 185$  nm et 254 nm. Or les UV-C sont filtrés par l'ozoneosphère. Cette étude n'est pas représentative de la photolyse naturelle de la molécule. C'est pourquoi l'utilisation d'une lampe UV émettant à des longueurs d'onde supérieures à 280 nm est plus pertinente. Dans l'étude de Tusnelda *et al.* (2003), une lampe au Xénon de 1000W équipée de filtres d'atténuation atmosphérique permet d'obtenir une proportion d'UV-B et UV-C semblable aux rayons touchant la surface terrestre. Les auteurs montrent que la dégradation par photolyse de la carbamazépine est très dépendante des matières présentes en suspension.

En effet, les matières organiques naturelles (MON) présentes dans l'eau modifient la dégradation photochimique de la carbamazépine. Une faible concentration de MON accélère

la dégradation par la formation d'espèces réactives comme l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène. Toutefois, à une concentration plus élevée en MON, la dégradation diminue. Les MON peuvent ainsi selon la concentration agir comme filtre aux UV ou en tant que précurseur d'espèces réactives.

### **6.1.3. L'éthinyl-estradiol**

Chez la femme, l'éthinyl-estradiol est excrété dans les urines sous forme de glucuronides. Certaines bactéries sont capables de régénérer l'éthinyl-estradiol à partir du conjugué éthinyl-estradiol-glucuronide (Okkerman *et al.*, 2001). Cette hormone de synthèse est basique et non polaire. Elle a tendance à s'adsorber aux particules en suspension (Kuster *et al.*, 2004, Fent *et al.*, 2006). Elle forme aussi des liens avec les acides humiques et fulviques et avec les particules minérales présentes dans l'eau (Yu *et al.*, 2004). Cette molécule peut alors être transportée sur de longues distances avant de sédimenter avec les particules.

Lorsque l'éthinyl-estradiol est fixé aux acides humiques, la biodégradation aérobie est plus efficace, mais l'élimination de cette substance est surtout due à l'hydrolyse et la photodégradation (Kuster *et al.*, 2004 ; Urase et Kikuta, 2005).

## **6.2. Devenir et dégradation dans les sols**

Le devenir des médicaments dans les sols et les sédiments est fonction de leurs propriétés physico-chimiques mais aussi des facteurs du milieu : la température, le pH, la capacité d'échange cationique (CEC), la richesse en argile et en matières organiques du sol (Boxall *et al.*, 2004).

### **6.2.1. L'ibuprofène**

Dans l'étude de Oappel *et al.* (2004), les auteurs ont démontré que l'ibuprofène est adsorbé aux particules des sols ayant pour pH 5,8 et 2,9. Et selon Ternes (1998) et Winkler *et al.* (2001) ce composé n'est pas retrouvé dans les eaux de lixiviation ce qui confirme sa forte fixation. Les concentrations en argiles et matières organiques ont une influence sur le degré d'adsorption de l'ibuprofène sur le sol (Beausse, 2004).

Le principal facteur de dégradation de l'ibuprofène est la biodégradation par les microorganismes (Boxall *et al.*, 2004).



### 6.2.2. La carbamazépine

La carbamazépine est adsorbée sur le sol (Williams *et al.*, 2006). Le potentiel de lixiviation de cette molécule est faible. D'après Williams *et al.* (2006), la carbamazépine ne s'infiltré pas dans l'eau souterraine à partir des champs irrigués. Par contre, le potentiel de contamination des eaux de surface est possible si le sol subit une forte érosion. Dans ce cas, les solides du sol, sur lesquels la carbamazépine est adsorbée, sont entraînés dans les eaux de ruissellement et transportés dans les cours d'eau où la désorption peut se produire.

En revanche Ternes *et al.* (2002) ont constaté que la carbamazépine ne présentait aucune adsorption sur le sable et le gravier provenant des aquifères.

### 6.2.3. L'éthinyl-estradiol

Cette hormone est fortement adsorbée sur les particules solides et les sédiments du sol à pH neutre ou basique. Le degré d'adsorption est étroitement lié à la concentration en matières organiques dans le sol (Ying et Kookana, 2005). Les principaux processus de dégradation de cette hormone dans les sols et les sédiments sont la photolyse, l'hydrolyse et la biodégradation en conditions aérobies et anaérobies (Okkerman et Groshart, 2001 ; Kuster *et al.*, 2004 ; Ying et Kookana, 2005). D'après Ying et Kookana (2005), l'hormone est plus longtemps présente en milieu anaérobie par rapport à son homologue naturel (l'oestradiol).

Ces observations indiquent que le devenir et la dégradation des trois médicaments choisis - ibuprofène, carbamazépine et éthinyl-estradiol - sont tributaires des conditions du milieu. De plus ces molécules sont persistantes dans l'environnement car selon le règlement n° 1907/2006 Annexe XIII du 18/12/06 de l'Institut National de l'Environnement Industriel et ses Risques (INERIS, sous la tutelle du Ministère de l'Ecologie), une substance remplit le critère de persistance lorsque la demi-vie en eau douce est supérieure à 40 jours ou lorsque la demi-vie dans les sédiments d'eau douce est supérieure à 120 jours.

## **7. Toxicité et impact environnemental de l'ibuprofène, la carbamazépine et l'éthinyl-estradiol sur la faune aquatique.**

Lors d'un discours sur les PPCPs dans l'environnement, K. Fent, professeur à l'Université des Sciences Appliquées de Muttens en Suisse s'interrogeait sur les effets écotoxicologiques aigus et chroniques déclenchés par les produits pharmaceutiques et les mélanges de ces derniers. Ce discours a été soutenu lors d'un congrès organisé par le Ministère de l'environnement du Canada en Mars 2007 (Kleywegt, 2007). Il s'est interrogé également sur les cibles biologiques de ces composés dans les organismes aquatiques.

Afin d'étudier cette toxicité, des tests en laboratoire ont été menés sur plusieurs espèces aquatiques végétales (algues), invertébrés (mollusques et arthropodes) et vertébrés (poissons). Les médicaments ont été utilisés seuls ou en mélange.

La toxicité peut être de trois types selon la durée d'exposition (Pellieux, 2008) :

- aiguë : exposition unique au toxique et observation dans les heures suivant l'administration,
- sub-chronique : exposition au toxique répétée pendant quelques semaines,
- chronique : exposition au toxique pendant une longue période allant de plusieurs mois à plusieurs années.

Ainsi, la toxicité de l'ibuprofène et de la carbamazépine est évaluée suivant cet ordre : toxicité aiguë (*cf.* §7.1), sub-aiguë (*cf.* §7.2) et enfin chronique (*cf.* §7.3). Les effets particuliers de l'éthinyl-estradiol ont été analysés séparément (*cf.* §7.4).

La toxicité est généralement exprimée à l'aide de l'indice  $EC_{50}$  pour Effective Concentration 50 qui indique la concentration pour laquelle la moitié des êtres vivants observés manifeste le critère choisi. On utilise cette valeur car selon la loi de Gauss c'est pour cette fraction de population que la marge d'erreur est la plus faible. La concentration obtenue permet de comparer les substances entre elles quant à leur potentiel toxique. En fonction de leur  $EC_{50}$ , les composés peuvent être séparés en cinq catégories selon la directive européenne 93/67/EEC (Tableau 7.1). Un autre indice peut être utilisé, il s'agit de la  $LC_{50}$ . Cet indice correspond à la valeur pour laquelle 50 % des individus d'un échantillon sont tués.

**Tableau 7.1 : Classification des toxiques selon la Directive 93/67/EEC**

EC <sub>50</sub>	Classification
< 0,1 mg/L	extrêmement toxique
0,1 à 1 mg/L	très toxique
1 à 10 mg/L	toxique
10 à 100 mg/L	nuisible
> 100 mg/L	non toxique

### 7.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë s'observe après exposition unique d'un organisme à un composé et pendant un temps court (Pellieux, 2008). Un composé est administré à des doses croissantes à des organismes répartis en plusieurs groupes. L'apparition d'un critère choisi est étudiée (immobilisation, arrêt de la croissance, létalité, ...). On obtient alors un pourcentage de réponse s'échelonnant entre 0 et 100 %. La toxicité peut ainsi être exprimée à l'aide de l'indice EC<sub>50</sub>.

Les expériences réalisées sur sept organismes vivants différents sont répertoriées dans les Tableaux 7.2 et 7.3. Ces organismes sont les algues *Desmodesmus subspicatus* et *Lemna minor*, les petits crustacés *Thamnocephalus platyurus* et *Daphnia magna*, les moules *Elliptio complanata*, les poissons *Oryzias latipes* et *Oncorhynchus mykiss* puis le polype *Hydra attenuata*. Quelques photographies de ces organismes sont données en Annexe 4. Les modèles utilisés vont de la culture cellulaire à des organismes entiers. L'observation porte sur l'immobilisation ou l'inhibition de la croissance de l'organisme, mais aussi sur les effets intra-cellulaires.

Les données des tableaux 7.2 et 7.3 sont brièvement analysées ci-dessous.

La variation dans les modèles biologiques ainsi que dans les méthodes d'exposition utilisées explique sans doute les fortes variations des EC<sub>50</sub> ou LC<sub>50</sub>. Ainsi l'ibuprofène inhibe la croissance de *Desmodesmus subspicatus* à la concentration de 315 mg/L et immobilise les *Daphnia magna* à 108 mg/L. Il tue 50 % des *Thamnocephalus platyurus*, des *Hydra attenuata* et des *Oryzias latipes* à 19 mg/L, 22 mg/L et plus de 100 mg/L respectivement.

**Tableau 7.2 : Observation des effets toxiques aigus de l'ibuprofène et de la carbamazépine sur cinq espèces aquatiques**

Organismes testés	Effets observés	Durée des tests	Médicament	Toxicité observée	Références
<i>Desmodesmus subspicatus</i> (algue)	Inhibition de la croissance	72 heures	Ibuprofène	EC <sub>50</sub> = 315 mg/L	Cleuvers, 2003
			Carbamazépine	EC <sub>50</sub> = 74 mg/L	
			Carbamazépine + Acide clofibrique	Identique à la carbamazépine seule	
			Ibuprofène + Diclofénac	Synergie d'action	
<i>Daphnia magna</i> (crustacé)	Immobilisation	48 heures	Ibuprofène	EC <sub>50</sub> = 108 mg/L	Cleuvers, 2003
			Carbamazépine	EC <sub>50</sub> > 100 mg/L	Jos <i>et al.</i> , 2003
		48 heures	Carbamazépine + Acide clofibrique	Synergie d'action	
			Ibuprofène + Diclofénac	Synergie d'action	
<i>Elliptio complanata</i> (moule d'eau douce)	Activité cellulaire	24 heures	Ibuprofène	Inhibition des cyclooxygénases	Gagné <i>et al.</i> , 2005
			Carbamazépine	Augmentation de la phagocytose	Gagné <i>et al.</i> , 2006
Culture cellulaire d'hépatocytes d' <i>Oncorhynchus mykiss</i> (poisson)	Stress oxydatif	60 min	Ibuprofène	Aucune	Gagné <i>et al.</i> , 2006b
			Carbamazépine	Augmentation du taux NADPH	
		48 heures	Carbamazépine	Augmentation de la peroxydation lipidique	
<i>Hydra attenuata</i> (polype)	Régénération et alimentation	96 heures	Ibuprofène	Diminution de la régénération et de l'alimentation	Quinn <i>et al.</i> , 2008b
			Carbamazépine		

**Tableau 7.3 : LC<sub>50</sub> de l'ibuprofène et de la carbamazépine sur trois espèces aquatiques**

Organismes testés	Effets observés	Durée des tests	Médicament	Toxicité observée	Références
<i>Thamnocephalus platyurus</i> (Crustacé)	Létalité	24 heures	Ibuprofène	LC <sub>50</sub> = 19 mg/L	Kim <i>et al.</i> , 2009
			Carbamazépine	LC <sub>50</sub> > 100 mg/L	
<i>Hydra attenuata</i> (polype)	Létalité	96 heures	Ibuprofène	LC <sub>50</sub> = 22,3 mg/L	Quinn <i>et al.</i> , 2008b
			Carbamazépine	LC <sub>50</sub> = 29,4 mg/L	
<i>Oryzias latipes</i> (poisson)	Létalité	96 heures	Ibuprofène	LC <sub>50</sub> > 100 mg/L	Kim <i>et al.</i> , 2009
			Carbamazépine	LC <sub>50</sub> = 46 mg/L	

L'ibuprofène n'est pas toxique pour *Desmodesmus subspicatus*, *Daphnia magna* et *Oryzias latipes*. Mais il est nuisible pour *Thamnocephalus platyurus* et *Hydra attenuata* (Tableau 7.1).

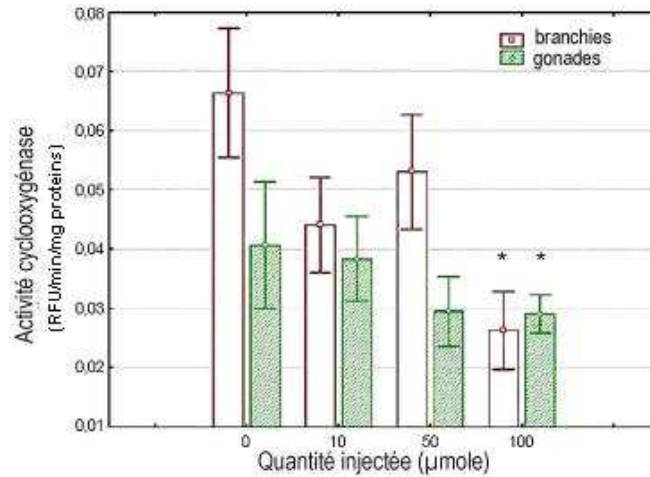
La carbamazépine inhibe la croissance de 50 % des *Desmodesmus subspicatus* à 74 mg/L et immobilise 50 % des *Daphnia magna* à plus de 100 mg/L. Cette molécule tue 50 % des crustacés *Thamnocephalus platyurus*, des polypes *Hydra attenuata* et des poissons *Oryzias latipes* à plus de 100 mg/L, 29,4 mg/L et 46 mg/L respectivement. La carbamazépine est nuisible pour *Desmodesmus subspicatus*, *Hydra attenuata* et *Oryzias latipes*.

Des essais avec des mélanges de PPCPs ont été conduits avec les algues *Desmodesmus subspicatus*, exposées d'une part au mélange carbamazépine – acide clofibrrique et d'autre part au mélange ibuprofène – diclofénac pendant 72 heures (Cleuvers, 2003). L'acide clofibrrique est un médicament hypolipémiant retrouvé dans des rivières (Ahrer *et al.*, 2001 ; Öllers *et al.*, 2001) dont l'EC<sub>50</sub> pour immobiliser ces algues est de 115 mg/L. Le diclofénac est un AINS ayant pour EC<sub>50</sub> 72 mg/L. Dans le premier cas, mélange carbamazépine – acide clofibrrique, la toxicité est identique à la toxicité de la carbamazépine seule. Alors que dans le deuxième cas, l'inhibition de la croissance des *Desmodesmus* est plus importante : il y a une synergie d'action entre l'ibuprofène et le diclofénac. Ceci montre que la toxicité peut être augmentée même si la toxicité aiguë d'une substance unique est faible.

De même, des *Daphnia* ont été soumises au même mélange de médicaments que *Desmodesmus*, carbamazépine - acide clofibrrique et ibuprofène – diclofénac (Cleuvers, 2003). Les effets toxiques observés sont plus importants que lorsque les substances sont étudiées séparément.

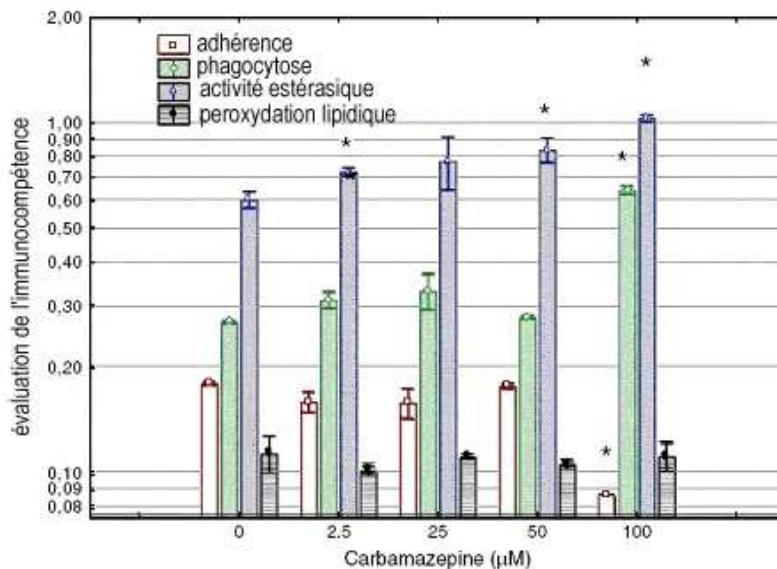
Selon certains scientifiques (Fent *et al.*, 2006), pour cibler la toxicité aiguë *in vivo* des produits pharmaceutiques, l'utilisation de cellules s'avère être un choix judicieux. Ainsi après avoir observé la toxicité aiguë sur des organismes entiers, qu'en est-il de celle-ci à l'échelle cellulaire ?

Des moules d'eau douce sont exposées à de l'ibuprofène pendant 24 heures à des concentrations croissantes jusqu'à 100 µmoles par injection dans le muscle adducteur (Gagné *et al.*, 2005). L'observation des branchies et des gonades indique qu'il y a eu diffusion du médicament dans les tissus car l'activité des COX a diminué (Figure 7.1). Ce résultat montre que les AINS sont capables de réduire l'inflammation dans les moules.



**Figure 7.1 : Effets de l'ibuprofène sur l'activité des COX des moules (Gagné *et al.*, 2005)**

Dans une autre expérience, l'exposition de l'hémolymphe des moules *Elliptio complanata* à la carbamazépine à des concentrations croissantes allant de 0 à 100 µM pendant 24 heures (Gagné *et al.*, 2006b) engendre des modifications de l'activité immunitaire (Figure 7.2). L'activité immunitaire des hémocytes de la lymphe est surveillée par l'intermédiaire de quatre paramètres : l'adhérence, la phagocytose, l'activité estérasiqque et la peroxydation lipidique. L'adhésion cellulaire est réduite à partir de 61 µM, elle peut s'expliquer par la dépolarisation membranaire qu'induit la carbamazépine. À l'inverse, la phagocytose augmente à partir de la concentration de 61 µM. L'activité intracellulaire des estérases augmente dès 2,5 µM. Pour finir, la peroxydation lipidique n'est pas modifiée.



**Figure 7.2 : Effets de la carbamazépine sur l'activité immunitaire des hémocytes issus de *E. complanata* (Gagné *et al.*, 2006)**

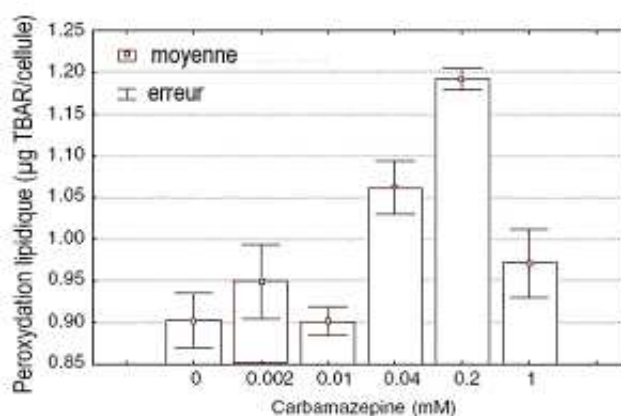
Malgré ces modifications, il en résulte que *in vitro* et à ces concentrations la carbamazépine n'entraîne pas d'immunosuppression chez la moule d'eau douce.

Les hépatocytes de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* sont exposés à 786 µg/L d'ibuprofène et 85 µg/L de carbamazépine séparément pendant 60 minutes (Gagné *et al.*, 2006b). Les résultats montrent que l'ibuprofène n'a pas d'effet sur le taux d'oxydation du NADPH mais l'exposition à la carbamazépine induit une forte élévation de ce taux (Tableau 7.4). Le NADPH ou Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate est utilisé par l'organisme pour se protéger contre les espèces réactives de l'oxygène et ainsi pallier au stress oxydatif. Les auteurs en déduisent que la carbamazépine initie le métabolisme oxydatif.

**Tableau 7.4 : Métabolisme oxydatif produit par les hépatocytes de truite en présence d'ibuprofène et de carbamazépine pendant 60 minutes (Gagné *et al.*, 2006b)**

Composé pharmaceutique	Taux d'oxydation du NADPH
Ibuprofène (786 µg/L)	1
Carbamazépine (85 µg/L)	84

De même, ces mêmes auteurs observent la peroxydation des lipides, autre marqueur du stress oxydatif, après exposition pendant 48 heures à des concentrations comprises entre 0 et 1 mM de carbamazépine. La peroxydation lipidique a significativement augmenté, traduisant l'apparition du stress oxydatif (Figure 7.3).








**Figure 7.3 : Peroxydation lipidique des hépatocytes après exposition à la carbamazépine pendant 48 heures pour des concentrations situées entre 0 et 1 mM (Gagné *et al.*, 2006b)**

Ces données suggèrent que la carbamazépine est toxique pour ces animaux aquatiques. Parmi les expériences relatant la toxicité aiguë des médicaments, celle de Quinn *et al.* (2008b) étudie la régénération du polype *Hydra attenuata*. Ce polype a la capacité de se régénérer

uniquement à partir de cellules souches multipotentes provenant de la région de l'estomac. Dix amas de ces cellules sont placés pendant 96 heures dans des puits contenant de l'ibuprofène ou de la carbamazépine à des concentrations croissantes. L'étude s'appuie sur les modifications morphologiques des polypes notamment sur l'observation des tentacules et du corps de l'animal. Un barème est établi, on parle de score allant de 0 à 10 (Tableau 7.5). Le score détermine l'état de l'organisme : 10 signifie que l'organisme est normal (tentacules et corps allongé), 8 que les tentacules sont arrondies aux extrémités (« clubbing »), à 6 elles sont raccourcies, à 5 c'est la phase tulipe (contraction complète du polype), à 2 la perte d'osmorégulation puis à 0 la désintégration. De 10 à 6, les phases sont réversibles, à l'inverse à partir d'un score inférieur ou égal à 5 les phases sont irréversibles et l'exposition est létale.

Avec chaque composé, le score décroît de 10 vers 0 plus la concentration augmente (Figure 7.4). A la concentration de 0,1 mg/L d'ibuprofène, la plupart des polypes sont au score 9. A partir de 5 mg/L la majorité est au score 7 et à la concentration en ibuprofène égale à 50 mg/L, tous les polypes restants sont morts (stade 0). La majorité des polypes exposés à la carbamazépine maintient un score supérieur à 8 jusqu'à la concentration 10 mg/L. Entre 10 et 50 mg/L, les polypes passent par le score 6 pour atteindre en grande partie les scores 1 et 3 qui sont irréversibles. Il en résulte que les polypes sont plus résistants à la carbamazépine qu'à l'ibuprofène.

**Tableau 7.5 : Score et observation de la toxicité des médicaments sur *Hydra attenuata* (Quinn et al., 2008b)**

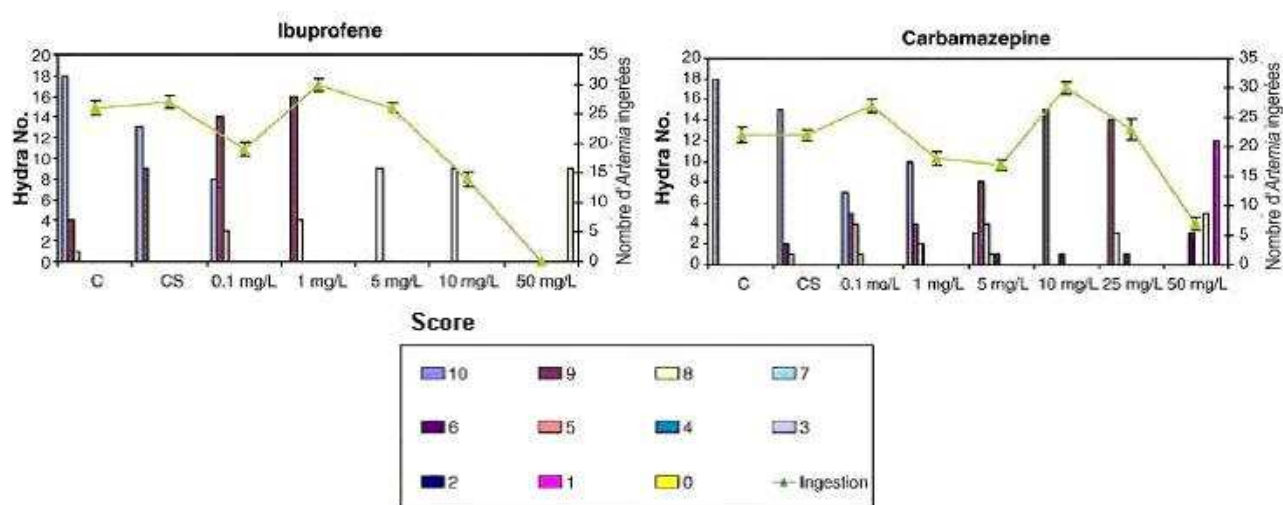
Score	Observations	
10	<i>Hydra attenuata</i> normale, tentacules déployées	
8	Premier signe d'intoxication : tentacules arrondies aux extrémités (« clubbing »)	
6	Tentacules raccourcies	
5	Forme tulipe	
0	Mort	



De plus, cette figure renseigne sur l'alimentation des polypes par le nombre d'*Artemia* ingérées en fonction des concentrations en médicaments présents. L'alimentation est représentée par la courbe et les triangles sur la Figure 7.4, légendée par « ingestion ». Elle diminue lorsqu'il y a passage à la morphologie correspondant au score inférieur ou égal à 8.

Ces résultats montrent que ces deux molécules ont des effets délétères sur le polype *Hydra attenuata*.

Ces expériences révèlent que l'exposition aiguë à ces composés entraîne des modifications parfois létales chez les organismes aquatiques étudiés. Cependant, pour obtenir ces réponses, les concentrations nécessaires sont de l'ordre du mg/L alors que dans les eaux celles-ci sont de l'ordre du ng/L.



**Figure 7.4 : Nombre d'Hydra à chaque "score de morphologie" et taux d'ingestion pour différentes concentrations d'ibuprofène et de carbamazépine. C : témoin, CS : témoin avec solvant (Quinn et al., 2008b)**

## 7.2. Toxicité subchronique

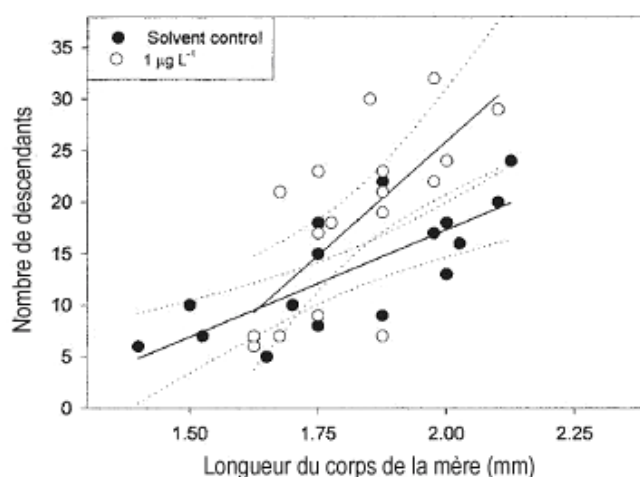
La toxicité subchronique s'observe après exposition répétée ou prolongée d'un organisme à un composé pendant plus de 96 heures et moins d'un mois (Pellieux, 2008).

Voici deux expériences rapportées dans la littérature qui suivent cette définition. La première étudie la croissance et la reproduction de *Daphnia pulex* en présence de carbamazépine en solution à des concentrations entre 1 et 200 µg/L pendant 14 jours. La seconde teste deux espèces à cette même molécule pendant 28 jours : le ver *Lumbriculus variegatus* et la larve de *Chironomus riparius* vivant dans les sédiments. Les résultats sont relatés dans le tableau 7.6.

**Tableau 7.6 : Expériences et résultats lors d'une exposition subchronique à la carbamazépine**

Organismes testés	Concentration en carbamazépine	Effets observés	Durée des tests	Toxicité observée	Références
<i>Daphnia pulex</i>	1 µg/L	Croissance et reproduction	14 jours	Maturité précoce et augmentation du nombre de descendants	Lurling <i>et al.</i> , 2006
	200 µg/L			Baisse du taux de croissance	
<i>Lumbriculus variegatus</i>	0,625 à 10 mg/kg	Reproduction	28 jours	Pas d'effet	Oetken <i>et al.</i> , 2005
<i>Chironomus riparius</i>	0,16 à 100 mg/kg	Développement et ratio entre les sexes		Blocage de l'évolution au stade nymphe	

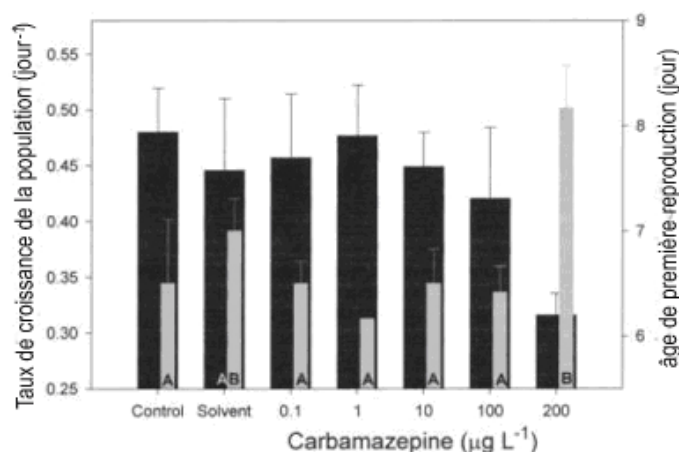
Dans l'étude de Lurling *et al.* (2006) des *Daphnia pulex* sont exposées à la carbamazépine aux concentrations allant de 1 à 200 µg/L pendant 14 jours. Ces concentrations sont proches de celles retrouvées dans l'environnement (Annexe 2). Les Daphnies femelles exposées à une concentration de 1 µg/L de carbamazépine présentent une maturité précoce et ont plus de descendants que celles de même taille plongées dans la solution témoin sans carbamazépine (Figure 7.5). Par exemple, une mère de 2 mm dans la solution témoin a entre 12 et 18 descendants. En revanche, une mère de 2 mm exposée à 1 µg/L de carbamazépine a entre 21 et 32 descendants.



**Figure 7.5 : Nombre de descendants en relation avec la taille du corps de la mère *Daphnia pulex* dans une solution de carbamazépine à 1 µg/L (Lurling *et al.*, 2006)**

D'après les auteurs, il reste à résoudre si cette observation est maintenue *in vivo* lorsque les conditions environnementales interviennent comme le stress lié à la recherche d'aliments ou les variations de température.

Lors de l'exposition à la concentration la plus élevée de cette expérience, soit 200 µg/L de carbamazépine, le taux de croissance de la population est réduit (Figure 7.6). Ce taux est un tiers inférieur par rapport à celui de la solution témoin (contrôle). Si bien que la maturité tarde à apparaître, engendrant un âge de première reproduction plus élevé.



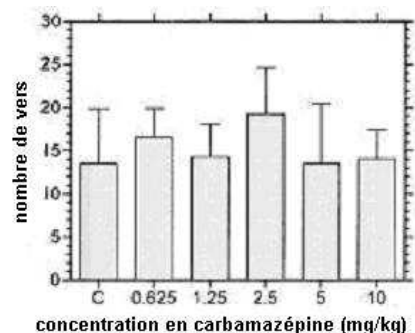
**Figure 7.6 : Taux de croissance de la population (barres noires) et âge de première reproduction de *Daphnia pulex* (barres grises) en présence de carbamazépine à différentes concentrations (Lurling *et al.*, 2006)**

Par conséquent cela indique qu'une exposition de plusieurs jours à de faibles concentrations en résidus pharmaceutiques a une incidence sur *Daphnia*. En comparaison, la concentration en carbamazépine est ici 500 fois plus faible que celle obtenue pour immobiliser 50 % des *Daphnia magna* en 24 ou 48 heures (Clevers, 2003 ; Jos *et al.*, 2003).

La plupart des études consacrées aux effets des résidus pharmaceutiques sur la faune aquatique sont réalisées avec une exposition « aqueuse » aux composés. Mais des organismes vivants sont aussi en relation avec les sédiments, ce sont les animaux benthiques. C'est pour cela qu'une expérience a été réalisée avec deux animaux benthiques : le ver *Lumbriculus variegatus* et la larve *Chironomus riparius*. Ces deux invertébrés d'eau douce ont été exposés pendant 28 jours à des sédiments contenant de la carbamazépine (Oetken *et al.*, 2005).

Les *Lumbriculus variegatus* ont été exposés à des sédiments contenant entre 0,625 et 10 mg/kg de carbamazépine pendant 28 jours. À la fin de l'essai, la reproduction et la

biomasse sont observées. Au 28<sup>ème</sup> jour, on observe que le nombre moyen de vers varie entre 14 et 19 lors d'une exposition à la carbamazépine, contre 13 dans le témoin (Figure 7.7).



**Figure 7.7 : Nombre de vers *Lumbriculus variegatus* au 28<sup>e</sup> jour d'exposition à la carbamazépine (C : témoin) (Oetken *et al.*, 2005)**

La variation n'est pas importante. Par conséquent, la carbamazépine dans les sédiments n'a pas d'effets sur la reproduction de *L. variegatus*.

Par les mêmes auteurs, la larve *Chironomus riparius* est exposée à des sédiments contenant entre 0,16 et 100 mg/kg de carbamazépine pendant 28 jours. Les observations portent sur le développement et le ratio entre les sexes. A la fin de l'expérience, une forte chute du développement s'observe : le taux de développement passe à 47 % à la concentration 4 mg/L, contre 92 % dans le témoin (Tableau 7.7). De plus, aux concentrations les plus élevées, soit 20 et 100 mg/kg, aucune larve ne s'est développée.

**Tableau 7.7 : Développement de *Chironomus riparius* après 28 jours d'exposition à la carbamazépine (Oetken *et al.*, 2005)**

	Témoin	Carbamazépine (mg/kg)				
		0,16	0,8	4	20	100
Développement (%)	92	89	91	47	0	0

Cet arrêt de développement s'explique par le blocage des larves de *C. riparius* au stade de la nymphe. Les insectes survivent jusqu'à quatre semaines sans subir la nymphose puis meurent. La suppression de la nymphose s'explique probablement par une interférence de la carbamazépine avec un mécanisme à cette étape de la vie ou par la modulation d'une fonction endocrinienne. Dans ce cas, les auteurs concluent que cette molécule constitue non seulement un danger pour ces larves mais pourrait l'être également pour d'autres insectes aquatiques. De toute évidence, cette hypothèse mériterait d'être étudiée expérimentalement.

D'autre part, dans toutes les expériences sur *C. riparius* il s'est révélé que la carbamazépine n'a pas d'influence sur le ratio des sexes des larves (Oetken *et al.*, 2005).

Ainsi la carbamazépine, en plus d'avoir une toxicité aiguë sur ces larves, possède un effet toxique significatif lors d'une exposition plus longue : blocage de la nymphose et donc de l'évolution. Concernant les résidus médicamenteux dans les sédiments, une seule étude est disponible à ce jour (Furlong *et al.*, 2004). Elle rapporte 4,16 mg/kg de carbamazépine en moyenne parmi 44 échantillons. Par conséquent, ce médicament peut présenter un risque pour la survie de certaines espèces benthiques.

Toutefois, pour observer des effets toxiques lors de l'exposition « aqueuse » sub-chronique à cette molécule, les concentrations nécessaires ont été plus élevées que celles observées dans l'environnement (Annexe 2).

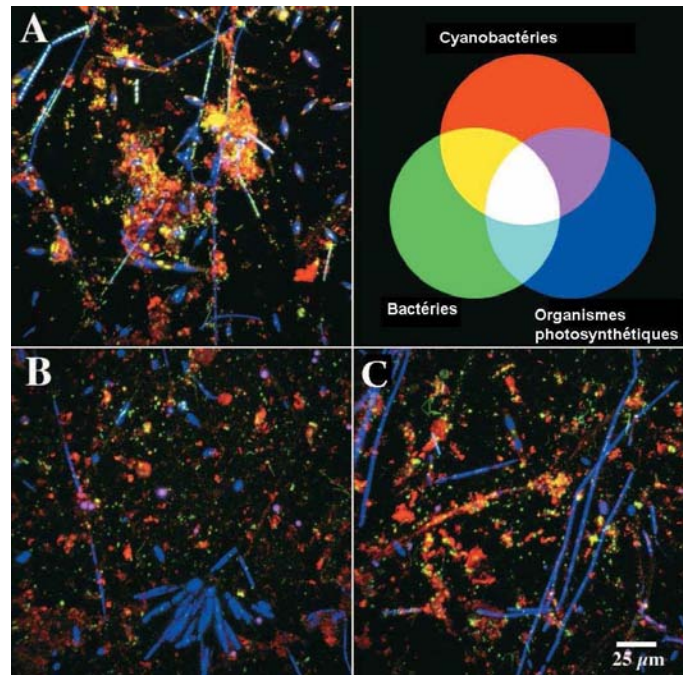
### **7.3. Toxicité chronique**

La toxicité chronique s'observe après l'administration répétée d'une substance à concentration constante pendant une période supérieure à un mois (Pellieux, 2008). Elle permet d'évaluer la latence dans l'apparition des effets, la nature de ces effets (modifications des fonctions et organes atteints), les effets cancérigènes et si il y a accumulation de composés dans l'organisme.

Malheureusement parmi les trois molécules d'intérêt, seulement deux essais ciblant la toxicité chronique sur les organismes aquatiques semblent disponibles. La première publication porte sur l'exposition à l'ibuprofène et à la carbamazépine des biofilms d'une rivière (Lawrence *et al.* 2005), l'autre publication concerne l'exposition de poisson Tête de boule ou *Pimephales promelas* à un mélange de médicaments (Parrott et Bennie, 2009).

Dans l'expérience de Lawrence *et al.* (2005), les biofilms se développent dans des bioréacteurs contenant l'eau de la rivière d'origine avec les sources en carbone et nutriments. Ces biofilms sont disposés sur des lames amovibles en polycarbonate afin de les observer au microscope. L'ibuprofène et la carbamazépine ont été ajoutés en permanence aux réacteurs en utilisant des pompes à seringue pour obtenir une concentration constante de 10 µg/L pendant 8 semaines.

En fin d'expérience, la structure des communautés est évaluée. L'analyse des biofilms sous l'influence de composés pharmaceutiques montre un changement dans l'architecture et les populations (Figure 7.8).



**Figure 7.8 : Photographies de biofilms exposés pendant huit semaines à la carbamazépine (B) et à l'ibuprofène (C) ; A : témoin (Lawrence *et al.*, 2005)**

La carbamazépine diminue fortement la masse des bactéries par rapport à l'ibuprofène. Ces deux molécules diminuent le nombre de cyanobactéries. Il y a une dominance des algues lorsque le biofilm est soumis à la carbamazépine (Figure 7.9). L'épaisseur traduit aussi des changements dans la population des biofilms avec une moyenne de  $35 \pm 26 \mu\text{m}$ ,  $45 \pm 25 \mu\text{m}$  et  $36 \pm 30 \mu\text{m}$  pour respectivement le témoin, la carbamazépine et l'ibuprofène (Figure 7.9, B).

La Figure 7.10 illustre la distribution verticale des cellules vivantes et mortes dans l'épaisseur du biofilm et le rapport vivants sur morts (V/M). Le biofilm témoin a une moyenne V/M de 2,4, le taux étant plus important à la base du biofilm. En revanche, en présence de carbamazépine et d'ibuprofène, les moyennes V/M sont plus élevées 3,2 et 3,5 respectivement, malgré que la distribution reste cohérente.

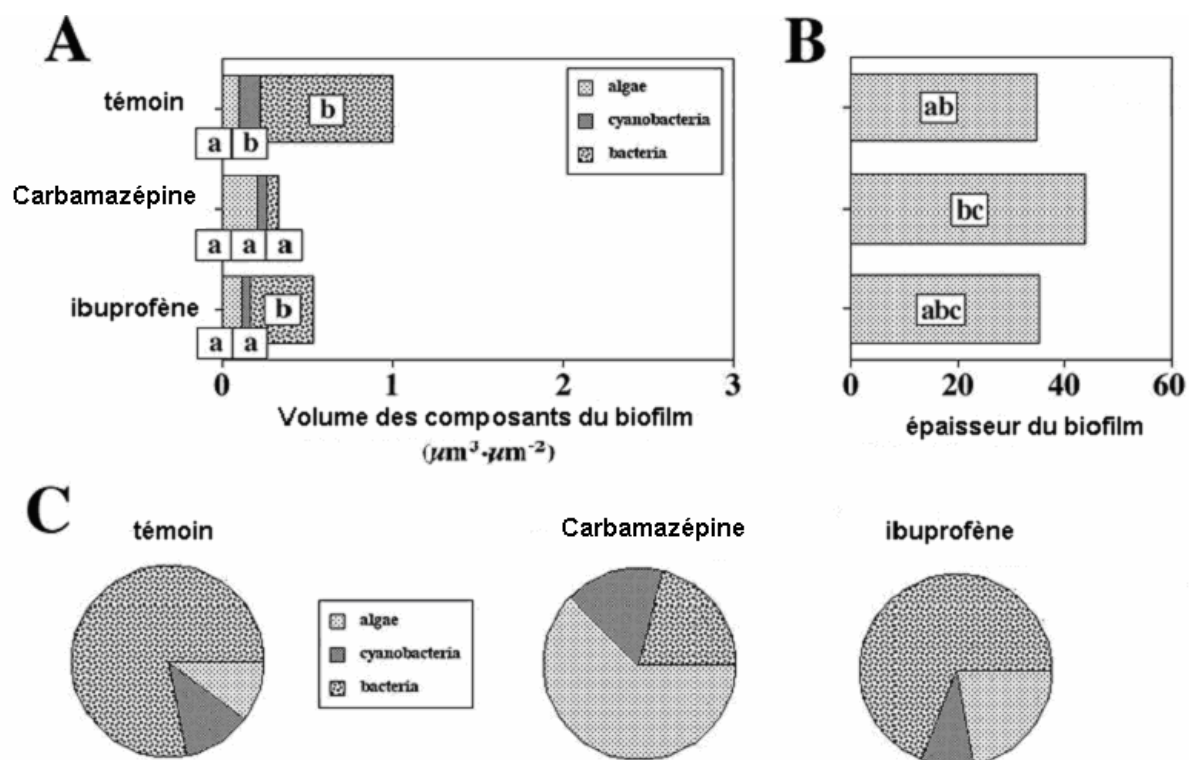


Figure 7.9 : Résultats obtenus après analyses des photographies illustrant les effets des composés médicamenteux sur les biofilms : (A) volume pour chaque composant, (B) épaisseur du biofilm, (C) répartition de chaque composant (Lawrence *et al.*, 2005)

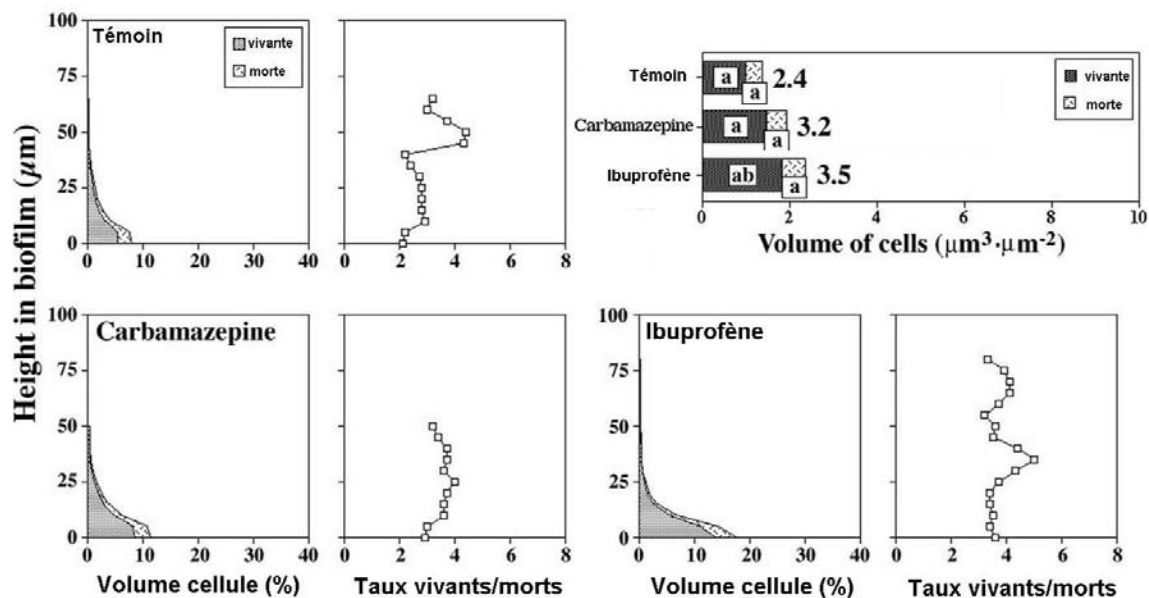
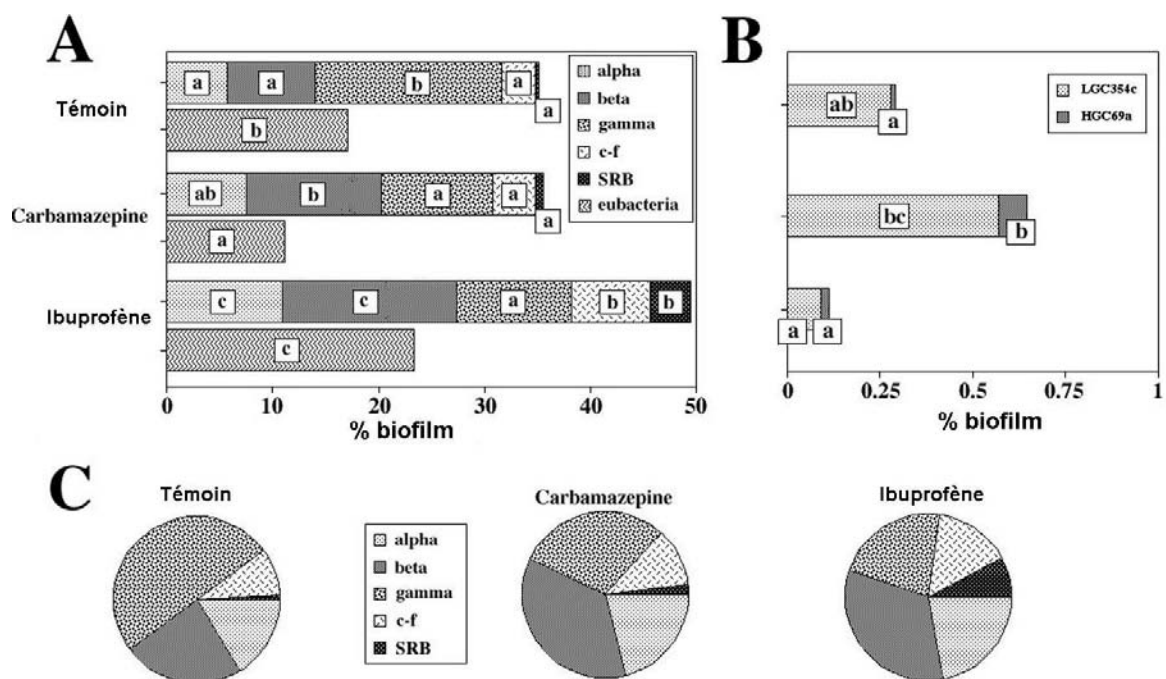


Figure 7.10 : Taux de cellules vivantes par rapport aux cellules mortes dans les biofilms (Lawrence *et al.*, 2005)

La méthode FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) indique que les molécules ont entraîné une importante augmentation des protéobactéries bêta, avec une diminution concomitante des protéobactéries gamma (Figure 7.11). Les Cytophage-flavobactéries (c-f) ont surtout augmenté dans le biofilm contenant de l'ibuprofène ainsi que les populations positives à la sonde SRB 385. Les sondes pour détecter les bactéries Gram positives à hauts ou bas segments GC contenus dans l'ADN (LGC354c et HGC69a) indiquent la présence de ces micro-colonies dans les biofilms. Elles représentent moins de 1 % mais d'importantes modifications sont observées. Il y a une augmentation des deux communautés en présence de carbamazépine et une diminution en présence d'ibuprofène.

Ces modifications indiquent une restructuration des biofilms. Certains microorganismes meurent, d'autres prennent leur place. Cette étude laisse à penser que les médicaments injectés induisent ces modifications. Or il est possible que l'ibuprofène et la carbamazépine aient une action sur certains micro-animaux qui vivent dans ces biofilms et se nourrissent de ceux-ci, comme les rotifères et les vorticelias. Dans ce cas, la disparition ou l'altération d'un de ces organismes expliquerait la modification du biofilm.



**Figure 7.11 : Résultats de l'analyse par méthode FISH renseignant sur la composition des biofilms (Lawrence *et al.*, 2005)**



Dans l'expérience de Parrott et Bennie (2009), les poissons Tête de Boule ou *Pimephales promelas* sont exposés pendant plus de 60 jours à un mélange de cinq composés pharmaceutiques : un fibrate (le gemfibrozil), l'acide salicylique (kératolytique ou antipyrétique) et trois AINS (le naproxène, le diclofénac et l'ibuprofène). Les concentrations choisies pour réaliser cet essai sont de l'ordre du dixième de microgramme par litre (0,217 µg/L pour l'ibuprofène). Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas eu de changements dans la croissance et le développement des poissons par rapport au témoin. Il n'y a pas eu d'effets sur les caractères sexuels secondaires des poissons ou sur la production d'œufs. L'exposition chronique à ces médicaments à des concentrations semblables à celles observées dans l'environnement n'affecterait pas la survie de ces poissons, ni leur reproduction.

Les résultats indiquent que ces résidus médicamenteux entraînent sur le long terme des variations dans la composition des biofilms aquatiques mais qu'ils n'ont pas d'effets sur *Pimephales promelas*. La survie des poissons ne serait pas touchée, mais qu'en est-il des espèces qui se nourrissent de ces biofilms ? Il y a de ce point de vue un manque de données concernant la toxicité chronique des résidus pharmaceutiques sur la faune et la flore aquatique.

## 7.4. Particularité de l'éthinyl-estradiol sur les espèces aquatiques

Les effets de l'éthinyl-estradiol (EE2) ont été analysés séparément car l'exposition à cette molécule entraîne deux grandes conséquences particulières sur les poissons : la féminisation et des effets délétères sur la reproduction.

Parmi les trois molécules sélectionnées pour réaliser ce travail, l'éthinyl-estradiol semble être la molécule la plus toxique envers les espèces aquatiques étudiées. Une LC<sub>50</sub> de 9,06 mg/L est déterminée pour le crustacé *Daphnia magna* après exposition pendant 48 heures à l'éthinyl-estradiol (Halling-Sorensen *et al.*, 1998). D'après le Tableau 7.1 cette molécule est classée comme toxique pour cette espèce.

Pour comparer la sensibilité des espèces à l'éthinyl-estradiol, la CME0 est utilisée. C'est la concentration minimale pour avoir un effet observable. Les CME0 sur trois poissons sont renseignées dans le tableau 7.8.

**Tableau 7.8 : CME0 de *Oncorhynchus mykiss*, *Pimephales promelas* et *Oryzias latipes* exposés à l'EE2**

Organismes testés	Effets observés	Durée des tests	Toxicité observée	Références
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truite arc-en-ciel)	Induction du vitellus chez la truite immature et la truite mâle	10 jours à 10°C	CME0 = 10 ng/L	Okkerman <i>et al.</i> , 2001
		10 jours à 16°C	CME0 = 0,1 ng/L	
<i>Pimephales promelas</i> (poisson tête-de-boule)	Diminution de la reproduction	28 jours	CME0 = 10 ng/L	Webb, 2001
<i>Oryzias latipes</i> (poisson médaka)	Modification du sexe	90 jours	CME0 = 0,03 ng/L	Carlsson <i>et al.</i> , 2006

Dans l'étude de Okkerman *et al.* (2001), après exposition de 10 jours à 10 ng/L d'EE2 à 10°C, il y a eu induction de la vitellogenèse chez la truite immature et chez la truite mâle. A 16°C, les mêmes observations ont été remarquées mais pour une concentration de 0,1 ng/L. La concentration minimale pour observer une diminution de la reproduction de *Pimephales promelas* après 28 jours d'exposition est de 10 ng/L (Webb, 2001). La concentration qui engendre une modification du sexe des *Oryzias latipes* est de 0,03 ng/L après 90 jours d'exposition (Carlsson *et al.*, 2006). Cette modification du sexe se traduit par la présence de testicules et d'ovaires dans un même individu.

Okkerman *et al.* (2001) expliquent que la concentration prévisible qui n'entraîne pas d'effets sur les poissons serait de 0,05 ng/L. Pour calculer celle-ci, ils ont utilisé la CMEO minimale observée, soit 0,1 ng/L, et lui ont ajouté un facteur de sécurité de l'ordre de 50. Ils obtiennent 0,05 ng/L. Cependant, dans l'étude de Carlsson *et al.* (2006), les caractères sexuels secondaires féminins sont apparus après exposition pendant 90 jours à 0,03 ng/L. Par conséquent, la concentration prévisible qui n'entraîne pas d'effets devrait être réévaluée car elle n'est pas valable pour tous les poissons.

Les concentrations d'éthinyl-estradiol relevées dans les eaux de surface (*cf.* Annexe 3) sont généralement plus élevées que les concentrations minimales qui entraînent des altérations du développement et de la reproduction chez les poissons. Par conséquent, cette molécule peut entraîner des déséquilibres du système endocrinien chez ces espèces dans leur milieu naturel.

## 8. Conclusion

Les médicaments sont utilisés en grande quantité à travers le monde. Dans les pays développés, la consommation progresse chaque année. A la suite de leur administration, les médicaments sont en partie excrétés via les fèces et les urines, ils atteignent les stations d'épuration par le réseau de collecte des eaux usées. Ils peuvent passer au travers des traitements de dépollution et se retrouver dans l'environnement. D'autres sources des médicaments à l'environnement sont l'agriculture, l'aquaculture ou le rejet des médicaments non utilisés dans le réseau d'eaux usées.

Les prélèvements effectués dans divers endroits confirment la présence de résidus médicamenteux dans les eaux. Cependant, les concentrations relevées dans l'environnement varient considérablement d'un site à l'autre. Ces disparités se justifient par des consommations différentes selon les pays, des moyens de dépollution inégaux selon les stations d'épuration et par le choix des méthodes analytiques.

L'étude des caractéristiques physico-chimiques des molécules est intéressante pour comprendre la stabilité des médicaments dans l'environnement. Dans ce travail, les trois molécules sélectionnées – ibuprofène, carbamazépine et éthinyl-estradiol – possèdent des temps de demi-vie élevés dans les eaux, elles sont dites persistantes.

Nos connaissances actuelles sur les médicaments et les résidus médicamenteux dans les organismes aquatiques indiquent que des effets aigus sont peu probables, excepté en cas de déversements accidentels : les concentrations dans l'environnement sont beaucoup plus faibles que les  $LC_{50}$  ou les  $EC_{50}$  observées. Toutefois, quelques publications suggèrent qu'ils sont présents à des concentrations suffisantes pour causer des effets chroniques.

Malgré cela, l'utilisation des médicaments comme indicateurs potentiels de l'état de l'environnement peut être discuté. Étant donné que les méthodes d'analyses exploitées ne sont pas identiques, une concentration seuil ou « alarme » ne peut pas être déterminée. La mise au point de méthodes de référence pour mieux quantifier les substances à des concentrations aussi faibles que le nanogramme par litre pourrait être fondamentale.

Cette brève revue bibliographique ne devrait pas alarmer sur la présence et les effets des médicaments dans les eaux, mais fait la synthèse des connaissances actuelles. Du fait du recours essentiel des médicaments pour faire face aux maladies, il ne serait pas réaliste de s'attendre à une réduction de leur utilisation. Cependant des actions peuvent être mises en œuvre pour réduire leur rejet dans l'environnement, telles que :

- L'amélioration des techniques de traitement des eaux : l'utilisation de technologies comme l'ozonation ou la filtration sur charbon activé déjà utilisées dans le processus de potabilisation de l'eau. Néanmoins la mise en application est coûteuse et ne peut être réalisée sans que les résidus à éliminer des effluents ne soient déterminés avec précision.
- La meilleure gestion des eaux usées provenant des hôpitaux. Ces établissements sont déjà soumis à une réglementation qui oblige l'hôpital à respecter une certaine qualité d'eau rejetée, mais qui ne tient pas compte des résidus médicamenteux.
- L'utilisation avertie des médicaments en agriculture afin de réduire l'utilisation au strict nécessaire.
- Une plus importante considération du module 1.6 lors de l'étude du dossier de demande d'A.M.M. d'un médicament, intitulé « évaluation du risque environnemental ».
- Et en dernier lieu, la sensibilisation et l'éducation du public sur la collecte des médicaments non utilisés, périmés ou non, afin d'en sécuriser l'élimination. Comme le fait actuellement l'ensemble de la profession pharmaceutique par le biais de l'association Cyclamed et par la recommandation sur la notice « Les médicaments ne doivent pas être jetés au tout à l'égout ou avec les ordures ménagères. Demandez à votre pharmacien ce qu'il faut faire des médicaments inutilisés. Ces mesures permettront de protéger l'environnement ».

## 9. Bibliographie

- Adler P., Steger-Hartmann T., Kalbfus W. (2001). Distribution of natural and synthetic estrogenic steroid hormones in water samples from southern and middle Germany. Acta Hydrochim Hydrobiol **29**, 227-241.
- Alder A.C., Bruchet A., Carballa M., Clara M., Joss A., Löffler D., McArdell C.S., Miksch K., Omil F., Tuhkanen T., Ternes T.A. (2006). Consumption and occurrence. In: Ternes T.A., Joss A. (Eds.), *Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances : The Challenge of Micropollutants in Urban Water Management*. IWA Publishing, London, UK, 15–54.
- Alighardashi A., Pons M. N., Potier O. (2008). Présence et devenir des médicaments dans les eaux usées urbaines, une analyse bibliographique. J Water Sci **21**(4), 413-426.
- Ahrer W., Scherwenk E., Bichberger, W. (2001). Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. J Chromatogr A **910**(1), 69-78.
- Andreozzi R., Marotta R., Pinto G., Pollio A. (2002). Carbamazepine in water : persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. Water Res **36**(11), 2869-77.
- Andreozzi R., Raffaele M., Nicklas, P. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. Chemosphere **50**(10), 1319-30.
- Ashton D., Hilton M., Thomas K. (2004). Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. Sci Total Environ **333**(1-3), 167-184.
- Avdeef A., Box K.J., Comer J.E.A., Hibbert C., Tam K.Y. (1998). Determination of liposomal membrane–water partitioning coefficients of ionizable drugs. Pharmaceut. Res. **15**(2), 209–215.
- Baronti C., Curini R., D'Asenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Samperi R. (2000). Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge treatment plants and in a receiving river water. Environ Sci Technol, **34**(24), 5059-5066.
- Belfroid A. C., Van der Horst A., Vethaak A.D., Schafer A.J., Rijs G.B., Wegener J., Cofino W.P. (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. Sci Total Environ **225**(1-2), 101-8.
- Bendz D., Paxeus N.A., Ginn T.R., Loge F.J. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study : Hoje River in Sweden. J Hazard Mater **122**(3), 195-204.
- Bound J.P., Kitsou K., Voulvoulis N. (2006). Household disposal of pharmaceuticals and perception of risk to the environment. Environ Toxicol Pharmacology, sous presse.
- Boxall A., Kolpin D., Sørensen B., Tolls J. (2003). Are veterinary medicines causing environmental risks? Environ Sci Technol **37**, 286A-294A.
- Bruchet A., Hochereau C. Picard C., Decottignies V., Rodrigues J.M., Janex-Habibi M.L. (2005). Analysis of drugs and personal care products in French source and drinking waters : the analytical challenge and examples of application. Water Sci Technol **52**(8), 53-61.
- Brun G., Bernier M., Losier R., Doe K., Jackman P., Lee H.B. (2006). Pharmaceutically active compounds in atlantic canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. Environ Toxicol Chem **25**(8), 2163-76.

- Buser H.-R., Poiger T., Muller M. (1999). Occurrence and environmental behavior of chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and wastewater. Environ Sci Technol, **33**(15), 2529-2535.
- Carballa M., Omil F., Lema J. M., Llompart M., Garcia C., Rodriguez I., Gomez M., Ternes T. (2005). Behaviour of pharmaceuticals and personal care products in a sewage treatment plant of northwest Spain. Water Sci Technol **52**(8), 29-35.
- Carballa M., Omil F., Lema J.M. (2008). Comparison of predicted and measured concentrations of selected pharmaceuticals, fragrances and hormones in Spanish sewage. Chemosphere **72**(8), 1118-23.
- Carlsson C., Johansson A. K., Alvan G., Bergman K., Kuhler T. (2006). Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I : environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. Sci Total Environ **364**(1-3), 67-87.
- Cleuvers M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. Toxicol Lett **142**(3), 185-94.
- Cueva-Mestanza R., Sosa-Ferrera Z., Torres-Padron M., Santana-Rodriguez J. (2008). Preconcentration of pharmaceutical residues in sediment samples using microwave assisted micellar extraction coupled with solid phase extraction and their determination by HPL-UV. J Chromatogr B(863), 150-157.
- Daughton C.G., Ternes T.A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment : agents of subtle change? Environ Health Persp **107**(6), 907-938.
- Davies J., Spiegelman G.B., Yim G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. Curr Opin Microbiol **9**(5), 445-53.
- Devauchelle N., Barret J., Salaun G. (1997). La reproduction naturelle et contrôlée des Bivalves cultivés en France. Rapport du groupe de travail du 14 et 15 novembre 1995 à Nantes. IFREMER - DRV/RA/RST/97-1 1 Brest.
- Dorosz P. (2007). Guide pratique des médicaments, Ed. Maloine.
- Dorosz P. (2008). Guide pratique des médicaments, Ed. Maloine.
- Drewes J.E., Arnold R., Fox P. (2000). Fate of pharmaceutical chemicals during groundwater recharge using reclaimed water. In : Proceedings of Conference on Emerging Issues. National Groundwater Association, Westerville, Ohio, US.
- Ellis J.B. (2006). Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. Environ Poll **144**, 184-189.
- Fahlenkamp H., Hannich C.B., Möhle E., Nöthe T., Ries T. (2004). Input and removal of hazardous substances in municipal sewage treatment plants. Chem Ing Tech **76**(8), 1179–1189.
- Farré M., Ferre I., Ginebra A., Figueras M., Olivella L., Vilanova M. (2001). Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography mass spectrometry and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio Fischeri*. J Chromatogr A(938), 187– 97.
- Fent K., Weston A., Caminada D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquat Toxicol **76**(2), 122-159.
- Ferrari B., Paxeus N., Lo Giudice R., Pollio A., Garric J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters : study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. Ecotoxicol Environ Saf **55**(3), 359-70.
- Furlong E., Kinney C., Ferrer I., Werner S., Cahill J., Ratterman G. (2004). Pharmaceuticals and personal-care products in solids : Analysis and field results for sediment, soil and biosolid samples. Preprints of Extended Abstracts presented at the ACS National Meeting, American Chemical Society,. Division of Environmental Chemistry **44**, 1320–1323.

- Gagne F., Berube E., Fournier M., Blaise C. (2005). Inflammatory properties of municipal effluents to *Elliptio complanata* mussels - lack of effects from anti-inflammatory drugs. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **141**(4), 332-7.
- Gagne F., Blaise C., Andre, C. (2006a). Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Ecotoxicol Environ Saf **64**(3), 329-36.
- Gagne, F., Blaise C., Fournier M., Hansen P.D. (2006b). Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **143**(2), 179-86.
- Garcia-Martin E., Martinez C., Tabares B., Frias J., Agundez J.A. (2004). Interindividual variability in ibuprofen pharmacokinetics is related to interaction of cytochrome P450 2C8 and 2C9 amino acid polymorphisms. Clin Pharmacol Ther., **76**, 119-27.
- Godfrey E., Woessner W., Benotti, M.J. (2007). Pharmaceuticals in on-site sewage effluent and ground water, Western Montana. Ground Water **45**(3), 263-71.
- Halling-sorensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lutzhoft H.C., Jorgensen S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review. Chemosphere **36**(2), 357-393.
- Hanselman T., Graetz D., Wilkie A. (2003). Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants : a review. Environ Sci Technol, **37**(24), 5471-5478.
- Heberer T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment : a review of recent research data. Toxicol Lett **131**(1-2), 5-17.
- Huang et Sedlak (2001). Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. Environ Toxicol Chem **20**(1), 133-9.
- Johnson A.C., Belfroid A., Di Corcia A.D. (2000). Steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. Sci Total Environ **256**,163-173.
- Jones-Lepp T.L., Alvarez D.A., Englert B., Batt A.L. (2009). Pharmaceuticals and Hormones in the Environment. in Encyclopedia of Analytical Chemistry, Meyers R.A., John Wiley and Sons, 59.
- Jos A., Repetto G., Rios J.C., Hazen M.J., Molero M.L., Del Peso A., Salguero M., Fernandez-Freire P., Perez-Martin J.M., Camean A. (2003). Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints. Toxicol In Vitro **17**(5-6), 525-32.
- Kasim N.A., Whitehouse M., Ramachandran C., Bermejo M., Lennernäs H., Hussain A.S., Junginger H.E., Stavchansky S.A., Midha K.K., Shah V.P., Amidon G.L. (2004). Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. Mol Pharmaceut **1**, 85-96.
- Kanda R., Griffin P., James H.A., Fothergill J. (2003). Pharmaceutical and personal care products in sewage treatment works. J Environ Monit **5**, 823–830.
- Khan S.J., Ongerth J.E. (2004). Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations. Chemosphere **54**, 355–367.
- Kim I., Tanaka H. (2009). Photodegradation characteristics of PPCPs in water with UV treatment. Environ Int **35**(5), 793-802.
- Kim Y., Choi K., Jung J., Park S., Kim P.G., Park J. (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. Environ Int **33**(3), 370-5.
- Kim J.W., Ishibashi H., Yamauchi R., Ichikawa N., Takao Y., Hirano M., Koga M., Arizono K. (2009). Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater



- crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). J Toxicol Sci **34**(2), 227-32.
- Kleywegt S. (2007). Comptes rendus de l'atelier, Queen's Landing Inn, Niagara-on-the-Lake, Ontario, Canada, Du 5 au 7 mars 2007. ISBN 978-0-662-69950-7. No de cat. : En13-2/8-2007F.
- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurnman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. (2002). Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000 : a national reconnaissance. Environ Sci Technol **36**(6), 1202-1211.
- Kreuzinger N., Clara M., Strenn B., Kroiss H. (2004). Relevance of the sludge retention time (SRT) as design criteria for wastewater treatment plants for the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals from wastewater. Water Sci Technol **50**(5), 149-156.
- Kreuzinger N., Clara M., Strenn B., Vogel B. (2004). Investigation on the behaviour of selected pharmaceuticals in the groundwater after infiltration of treated wastewater. Water Sci Technol **50**, 221-228.
- Kuch H., Ballschmiter K. (2000). Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level. Fresenius J Anal Chem **366**(4), 392-5.
- Kuhne M., Ihnen D., Moller G., Agthe O. (2000). Stability of tetracycline in water and liquid manure. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med **47**(6), 379-84.
- Kümmerer 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**, 957-969.
- Kuster M., Lopez De Alda M.J., Barcelo D. (2004). Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. Analytical Chemistry **23**(10-11), 790-798.
- Länge R., Hutchinson T.H., Croudace C.P., Siegmund F., Schweinfurth H., Hampe P., Panter G.H., Sumpter J.P. (2001). Effects of the synthetic estrogen 17 $\alpha$  ethynylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environ Toxicol Chem **20**, 1216-1227.
- Leclercq M., Mathieu O., Gomez E., Casellas C., Fenet H., Hillaire-Buys D. (2009). Presence and fate of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites at wastewater treatment plants. Arch Environ Contam Toxicol **56**(3), 408-15.
- Lévy R.H., Mattson R.H., Meldrum B.S., Perucca E. (2002). Antiepileptic Drugs. Ed. Lippincott W&W., USA. 227-235.
- Lissemore L., Hao C., Yang P., Sibley P.K., Mabury S., Solomon K.R. (2006). An exposure assessment for selected pharmaceuticals within a watershed in Southern Ontario. Chemosphere **64**(5), 717-29.
- Liu R., Zhou J.L., Wilding A. (2004). Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. J Chromatogr A(1038), 19-26.
- Llorens E., Matamoros V., Domingo V., Bayona J.M., Garcia J. (2009). Water quality improvement in a full-scale tertiary constructed wetland : effects on conventional and specific organic contaminants. Sci Total Environ **407**(8), 2517-24.
- Loos R., Wollgast J., Huber T., Hanke G. (2007). Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. Anal Bioanal Chem **387**(4), 1469-78.

- Loos R., Locoro G., Contini S. (2010). Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS analysis. Water Res **44**(7), 2325-35
- Lurling M., E. Sargant, Roessink I. (2006). Life-history consequences for *Daphnia pulex* exposed to pharmaceutical carbamazepine. Environ Toxicol **21**(2), 172-80.
- Metcalfe C., Koenig B.G., Bennie D.T., Servos M., Ternes T.A. (2003). Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. Environ Toxicol Chem **22**(12), 2872-2880.
- Meylan W.M., Howard P.H., Boethling R.S. (1996). Improved method for estimating water solubility from octanol water partition coefficient. Environ Toxicol Chem **15**(2), 100-106.
- Meissl H., Ekström P. (1991). Action of gamma-aminobutyric acid (Gaba) in the isolated photosensory pineal organ. Brain Res **562**, 71-78.
- Newman M. C., Unger M.A. (2003). Fundamentals of Ecotoxicology, 2nd edition. Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- Oetken M., Nentwig G., Löffler D., Ternes T., Oehlmann J. (2005). Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine. Arch Environ Contam Toxicol **49**(3), 353-61.
- Okkerman P.C., Groshart C.P., Pijnenburg A. (2001). Chemical study of estrogens. Report no. 2001.028. National Institute for Coastal and Marine Management (RIKZ). The Hague, NL.
- Osada M., Mori K., Nomura T. (1992). In vitro effects of estrogen and serotonin release of eggs from the ovary of the scallop. Nippon Suisan Gakkaishi **58**, 223-227.
- Öllers S., Singer H.P., Fässler P., Müller R.S. (2001). Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. J Chromatogr A(911), 225-234.
- Palmer P. M., Wilson L.R., O'Keefe P., Sheridan R., King T., Chen C.Y. (2008). Sources of pharmaceutical pollution in the New York City Watershed. Sci Total Environ **394**(1), 90-102.
- Papoulias D.M., Noltie D.B., Tillitt D.E. (1999). An in vivo model fish system to test chemical effects on sexual differentiation and development: exposure to ethinylestradiol. Aquatic Toxicology **48**, 37-50.
- Parrott J.L. et Bennie D.T. (2009). Life-cycle exposure of fathead minnows to a mixture of six common pharmaceuticals and triclosan. J Toxicol Environ Health A **72**(10), 633-41.
- Paxeus N. (2004). Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine, beta-blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. Water Sci Technol **50**(5), 253-60.
- Pellieux N. (2008). Fiche toxicologique FT0, INRS, ISBN 978-2-7389-1647-1.
- Quaglino A., Craig-Veit C., Viant M., Erichsen A., Fry D., Millam J. (2002). Oral estrogen masculinizes female zebra finch song system. Horm Behav **41**, 236-241.
- Quinn B., Gagne F., Blaise, C. (2008a). The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuata*. Sci Total Environ **402**(1), 62-9.
- Quinn B., Gagne F., Blaise, C. (2008b). An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. Sci Total Environ **389**(2-3), 306-14.
- Rafols C., Roses M., Bosch E. (1997). A comparison between different approaches to estimate the aqueous pKa of several non-steroidal anti-inflammatory drugs. Anal Chim Acta **338**, 127-134.

- Rodriguez I., Quintana J.B., Carpinteiro J., Carro A.M., Lorenzo R.A., Cela R. (2003). Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as tertbutyldimethylsilyl derivatives. J Chromatogr A(985),265–274.
- Scheytt T., Mersmann P., Lindstadt R., Heberer T. (2005). Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments. Chemosphere **60**(2), 245-53.
- Schoenfuss H.L., Levitt J.T., Van Der Kraak G., Sorensen P.W. (2002). Ten-week exposure to treated sewage discharge has relatively minor, variable effect on reproductive behavior and sperm production in goldfish. Environ Toxicol Chem **21**, 2185-2190.
- Scholz S. and Gutzeit H.O. (2000). 17- $\alpha$ -ethinyloestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*oryzias latipes*). Aquatic Toxicology **50**, 363-373.
- Schulte-Oehlmann U., Bauer B., Fioroni P., Oehlmann J., Kalbfus W. (1997). The use of *Littorina littorea* for tributyltin (TBT) effect monitoring - Results from the German TBT survey 1994/1995 and laboratory experiments. Environ Pollut **96**(3), 299-309.
- Schulte-Oehlmann U., Markert B., Oehlmann J. (2001). Development of a biotest with *Marisa cornuarietis* (Gastropoda : Prosobranchia) for the assessment of environmental chemicals with sex hormone-mimicking effects. Final report for R&D project 297 65 001/04, Federal Environmental Agency, Berlin
- Schulte-Oehlmann U., Oetken M., Bachman J. et Oehlmann J. (2004). Effects of ethinyloestradiol and methinyltestosterone in prosobranch snails. In: Kummerer, K. (Ed.), Second edition, Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risks, Springer-Verlag, Berlin, 233-247.
- Schulz R., Liess M. (2001). Toxicity of aqueous-phase and suspended particle-associated fenvalerate: chronic effects after pulse-dosed exposure of *Limnephilus lunatus* (Trichoptera). Environ Toxicol Chem **20**, 185-190.
- Schultz I.R., Skillmen A., Nicolas J.M., Cyr D.G., Nagler J.J. (2003). Short-term exposure to 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol decreases the fertility of sexually maturing male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ Toxicol Chem **22**, 1272-1280.
- Spengler P., Körner W., Metzger J.W. (2001). Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. Chemical analysis. Environ Toxicol Chem **20**(10),2133-2141.
- Spengler P., Körner W., Bolz U., Schuller W., Hanf V., Metzger J.W. (2001). Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis. Environ Toxicol Chem **20**(10), 2142-51.
- Stuer-Lauridsen F., Birkved M., Hansen L.P., Holten Lutzhoft H.C., Halling-Sorensen B. (2000). Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. Chemosphere **40**(7), 783-793.
- Stumpf M., Ternes T.A., Wilken R.D., Rodrigues S.V., Baumann W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Sci Total Environ **225**, 135–141.
- Ternes T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, Water Res., **32**, 3245-3260.
- Ternes T.A. (2001). Pharmaceuticals and metabolites as contaminants of the aquatic environment. In: Daughton, C.G., Jones-Lepp, T. (Eds.), Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues. Symposium Series 791, American Chemical Society, Washington DC, 39–54.
- Ternes T.A., Bonerz M., Schmidt T. (2001). Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry". J Chromatogr A(938), 175–185.

- Ternes T.A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R.D., Servos M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. Investigations in Germany, Canada and Brazil. Sci Total Environ **225**, 81-90.
- Ternes T.A., Janex-Habibi M.L., Knacker T., Kreuzinger N., Siegrist H. (2004). Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse. Rapport final POSEIDON (EVK1-CT-2000-00047).
- Ternes T.A., Joss A. (2006). Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances. The Challenge of Micropollutants in Urban Water Management. IWA Publishing, London, ISBN 1843390930, 249.
- Thiele-Bruhn S. (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. J Plant Nutrition Soil Sci, 166(2), 145-167.
- Tixier C., Singer H., Oellers S., Muller S. (2003). Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surface waters. Environ Sci Technol **37**(6), 1061– 8.
- Van den Belt K., Verheyen R., Witters H. (2001). Reproductive effects of ethynylestradiol and 4t-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). Environ Cont Tox **41**, 458-467.
- Watabe Y., Kubo T., Nishikawa T., Fujita T., Kaya K., Hosoya K. (2006). Fully automated liquidchromatography-mass spectrometry determination of 17 $\beta$ -estradiol in river water. J Chromatogr A(1120), 252-259.
- WEBB S. (2001). A data bases perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals. Aquatic risk characterization. In: Kummerer, K. (Ed.), first edition, Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risks, Springer-Verlag, Berlin, 205-219.
- Wiegel S., Aulinger A., Brockmeyer R., Harms H., Loffler J., Reincke H., Schmidt R., Stachel B., Von Tumpling W., Wanke A. (2004). Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. Chemosphere **57**(2), 107-126.
- Yalkowsky S.H., Dannenfelser R.M. (1992). Aquasol database of aqueous solubility. Version 5, College of Pharmacy, University of Arizona ; Tuscon, AZ.
- Ying G.G., Kookana R.S., Dillon P. (2003). Sorption and degradation of selected endocrine disrupting chemicals in aquifer material. Water Research, **37**(15), 3785-3791.
- Ying G.G., Kookana R.S. (2005). Sorption and degradation of estrogen-like-endocrine disrupting chemicals in soil. Environ Toxicol Chem **24**(10), 2640-2645.
- Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli R. (2005). Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. J Hazard Mater **122**(3), 109–205.
- Zukowska B., Breivik K. Wania F. (2005). Evaluating the environmental fate of pharmaceuticals using a level III model based on poly-parameter linear free energy relationships. Sci Total Environ, **359**(1-3), 177-87

## 10. Annexes

**Annexe 1 : Concentrations d'ibuprofène dans différentes eaux**

Type d'eau analysée	Concentrations moyennes	Pays	Référence
Eaux usées	786 ng/L	Canada	Gagné <i>et al.</i> , 2006b
	3100 ng/L	n.c.	Ashton <i>et al.</i> , 2004
	100 to 800 ng/L	n.c.	Ashton <i>et al.</i> , 2004
	1300 ng/L	n.c.	Tixier <i>et al.</i> , 2003
	1500, 870, 850 ng/L	n.c.	Farré <i>et al.</i> , 2001
	920 ng/l	Brésil	Stumpf <i>et al.</i> , 1999
	1000 ng/L	USA	Palmer <i>et al.</i> , 2008
Moyenne dans les eaux usées	1158 ng/L		
Eaux de surface	20 ng/L	Allemagne	Gagné <i>et al.</i> , 2006a
	40 ng/L	Espagne	Llorenz <i>et al.</i> , 2009
	2 ng/L	Espagne	Llorenz <i>et al.</i> , 2009
	1,2 ng/L	Italie	Loos <i>et al.</i> , 2007
	6 ng/L	Danube	Loos <i>et al.</i> , 2010
	6,21 ng/L	Europe	Kümmerer, 2001
	2700 ng/l	Espagne	Kümmerer, 2001
	6 ng/L	Danube	Loos <i>et al.</i> , 2010
	35 ng/L	Danube	Loos <i>et al.</i> , 2010
Moyenne dans les eaux de surface	313 ng/L		
Eau potable	Traces	Allemagne	Heberer 2002

## Annexe 2 : Concentrations de carbamazépine dans différentes eaux



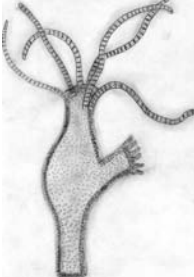



Type d'eau analysée	Concentrations moyennes	Pays	Référence
Eaux usées	85 ng/L	Canada	Gagné <i>et al.</i> , 2006b
	100 ng/L	USA	Palmer <i>et al.</i> , 2008
	635 ng/L	Allemagne	Heberer, 2002
	2,4 - 9,5 ng/L	France	Leclercq <i>et al.</i> , 2009
	235 ng/L	France	
	208 ng/L	France	
	416 ng/L	France	
	258 ng/L	France	
	146 ng/L	France	
	112 ng/L	France	
	33 ng/L	Canada	Gagné <i>et al.</i> , 2006b
	2300 ng/L	Canada	Metcalfé <i>et al.</i> , 2003
	1200 ng/L	France	Ferrari <i>et al.</i> , 2003
	980 ng/L	France	
	1030 ng/L	Grèce	
	300 ng/L	Italie	
	340 ng/L	Italie	
	500 ng/L	Italie	
840 ng/L	Suède		
6300 ng/L	n.c.	Ternes, 1998	
Moyenne dans les eaux usées	801,2 ng/L		
Eaux de surface	1 ng/L	USA	Lissemor <i>et al.</i> , 2006
	16,2+-3,0 ng/L		
	370 ng/L	Espagne	Llorenz <i>et al.</i> , 2009
	28 ng/L		
	9 ng/L 6,4ng/L	Italie	Loos <i>et al.</i> , 2007
	37 ng/L	Danube	Loos <i>et al.</i> , 2010
	2,5 ng/L	Europe	Kümmerer, 2001
	> 1075 ng/L	Allemagne	Heberer, 2002
	33 ng/L	Danube	Loos <i>et al.</i> , 2010
	37 ng/L	Danube	
	73 ng/L	Danube	
25 ng/L	Delta du Danube / Mer Noire		
Moyenne dans les eaux de surface	131,84 ng/L		
Eaux souterraines	0,17 ng/L	USA	Godfrey <i>et al.</i> , 2007
Eau potable	30 ng/L	n.c.	Ternes, 2001

### Annexe 3 : Concentrations d'éthinyl-estradiol dans différentes eaux









Type d'eau analysée	Concentrations moyennes	Pays	Référence
Eaux usées	traces	Brésil, Allemagne, Canada, Grande-Bretagne, Italie, Pays-Bas, USA	*
	17 ng/L	Allemagne	Stumpf <i>et al.</i> , 1999
	9 ng/L	Canada	Ternes <i>et al.</i> , 1999
	3 ng/L	Italie	Baronti <i>et al.</i> , 2000
	15 ng/L	Allemagne	Ternes <i>et al.</i> , 1999
	12 ng/L	Allemagne	Spengler <i>et al.</i> , 2001
Moyenne eaux usées	11,2 ng/L		
Eaux de surface	4,3 ng/L	Pays-Bas	Ternes <i>et al.</i> , 1999
	0,04 ng/L	Italie	Baronti <i>et al.</i> , 2000
	1,3 ng/L	Corée	Kim <i>et al.</i> , 2007
Moyenne eaux de surface	1.88 ng/L		
Eau potable	2,4 ng/L	Allemagne	Adler <i>et al.</i> , 2001

\* Belfroid *et al.*, 1999 ; Spengler *et al.*, 2001 ; Ternes *et al.*, 1998 ; Baronti *et al.*, 2000 ; Kuch et Ballschmiter, 2000 ; Johnson *et al.*, 2000 ; Adler *et al.*, 2001 ; Huang et Sedlak, 2001.

## Annexe 4 : Organismes testés

Organismes testés	
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	 <p><a href="http://www.butbn.cas.cz">http://www.butbn.cas.cz</a></p>
<i>Lemna minor</i>	 <p><a href="http://www.homeophyto.com">http://www.homeophyto.com</a></p>
<i>Hydra attenuata</i>	 <p><a href="http://www.dan.shuttle.de">http://www.dan.shuttle.de</a></p>
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	 <p><a href="http://urzeitkrebse.sabrina-mueller.de">http://urzeitkrebse.sabrina-mueller.de</a></p>
<i>Oryzias latipes</i>	 <p><a href="http://133.39.75.130">http://133.39.75.130</a></p>
<i>Daphnia magna</i>	 <p><a href="http://www.mblaquaculture.com">http://www.mblaquaculture.com</a></p>



<p><i>Elliptio complanata</i></p>	 <p>Alan Cressler®</p>
<p>Hépatocyte d' <i>Oncorhynchus mykiss</i></p>	 <p><a href="http://www.scielo.br">http://www.scielo.br</a></p>
<p><i>Daphnia pulex</i></p>	 <p><a href="http://www.friendsofwarnhamlnr.org.uk">http://www.friendsofwarnhamlnr.org.uk</a></p>
<p><i>Lumbriculus variegatus</i></p>	 <p><a href="http://lbs144.tripod.com">http://lbs144.tripod.com</a></p>
<p><i>Chironomus riparius</i></p>	 <p><a href="http://www.rios-galegos.com/dipte27.jpg">http://www.rios-galegos.com/dipte27.jpg</a></p>
<p><i>Pimephales promelas</i></p>	 <p><a href="http://denr.sd.gov">http://denr.sd.gov</a></p>
<p><i>Carassius auratus</i></p>	 <p><a href="http://nas.er.usgs.gov">http://nas.er.usgs.gov</a></p>
<p><i>Marisa cornuarietis</i></p>	 <p><a href="http://www.petfish.net">http://www.petfish.net</a></p>



N° d'identification :

TITRE

**Les médicaments dans les eaux : présence et impact écotoxicologique.  
Exemple de trois molécules : ibuprofène, carbamazépine et éthinyl-estradiol**

Thèse soutenue le vendredi 1<sup>er</sup> Avril 2011

Par Olivier BAZARD

RESUME

La problématique environnementale concernant les médicaments est liée au fait qu'ils sont développés pour avoir des effets sur le vivant et qu'ils sont rejetés même en faible quantité dans l'environnement. La principale voie d'accès des médicaments à l'environnement est le rejet dans les eaux usées. Et l'élimination de ces composés dépend des installations des stations d'épuration.

Les trois molécules ciblées dans ce travail sont l'ibuprofène, anti-inflammatoire non stéroïdien ; la carbamazépine, antiépileptique ; et l'éthinyl-estradiol, contraceptif hormonal. Ces trois molécules sont persistantes dans l'environnement et ont été retrouvées à des concentrations de l'ordre du nanogramme par litre dans différentes eaux.

Plusieurs expériences ont été répertoriées afin d'étudier le possible impact sur la faune et la flore aquatique. Il en ressort que l'exposition aiguë à ces composés entraîne des modifications parfois létales chez les organismes aquatiques étudiés. Toutefois, pour obtenir ces réponses, les concentrations nécessaires sont souvent supérieures à celles retrouvées dans les eaux. Il y a encore actuellement un manque de données concernant la toxicité chronique des composés pharmaceutiques mais certaines études montrent des modifications dans la faune et la flore aquatique.

Ainsi, il est important de contribuer à la mise en œuvre d'actions permettant de réduire au maximum le rejet des médicaments dans l'environnement.

MOTS CLES : Médicaments, eau, environnement, ibuprofène, carbamazépine, éthinyl-estradiol

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Monsieur J.-C. BLOCK	Laboratoire de chimie physique et microbiologie pour l'environnement	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>

Thèmes

1 – Sciences fondamentales  
3 – Médicament  
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement  
4 – Alimentation – Nutrition  
6 – Pratique professionnelle