

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : *Santé Publique*

Par

**Lise CHARUAUD**

## **Résidus de médicaments vétérinaires dans les eaux destinées à la consommation humaine en zone d'élevage intensif** Cas de bassins versants bretons

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 19 décembre 2018

Unité de recherche : Inserm, École des Hautes Études en Santé Publique, Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail-Irset-Inserm UMR 1085

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Hélène Budzinski      Directeur de recherche CNRS - UMR CNRS 5805 EPOC – OASU - Bordeaux  
Yves Lévi              Professeur d'Université – UMR 8079 Université Paris sud CNRS AgroParisTech

### **Composition du Jury :**

	Prénom Nom	Fonction et établissement d'exercice (9)(à préciser après la soutenance)
Président :	Bernard Jégou	Directeur de la recherche – EHESP –Irset Inserm UMR 1085
Examineurs :	Yves Lévi	Professeur d'Université – UMR 8079 Université Paris sud CNRS AgroParisTech
	Hélène Budzinski	Directeur de recherche CNRS - UMR CNRS 5805 EPOC – OASU - Bordeaux
	Benoît Roig	Professeur d'Université – CHROME EA 7352 –Université de Nîmes
Dir. de thèse :	Barbara Le Bot	Professeur, Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique
Co-dir. de thèse :	Emilié Jardé	Chargée de Recherche CNRS, UMR 6118 – CNRS Géosciences Rennes

# REMERCIEMENTS

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au Laboratoire d'Étude et de Recherche en Santé Environnement (LERES), rattaché au département Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR 1085 et à l'École des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP). Cette thèse a été développée dans le cadre d'un contrat avec l'Agence Française de la Biodiversité et la Région Bretagne, je remercie donc ces deux partenaires.

Je remercie également tous les autres partenaires du projet sans qui rien de cela n'aurait été rendu possible : l'Agence Régionale de la Santé (ARS) Bretagne, la Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL) Bretagne, la Société Publique Locale Eau du Bassin Rennais, Véolia, le Syndicat Mixte Arguenon-Penthièvre.

Merci à Hélène Budzinski et à Yves Lévi d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, et à Benoît Roig et Bernard Jégou pour avoir accepté d'être membres du jury de thèse.

Ensuite, je remercie mes deux directrices de thèse. Barbara, pour ta bienveillance et ta compréhension même quand je me laissais dépasser par mes émotions, pour ton recul avisé qui aura ouvert de nouvelles perspectives que je ne voyais pas de l'intérieur, pour tes efforts pour te rendre disponible malgré ton planning chargé, pour tes passages dans le bureau le soir ces derniers mois pour voir où en était le moral de tes deux doctorantes... Merci Emilie, pour ta toujours très grande disponibilité et ta réactivité hors du commun pour relire tous les documents envoyés, pour toutes les suggestions apportées qui ont largement enrichi ce travail et pour m'avoir fait découvrir ce domaine de la thèse qui m'était inconnu, les stanols.

Merci à toute l'équipe du LERES.

Fabien, pour tous tes apports précieux sur l'aspect analytique de ce travail, et ce depuis mon stage de Master 2, pour tes très solides connaissances qui m'auront permis de répondre à bien des questions, pour ta disponibilité « tu as 5 minutes... », pour ton talent de dénicheur de fautes d'orthographe, pour cette grande discussion cinéma décalé pendant notre trajet à Caen.

Delphine, pour tout l'aspect évaluation des performances de la méthode, sur lequel j'ai buté plus d'une fois avant de bien comprendre l'organisation des essais, les statistiques, les interprétations...

Marie-Florence, pour ta gentillesse et ta bonne humeur communicative, pour ton aide précieuse lors de cette fichue revue de la littérature, dont nous avons réussi à venir à bout !

Erwann, pour tes talents excel inégalés qui nous auront bien facilité le traitement des données, pour avoir pris le temps toi aussi de répondre à mes « tu as 5 minutes... » (et essayer d'obtenir des bières en échange ahah).

Catherine, qui bien que partie voguer vers d'autres horizons, m'aura tout appris du capricieux RRLC, avec pédagogie (déjà !) et patience.

Merci à aux unités microbiologie et chimie pour leurs analyses dans le cadre de ce travail.

Merci à toutes les personnes de l'accueil, Nathalie, Anne-Cécile, Anne, Martine, de m'avoir attendu quand je rentrais pile poil trois minutes avant la fermeture administrative avec mes mille glacières.

Merci à toute l'unité micropolluants pour leur bonne humeur et leurs blagues incessantes qui ont rendu les moments de manip' très savoureux !

Véronique pour ta douceur et ta réactivité pour les salles,

Ève pour nos incessantes batailles avec mes factures d'hôtel,

Merci à Dominique pour ton aide avec SMILE, que j'ai eu bien du mal à maîtriser n'étant pas une grande adepte de la technologie.

Merci Fleur, pour ton aide sur les multiples conventions, appels à projets, dossiers de financements...

Merci à tout le pôle terrain pour votre bonne humeur, votre gentillesse pour m'avoir laissé utiliser vos voitures sans avoir trop peur ? (peut-être que si vous aviez peur...). Je vous confie mes 20 glacières, prenez-en soin !

Merci à Malle, mon papa du labo, mon co-équipier de laverie (pas merci pour t'être moqué de moi quand je devais vider les eaux usées), pour les palets, pour « Zoizo », pour tes quelques passages quotidiens dans le bureau qui nous ont permis de maîtriser les Simpson à la perfection. Un ami de bureau, mais un ami en dehors du bureau aussi.

Last but not least, Quentin, le collègue phare, l'acolyte, l'équipier du projet sans qui il faut bien le dire, je ne serais pas venu au bout de cette thèse! Nous n'aurions pas pu avoir meilleur instinct en décidant de te choisir pour ce stage de Master 2, qui s'est transformé en contrat tant ta présence est vite devenue indispensable ! Du développement, des analyses et toujours avec le sourire et l'enthousiasme même dans les moments de rush (ce grand instant sur SMILE où il fallait rentrer tous les résultats...). On en aura fait des parties de tétis dans les congélateurs, et on en aura échangé des mails depuis mon bureau au RDC et ton bureau au 2<sup>e</sup>. Encore une fois, un grand merci pour tout.

Merci à tous les thésards.

A ceux avec qui j'ai partagé ce bureau au cours de ces trois années, Gaëlle, Alexis, Yanis et brièvement Jade. A notre immense plante, aux nombre incommensurable de cafetières que

l'on aura bu, aux partages de chansons et autres échanges culturels, aux partages des moments moins faciles aussi, aux questions partagées, merci.

Aux « anciens », Jean, Arnaud, Adé, Hugo pour les RU, Joe Dassin, les « de Tchernobyl », le comptage des poissons décédés dans l'aquarium, l'Amirautééééé, les « trop » nombreuses soirées au Dejaz'...

À Maxime, parce que tu auras eu la moins facile des thèses, mais que tu auras été jusqu'au bout !!

Merci à tous les autres.

Merci à ma famille qui bien qu'elle ne devait pas tout suivre posait toujours la question, et chez qui je pouvais me réfugier à l'improviste les week-ends.

Merci aux copains du lycée, pour avoir fait semblant de lire mon article, et pour avoir été présents bien que physiquement éloignés.

Merci à Loic « peuplier » toujours présent, à Benji pour les prises de news sans faille et les afterworks du danger, à Vivien pour m'avoir encouragé au quotidien dans la partie la plus difficile de cette thèse.

Merci à tous les copains rennais, à « Cap'Tab' », pour TOUT. Les moments, musicaux, moins musicaux, calmes, moins calmes. Votre présence aura été le meilleur des réconforts tout au long de ses trois ans.

Pour finir, merci à Maud et Manu, les piliers, le noyau dur, les soutiens indéfectibles, le trio magique ou infernal, que ce soit dans le partage de cette expérience doctorale ou dans le partage du reste, ce reste si important. À Rennes, à Botmeur, à Idanha a Nova, à Nantes, sur un rocher au petit matin à PISOES. À la poussière! Vous aime fort. Manu, une mention pour nos IPA hebdomadaires lors de cette dernière année, la première gorgée remède à tout, nos lubies et discussions pour faire le plein de courage, de marrade et d'amitié. Courage pour la fin.

# LISTE DES VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

Les travaux de recherche réalisés au cours de cette thèse ont fait l'objet de diverses valorisations : articles, communications.

## **ACL - Articles dans des revues internationales ou nationales avec comité de lecture répertoriées par l'AERES ou dans les bases de données internationales (ISI Web of Knowledge, Pub Med...).**

1. Charuaud L., Jardé E, Jaffrézic A, Thomas M-F, Le Bot B, Veterinary pharmaceutical residues from natural water to tap water: Sales, occurrence and fate, Journal of Hazardous Materials, Volume 361, 2019, Pages 169-186, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.075>.

## **ACTI - Communications avec actes dans un congrès international.**

1. Charuaud L., Jardé E., Jaffrézic A., Panaget T., Billon M., Le Bot B., Prioritisation of veterinary pharmaceuticals prior to a monitoring campaign: case of Brittany, an intensive husbandry area. ICRAPHE, September 8-9, 2016, Paris, France.
2. Charuaud L., Jardé E, Jaffrézic A, Panaget T., Billon M, Goyat Q, Mercier F, Le Bot B, Veterinary pharmaceutical residues in water resources and tap water in an intensive husbandry area in France, 6th Annual International Forum on Water , July 16-19, 2018, Athens, Greece

## **ACTN – Communications avec actes dans un congrès national.**

1. Charuaud L., Jardé E., Jaffrézic A., Panaget T., Billon M., Mercier F., Le Bot B., Résidus de médicaments vétérinaires dans les eaux destinées à la consommation humaine en zones d'élevage : Campagne exploratoire sur des bassins versants bretons. 22<sup>ème</sup> Journées Informations Eaux, 11-13 octobre, 2016, Poitiers.
2. Charuaud L., Jardé E., Jaffrézic A., Panaget T., Billon M., Mercier F., Le Bot B., Résidus de médicaments vétérinaires dans les eaux destinées à la consommation humaine en zones d'élevage : cas des bassins versants bretons. 22<sup>ème</sup> Journées Informations Eaux, 11-13 octobre, 2016, Poitiers

# SOMMAIRE

LISTE DES VALORISATIONS SCIENTIFIQUES .....	4
SOMMAIRE .....	5
LISTE DES FIGURES .....	9
LISTE DES TABLEAUX .....	11
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	13
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	16
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	20
1.1. Les résidus de médicaments vétérinaires de la ressource en eau à l'eau du robinet : ventes, occurrences et devenir dans les eaux.....	21
1.2. Synthèse bibliographique des outils de détermination de la contamination fécale dans les ressources en eau .....	40
1.2.1. Traceurs chimiques directs : Les stérols et les stanols fécaux .....	42
1.2.1.1. Les profils en stérols et stanols par espèce.....	43
1.2.1.2. Comportement des stanols dans l'environnement.....	46
1.2.1.3. Exploitation des « empreintes stanols » .....	47
1.2.1. Traceurs chimiques directs : Les acides biliaires .....	50
1.2.2. Traceurs chimiques indirects : les résidus pharmaceutiques.....	51
CHAPITRE 2 : MATÉRIELS & MÉTHODES .....	54
2.1. Méthodologie générale .....	54
2.2. Stratégie d'échantillonnage.....	55
2.2.1. La région Bretagne.....	55
2.2.1.1. Production d'eau potable en Bretagne et qualité de la ressource.....	55
2.2.1.2. Une terre d'élevage .....	58
2.2.2. Sélection des sites de prélèvements .....	59
2.2.2.1. La pression d'élevage .....	60
2.2.2.2. Les débits d'eau journaliers destinés à la production d'eau potable .....	62
2.2.2.3. Priorisation finale des sites.....	62
2.2.3. Définition des périodes et fréquences d'échantillonnage.....	63
2.2.4. Campagnes de prélèvements, protocole d'échantillonnage et paramètres analysés .....	68
2.2.4.1. Déroulement des campagnes de prélèvements .....	68

2.2.4.2.	Protocole d'échantillonnage .....	69
2.3.	Sélection des résidus de médicaments vétérinaires d'intérêt .....	71
2.3.1.	Liste initiale de résidus vétérinaires considérée .....	71
2.3.2.	Méthodologie du travail de hiérarchisation .....	73
2.3.2.1.	Le potentiel d'entrée dans l'environnement .....	74
2.3.2.1.1.	Cible animale et voie d'administration. ....	74
2.3.2.1.2.	Niveau de prescription des molécules. ....	76
2.3.2.2.	Potentiel de mobilité du sol vers l'eau .....	77
2.3.2.3.	La persistance des RMV dans le milieu aquatique .....	82
2.3.2.4.	Classement final des composés vétérinaires .....	84
2.3.2.5.	Métabolisme des RMV retenus .....	86
2.4.	Méthodes d'analyses de RMV .....	89
2.4.1.	Recherche bibliographique sur l'analyse des RMV .....	89
2.4.1.1.	Pré-traitement de l'échantillon et extraction des RMV .....	92
2.4.1.1.1.	Pré-traitement des échantillons .....	95
2.4.1.1.2.	Traitement de l'échantillon.....	95
2.4.1.2.	Séparation des RMV par chromatographie en phase liquide haute performance.....	98
2.4.1.3.	Détection par spectrométrie de masse en tandem .....	100
2.4.1.3.1.	L'ionisation: .....	101
2.4.1.3.2.	L'analyseur de masse.....	102
2.4.2.	Développement de la méthode d'analyse multi-résidus des RMV .....	105
2.4.2.1.	Pré-traitement des échantillons .....	105
2.4.2.2.	Optimisation de l'étape d'extraction.....	107
2.4.2.3.	Optimisation de la séparation chromatographique .....	110
2.4.2.4.	Optimisation de la détection .....	114
2.4.2.4.1.	Paramètres de la source d'ionisation.....	114
2.4.2.4.2.	Sélection des transitions.....	114
2.4.2.5.	Correction des effets matrices.....	119
2.4.2.6.	Composés exclus de la méthode d'analyse .....	119
2.4.3.	Contrôle qualité et performances de la méthode d'analyse.....	120
2.4.3.1.	Contrôle qualité de la méthode.....	120
2.4.3.2.	Evaluation des performances de la méthode .....	122
2.4.3.2.1.	La fonction d'étalonnage appliquée dans un domaine d'étalonnage.....	122
2.4.3.2.2.	L'exactitude de la méthode.....	124
2.4.3.2.3.	Essai inter-laboratoire.....	128

2.4.4.	Seconde méthode d'analyse des RMV .....	129
2.4.4.1.	Pré-traitement de l'échantillon .....	130
2.4.4.2.	Traitement de l'échantillon .....	130
2.4.4.3.	Séparation par chromatographie en phase liquide ultra haute performance .	131
2.4.4.4.	Détection par spectrométrie de masse en tandem .....	132
2.4.4.4.1.	Paramètres de la source d'ionisation .....	132
2.4.4.4.2.	Sélection des transitions.....	132
2.4.4.5.	Application sur échantillons réels .....	133
2.4.4.6.	Contrôle qualité de la méthode d'analyse.....	133
2.5.	Analyse de la contamination fécale associée dans les ressources en eaux...	136
2.5.1.	Analyse de la contamination fécale bactériologique .....	136
2.5.2.	Analyse des stanols .....	136
2.6.	Carbone organique dissous, débits des ressources en eaux et pluviométrie .	138
2.6.1.	Carbone organique dissous (COD) .....	138
2.6.2.	Débits de ressources en eaux.....	138
2.6.3.	Pluviométrie dans les 72 heures avant prélèvement.....	138
<b>CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>		<b>139</b>
3.1.	Veterinary pharmaceutical residus in water resources and tap water in an intensive husbandry area in France .....	140
3.2.	Résultats obtenus avec la seconde méthode d'analyse des RMV .....	179
3.3.	Mise en perspective des résultats avec les hiérarchisations des molécules d'intérêt et des sites d'études.....	180
3.3.1.	Mise en perspective des résultats dans les eaux brutes avec la priorisation des molécules.....	180
3.3.2.	Mise en perspective des résultats dans les eaux brutes avec la hiérarchisation des sites d'étude .....	184
3.4.	Conservation des RMV d'intérêt lors de la congélation .....	187
3.5.1	Protocole de l'essai de conservation .....	187
3.5.2.	Résultats de l'essai de conservation .....	187
3.5.3.	Mise en perspective avec les résultats des deux premières campagnes de mesure .....	192
3.5.4.	Conclusions et limites de l'expérience.....	194
<b>CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>195</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>201</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>220</b>
ANNEXE 1: Composés vétérinaire présélectionnés par le groupe de travail du Plan Régional Santé Environnement 2.....		221

ANNEXE 2 : Liste des molécules sélectionnées dans le cadre du projet REMEDES...	222
ANNEXE 3 : Structures et propriétés des RMV analysés.....	223
ANNEXE 4: Résultats bruts des analyses des RMV et RMH dans les EB .....	229
ANNEXE 5: Résultats des analyses des stanols dans les EB.....	234
ANNEXE 6: Résultats des analyses microbiologiques dans les EB .....	239
ANNEXE 7: Résultats des analyses de COD dans les EB .....	240
ANNEXE 8: Débits au jour du prélèvement dans les ressources .....	241
ANNEXE 9: Résultats bruts des analyses des RMV et RMH dans les ET .....	242
ANNEXE 10: Cinétiques de dégradation des RMV de la méthode multi-résidus pendant la congélation.....	247

# LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure du cholestérol. ....	42
Figure 2: Formation de 4 stanols de configuration isomérique différente à partir du cholestérol.....	43
Figure 3: Distribution des stéroïdes (en %) dans les fèces de quatre espèces (d'après Shah et al. 2007).....	44
Figure 4: Distribution des stéroïdes (en %) dans les fèces de quatre espèces (d'après Leeming et al. 1996). ....	44
Figure 5: Distribution des stéroïdes (en %) dans les fèces de trois espèces (d'après Derrien et al. 2012).....	44
Figure 6: ACP des 88 échantillons analysés par Derrien et al. (2011) .....	50
Figure 7: Sous-bassin versant Vilaine et côtiers bretons au sein du bassin Loire-Bretagne. ....	55
Figure 8: Répartition des volumes d'eau brute prélevés pour l'alimentation en eau potable sur le territoire breton en 2014 .....	56
Figure 9: Pourcentages de masses d'eau (par type d'eau) classées en "bon état" en 2013 (Source: bretagne-environnement.org). ....	58
Figure 10: Périodes d'interdiction d'épandage pour la région Bretagne (Source: DREAL Bretagne, Plaquette Directive Nitrates : 5 <sup>ème</sup> programme d'actions en Bretagne, 2014). 66	
Figure 11: Résultats du PBT profiler pour l'antibiotique chlortétracycline. ....	83
Figure 12 : Étapes de la SPE (source: Catalogue en ligne de Macherey-Nagel). ....	96
Figure 13 : Principe général du fonctionnement d'un spectromètre de masse. ....	101
Figure 14 : Principe de l'électrospray (source : <i>ThermoFisher.com</i> ).....	101
Figure 15 : Représentation du triple quadripôle. ....	103
Figure 16 : Mode Full Scan. ....	103
Figure 17 : Mode SIM.....	103
Figure 18 : Mode Product Ion Scan.....	104
Figure 19 : Mode Precursor Ion Scan. ....	104
Figure 20 : Mode Multiple Reaction Monitoring. ....	105
Figure 21 : Support des cartouches Oasis HLB (source: <i>www.waters.com</i> ). ....	108
Figure 22 : Support des cartouches Strata X (source : <i>www.phenomenex.com</i> ).....	108
Figure 23 : Phase stationnaire Zorbax Eclipse plus avec double post-silanisation (source : <i>www.agilent.com</i> ). ....	110

Figure 24 : Phase stationnaire XBridge BEH avec tri-fonctionnalisation (source : <a href="http://www.waters.com">www.waters.com</a> ).....	111
Figure 25 : chromatogramme de la méthode d'analyse des RMV (solution mélange à 500 ng/L).....	114
Figure 26 : SCAN de la flunixine en mode positif. ....	115
Figure 27 : FIA1 pour la flunixine [M+H]. ....	116
Figure 28 : FIA2 pour la flunixine (énergie de collision 35eV). ....	116
Figure 29 : FIA3 pour la flunixine (transition 297->239).....	117
Figure 30 : Structure de la dihydrostreptomycine. ....	129
Figure 31: Structure de la néomycine. ....	129
Figure 32 : Structure du florfénicol amine.....	129
Figure 33: Taux de recouvrement de la flunixine en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b). ....	188
Figure 34: Taux de recouvrement de l'ampicilline en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b) ....	189
Figure 35: Taux de recouvrement de la chlortétracycline en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b). ....	189
Figure 36: Taux de recouvrement de la sulfaméthazine en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b). ....	190
Figure 37: Taux de recouvrement de l'érythromycine en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b). ....	191
Figure 38: Taux de recouvrement du méloxicam en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b). ....	191

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Signification des rapports moléculaires calculés pour les stérols et les stanols. ....	48
Tableau 2: Densités par type d'élevage sur le territoire breton et le territoire national (données Agreste 2017).....	59
Tableau 3: Classement des captages selon la pression d'élevage. ....	61
Tableau 4: Pression d'élevage au niveau des captages d'eaux souterraines. ....	62
Tableau 5: Résultats de la hiérarchisation des captages d'ESU. ....	63
Tableau 6: Définitions des types de fertilisants (Source: DREAL Bretagne, Plaquette Directive Nitrates : 5 <sup>ème</sup> programme d'actions en Bretagne, 2014. ....	67
Tableau 7: Récapitulatif du déroulement des campagnes.....	69
Tableau 8: Liste initiale de RMV sur la base des travaux REMEDES et GDT PRSE2. ..	72
Tableau 9: Catégories établies par cibles animales et voies d'administration. ....	76
Tableau 10: Catégories établies par niveaux de prescription. ....	77
Tableau 11 : Catégories établies en fonction du Koc des composés. ....	81
Tableau 12: Kd et Koc de l'enrofloxacin et la marbofloxacin reportés dans la littérature. ....	82
Tableau 13: Catégories établies selon la demi-vie dans l'eau estimée par l'outil PBT profiler.....	83
Tableau 14: Scores finaux du travail de hiérarchisation (4 critères). ....	85
Tableau 16: Scores finaux des molécules à trois critères.....	85
Tableau 17: Métabolites répertoriés dans les fiches Résumés des Caractéristiques du Produit des RMV.....	86
Tableau 18: Liste finale des RMV sélectionnés pour le travail de thèse.....	87
Tableau 18 : Méthodes d'analyse multi-résidus des RMV dans les eaux naturelles.....	90
Tableau 19 : Exemples de méthodes d'analyse multi-résidus de médicaments humains et vétérinaires dans les eaux du robinet.....	91
Tableau 20 : Préparation des échantillons et méthodes d'extraction des RMV dans les eaux naturelles.....	93
Tableau 21 : Préparation des échantillons et méthodes d'extraction de résidus pharmaceutiques dans les eaux du robinet.....	94

Tableau 22 : Conditions chromatographiques de l'analyse des RMV dans la littérature scientifique.....	99
Tableau 23: Taux de recouvrement des RMV en l'absence d'acide ascorbique.....	106
Tableau 24 : Gradient d'élution retenu pour la séparation chromatographique méthode multi-résidus.....	112
Tableau 25 : Fenêtres d'acquisition du chromatogramme et "dwell-time" associés.....	113
Tableau 26: Temps de rétention et transitions de la méthode d'analyse multi-résidus des RMV.....	118
Tableau 27: Gammes d'étalonnages.....	120
Tableau 28: Grandeurs retrouvées pour les 5 gammes de la flunixinine 297-239.....	123
Tableau 29: Biais absolus pour les 5 gammes de la flunixinine 297-239. ....	123
Tableau 30: Biais relatifs pour les 5 gammes de la flunixinine 297-239. ....	123
Tableau 31: Résultats de l'évaluation des performances de la méthode d'analyse des RMV multi-résidus.....	127
Tableau 32: Résultats de l'essai inter-laboratoire.....	128
Tableau 33: Gradient de la phase mobile de la seconde méthode d'analyse. ....	131
Tableau 34: Transition du florfenicol amine et de la dihydrostreptomycine. ....	132
Tableau 35 : Taux de recouvrement sur échantillons réels de la dihydrostreptomycine et du florfenicol amine. ....	133
Tableau 36 : RMV quantifiés ou non dans les EB et criticité attribuée lors de la hiérarchisation.....	180
Tableau 37: Nombre de RMV quantifiés par campagne (C1 à C5) et par captage dans les EB. ....	184
Tableau 39: Durées de congélation et concentrations pour l'éprinomectine, florfenicol, ivermectine, lincomycine et tilmicosine dans les échantillons d'eaux brutes lors des campagnes 1 et 2. ....	193
Tableau 40: Durées de congélation et concentrations pour l'éprinomectine, le florfenicol, l'ivermectine, la tilmicosine et le toltrazuril sulfone dans les échantillons d'eaux traitées lors des campagnes 1 et 2. ....	193

# LISTE DES ABBRÉVIATIONS

<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>ACP</b>	Analyse en composantes principales
<b>AELB</b>	Agence de l'Eau Loire-Bretagne
<b>ANSES</b>	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
<b>ARS</b>	Agence Régionale de Santé
<b>BEH</b>	Bridge Ethylene Hybrid
<b>BRGM</b>	Bureau de Recherche Géologiques et Minières
<b>BSTFA</b>	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
<b>CEP</b>	Comité Experts Priorisation
<b>COD</b>	Carbone Organique Dissous
<b>DCE</b>	Directive Cadre sur l'Eau
<b>DRAAF</b>	Direction Régionale de l'Agriculture, de l'Alimentation et de la Forêt
<b>DREAL</b> Logement	Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement
<b>EB</b>	Eau Brute
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDCH</b>	Eaux Destinées à la Consommation Humaine
<b>EDTA</b>	Éthylènediaminetétraacétique
<b>EMA</b>	Écart maximal acceptable
<b>ESI</b>	Electrospray
<b>ESO</b>	Eau souterraine
<b>ESU</b>	Eau superficielle
<b>EUP</b>	Eau ultra pure

<b>ET</b>	Eau Traitée
<b>FIA</b>	Flow Injection Analysis
<b>FQs</b>	Fluoroquinolones
<b>GC</b>	Chromatographie gazeuse

**GDT PRSE 2** Groupe de Travail du Programme Régional Santé et Environnement 2 Bretagne <http://www.prse-bretagne.fr/>

<b>HFBA</b>	Acide heptafluorobutyrique
<b>HILIC</b>	Chromatographie liquide à interactions hydrophiles
<b>HLB</b>	Hydrophilic Lipophilic Balance
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide haute performance
<b>HSS</b>	High Strength Silica
<b>INERIS</b>	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
<b>INSEE</b>	Institut national de la statistique et des études économiques
<b>IRSTEA</b>	Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture
<b>IT</b>	Ion Trap (Piège à ion)
<b>LC</b>	Chromatographie liquide
<b>LERES</b>	Laboratoire d'étude et de recherche en santé environnement
<b>LQ</b>	Limite de Quantification
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>MLs</b>	Macrolides
<b>MRM</b>	Multiple Reaction Monitoring
<b>MS-MS</b>	Spectrométrie de masse en tandem
<b>MTBE</b>	Methyl Tertiary Butyl Ether
<b>PARDN</b>	Programme d'Actions Régional Directive Nitrate
<b>POCIS</b>	Polar Organic Chemical Integrative Samplers
<b>RMH</b>	Résidus de Médicaments à usage Humain

<b>RMV</b>	Résidus de Médicaments Vétérinaires
<b>RRLC</b>	Chromatographie liquide à résolution rapide
<b>SAs</b>	Sulfonamides
<b>SAU</b>	Surface Agricole Utilisée
<b>SIM</b>	Single Ion Monitoring
<b>SPE</b>	Extraction sur phase solide
<b>TCs</b>	Tétracyclines
<b>TMCS</b>	Trimethylchlorosilane
<b>TMP</b>	Triméthoprim
<b>TOF</b>	Time of flight (Temps de vol)
<b>UDI</b>	Unité de Distribution
<b>UGB</b>	Unité Gros Bétail
<b>UHPLC</b>	Chromatographie liquide ultra haute performance

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

« L'eau n'est pas un bien marchand comme les autres mais un patrimoine qu'il faut protéger, défendre et traiter comme tel ». Tel est le premier élément dont fait état la Directive Cadre sur l'Eau (DCE), établie en octobre 2000 (Directive 2000/60/CE, 2000), qui, face au constat de la dégradation du bon état chimique des eaux superficielles et des eaux souterraines, fixe des objectifs pour restaurer l'état de ces masses d'eaux. Parmi les polluants émergents responsables en partie de la dégradation de la qualité chimique des eaux, les résidus de médicaments représentent une menace diffuse et potentiellement persistante dans les hydro-systèmes. Leur présence dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) participe pour partie à l'exposition de la population (Cai et al., 2015; Carmona et al., 2014; Feito et al., 2010; Leung et al., 2013; Mompelat et al., 2009; Togola and Budzinski, 2008).

En France, environ 3000 médicaments à usage humain et 300 médicaments à usage vétérinaire sont sur le marché. Le Plan National sur les Résidus de Médicaments dans les eaux (PNRM, 2011-2015), élaboré par les ministères chargés de la santé et de l'écologie avec pour objectif l'acquisition de connaissances sur la contamination des milieux aquatiques, a réuni un large panel d'acteurs incluant des institutionnels, des chercheurs, des professionnels de la santé, des associations de professionnels, d'usagers, de malades et de défense de l'environnement, et des industriels. Ainsi, des actions variées ont été déployées, aussi bien de terrain via des campagnes d'occurrence de grandes envergures que des actions ponctuelles de sensibilisation du grand public ou encore la rédaction d'un guide technique de bonne gestion des déchets dans les établissements de santé.

Parmi les actions de terrain, la campagne de mesure réalisée à l'échelle nationale sur les résidus de médicaments dans les EDCH portée par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) en 2011, a mis en évidence la présence de résidus à usage humain et vétérinaire, dans les ressources en eaux mais également dans les eaux issues des usines de potabilisation, c'est-à-dire les eaux traitées destinées à la consommation humaine (ANSES, 2011).

À ce jour, peu d'études se sont attachées spécifiquement aux sources animales de la contamination médicamenteuse. Le Comité Experts Priorisation (CEP), créé en 2010 par l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS) et l'Agence

Française pour la Biodiversité (AFB), a pour mission de définir les listes de substances chimiques prioritaires pour la réduction, la surveillance et l'acquisition de données. Parmi les 129 substances définies comme prioritaires dans les recommandations du CEP publiées en 2014, 23 sont des résidus de médicaments, dont 4 possédant un usage en médecine vétérinaire (Dulio and Andres, 2014). Pourtant, tout comme leurs homologues à usage humain, les médicaments vétérinaires sont des substances bioactives à faibles doses, administrées aux animaux « en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques » (L.511 du Code de la Santé Publique).

Cette prise en compte limitée des RMV comme molécules prioritaires à rechercher dans les milieux aquatiques au niveau national peut s'expliquer par le fait que la contamination par les RMV est une problématique dépendante de l'occupation des sols agricoles à l'échelle régionale voir locale. En effet, les activités d'élevages sont réparties de façon hétérogène sur le territoire français, de fait des caractéristiques des sols et du climat qui favorisent une spécificité territoriale de cultures et d'élevage.

Depuis la seconde guerre mondiale, la Bretagne a misé sur l'agriculture pour son développement économique. À ce jour, la Bretagne est la première région de France pour la production de denrées animales. Environ 60% du territoire breton est dédié à l'agriculture et la région compte un cheptel d'environ 7 millions de porcins, 2 millions de bovins et 89 millions de volailles, représentant respectivement 56%, 11% et 33% du cheptel national (Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt Bretagne (DRAAF), 2017a). A titre comparatif, la Bretagne comptait 3,3 millions d'habitants au 1<sup>er</sup> janvier 2017 (Institut national de la statistique et des études économiques (INSEE), 2018).

Les animaux sont parfois détenus dans des espaces confinés, notamment dans les élevages hors sol de porcs ou de volailles. Dans ces conditions les animaux sont soumis à un risque accru de développer des maladies. Pour éviter que celles-ci se répandent à la totalité du cheptel, des traitements sont administrés aux animaux pas seulement en curatif mais également en prophylactique. Seuls les médicaments vétérinaires contenant un antibiotique d'importance critique (céphalosporines 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> générations, fluoroquinolones) sont interdits en usage prophylactique et ce depuis 2016 (Article R5141-117-1, Code de la Santé Publique).

Une fois administré aux animaux, les RMV vont être partiellement ou complètement métabolisés puis excrétés dans l'urine et les fèces. Par la suite, le recyclage important

de ces effluents d'animaux sur les sols pour valoriser l'azote, le phosphore et le carbone peut générer une pollution diffuse car ils contiennent des quantités importantes de RMV (Xie et al., 2018). Différentes voies d'entrées et de transferts des RMV dans les milieux aquatiques existent à partir des sources émettrices que sont les effluents animaux. Ainsi, les RMV peuvent être transférés vers les ressources en eau par lixiviation ou ruissellement à partir des parcelles ayant reçu les effluents d'élevage, ou à partir de parcelles pâturées et également par le biais d'activités piscicoles.

Le Plan Régional Santé Environnement 2 (PRSE2) Bretagne (2011-2015), ainsi que son successeur le PRSE3 (2017-2021), intègrent un axe sur « l'occurrence des résidus médicamenteux notamment d'origine vétérinaire, dans les eaux destinées à la consommation humaine en Bretagne ». Le projet REMEDES, dont le rapport a été publié en 2015 (Soulier et al., 2015), est le premier à avoir fait état de la contamination des eaux de surface bretonnes par les RMV, sur deux bassins versants localisés respectivement dans le Morbihan et en Ille-et-Vilaine.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse qui vise à établir un premier état des lieux de la contamination des eaux destinées à la consommation humaine par les RMV en zone d'élevage, en Bretagne, pour *in fine* déterminer si la population est susceptible d'être exposée à ces composés via l'eau potable.

Ainsi, cette thèse vise à (i) étudier l'occurrence des résidus à usage vétérinaire dans les ressources et les eaux distribuées au robinet, (ii) développer une méthode d'analyse pour la liste de composés retenus, (iii) acquérir des premières données de contamination par les RMV dans les EDCH en Bretagne (composés, niveaux de concentrations) et (iv) identifier les sources de cette contamination à l'aide de l'étude de la contamination fécale associée dans les eaux brutes.

Ce manuscrit est divisé en trois chapitres :

- 1). Une synthèse bibliographique sur les connaissances actuelles relatives à l'occurrence et au devenir des RMV dans les eaux brutes et les eaux traitées. Une synthèse bibliographique est également réalisée sur les techniques utilisées pour la détermination de l'origine de la contamination fécale dans l'eau.
- 2). Les matériels et méthodes mis en place, pour la sélection des résidus vétérinaires d'intérêt, la stratégie d'échantillonnage incluant les protocoles de prélèvements et les méthodes d'analyses dont leurs développements

3). Les résultats d'occurrence des RMV dans les eaux brutes et les eaux traitées correspondantes, et les résultats de la contamination fécale associée, ainsi que les interprétations et discussions qui en résultent.

Enfin, ce travail se termine par une conclusion qui synthétise les données acquises sur l'occurrence des RMV dans les EDCH en Bretagne, et qui propose des pistes de réflexion pour de futurs travaux.

# CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

La compréhension globale de la problématique des RMV dans les eaux destinées à la consommation humaine nécessite au préalable de connaître les données de contamination, c'est-à-dire d'occurrence des RMV dans les eaux brutes et les eaux traitées. Pour interpréter ces données de contamination, il convient de s'attacher à des facteurs pouvant être impactant, comme les niveaux de vente de composés, leur comportement dans les eaux naturelles, (i.e. sorption, mécanismes de dégradation) et leur devenir dans les filières de potabilisation de l'eau.

Cette revue de la littérature a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Hazardous Materials*, c'est sous cette forme qu'elle est présentée dans le manuscrit.

Dans un second temps, ce chapitre propose une brève synthèse bibliographique sur les outils existants pour déterminer l'origine de la contamination fécale dans les eaux brutes.

**1.1. Les résidus de médicaments vétérinaires de la  
ressource en eau à l'eau du robinet : ventes,  
occurrences et devenir dans les eaux**



## Review

# Veterinary pharmaceutical residues from natural water to tap water: Sales, occurrence and fate



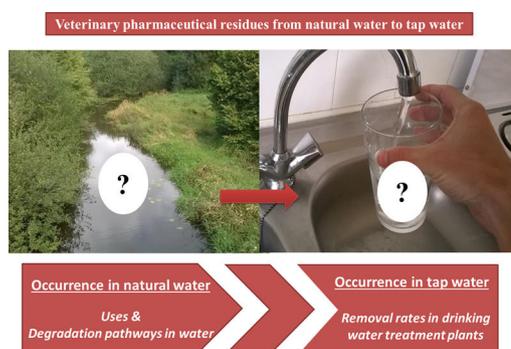
Lise Charuaud<sup>a,\*</sup>, Emilie Jarde<sup>b</sup>, Anne Jaffrezic<sup>c</sup>, Marie-Florence Thomas<sup>a</sup>, Barbara Le Bot<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) – UMR\_S 1085, F-35000 Rennes, France

<sup>b</sup> Univ Rennes, CNRS, Géosciences Rennes – UMR6118, 35000 Rennes, France

<sup>c</sup> UMR SAS, Agrocampus Oust, INRA, 35000 Rennes, France

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

**Keywords:**

Veterinary drugs  
Antibiotics  
Animal husbandry  
Drinking water treatment plant  
Removal rates

## ABSTRACT

Veterinary pharmaceuticals (VPs) increasingly used in animal husbandry have led to their presence in aquatic environments – surface water (SW) or groundwater (GW) – and even in tap water. This review focuses on studies from 2007 to 2017. Sixty-eight different veterinary pharmaceutical residues (VPRs) have been quantified worldwide in natural waters at concentrations ranging from nanograms per liter ( $\text{ng L}^{-1}$ ) to several micrograms per liter ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). An extensive up-to-date on sales and tonnages of VPs worldwide has been performed. Tetracyclines (TCs) antibiotics are the most sold veterinary pharmaceuticals worldwide. An overview of VPRs degradation pathways in natural waters is provided. VPRs can be degraded or transformed by biodegradation, hydrolysis or photolysis. Photo-degradation appears to be the major degradation pathway in SW. This review then reports occurrences of VPRs found in tap water, and presents data on VPRs removal in drinking water treatment plants (DWTPs) at each step of the process. VPRs have been quantified in tap water at  $\text{ng L}^{-1}$  concentration levels in four studies of the eleven studies dealing with VPRs occurrence in tap water. Overall removals of VPRs in DWTPs generally exceed 90% and advanced treatment processes (oxidation processes, adsorption on activated carbon, membrane filtration) greatly contribute to these removals. However, studies performed on full-scale DWTPs are scarce. A large majority of fate studies in DWTPs have been conducted under laboratory at environmentally irrelevant conditions (high concentration of VPRs ( $\text{mg L}^{-1}$ ), use of deionized water instead of natural water, high concentration of oxidant, high contact time etc.). Also, studies on VPRs occurrence and fate in tap water focus on antibiotics. There is a scientific gap on the occurrence and fate of antiparasitic drugs in tap waters.

**Abbreviations:** VPs, veterinary pharmaceuticals; VPRs, veterinary pharmaceutical residues

\* Corresponding author at: EHESP/LERES, 15, Avenue du Pr. Léon-Bernard, CS 74 312, 35043 Rennes Cedex, France.

E-mail address: [lise.charuaud@ehesp.fr](mailto:lise.charuaud@ehesp.fr) (L. Charuaud).

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.075>

Received 5 April 2018; Received in revised form 31 July 2018; Accepted 22 August 2018

Available online 24 August 2018

0304-3894/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

As the human population is growing, animal production is also rapidly expanding to feed this population [1]. This leads to intensive agricultural practices, with confined animal feeding operations (CAFOs) [2,3]. In CAFOs, it is a common practice to use veterinary pharmaceuticals (VPs) not only for curative ends, but also prophylactic purposes [1,4,5]. VPs have also been widely used for growth promotion [4], even if this practice has begun to be restricted or even banned, for example in the European Union (EU) [6,7]. Nowadays, more than 2000 veterinary pharmaceutical products are available on the market worldwide [8]. VPRs can be released into the environment either directly with urine and feces of animals in pastures or during aquaculture activities, or indirectly during the spreading of contaminated manure and slurry [7,9–12]. Because of their continuous use, veterinary pharmaceutical residues (VPRs) represent a diffuse and pseudo-persistent pollution in the environment. Among other emerging contaminants, VPRs have been quantified worldwide in aquatic environment, with progresses in analytical methods [10,13,14]. As tap water is produced worldwide from natural waters (SW or GW), it is important to review the occurrence of VPRs in natural waters and the factors affecting this occurrence. Indeed VPRs occurring in natural waters may reach DWTPs which produce tap water. A public health concern is that if these compounds are not fully removed and/or transformed in DWTPs, the human population could be chronically exposed to these compounds. This continuous exposure may represent a risk as VPs are designed to exert biological effects on animals at low doses (as for antibiotic which are active at mg of drug per kg of animal weight) or very low doses (hormones which are active at  $\mu\text{g}$  of drug per kg of animal weight) [12]. VPR may also interact together or with other organic contaminants present in drinking water, resulting in addition or synergistic effects [12]. Moreover, chronic exposure of pathogens, commensal or environmental bacteria to veterinary antibiotics can lead to cross-resistance to antibiotics through the development and selection of more harmful bacteria [12,15]. It is a crucial issue as no new class of antibiotics has been discovered since 1987 [8].

However, data on VPRs fate in DWTPs as well as on their occurrence in tap water are scarce and deserve more attention as it is not known if those micropollutants are removed during the applied treatment processes. Lastly, transformation products (TPs) of VPRs should also be considered. Subsequent compounds generated after the transformation process of a certain “parent compound” are considered as TPs. TPs can be generated by natural processes such as metabolization in the treated animals [7,11,16] or via hydrolysis or photolysis in the environment [17–19]. They can also be derived from engineering processes, for example during agricultural waste management practices (i.e. digestion, composting, etc.) [5,20] or in DWTPs during oxidation steps [12,21,22]. These TPs can retain a biological activity [21,23,24] which may pose risks towards aquatic ecosystems or human health.

Ciprofloxacin is the main metabolite of the veterinary antibiotic enrofloxacin, and it is also a pharmaceutical used in human medicine. Both compounds have been proved to exert a negative impact on amphibian larvae growth and development at concentrations greater than or equal to  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  [25]. Photo-transformation products of the antibiotic tetracycline exhibit a higher toxicity towards luminescent bacteria *V. fischeri* than tetracycline [26] and photoproducts of the hormone altrenogest seem to possess significant androgenic activity according to in vitro tests performed by Wammer et al. [27]. Thus aquatic ecosystems can be negatively impacted by TPs generated by VPRs. When considering TPs produced during tap water production, TPs can gain toxicity during oxidation processes [28,29]. TPs of nitroimidazoles compounds generated during ozonation process were more toxic to *V. fischeri* than the initial nitro-imidazoles [29]. In Leavey-Roback et al. [28], chloramination disinfection of veterinary antibiotics such as tetracyclines or macrolides induces the formation of the carcinogenic disinfection product N-nitrosodimethylamine.

Thus, these TPs may threaten human health.

Many reviews have been published on veterinary pharmaceutical residues in the environment [4,6–9,12,15,16,30–44]. In those reviews, veterinary pharmaceutical residues occurrence and fate in soil have been largely studied, as mobility from soil to water. But only few reviews have been published on occurrence and fate in natural waters (sorption and degradation) and tap water. This review provides an update on research performed from 2007 to 2017 on (1) the occurrence of 65 VPRs (i.e. antibiotics, antiparasitic drugs, anti-inflammatory drugs) in natural waters (surface water and groundwater; 38 studies) related to (2) their uses and their fate. An extensive up-to-date on sales data worldwide, ten years after Sarmah et al., publication [38] is provided, as sales and usages are critical factors impacting environmental occurrence of VPRs [45–47]. Sales trends over the past decade are presented for countries where they are available in the public domain. It is also mentioned when there is no available sales information for countries which are likely to be significant consumers of VPRs. In 2009, Kümmerer [35] reported a lack of information on VPRs degradation pathways, especially on photolysis, with comparison between direct and indirect photolysis. To fill this gap, a complete and up-to-date overview of degradation pathways by chemical family is provided (38 studies). Afterwards, this review focuses on (3) VPRs occurrence in tap water (11 studies) consequently to (4) their behaviour during drinking water treatment plant processes (28 studies).

Few reviews address VPRs behaviour in DWTPs, and deal with pharmaceuticals and personal care products with great emphasis on human pharmaceuticals [23,48] or with antibiotics used both in human and veterinary medicine [32,49]. To our knowledge, this review is the first to gather all available data on VPRs removal rates and fate in DWTPs.

## 2. Occurrence of VPRs in natural waters

The occurrences of VPRs (since 2007) in surface water and groundwater are presented in Figs. 1 and 2. Fig. 1 focuses on VPRs that have been searched in more than one hundred samples (all studies included). The minimum and maximum quantified concentrations of VPRs in each study are shown on the graphic. Fig. 2 focuses on VPRs searched in less than one hundred samples and shows minimum and maximum concentrations quantified in each study. VPRs that were investigated but not detected have not been reported in Figs. 1 and 2, for example coccidiostat toltrazuril and its metabolites [50], avermectins [51] or some corticosteroids [13,14].

In the 38 studies considered [2,13,14,45–47,51–84], sampling was carried out near husbandry facilities or crops in rural watersheds, once or several times at different seasons of the year.

As reported in Figs. 1 and 2, 64 different VPRs were detected in surface waters, especially rivers [59,61,63,64] but also lakes [55,58], at concentrations ranging from  $< 1 \text{ ng L}^{-1}$  [58,68,72] to  $255 \mu\text{g L}^{-1}$  (tetracycline [83]; out-of-scale value in Fig. 1). High levels of concentrations depend on the study location and of the veterinarian prescriptions in the corresponding area. For example, the highest concentration level (tetracycline;  $255 \mu\text{g L}^{-1}$ ) was quantified in a sampling site that was assumed to be affected by the discharge of veterinary pharmaceuticals from a swine manure composting facility [83]. Sulfapyridine, sulfamethazine, sulfamethoxy-pyridazine and sulfadiazine were quantified in the Llobregat river in Spain at  $12 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $6192 \text{ ng L}^{-1}$ ;  $3704 \text{ ng L}^{-1}$  and  $2312 \text{ ng L}^{-1}$ , respectively. Similarly, many agricultural areas were located upstream the sampling site [67].

In the 11 studies considered in groundwater, 47 VPRs were quantified with concentrations ranging from  $< 1 \text{ ng L}^{-1}$  [76] to  $3.461 \mu\text{g L}^{-1}$  for sulfacetamide [79]. Sulfonamides (SAs) constitute the most detected chemical family but also the most studied (28 studies on 38 studies considered) so there may be a bias. Surface water can be a source of contamination for groundwater through artificial or natural exchanges between the two resources [46,59,85].

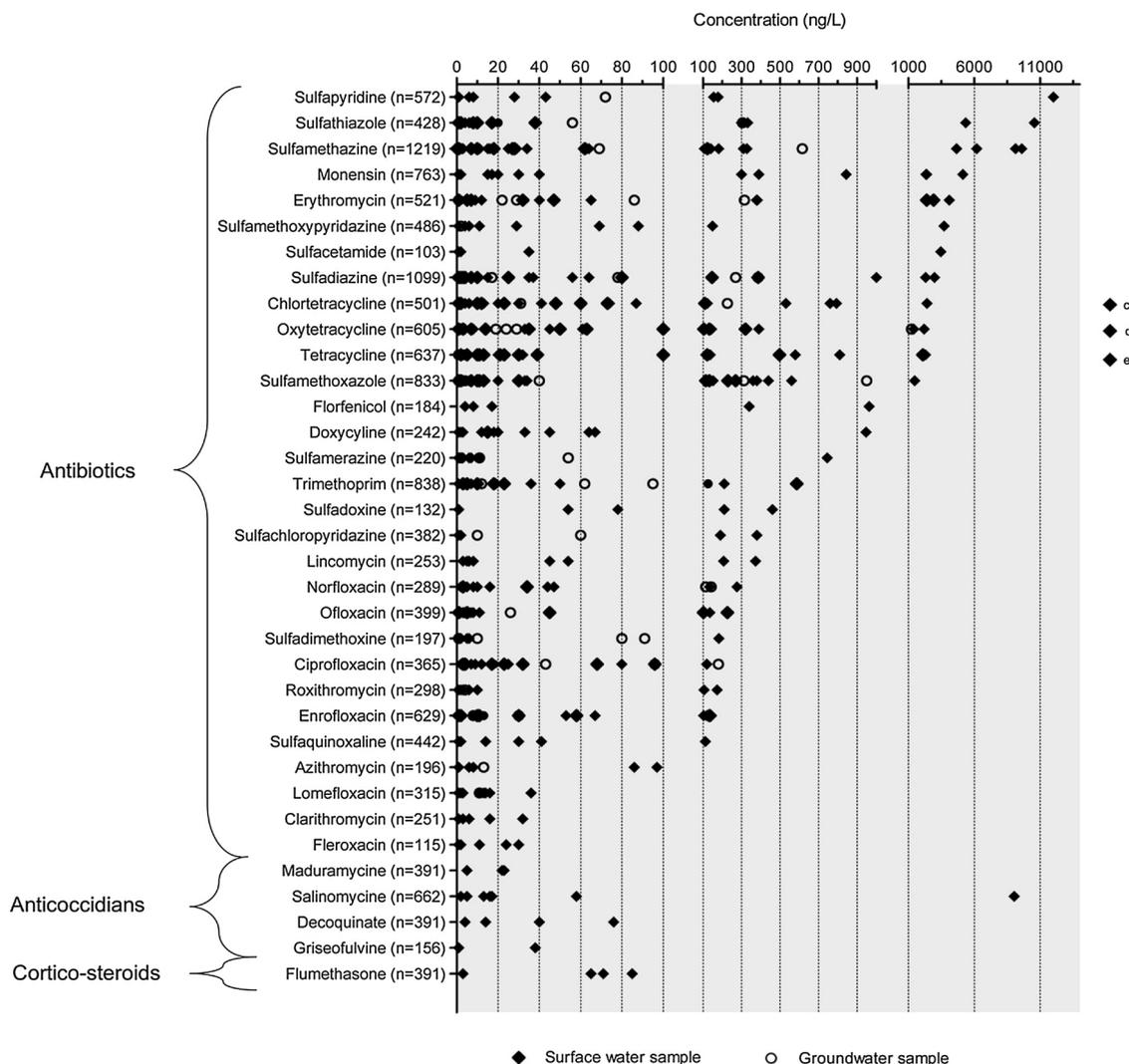


Fig. 1. Concentration ranges (ng/L) of VPRs frequently searched in natural waters (2007–2017) (n<sup>a</sup> samples > 100)<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>n = number of samples where the compound was searched (all studies included).

All details (studies references, studies locations...) can be found in Table S1 and Table S2 in Supplementary Information.

<sup>c</sup>Out-of-scale value (Chlortetracycline: 44 µg/L).

<sup>d</sup>Out-of-scale value (Oxytetracycline: 68 µg/L).

<sup>e</sup>Out-of-scale value (Tetracycline: 255 µg/L).

### 3. Factors impacting the occurrence of VPRs in natural waters

#### 3.1. Sales and uses of VPs worldwide

Uses of VPs strongly differ between countries, because of the different animal species (i.e. swine, cattle, sheep, etc.), animal farming methods and climate conditions [9,62]. However, the therapeutic classes most often used are antibiotics, antiparasitics (endo- and ectoparasitics) and steroidal hormones [9,12]. Antibiotics represent 70% of all consumed drugs that are approved for animal medicine worldwide [11]. Other therapeutic classes used in veterinary medicine include non-steroidal anti-inflammatory drugs, anxiolytics and sedatives such as benzodiazepines, beta-agonists agents, anesthetics, euthanasia products, antacids, diuretics, emetics, etc. [12].

In 2006, [38] provided an international overview of veterinary antibiotics sales by compiling available information at that time. Based on this previous work, an up-to-date of the sales was performed in order to show new trends in these uses and determine evolutions in data availability. In 2006, sales data were not available in the United States

of America (USA) and only a few European countries (Sweden, Denmark, Finland, and Netherlands) were publishing their antibiotic sales in the public domain [38]. Current available sales data, i.e. about ten years after [38], are presented below.

Tables 1–3 report the latest available sales amounts for USA (2016), Europe (2015), France (2016), Japan (2015), Korea (2015), New Zealand (2014) and Australia (2010).

According to the Tables 1–3, the most frequently used antibiotics worldwide for veterinary purposes are tetracyclines (TCs), SAs, penicillins (PENs) and macrolides (MLs).

In the USA, the amount of antibiotics sold for veterinary purposes equals 70% of total antibiotics sales [1,3,6,86]. An increase of 11% in total annual sales amount was reported between 2009 and 2016, but sales decreased by 10% between 2015 and 2016 [87]. Sales of lincosamides and cephalosporins increased by more than 50% between 2009 and 2016 [87]. Total amount of antibiotics for veterinary use was estimated at almost 13 983 tons in 2016 [87], perhaps the world's largest (or second behind China [3,88]). These high amounts are not only due to the presence of large numbers of livestock, but also to the authorized

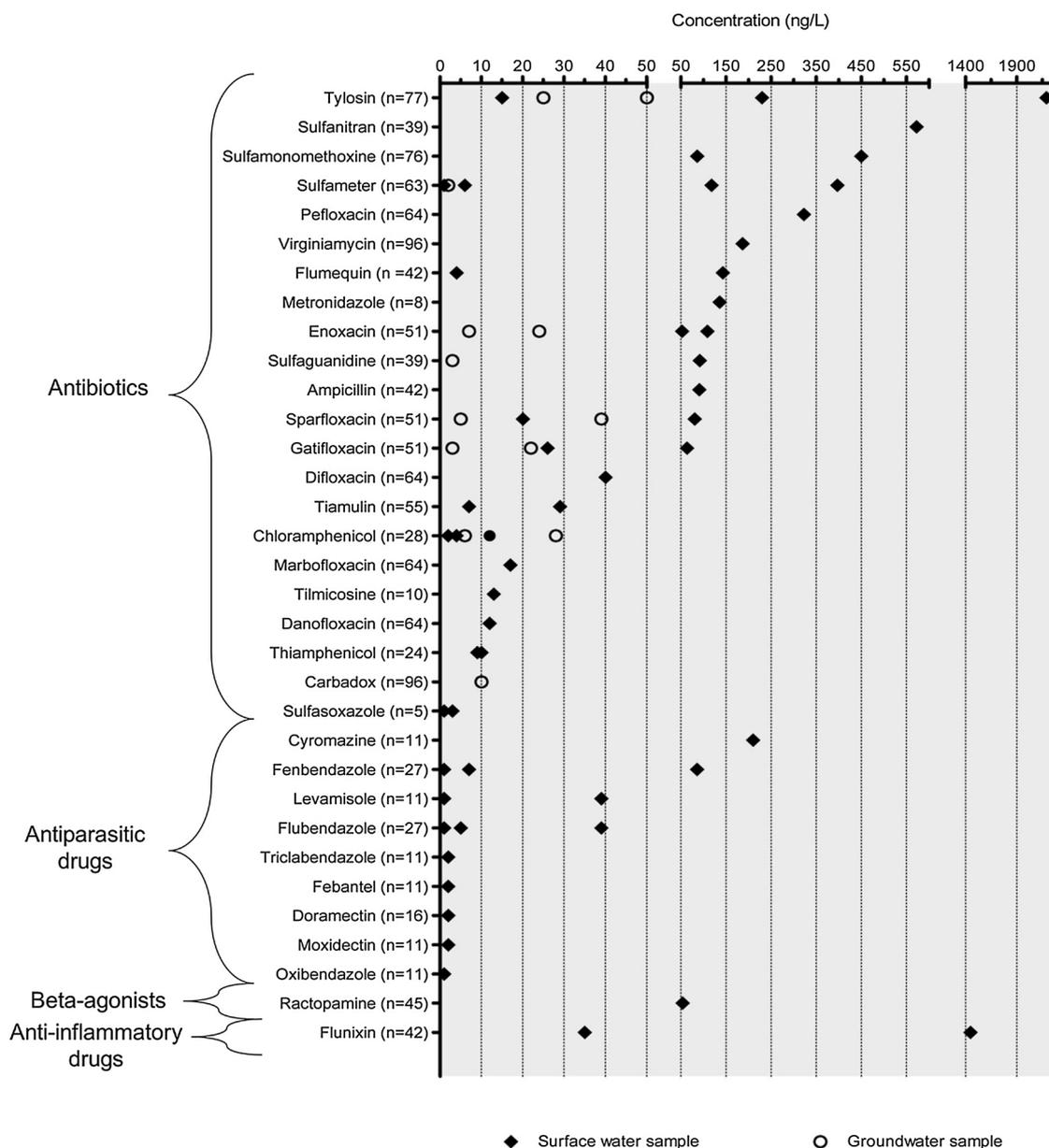


Fig. 2. Concentration ranges (ng/L) of VPRs less searched in natural waters (2007–2017) ( $n^a$  samples < 100)<sup>b</sup>.

<sup>a</sup> $n$  = n number of samples where the compound was searched (all studies included).

<sup>b</sup>All details (studies references, studies locations...) can be found in Table S1 and Table S2 in Supplementary Information.

use of antibiotics as growth promoters [12]. High use of ionophores is largely responsible for quantification of monensin in surface water (300–5130 ng L<sup>-1</sup>; [70,71]), salinomycin (9022 ng L<sup>-1</sup>; [71]) and narasin (348 ng L<sup>-1</sup>; [71]) but also in groundwater (monensin, 20–2950 ng L<sup>-1</sup>; [2,81]).

Canada also has a large and dynamic animal food production industry [38] and is reported to have a widespread use of veterinary antibiotics [86]. However, data on veterinary pharmaceuticals sales in Canada are still not available in the public domain.

Since 2010, the European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) releases an annual report of antimicrobials sales, currently including data from 30 European countries, including France. Total antimicrobials sales were 8361 tons in 2015 according to the latest report [89]. Prevalent families differ from those in the USA. However, ionophores, which constitute the second most sold family of compounds in the USA, are not included in the ESVAC report. Indeed, in Europe these compounds are no longer used as feed additives because

growth promoters have been banned since 2006 [90]. This may explain the differences observed between Europe and USA sales.

In 2015, the highest antimicrobial sales were reported for Spain with 3030 tons, Italy with 1310 tons and Germany with 858 tons [89]. Between 2011 and 2015, the general trend was a 13% decrease in veterinary antibiotics sales in Europe (25 countries included). Some countries included in the ESVAC report also publish individual detailed annual reports of their antibiotics sales such as France [91] or United-Kingdom [92].

In 2006 [38], sales amounts of veterinary pharmaceuticals were lacking in Asia. Ten years later, even though veterinary antibiotics uses are regulated in China, there is currently no official governmental report on sales amounts [88,93], while some previous studies suggest that China may be the first consumer of veterinary antibiotics in the world [1,3,6]. Nevertheless, limited available data suggest 210,000 tons of antibiotics are produced annually, with 46% of this tonnage used for food-producing animals [93,94].

**Table 1**  
Sales of VPRs in France [91], Europe [89] and USA [87].

SALES IN FRANCE IN 2016			SALES IN EUROPE IN 2015 <sup>a</sup>			SALES IN UNITED STATES IN 2016		
Chemical family	Authorized Compounds in 2016	Sales (tons of active ingredient)	Chemical family	Authorized compounds in 2010–2015	Sales (tons of active ingredient)	Chemical family	Actively Marketed Compounds in 2016	Sales (tons of active ingredient)
TCs	Chlortetracycline Doxycycline Oxytetracycline	185	TCs	Chlortetracycline Oxytetracycline Tetracycline Doxycycline	2723	TCs	Chlortetracycline Oxytetracycline Tetracycline	5867
SAs	Sulfadiazine Sulfamethazine Sulfadimethoxine Sulfaguandine Sulfamethoxypridazine Sulfadoxine	111	PENs	Amoxicillin Ampicillin Penicillin G Phenoxymethyl-penicillin Pheneticillin Penethamate Cloxacillin Dicloxacillin Nafcillin Oxacillin Metampicillin	2072	Ionophores	Laidlomycin Lasalocid Monensin Narasin Salinomycin	4603
PENs	Amoxicillin Ampicillin Penicillin G Phenoxymethylpenicillin Cloxacillin	78	SAs	Formosulfathiazole Phthalylsulfathiazole Sulfacetamide Sulfachlorpyridazine Sulfaclozine Sulfadiazine Sulfamonomethoxine Sulfadimethoxine Sulfamethazine Sulfadoxine Sulfafurazole Sulfaguandine Sulfalene Sulfamerazine Sulfamethizole Sulfamethoxazole Sulfamethoxypridazine Sulfanilamide Sulfapyridine Sulfaquinoxaline Sulfathiazole Sulfazuinoxaline	978	Others <sup>b</sup>	Novobiocin Florfenicol Ormetoprim Bambermycins Avilamycin Tiamulin Polymyxin B1 Bacitracin Carbadox Virginiamycin	1235
Aminoglycosides	Dihydrostreptomycin Apramycin Gentamicin Neomycin Spectinomycin	56	MLs	Erythromycin Gamithromycin Oleandomycin Spiramycin Tildipirosin Tilmicosin Tulathromycin Tylosin Tyvalosin	598	PENs	Amoxicillin Ampicillin Cloxacillin Penicillin	843
MLs	Spiramycin Erythromycin Tilmicosin Tylosin	37	Polymyxins	Colistin Polymyxin B	561	MLs	Erythromycin Gamithromycin Tildipirosin Tilmicosin Tulathromycin Tylosin Tyvalosin	555

Acronyms: TCs: Tetracyclines SAs: Sulfonamides PENs: Penicillins MLs: Macrolides.

<sup>a</sup> Sales in Europe integrate 30 european countries sales data, including France.

<sup>b</sup> Others include the following: Aminocoumarins, Amphenicols, Diaminopyrimidines, Glycolipids, Orthosomycins, Pleuromutilins, Polymyxins, Polypeptides, Quinoxalines, Streptogramins.

Furthermore, to our knowledge, India, Indonesia or Thailand are still neither reporting any information on veterinary pharmaceutical types or amounts used.

On the other hand, as shown in Table 2, reports have been released in South Korea [95], and in Japan [96]. To our knowledge, Japan is the only country worldwide reporting the sales of antiparasitic drugs (antihelmintics and antiprotozoals). The most sold antiparasitic drugs are fenbendazole and praziquantel with about 3 tons, ranking 22nd and 23rd in veterinary sales amounts. Between 2007 and 2015, VPs sales in

Japan decreased by 11%, with 879 tons in 2007 [97] and 788 tons in 2015 [96]. In Korea, overall sales of antibiotics (including anticoccidians) have also gradually decreased, with 1527 tons sold in 2007 and 910 tons in 2015 [95]. However, phenicols and cephalosporins sales have been multiplied by 3 and 5, respectively [95]. Occurrence of oxytetracycline ( $390\text{--}1410\text{ ng L}^{-1}$ , [61]), chlortetracycline ( $13\text{--}793\text{ ng L}^{-1}$ , [61,63]), tylosin ( $230\text{--}2190\text{ ng L}^{-1}$ , Ok et al.), florfenicol ( $17\text{--}340\text{ ng L}^{-1}$ ; [63]) and enrofloxacin ( $10\text{--}133\text{ ng L}^{-1}$ , [63]) in Korean surface waters can be explained by the fact that those

**Table 2**  
Sales of VPRs in Korea [95] and Japan [96] in 2015.

Most Sold VPs in Korea (2015)			Most Sold VPs in Japan (2015)		
Chemical family	Compound	Sales of active ingredient (tons)	Chemical family	Compound	Sales of active ingredient (tons)
TCs	Oxytetracycline	159	TCs	Oxytetracycline	179
PENs	Amoxicillin	140	TCs	Doxycycline	79
Phenicol	Florfenicol	92	TCs	Chlortetracycline	76
TCs	Chlortetracycline	76	SAs	Sulfamethoxazole	60
PENs	Ampicillin	57	MLs	Tylosin	48
MLs	Tylosin	39	MLs	Erythromycin	38
Quinolones	Enrofloxacin	37	PENs	Ampicillin	37
SAs	Sulfathiazole	32	Pleuromutilins	Tiamulin	32
SAs	Sulfamethoxazole	28	PENs	Amoxicillin	31
Pleuromutilins	Tiamulin	18	Lincosamides	Lincomycin	29

Acronyms: TCs: Tetracyclines SAs: Sulfonamides PENs: Penicillins MLs: Macrolides.

compounds are among the top ten sellers in the country. On the contrary, tetracycline, which has been quantified at  $255 \mu\text{g L}^{-1}$  [83], is not included in the top ten sellers of Korea. In Japan, oxytetracycline, the most sold compound, was quantified at  $68\,000 \text{ ng L}^{-1}$  [65].

New Zealand and Australia both reported zinc bacitracin as the most sold compound. Zinc bacitracin is used for the treatment and prevention of necrotic enteritis in poultry, and is administered in the feed. In Australia, there were no significant change in the total amount of antibiotics sold between 2005 and 2010. Growth promotants accounted for 4%–7% of total antimicrobials sold for use in food animals [98]. In New Zealand, antibiotic sales increased by 13% between 2010 and 2014. Sales of TCs and cephalosporins increased by 57% and 36%, respectively [99].

It has to be considered that tonnages may not be an adequate parameter to assess the actual use pattern of VPs. In addition, increasing or decreasing sales trends over time may reflect usage changes, but it may also be representative of changes in animal populations across the country. To eliminate of this bias, a population correction unit [89] is used or a ratio of the active ingredient sold (mg) per kilogram of animal bodyweight is applied [91,92].

Within a country, uses of VPRs vary throughout the year. In winter, livestock tend to be more sensitive to pathogens and prophylactic treatments are increased to prevent respiratory diseases or other epidemics in herds [65]. Some exceptions may be noted, such as a common indication of SAs for bacterial or protozoal infections occurring in summer.

### 3.2. Fate of VPRs in natural waters

This part of the review considers the behaviour of VPRs in natural waters— transfer and sorption to sediment, and degradation pathways – which will affect concentration levels in natural water. Beyond sorption and degradation, climate and weather strongly influence VPRs concentrations in natural waters with heavy rainfall resulting in higher flow rate and significant dilution of VPRs in the waterbodies [54,57].

#### 3.2.1. Partitioning and sorption

VPRs are found in different fractions of water: soluble fraction, colloidal fraction or particular fraction [45,100,101]. Ionic and hydrophobic interactions known to occur between VPRs and soil [7,8,10,11,16,35,44,102,103] will apply for the partitioning between VPRs and the different fractions: colloids, solid particulate matter (SPM) and sediment. To determine the partitioning behaviour and the dynamics of VPRs between the different phases (i.e. soluble, colloidal, SPM, sediment), the calculation of a pseudo-partition coefficient (*P-PC*) is useful [104,105]. (*P-PC*) is calculated as the ratio of the VPR concentration in the studied solid phase (either colloidal, SPM or sediment) to the corresponding concentration in the water phase (soluble).

Calculated *P-PCs* between water and SPM are presented in Table 4

[45,101], and Table 5 identified some of the *P-PC* between sediment and water phase calculated for veterinary antibiotics [45,53,57,104–108].

Tables 4 and 5 show that means *P-PCs* water – SPM and *P-PCs* water-sediment for antibiotics increase in the following order: SAs and MLs ( $10^2$  order) < TCs (up to  $10^3$ ) < fluoroquinolones (FQs) (up to  $10^4$ ). As expected, TCs and FQs have a stronger binding capacity to solid fractions (sediments and SPM) than SAs [100,101,106,107], as in soils. FQs tend to be more persistent than MLs once in sediments [100] and have a higher tendency to accumulate in sediments than TCs [108]. As SAs, trimethoprim, lincomycin and florfenicol tend to be distributed only in the aqueous phase [109].

Thus, sediment constitute an important sink but also a potential secondary source for VPRs, which can be released in water through sorption-desorption and re-suspension processes [53,105,106,108,109]. However, no significant seasonal variations of SAs, MLs, TCs and FQs concentrations in the sediment were reported in Refs. [100,107].

Sorption will also influence VPRs transport into groundwaters. As VPRs are mostly ampholytic compounds, a retardation of their transport in groundwaters can be expected because of ion sorption dominated by electrostatic interactions [110].

#### 3.2.2. Degradation in water

In water, VPRs can be degraded and/or transformed through biotic (biodegradation) or abiotic (hydrolysis or photolysis) processes. These degradation mechanisms are more efficient during dry seasons, as a rise in temperature promotes microbial activity and photolysis [46,47,55].

Photolysis is an important degradation pathway of VPRs in surface water [17,26]. VPRs can undergo direct photolysis with direct absorbance of photons [111] if there is an overlap between the irradiation spectrum and the absorption spectra of the molecule [112]. VPRs that do not absorb light at  $\lambda > 290 \text{ nm}$  do not undergo direct photolysis [111,112]. VPRs can also be subjected to indirect photolysis or even self-sensitized photo-oxidation [113].

Indirect photolysis is induced by light absorption of components from dissolved organic matter (DOM) or nitrates [26,111]. The components will generate various reactive species of oxygen (ROS), such as light excited DOM, hydroxyl radical, peroxy radicals, singlet oxygen, and superoxide [18]. ROS can react with VPRs and increase their degradation [19]. However, DOM can also prevent photolysis of VPRs by screening sunlight [18,19,114], by competitive absorption of solar radiations [17], by quenching ROS [18,19], or by adsorbing VPRs themselves [112]. In the end, indirect photolysis of VPRs will depends of the balance of each opposite contribution of DOM (i.e. photo-sensitizing and/or inhibiting photolysis) [17]. Self-sensitized photo-oxidation is a process in which photo-sensitized organic compounds may produce reactive singlet oxygen via the energy transfer from the light-excited triplet state of the molecule to ground state. The reactive singlet oxygen will then transform and/or degrade the organic

**Table 3**  
Sales of VPRs in New-Zealand in 2014 [99] and in Australia in 2010 [98].

Sales in New Zealand in 2014			Sales in Australia in 2010		
Chemical family	Compound	Sales of active ingredient (tons)	Chemical family	Compound	Sales of active ingredient (tons)
Polypeptide	Zinc Bacitracin	23	Polypeptides	Zinc Bacitracin	113
PENs	Amoxicillin	14	TCs	Polymixin B	58
	Benzylpenicillin			Chlortetracycline	
	Ampicillin			Doxycycline	
	Cloxacillin			Oxytetracycline	
	Penethamate Hydriodide			Tetracycline	
TCs	Chlortetracycline	9	MLs + Streptogramins	Erythromycin	54
	Oxytetracycline			Kitasamycin	
	Doxycycline			Oleandomycin	
				Tilmicosin	
MLs + Lincosamides	Clindamycin	8	PENs + beta-lactamase inhibitors	Tulathromycin	26
	Oleandomycin			Tylosin	
	Erythromycin			Virginiamycin	
	Pirlimycin			Amoxicillin	
	Tilmicosin			Ampicillin	
	Lincomycin			Benzathine penicillin	
	Spiramycin			Clavulanic acid	
	Tylosin			Cloxacillin	
	Tulathromycin			Penethamate	
				Procaine penicillin	
SAs	Sulfadiazine	4	SAs + diaminopyrimidine	Phthalylsulfathiazole	13
	Sulphamethoxazol			Sulfacetamide	
	Sulphapyridine			Sulfadiazine	
	Sulphadimethoxine			Sulfamethazine	
	Sulphamethoxyypyridazine			Sulfadoxine	
	Sulphaquinoxaline			Sulfaquinoxaline	
	Sulphaguanidine			Trimethoprim	
	Sulphanilamide				
	Sulphathiazole				
	Sulphamerazine				
	Sulphamethoxyypyridazine				
	Sulphasoxazole				
	Sulphamethazine				
	Sulphanilamide				
	Trimethoprim				

Acronyms: TCs: Tetracyclines SAs: Sulfonamides PENs: Penicillins MLs: Macrolides.

compound by oxidation [111]. TCs, ionophores and phenicol antibiotics, are subjected to self-sensitization photo-oxidation [19,111,115]. For phenicols, the photo-oxidation occurs on the carbon atoms and generate isomers of the parent compounds [111].

Table S3 presents the photolysis tests performed under experimental conditions close to environmental conditions. For example, experiments performed in freshwater are preferred to experiments performed in deionized water. Likewise, experiments performed under sunlight are preferred to experiments performed in artificial light. When the study is performed on deionized water, only direct photolysis is estimated. Both direct and indirect photolysis is evaluated on freshwater, due to the presence of DOM.

Several parameters will influence the photolysis rate of VPRs such as VPR concentration levels [26,114,116], water pH [17,27,116–118], ionic species (i.e. nitrates, phosphates, divalent cations as  $\text{Ca}^{2+}$ ) [17,19,26,113,116,119,120], composition and concentration of DOM [18,19,26,121], light intensity [116] and depth of natural waters [19].

Besides, VPRs can be biodegraded and/or biotransformed by bacteria [122–125] or fungi present in water. However, fungi do not usually have a great role in degradation of pharmaceuticals in the aquatic environment [126]. Concerning steroidal hormones, although data are lacking, it has been suggested that they are subjected to biodegradation [34], and biodegradation of antiparasitic drugs in soil has been reported [34]. Thus, it can be assumed that biodegradation is also likely to occur in aquatic environment.

Hydrolysis is also a common reaction leading to abiotic degradation of substances in the aquatic environment [127]. VPRs may either be stable in water or rapidly hydrolyzed.

Table 6 summarizes the degradation pathways reported by literature for the studied chemical families. These studies focus on degradation pathways of antibiotics including ionophores. Data on the environmental behaviour of antiparasitic drugs in water is missing in the literature.

According to Table 6, only SAs are reported to be subjected to biodegradation, while hydrolysis has been observed for PENs, cephalosporins and TCs. Photolysis appears to be the major degradation/transformation pathway of VPRs in natural waters. Moreover, according to the half-lives reported in Table 6, photolysis degradation of VPRs is also occurring faster than hydrolysis and biodegradation of VPRs.

Multiple transformation products can be generated during the degradation of parent compounds [17–19,120,128]. Photolysis of fluorquinolones leads to the formation of 5 and 2 photo-transformation products for enrofloxacin and marbofloxacin respectively [17], while photolysis of the SAs sulfadimethoxine, sulfamethazine and sulfamethoxyypyridazine generated 11, 8 and 6 transformation products, respectively [18,128,129]. These TPs can be more stable than the parent compounds as it was observed with sulfamethoxyypyridazine and sulfathiazole photo-degradation products for example [129,130]. Also TPs may still exercise a biological activity or even be more toxic to the

**Table 4**  
Pseudo-partitioning coefficients water – SPM of VPRs reported in literature.

Chemical family	Molecule	$P\text{-}PC_{SPM}^a$ (L/kg) range <sup>b</sup>	Mean $P\text{-}PC_{SPM}$ (L/kg)	Reference
SAs	Sulfadiazine	5–1167	249	[101]
		/ <sup>c</sup>	102	[45]
	Sulfamethazine	25–4192	1220	[101]
		/	1295	[45]
FQs	Enrofloxacin	/	5722	[45]
	Ofloxacin	77–13457	3456	[101]
		/	3930	[45]
	Norfloxacin	96–3325	574	[101]
TCs	Oxytetracycline	40–5188	1472	[101]
		/	35403	[45]
	Tetracycline	221–6173	2572	[101]
		/	31379	[45]

Acronyms: TCs: Tetracyclines SAs: Sulfonamides FQs: Fluoroquinolones.

<sup>a</sup> Pseudo-partition coefficient between water and SPM (Solid Particulate Matter).

<sup>b</sup> Range: variability among the different samples.

<sup>c</sup> Values are not reported in the study.

ecosystems than the parent compound [26,119,128]. The antimicrobial-active transformation products 4-Epi-,  $\alpha$ -apo-, and  $\beta$ -apo-oxytetracycline were identified during hydrolysis of oxytetracycline [120]. Altrenogest photoproducts exhibit an androgenic activity comparable to that of altrenogest [131]. However TPs can also be inactive, as TPs generated during the photolysis of the ionophore salinomycin or the aminoglycoside streptomycin [19,112].

#### 4. Occurrence of VPRs in tap water

There is an evident lack of data on the occurrence of VPRs in tap water, as shown in Table 7, which includes only four studies from 2007 to 2017 [82,132–134].

Due to this limited number of studies on VPRs in tap water (11 studies), the studies locations are not specifically rural areas with livestock activities nearby. All studies analyzing at least one VPR in tap water were taken into account. Nevertheless, VPRs have been quantified in tap water at lower concentrations than in water resources (both SW and GW), from  $2 \text{ ng L}^{-1}$  [132] to a maximum of  $104 \text{ ng L}^{-1}$  [133]. In China, 6 VPRs were quantified in the 113 tap waters sampled in 13 cities, up to  $104 \text{ ng L}^{-1}$  for thiamphenicol [133]. During a national survey conducted in France on 285 samples, only 3 of the 12 investigated compounds were detected [82].

Besides the studies mentioned in Table 7, a few other studies have investigated VPRs in tap water but without detecting any [135–141].

#### 5. Fate of VPRs in drinking water treatment plants

In DWTPs, the VPRs are subjected to the same or very similar processes that they face in water resources. Thus, their fate and behaviour in DWTPs depends on the same physical or chemical reactions as in the environment (i.e. adsorption, oxidation, biodegradation). Nowadays, DWTPs are not designed to treat VPRs, but because some VPRs have similar physicochemical properties (polarity, molecular weight) to other micropollutants (pesticides for example), some of them can be removed. For example, the use of membranes with molecular weight cut-off varying between 200 and 400 Da is generally appropriate for pesticides removal [142]. These results can be compared with nanofiltration removal efficiencies observed by Dolar et al. [143] for VPRs such as febantel and ciprofloxacin.

For the production of tap water from surface water with high total organic carbon concentration, the average DWTP has a clarification process, preceded or followed by advanced treatment processes (i.e. activated carbon, oxidation, membranes filtration). The last step is

disinfection. A scheme of a DWTP is succinctly represented in Fig. 3. Each treatment step is described in details in the corresponding section below.

The Table 8 summarizes removal rates for some VPRs reported during the different DWTPs steps. The considered studies were mostly conducted at laboratory scale, thus the parameters used vary from one study to another (i.e. VPR concentration, oxidant concentration, contact time etc.) and may not be representative of full-scale DWTP conditions. The main bias in laboratory studies is the VPRs concentration. For example, in studies reported on VPRs adsorption on activated carbon, VPRs concentrations vary from  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  [144] to  $600 \text{ mg L}^{-1}$  [145], which are not representative of environmental concentrations. To compare, in a study performed on full-scale DWTP [135], the reported concentration of the antibiotic erythromycin in the influent prior to filtration on activated carbon was included between 0.8 and  $1.4 \text{ ng L}^{-1}$ .

#### 5.1. Clarification

Clarification consists of several steps: coagulation, flocculation, sedimentation and sand filtration [146]. Clarification aims at reducing turbidity and total organic carbon by removing particulate matter and colloids [147]. The main parameters that control clarification process are the coagulant/flocculant types and amounts, pH [146]. As VPRs can be adsorbed onto particulate matter and colloids, they may be removed during the clarification process, depending on their physicochemical properties (log Kow and pkas) [147]. TCs are amphoteric compounds which possess three pkas and they are known to bind on particulate matter and colloids by ionic exchanges in raw water. Coagulation of seven TCs was studied on river water at lab-scale, with aluminum polychloride as coagulant [148]. Coagulation was effective to remove TCs with optimum removal rates ranged between 47% and 66% for an incoming concentration of  $100 \mu\text{g/L}$  of TCs and  $60 \text{ mg/L}$  of coagulant. However, most studies indicate that clarification steps alone poorly remove VPRs [28,48,144,149–151], for any operating conditions.

#### 5.2. Advanced treatment technologies

Oxidation processes, adsorption on activated carbon, and membrane filtration processes (ultrafiltration, nanofiltration) are classified as advanced treatment technologies and are mainly used on raw surface water [146].

##### 5.2.1. Oxidation processes

Pre-oxidation can be performed as first step of the process, using either  $\text{KMnO}_4$ , chlorine-derived species, or ozone ( $\text{O}_3$ ). The aim of pre-oxidation is to eliminate mineral compounds such as iron or manganese, which can modify the color and taste of water, but also algae [152]. An intermediate oxidation step sometimes takes place after clarification using  $\text{O}_3$  only. Its goal is to enhance the degradation of micropollutants and residual organic matter. Finally, oxidation is performed for a third time as the last step in the whole treatment process. It is the disinfection step, which aims to eliminate all micro-organisms before distribution of the treated water. Disinfection can be performed either with  $\text{O}_3$ , chlorine-derived species or ultraviolets (UV) [153]. The oxidant type impacts the process. Ben et al. [154] found that the reaction rates constants of SAs with chlorine dioxide at pH7 and  $20^\circ\text{C}$  were higher than with free chlorine, but lower than with ozone under comparable experimental conditions. Besides the oxidant type, the contact time and the dosage of the oxidant is different between pre-oxidation, intermediate oxidation and disinfection [147]. VPR degradation rate during the oxidation steps will depend on those parameters, with enhanced degradation at higher oxidant doses and through longer contact time. Garoma et al. [151] studied the influence of ozone gas concentration on ozonation reaction of four sulfonamides. At 120 s of reaction, SAs removal ranged between 90 and 99% for  $3.2 \text{ mg L}^{-1}$  of

**Table 5**  
Pseudo-partitioning coefficients water –sediment of VPRs reported in literature.

Chemical family	Molecule	P-PC <sub>Sed</sub> <sup>a</sup> (L/kg) range <sup>b</sup>	Mean P- PC <sub>Sed</sub> (L/kg)	Reference
SAs	Sulfachloropyridazine	Not detected (ND) <sup>c</sup> –287	254	[104]
	Sulfadiazine	518–3279	/ <sup>d</sup>	[105]
	Sulfadimethoxine	ND–332	223	[104]
		/	402	[106]
	Sulfadoxine	ND–432	312	[104]
		2–71	/	[53]
	Sulfamethazine	356–1414	/	[105]
		64–344	225	[104]
	Sulfamethoxazole	42–182	/	[53]
		57–232	185	[104]
		ND–22	/	[53]
	Sulfamonomethoxine	27–89	/	[53]
		Sulfapyridine	ND–195	/
Sulfathiazole	/	378	[106]	
Diaminopyrimidines	Trimethoprim	15–789	/	[53]
MLs	Erythromycin	/	211	[106]
		37–1811	/	[105]
		45–247	105	[107]
	Roxithromycin	ND–2030	/	[53]
		168–51934	/	[105]
	Tylosin	ND–1810	/	[53]
		/	91	[106]
FQs	Danofloxacin	ND–214	/	[53]
	Difloxacin	31–3530	/	[53]
	Enrofloxacin	36–1457	635	[45]
		ND–1266	1003	[104]
	Fleroxacin	753–5800	/	[53]
		44–2620	/	[53]
		63–184	/	[53]
	Marbofloxacin	313–1370	/	[53]
	Norfloxacin	31,723–68,065	/	[105]
		4493–47,093	16543	[108]
	Ofloxacin	ND–5440	/	[53]
		ND–1022	838	[104]
		5925–12,465	9493	[108]
	Pefloxacin	40–1071	356	[45]
		212–5500	/	[53]
		ND–1066	771	[104]
	Sarafloxacin	ND–2990	/	[53]
		3380–6510	/	[53]
	TCs	Chlortetracycline	/	305
ND–1018			842	[104]
Doxycycline		2–18	/	[53]
		Oxytetracycline	/	1267
Tetracycline		/–1398	/	[57]
		277–1398	951	[108]
		ND–968	786	[104]
Tetracycline		/	1051	[106]
		/–1410	/	[57]
		768–1227	1020	[108]
		347–10,000	/	[53]
Phenicol	Florfenicol	351–844	687	[104]
		< 1–3	/	[53]

Acronyms: TCs: Tetracyclines SAs: Sulfonamides PENs: Penicillins MLs: Macrolides FQs: Fluoroquinolones.

<sup>a</sup> Pseudo-partition coefficient between water and SPM (Solid Particulate Matter).

<sup>b</sup> Range: variability among the different samples.

<sup>c</sup> Not detected.

<sup>d</sup> Values are not reported in the study.

ozone gas applied. For the same reaction time, SAs removal ranged between 65 and 80% when using an ozone concentration of 2.3 mg L<sup>-1</sup>. Thus, results showed that the removal of all sulfonamides increased as ozone gas concentration increased [151].

Oxidation processes can lead to the formation of oxidation by-products that may be more toxic than the parent compound. Currently, the formation pathway, the chemical structure and the potential impacts towards human health of those transformation products are largely unknown [21].

**5.2.1.1. KMnO<sub>4</sub>.** Pre-oxidation can be performed as first step of the process, using potassium permanganate (KMnO<sub>4</sub>), chlorine-derived species, or ozone (O<sub>3</sub>). In a full-scale DWTP, up to 87% and 89% of florfenicol and flunixin, respectively, were removed during the pre-oxidation (using KMnO<sub>4</sub>) and coagulation stages (using aluminum polychloride). However, this high removal rate was probably largely due to the pre-oxidation step [155].

**5.2.1.2. Ozonation.** Ozone has an important reduction potential (E = 2.07 V), superior to Cl<sub>2</sub> (E = 1.36 V). Consequently, it is a

**Table 6**  
Fate of VPRs in natural waters.

Compounds	Biodegradation (min-max half-lives)	Hydrolysis (min-max half-lives)	Direct photolysis	Indirect photolysis	Min-max photolysis half-life	Photolysis references
Altrenogest (hormone)	/ <sup>a</sup>	/	Yes	No <sup>b</sup>	27 s	[131]
Aminoglycosides	/	/	No	Yes	/	[112]
Cephalosporins	No [174]	Yes (2.5–22 days) [174,175]	/	/	/	
Phenolics	/	No [176,177]	No	Yes	4.1–7.6 days	[111]
FQs	No [114,116]	No [17,114]	Yes	No	7.7–29 min	[17,27,113,114,116,119]
Ionophores (lasalocid)	/	No [178]	Yes	/	5–59 min	[19,178]
Ionophores (monensin)	/	No [178]	No	Yes	4,1 days	[19]
Ionophores (salinomycine, narasin)	/	No [178]	Yes	Yes	53 h	[19,178]
PENs	No [179]	Yes (20-27 days) [16,180,181]	/	/	/	/
Quinolones	/	No [176]	No	No	/	[176]
SAs	Yes (17 -153 days) [122,123,124]	No <sup>c</sup> [127]	Yes	Yes	13 min–14 h	[18,121,128,130,182]
TCs	/	Yes (16-116 days) [120,176,183]	Yes	Yes	0.19–5 days	[26,120,176]
MLs	No [184]	No [177]	Yes <sup>d</sup>		200 days	[184]

Acronyms: TCs: Tetracyclines SAs: Sulfonamides PENs: Penicillins MLs: Macrolides FQs: Fluoroquinolones.

<sup>a</sup> Data not available.

<sup>b</sup> direct photolysis too fast.

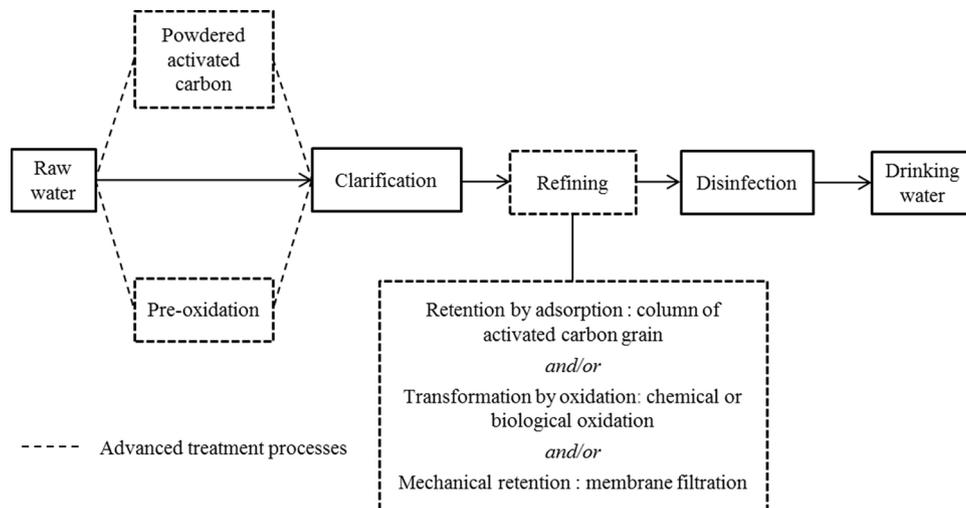
<sup>c</sup> on the 12 studied compounds only 3 were partly and slowly degraded: sulfadiazine, sulfachloropyridazine and sulfamethoxyipyridazine.

<sup>d</sup> No distinction between direct and indirect photolysis.

**Table 7**  
Occurrence of VPRs in tap water.

Type molecule	Family	Drug name	Min. – Max. conc. (ng/L)	Median conc.	Study Place	Reference
Antibiotics	MLs	Erythromycin	5	/	USA (North Carolina)	[132]
		Tylosin	4	/	USA (North Carolina)	[132]
			/–20	/	France (nationwide survey)	[82]
	SAs	Sulfamethazine	/–7	6	China	[133]
		Sulfathiazole	/–90	9	China	[133]
	TCs	Oxytetracycline	27	< 4	China	[133]
	FQs	Danofloxacin	1	/	China	[134]
	Quinolones	Danofloxacin	/–57	/	France (nationwide survey)	[82]
	Phenolics	Flumequine	2–3	/	USA (North Carolina)	[132]
	Nitroimidazoles	Florfenicol	< 50	/	France (nationwide survey)	[82]
Thiamphenicol		/–104	18	China	[133]	
Dimetridazole		/–15	7	China	[133]	
	Metronidazole	/–19	2	China	[133]	

Acronyms: TCs: Tetracyclines SAs: Sulfonamides MLs: Macrolides FQs: Fluoroquinolones.



Clarification : coagulation – flocculation -settling - sand filtration

**Fig. 3.** Representation of a drinking water treatment plant.

**Table 8**  
Removal rates of VPRs during different DWTPs steps.

Chemical family	Compound	Clarification only	Clarification + KMnO4	Chlorination	Ozonation	UV	Activated carbon	Membranes	References
SAs	Sulfamethazine	< 10%	/	95%	67%	100%	19%–94.6%	> 60%	[24,144,149,158,163]
	Sulfamethoxazole	< 10%	/	> 75%	76–> 90%	> 94.6%	23%–86.8%	> 70%	[144,158,163,169,170]
	Sulfadiazine	/	/	/	> 90%	100%	97.5%	/	[144,151,169]
	Sulfaquinoxaline	/	/	/	99%	/	/	/	[24]
	Sulfathiazole	/	/	/	> 90%	100%	/	60%	[151,163,169]
	Sulfamethizole	/	/	/	> 90%	> 94.6%	90.8%	> 60%	[151,163,169]
	Sulfaguandine	/	/	/	/	100%	96.9%	/	[144,169]
	Sulfamerazine	/	/	/	/	100%	90.6%	> 60%	[144,163,169]
	Sulfadimethoxine	/	/	/	/	100%	89.3%	80%	[144,163,169]
	Sulfisoxazole	/	/	/	/	94.6%	/	/	[169]
	Sulfachloropyridazine	/	/	/	/	> 94.6%	93.2%	> 60%	[144,163,169]
	Sulfamer	/	/	/	/	/	95.5%	/	[144]
	Sulfamonomethoxine	/	/	/	/	/	93.6%	/	[144]
	Sulfamethoxyipyridazine	/	/	/	/	/	97.2%	/	[144]
Sulfapyridine	/	/	/	/	/	96.8%	/	[144]	
TCs	Oxytetracycline	< 10%–47%	/	/	57%	/	20%–97.6%	100%	[144,148,158,163]
	Tetracycline	< 10%–49%	/	/	71%	/	17%–99%	100%	[144,148,158,163]
	Chlortetracycline	38–55%	/	/	/	/	> 80%–99.5%	100%	[144,148,163]
	Doxycycline	22–42%	/	/	/	/	/	/	[144,148,163]
Quinolones	Flumequine	/	/	0%	/	/	98.7%	/	[23,144]
	Oxolinic acid	/	/	/	/	/	99.4%	/	[144]
FQs	Lomefloxacin	/	/	/	93%	/	> 80%	/	[156,160]
	Enrofloxacin	/	/	/	/	14%	> 80%	> 92.1%	[160,167,185]
	Pefloxacin	/	/	/	/	19%	/	/	[167]
	Difloxacin	/	/	/	/	12%	/	/	[167]
	Ofloxacin	/	/	/	/	/	> 80%	/	[160]
	Sarafloxacin	/	/	/	/	/	> 80%	/	[160]
	Norfloxacin	/	/	/	/	/	> 80%	/	[160]
	Erythromycin	< 10%	/	> 75%	100%	/	96.3%	/	[144,158,170]
MLs	Kitrasamycin	/	/	/	/	/	99.6%	/	[144]
	Roxithromycin	/	/	/	/	/	95.1%	/	[144]
	Spiramycin	/	/	/	/	/	91.7%	/	[144]
	Florfenicol	/	87%	90% <sup>b</sup>	/	/	98.5%	/	[144,155]
	Chloramphenicol	/	/	75%	/	25%	98.4%	/	[22,144]
	Amoxicillin	< 10%	/	100%	54%	/	23%	/	[158,165]
β-lactams	Penicillin G	/	/	100%	/	/	96.2%	/	[144,165]
	Monensin	/	/	/	/	100%	/	/	[168]
Ionophores	Salinomycin	/	/	/	/	100%	/	/	[168]
	Nigericin	/	/	/	/	100%	/	/	[168]
	Narasin	/	/	/	/	100%	/	/	[168]
NSAIDs <sup>a</sup>	Flunixin	/	89%	/	/	/	/	/	[155]

Acronyms: TCs: Tetracyclines SAs: Sulfonamides PENs: Penicillins MLs: Macrolides FQs: Fluoroquinolones.  
<sup>a</sup> NSAIDs : nonsteroidal anti-inflammatory drugs.  
<sup>b</sup> chlorination + filtration.

powerful oxidant [156]. It can interact with VPRs either directly or via hydroxyl radicals formed during ozone decomposition at pH 7 or higher [24,29,151,157]. SAs (sulfadiazine and sulfamethoxazole) antibiotics and nitroimidazole antibiotics (metronidazole, dimetridazole, tinidazole, ronidazole) had a higher degradation rate when reacting with hydroxyl radical formed during ozone decomposition than when reacting with molecular ozone [29,157]. Therefore, the ozone process is usually more efficient at alkaline pH [29,151,156]. An exception was noted in Urbano et al. [24], where sulfaquinolone degraded faster and more efficiently (99% in one minute) at acidic pH when reacting only with molecular ozone at 2.8 mg/L. The exception was explained by the greater selectivity of ozone towards sulfaquinolone compared to hydroxyl radicals [24]. At a full-scale DWTP, ozonation was the main step responsible for antibiotics degradation, with a removal rate of 65% for 1 mg/L of ozone [158]. Removal rates during ozonation may be reduced by organic matter and inorganic salts in water resources which can act as scavengers during radical reactions [24,48,151]. The degradation products formed and their properties depend on the oxidant (ozone or hydroxyl radical) most prevalent in the process [156]. When antibiotics react directly with ozone, degradation products appear to be biologically inactive. However, when antibiotics react with hydroxyl radicals, toxic and persistent degradation products could be generated [23,24,29,156]. For example, four degradation products were identified after sulfaquinolone ozonation, including three highly toxic and persistent compounds [24]. Moreover, assessing VPRs degradation pathways during ozonation is a complex task, because one VPR can lead to many by-products. For example, 27 degradation products of lomefloxacin and 9 degradation products of tetracycline have been identified after ozonation reactions [23].

### 5.2.2. Adsorption on activated carbon

Activated carbon is used to adsorb and sometimes biologically degrade (after ozonation) organic matter and micropollutants [147]. The adsorption level of VPRs on activated carbon depends on the nature, the surface area and the porosity of the adsorbent as well as on the properties of the VPR (i.e. size; log Kow and pKa) [49,145]. Adsorption on powder or granular activated carbon is known to remove efficiently hydrophobic pharmaceuticals from water [28,48,49]. VPRs are not destructed but transferred to another phase [48,159] thus avoiding the formation of transformation products [48], except with biological activated carbon. Biological activated carbon consists in microorganisms adsorbed on the surface of the activated carbon and forming bacteria colonies [145]. Thus, VPRs may be biotransformed by contact with the bacteria and generate TPs.

Powder activated carbon at 20 mg/L (pore size of 3.03 nm, specific surface area of 853 m<sup>2</sup>/g) showed high adsorption capacity (> 85%) on antibiotics belonging to six different chemical families (SAs, TCs, phenolics, quinolones, MLs, and PENs) in surface water [144]. FQs were also efficiently eliminated by powder activated carbon (diameter of 40 µm) in Fu et al. [160], where the removal rate of five FQs reached 80–96% after 30–40 h. Granular activated carbon filtration efficiently removed more than 68% of the seven tetracyclines studied by [148]. Two different carbons were used in this study, a coconut-based carbon (pore volume of 0.495 cc/g, specific surface area of 1230 m<sup>2</sup>/g) and a coal-based carbon (pore volume of 0.548 cc/g, specific surface area of 1110 m<sup>2</sup>/g). Coal-based carbon was a bit more efficient, maybe due to a larger pore volume, but it was not significantly different. Biological activated carbon filtration can also be used as in Liu et al. [158]. For a contact time of 15 min, this system accounted for 23%, 23% 20%, 19%, 17% of amoxicillin, sulfamethoxazole, oxytetracycline, sulfamethazine and tetracycline removals respectively. Even if studies number on activated carbon is limited for now (few compounds tested, and few AC types), the results tend to demonstrate that activated carbon participates to the removal of VPRs in DWTPs. Nevertheless, future work will need to assess which carbon type will be more efficient for specific VPRs.

### 5.2.3. Membrane filtration

Membrane processes, such as ultrafiltration (UF) and nanofiltration (NF) are used to remove natural organic matter and disinfection by-product precursor matter such as humic acids [161]. Membranes will act as physical barriers that will reject some compounds and let some other pass through, depending on the membranes pore size and molecular weight of the substances [32]. Concerning micropollutants, results are mixed [162], even if membrane processes prove to be highly efficient in the removal of some micropollutants ([32,48,163]). The efficiency of VPRs rejection by membrane filtration depends on VPR properties (size, molecular weight, etc.), membrane properties (molecular weight cut-off, pore size, surface charge, etc.), matrix composition (presence and nature of organic matter, ionic strength) and temperature [32,143]. The main rejection mechanisms for a membrane are charge and size exclusion [143,163]. Thus, an important aspect to consider with membrane filtration is the molecular weight cut-off, which reports the molecular weight (expressed in Dalton) of a hypothetical non-charged solute that is 90% rejected [142]. In Koyuncu et al. [163], nanofiltration rejections were higher than 95% for VPRs with a molecular weight higher than 300 g/mol. As a result, TCs antibiotics with molecular weight of around 450 g/mol were completely rejected, while sulfamethoxazole, the SAs with the lowest molecular weight (253 g/mol), had the smallest rejection rate. Therefore, only small VPRs with a molecular weight inferior to the cutoff molecular weight of the membrane will pass through membranes processes. In a laboratory-scale test, three VPRs from different therapeutic classes (ciprofloxacin, dexamethasone and febantel) present in ultrapure water were removed (> 97%) with the 4 different nanofiltration membranes (NF90, NF270, NF and HL) [143]. In some cases, like in presence of organic matter in the matrix, even small VPRs can be rejected by interacting with organic matter to form a macromolecular complex rejected by size exclusion. They can also undergo hydrophobic interactions with the membrane caused by organic matter, thus narrowing the pores and leading to a higher rejection [143].

Some studies mention that there is no generation of by-products with membranes [32]. Nevertheless, microbial attachment and growth on membranes [164] may lead to the generation of TPs by biodegradation. Depending on their sizes and molecular weights, TPs may be rejected or pass through the membrane.

### 5.3. Disinfection

Disinfection is the last step in the whole treatment process. It aims to eliminate all micro-organisms before distribution of the treated water. Disinfection can be performed either with O<sub>3</sub>, chlorine-derived species or ultraviolets (UV) [153].

#### 5.3.1. Chlorination

Several species with chlorine are used in DWTPs to disinfect water (free chlorine, chlorine dioxide, chloramines) but also have the potential to oxidize micropollutants. Free chlorine (i.e. hypochlorite anion and hypochlorous acid) is a non-selective oxidant widely used in DWTP at the disinfection step [21,23].

In full-scale DWTPs, different behaviours of VPRs were observed when reacting with free chlorine. In Liu et al. [158], only 4% of all antibiotics were removed during the disinfection step. This percentage was explained by the low concentrations of antibiotics in the influent (below 10 ng L<sup>-1</sup>) and the low dosage of chlorine. It can be assumed that the low amount of chlorine will be preferentially consumed by other compounds and/or micro-organisms having higher chlorine demand than antibiotics. The quinolone flumequine, which does not have a piperazine ring, does not react at all with chlorine and the FQ enrofloxacin reacts very slowly [23]. As an explanation, organic matter may interact and form complexes with VPRs, slowing down the reaction rate with chlorine species [32]. Other VPRs are known to react heavily with chlorine such as trimethoprim, tetracyclines and FQs like ciprofloxacin

or levofloxacin [23].

A major drawback of chlorination is the formation of disinfection by-products can retain the initial biological activity of the parent compounds, or even become more toxic than parent compounds [22]. Disinfection by-products of the antibiotic carbadox are believed to retain antibacterial activity as the biological active n-oxide group remains in their structures [23]. Sulfamethazine degradation by chlorine induces the formation of trihalomethanes and haloacetic acids, which are undesirable chlorination by-products, potentially carcinogenic [149]. 38 disinfection by-products were generated during the chlorination of sulfamethoxazole, sulfathiazole and sulfadimethoxine [21]. Fifteen of these disinfection by-products may have retained antibacterial activity as their sulfonamide functional group was preserved. Besides, 21 disinfection by-products may have acquired negative and toxic effects by the incorporation of a chlorine atom in their chemical structure [21].

Chlorine dioxide is used to replace conventional chlorine species because it does not lead to the formation of halogenated species like trihalomethanes when reacting with organic compounds [32,150,165,166]. Instead, chlorine dioxide induces the formation of oxygenated and hydroxylated products when reacting with TCs [23]. In addition, chlorine dioxide is more selective than free chlorine, and does not react with aromatic, hydrocarbons, carbohydrates, primary and secondary amines, aldehydes, and ketones or piperazine ring. Consequently, the antibacterial activity of FQs remains after the disinfection step with chlorine dioxide. Chlorine dioxide reacts with phenols and tertiary amine groups or piperazine rings [23,32,166]. This is supported by the fact that [166] noticed a chlorination of the piperazine ring of enrofloxacin and ciprofloxacin.

Chloramine can also be used for disinfection in DWTPs. However, there is a concern that their reaction with micropollutants like VPRs may lead to the formation of carcinogenic N-nitrosodimethylamine (NDMA) [28]. Indeed, some VPRs with diethylamine groups are very reactive with chloramine. Spiramycin and minocycline were transformed respectively at 3.4 and 4.9% into NDMA in Leavey-Roback et al. [28]. The carcinogenic effect of the resulting NDMA solutions has not been assessed in the study. However, as NDMA is classified as a carcinogenic compound at low concentration levels ( $\text{ng L}^{-1}$ ) [28] it can be assumed that it can be harmful to human health.

### 5.3.2. Ultraviolets (UV)

UV (254 nm) is used in DWTPs as a disinfectant, but it can also contribute to the reduction of water contamination by some chemical families of VPRs. Efficiency of VPRs removal by UV oxidation depends on the ability of the VPR to absorb at 254 nm, the UV fluence (i.e. UV dose, expressed in  $\text{mJ/m}^2$ ) and on the irradiation time [167,168]. For twelve SAs (sulfaguanidine, sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfathiazole, sulfamethizole, sulfamethoxazole, sulfonamide, sulfisoxazole, sulfachloropyridazine, sulfamethoxydiazine, sulfadimethoxine) direct UV photolysis at 254 nm was very efficient, with removal rates between 95% and 100% after 30 min of irradiation. It was noticed that SAs with a five-membered heterocycle undergo a higher removal rate than sulfonamides with a six-membered heterocycle [169]. Four ionophores (monensin, salinomycin, nigericin and narasin) were completely degraded in 300 s. Faster degradation was observed for salinomycin and narasin than monensin. This difference was attributed to the extra double bonds of narasin and salinomycin [168]. UV photolysis can generate transformation products with equal or higher antibacterial activity. For example, the FQ enrofloxacin can be degraded into ciprofloxacin, which is also used as a pharmaceutical [167].

### 5.4. Overall removal efficiencies

In Liu et al. [158] the behaviour of six veterinary antibiotics was studied in an industrial-scale DWTP including coagulation, sedimentation, sand filtration and chlorination processes, combined with an

advanced treatment process composed of ozonation and biological activated carbon. 91% of total antibiotics were removed during the whole process (85% for amoxicillin; 86% for oxytetracycline; 92% for tetracycline; and complete removal for sulfamethoxazole, sulfamethazine, and erythromycin) [158].

In 2011, Boleda et al. [135] studied a DWTP composed of dioxo-chlorination, clarification and a separation of water into two parallel treatment lines. The first treatment line was a conventional one (ozonation and granular activated carbon filtration) and the second an advanced one (ultrafiltration, ultraviolets and reverse osmosis). The two different treatment lines (conventional one and advanced one) were then blended and the water was chlorinated and distributed. Reverse osmosis is not usually used for drinking water treatment, but in Boleda et al. [135] the raw water quality was altered by salt mine exploitations, so reverse osmosis was applied for desalination.

Six veterinary antibiotics (lincomycin, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine, sulfamethazine, trimethoprim and tylosin) were studied and efficiently eliminated with removal percentages > 99%. Lincomycin, sulfamethoxazole and trimethoprim were totally removed with both applied treatments (conventional and advanced). The conventional treatment was more effective to remove sulfadimethoxine and sulfamethazine than the advanced treatment. On the other hand, tylosin was eliminated at 99% with the advanced treatment and at 94% with the conventional treatment [135].

Other studies reported complete removal of the studied VPRs with conventional treatments for the following compounds: lincomycin [147,170], sulfamethazine [170], sulfadimethoxine [170], and sulfathiazole [170], tiamulin [147], flunixin [155]. Influent concentration levels ranged from  $4 \text{ ng L}^{-1}$  to  $50 \text{ ng L}^{-1}$  [147,155,170].

## 6. Conclusion and way forward

VPRs have been widely quantified in natural waters (either surface water or groundwater) between 2007 and 2017, from  $1 \text{ ng L}^{-1}$  to  $255 \mu\text{g L}^{-1}$ . This demonstrates that natural waters contamination by VPRs is still an actual issue that must be evaluated and managed. Plenty of parameters are involved in the dynamics (occurrence, mobility, persistence) of VPRs in natural water, depending on spatial aspects and temporal aspects. An emphasis is made on sales and uses of VPRs which are major factors impacting their occurrence. The update provided in this review on VPRs sales worldwide (regarding the available information) shows that sales tend to decrease in most countries with the exception of the USA and in New Zealand. TCs are the most sold veterinary antibiotics worldwide, followed by PENs, MLs and SAs. Compared to ten years ago, more countries sales data are available in the public domain which is an improvement. Indeed, sales information enables a better targeting of the compounds to be sought in the environment of specific countries. Nevertheless, sales amounts of probably important VPRs consumer countries such as China, India or Canada are not yet available. Considering fate of VPRs in natural waters, studies published over the past few years have provided knowledge on the degradation mechanisms in natural waters. VPRs can be degraded or transformed by biodegradation, hydrolysis or photolysis. Photo-degradation appears to be the major degradation pathway in SW.

Only few studies were published on VPRs occurrence in tap water (11 studies), as shown in Section 3. Nevertheless, veterinary antibiotics have been detected from traces to  $100 \text{ ng L}^{-1}$ . Those concentration levels are unlikely to cause acute toxicity effects on human health [171]. However there is a concern as VPRs are added to the cocktails of micropollutants already present in drinking water, such as human drug residues, pesticides, biocides, flame retardants, metals [172,173]. It is therefore important to understand fate of VPRs in DWTPs. Overall removals of VPRs in DWTPs generally exceed 90% and advanced treatment processes (oxidation processes, adsorption on activated carbon, membrane filtration) greatly contribute to these removals. However, studies in VPRs fate performed on full-scale DWTPs are scarce (6 studies).

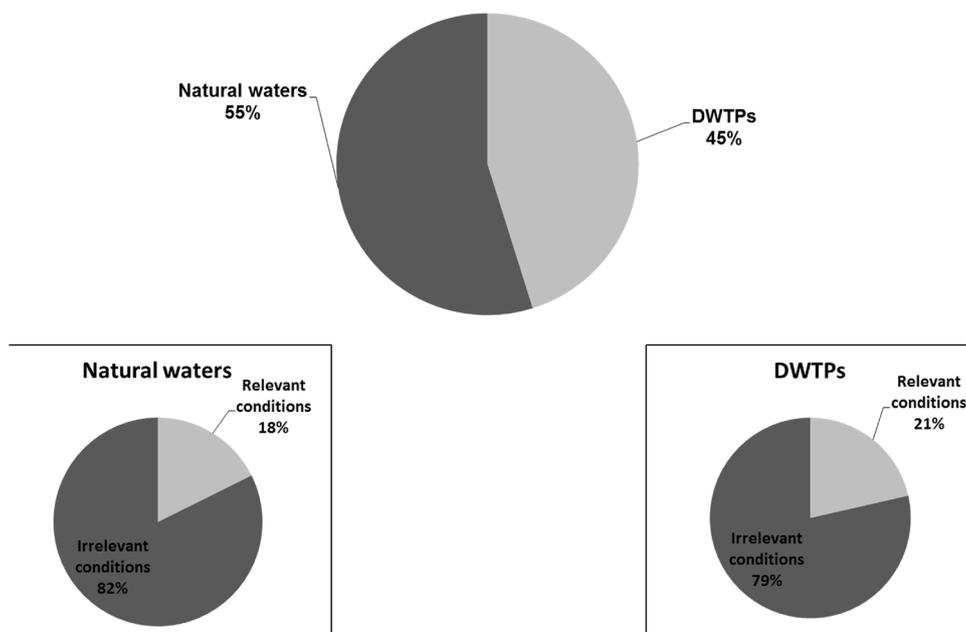


Fig. 4. Number of studies dealing with fate of VPRs in natural waters and DWTPs.

Fig. 4 is focusing on studies on fate of VPRs in natural waters and fate of VPRs in DWTPs (however, studies on VPRs occurrence in natural and tap water are not considered). Among the 38 studies dealing with VPRs fate in natural waters, only 18% were conducted under environmentally relevant conditions. Conditions considered as environmentally relevant were the following: VPRs concentrations below  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ; natural sunlight; natural water. Conditions considered as environmentally irrelevant were the following: VPR concentrations higher than  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , artificial sunlight, deionized water.

Among the 28 selected papers on the fate of VPRs in DWTP, only 21% were performed under relevant full-scale DWTP conditions (Fig. 4). Additional parameters such as concentration of the reactive used in DWTP (oxidant for example) and contact time were considered. This suggests that results of fate studies in DWTP should be considered with caution as the removal rates may be different in full-scale DWTP conditions. Although the issue of experimental conditions and experimental concentrations levels has long been emphasized in order to accurately reproduce environmental phenomena, it seems that there are still improvements to be made.

Also, oxidation processes can result in the formation of oxidation by-products that may be more toxic than the parent compound. Currently the formation pathway, the chemical structure and the potential impacts of these transformation products on human health are largely unknown and need to be investigated. To finish, many VPRs have not been investigated yet. There is a scientific gap on the occurrence and fate of antiparasitic drugs in natural waters and tap water (only 11 studies considered versus 105 studies on antibiotics).

#### Acknowledgments

This work was supported by La Région Bretagne (COH15002), L'Agence Française de la Biodiversité (Project no. 224), EHESP (2015/539/DRH/EHESP), ARS and DREAL Bretagne (56/2016/277).

Declarations of interest: none.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.075>.

#### References

- [1] T.P. Van Boeckel, C. Brower, M. Gilbert, B.T. Grenfell, S.A. Levin, T.P. Robinson, A. Teillant, R. Laxminarayan, Global trends in antimicrobial use in food animals, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) 5649–5654, <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>.
- [2] S. Bartelt-Hunt, D.D. Snow, T. Damon-Powell, D. Miesbach, Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities, *J. Contam. Hydrol.* 123 (2011) 94–103, <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2010.12.010>.
- [3] S. Obimakinde, O. Fatoki, B. Opeolu, O. Olatunji, Veterinary pharmaceuticals in aqueous systems and associated effects: an update, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 3274–3297, <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7757-z>.
- [4] R.R. Kumar, J.T. Lee, J.Y. Cho, Fate, occurrence, and toxicity of veterinary antibiotics in environment, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 55 (2012) 701–709, <https://doi.org/10.1007/s13765-012-2220-4>.
- [5] A. Van Epps, L. Blaney, Antibiotic residues in animal waste: occurrence and degradation in conventional agricultural waste management practices, *Curr. Pollut. Rep.* 2 (2016) 135–155, <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0037-1>.
- [6] L. Du, W. Liu, Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review, *Agron. Sustain. Dev.* 32 (2012) 309–327, <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0062-9>.
- [7] K.-R. Kim, G. Owens, S.-I. Kwon, K.-H. So, D.-B. Lee, Y.S. Ok, Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment, *Water Air Soil Pollut.* 214 (2011) 163–174, <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0412-2>.
- [8] R.P. Tasho, J.Y. Cho, Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: a review, *Sci. Total Environ.* 563–564 (2016) 366–376, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.140>.
- [9] S.A. Kools, A. Boxall, J.F. Moltmann, G. Bryning, J. Koschorreck, T. Knacker, A ranking of European veterinary medicines based on environmental risks, *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4 (2008) 399–408.
- [10] A.B.A. Boxall, Veterinary medicines and the environment, in: F. Cunningham, J. Elliott, P. Lees (Eds.), *Comp. Vet. Pharmacol.* Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010, pp. 291–314, [https://doi.org/10.1007/978-3-642-10324-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-10324-7_12).
- [11] D.S. Jeon, T.-K. Oh, M. Park, D.S. Lee, Y.J. Lim, J.S. Shin, S.G. Song, S.C. Kim, Y. Shinogi, D.Y. Chung, Reactions and behavior relevant to chemical and physical properties of various veterinary antibiotics in soil, *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 59 (2014) 391–397.
- [12] H. Bártíková, R. Podlipná, L. Skálová, Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants, *Chemosphere* 144 (2016) 2290–2301, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.137>.
- [13] A. Iglesias, C. Nebot, J.M. Miranda, B.I. Vázquez, A. Cepeda, Detection and quantitative analysis of 21 veterinary drugs in river water using high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19 (2012) 3235–3249, <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0830-3>.
- [14] A. Iglesias, C. Nebot, B.I. Vázquez, J.M. Miranda, C.M.F. Abufin, A. Cepeda, Detection of veterinary drug residues in surface waters collected nearby farming areas in Galicia, North of Spain, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 2367–2377, <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2142-7>.

- [15] W.-Y. Xie, Q. Shen, F.J. Zhao, Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review: antibiotics and antibiotic resistance, *Eur. J. Soil Sci.* 69 (2018) 181–195, <https://doi.org/10.1111/ejss.12494>.
- [16] N. Kemper, Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, *Ecol. Indic.* 8 (2008) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>.
- [17] M. Sturini, A. Speltini, F. Maraschi, A. Profumo, L. Pretali, E. Fasani, A. Albini, Photochemical degradation of marbofloxacin and enrofloxacin in natural waters, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 4564–4569.
- [18] J.J. Guerard, Y.-P. Chin, H. Mash, C.M. Hadad, Photochemical fate of sulfadimethoxine in aquaculture waters, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 8587–8592.
- [19] P. Sun, S.G. Pavlostathis, C.-H. Huang, Photodegradation of veterinary ionophore antibiotics under UV and solar irradiation, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 13188–13196, <https://doi.org/10.1021/es5034525>.
- [20] C.P. Youngquist, S.M. Mitchell, C.G. Cogger, Fate of antibiotics and antibiotic resistance during digestion and composting: a review, *J. Environ. Qual.* 45 (2016) 537, <https://doi.org/10.2134/jeq2015.05.0256>.
- [21] M. Wang, D.E. Helbling, A non-target approach to identify disinfection byproducts of structurally similar sulfonamide antibiotics, *Water Res.* 102 (2016) 241–251, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.042>.
- [22] H. Dong, Z. Qiang, J. Hu, J. Qu, Degradation of chloramphenicol by UV/chlorine treatment: kinetics, mechanism and enhanced formation of halonitromethanes, *Water Res.* 121 (2017) 178–185, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.030>.
- [23] C. Postigo, S.D. Richardson, Transformation of pharmaceuticals during oxidation/disinfection processes in drinking water treatment, *J. Hazard. Mater.* 279 (2014) 461–475, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.07.029>.
- [24] V.R. Urbano, M.G. Maniero, M. Pérez-Moya, J.R. Guimarães, Influence of pH and ozone dose on sulfaquinoxaline ozonation, *J. Environ. Manage.* 195 (2017) 224–231, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.019>.
- [25] P.M. Peltzer, R.C. Lajmanovich, A.M. Attademo, C.M. Junges, C.M. Teglia, C. Martinuzzi, L. Curi, M.J. Culzoni, H.C. Goicoechea, Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 51 (2017) 114–123, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.021>.
- [26] S. Jiao, S. Zheng, D. Yin, L. Wang, L. Chen, Aqueous photolysis of tetracycline and toxicity of photolytic products to luminescent bacteria, *Chemosphere* 73 (2008) 377–382, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.042>.
- [27] K.H. Wammer, A.R. Korte, R.A. Lundeen, J.E. Sundberg, K. McNeill, W.A. Arnold, Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials: norfloxacin, ofloxacin, and enrofloxacin, *Water Res.* 47 (2013) 439–448, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.025>.
- [28] S.L. Leavey-Roback, S.W. Krasner, I.(Mel)H. Suffet, Veterinary antibiotics used in animal agriculture as NDMA precursors, *Chemosphere*. 164 (2016) 330–338, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.070>.
- [29] M. Sánchez-Polo, J. Rivera-Utrilla, G. Prados-Joya, M.A. Ferro-García, I. Bautista-Toledo, Removal of pharmaceutical compounds, nitroimidazoles, from waters by using the ozone/carbon system, *Water Res.* 42 (2008) 4163–4171, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.05.034>.
- [30] D.S. Aga, M. Lenczewski, D. Snow, J. Muurinen, J.B. Sallach, J.S. Wallace, Challenges in the measurement of antibiotics and in evaluating their impacts in agroecosystems: a critical review, *J. Environ. Qual.* 45 (2016) 407, <https://doi.org/10.2134/jeq2015.07.0393>.
- [31] A.B. Boxall, D.W. Kolpin, B. Halling-Sørensen, J. Tolls, Are veterinary medicines causing environmental risks? *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 37 (2003), <https://doi.org/10.1021/es032519b>.
- [32] V. Homem, L. Santos, Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices—a review, *J. Environ. Manage.* 92 (2011), <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.05.023>.
- [33] F. Kaczala, S.E. Blum, The occurrence of veterinary pharmaceuticals in the environment: a review, *Curr. Anal. Chem.* 12 (2016) 169–182.
- [34] S.J. Khan, D.J. Roser, C.M. Davies, G.M. Peters, R.M. Stuetz, R. Tucker, N.J. Ashbolt, Chemical contaminants in feedlot wastes: concentrations, effects and attenuation, *Environ. Int.* 34 (2008) 839–859, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.10.007>.
- [35] K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment – a review – part I, *Chemosphere* 75 (2009) 417–434, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>.
- [36] K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment – a review – part II, *Chemosphere* 75 (2009) 435–441, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.006>.
- [37] J.-P. Lumaret, F. Errouissi, K. Floate, J. Rombke, K. Wardhaugh, A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (2012) 1004–1060.
- [38] A.K. Sarmah, M.T. Meyer, A.B.A. Boxall, A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment, *Chemosphere* 65 (2006) 725–759, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>.
- [39] M. Slana, M.S. Dolenc, Environmental Risk Assessment of antimicrobials applied in veterinary medicine—a field study and laboratory approach, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35 (2013) 131–141, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.11.017>.
- [40] D.D. Snow, S.L. Bartelt-Hunt, D.L. Brown, J. Sangster, D.A. Cassada, Detection, occurrence and fate of pharmaceuticals and steroid hormones in agricultural environments, *Water Environ. Res.* 82 (2010) 869–882, <https://doi.org/10.2175/106143010X12756668800618>.
- [41] S. Thiele-Bruhn, Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 166 (2003) 145–167, <https://doi.org/10.1002/jpln.200390023>.
- [42] J. Tolls, Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review, *Env. Sci. Technol.* 35 (2001), <https://doi.org/10.1021/es0003021>.
- [43] P.J. Van den Brink, J.V. Tarazona, K.R. Solomon, T. Knacker, N.W. Van den Brink, T. Brock, J.P. Hoogland, The use of terrestrial and aquatic microcosms and mesocosms for the ecological risk assessment of veterinary medicinal products, *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 820–829.
- [44] S.R. Wegst-Uhrich, D.A. Navarro, L. Zimmerman, D.S. Aga, Assessing antibiotic sorption in soil: a literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides, *Chem. Cent. J.* 8 (2014) 5.
- [45] Y. Li, B. Liu, X. Zhang, J. Wang, S. Gao, The distribution of veterinary antibiotics in the river system in a livestock-producing region and interactions between different phases, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 16542–16551, <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6677-2>.
- [46] L. Yao, Y. Wang, L. Tong, Y. Li, Y. Deng, W. Guo, Y. Gan, Seasonal variation of antibiotics concentration in the aquatic environment: a case study at Jiangnan Plain, central China, *Sci. Total Environ.* 527–528 (2015) 56–64, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.091>.
- [47] L. Yao, Y. Wang, L. Tong, Y. Deng, Y. Li, Y. Gan, W. Guo, C. Dong, Y. Duan, K. Zhao, Occurrence and risk assessment of antibiotics in surface water and groundwater from different depths of aquifers: a case study at Jiangnan Plain, central China, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 135 (2017) 236–242, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.006>.
- [48] Y. Yang, Y.S. Ok, K.-H. Kim, E.E. Kwon, Y.F. Tsang, Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: a review, *Sci. Total Environ.* 596–597 (2017) 303–320, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102>.
- [49] M.J. Ahmed, Adsorption of quinolone, tetracycline, and penicillin antibiotics from aqueous solution using activated carbons: review, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 50 (2017) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.004>.
- [50] J. Olsen, E. Björklund, K.A. Krogh, M. Hansen, Development of an analytical methodology for the determination of the antiparasitic drug toltrazuril and its two metabolites in surface water, soil and animal manure, *Anal. Chim. Acta* 755 (2012) 69–76, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.015>.
- [51] T.S. Thompson, D.K. Noot, F. Forrest, J.P. van den Heever, J. Kendall, J. Keenlisde, Large volume injection for the direct analysis of ionophores and avermectins in surface water by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 127–135, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.024>.
- [52] M.J. Bernot, L. Smith, J. Frey, Human and veterinary pharmaceutical abundance and transport in a rural central Indiana stream influenced by confined animal feeding operations (CAFOs), *Sci. Total Environ.* 445–446 (2013) 219–230, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.039>.
- [53] L.-J. Zhou, Q.L. Wu, B.-B. Zhang, Y. Zhao, B.-Y. Zhao, Occurrence, spatiotemporal distribution, mass balance and ecological risks of antibiotics in the subtropical shallow Lake Taihu, China, *Environ. Sci. Process. Impacts* 18 (4) (2016) 500–513, <https://doi.org/10.1039/C6EM00062B>.
- [54] L. Tong, S. Huang, Y. Wang, H. Liu, M. Li, Occurrence of antibiotics in the aquatic environment of Jiangnan Plain, central China, *Sci. Total Environ.* 497–498 (2014) 180–187, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.068>.
- [55] L. Tong, P. Li, Y. Wang, K. Zhu, Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS, *Chemosphere* 74 (2009) 1090–1097, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.051>.
- [56] S. Managaki, A. Murata, H. Takada, B.C. Tuyen, N.H. Chiem, Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 8004–8010, <https://doi.org/10.1021/es0709021>.
- [57] Y. Luo, L. Xu, M. Rysz, Y. Wang, H. Zhang, P.J.J. Alvarez, Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the Haihe River Basin, China, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 1827–1833, <https://doi.org/10.1021/es104009s>.
- [58] J. Jiang, L. Ye, Y. Chen, Contamination of surface water with veterinary antibiotics in Tiaoxi River Basin, East China, *Asian J. Chem.* 26 (2014) 8453–8459, <https://doi.org/10.14233/ajchem.2014.17941>.
- [59] V. Burke, D. Richter, J. Greskowiak, A. Mehrtens, L. Schulz, G. Massmann, Occurrence of antibiotics in surface and groundwater of a drinking water catchment area in Germany, *Water Environ. Res.* 88 (2016) 652–659, <https://doi.org/10.2175/106143016X14609975746604>.
- [60] A. Selvam, K. Kwok, Y. Chen, A. Cheung, K.S.Y. Leung, J.W.C. Wong, Influence of livestock activities on residue antibiotic levels of rivers in Hong Kong, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 9058–9066, <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6338-5>.
- [61] Y.S. Ok, S.-C. Kim, K.-R. Kim, S.S. Lee, D.H. Moon, K.J. Lim, J.-K. Sung, S.-O. Hur, J.E. Yang, Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province, Korea, *Environ. Monit. Assess.* 174 (2011) 693–701.
- [62] R. Wei, F. Ge, S. Huang, M. Chen, R. Wang, Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China, *Chemosphere*. 82 (2011) 1408–1414, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.067>.
- [63] Y. Kim, K.-B. Lee, K. Choi, Effect of runoff discharge on the environmental levels of 13 veterinary antibiotics: a case study of Han River and Kyungahn Stream, South Korea, *Mar. Pollut. Bull.* 107 (2016) 347–354, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.011>.
- [64] X. Zhang, Y. Li, B. Liu, J. Wang, C. Feng, M. Gao, L. Wang, Prevalence of veterinary antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the surface water of a livestock production region in Northern China, *PLoS One* 9 (2014) e111026, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111026>.

- doi.org/10.1371/journal.pone.0111026.
- [65] Y. Matsui, T. Ozu, T. Inoue, T. Matsushita, Occurrence of a veterinary antibiotic in streams in a small catchment area with livestock farms, *Desalination* 226 (2008) 215–221, <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.01.243>.
- [66] J.-Y. Pailler, A. Krein, L. Pfister, L. Hoffmann, C. Guignard, Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 4736–4743, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.042>.
- [67] M.S. Díaz-Cruz, M.J. García-Galán, D. Barceló, Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography–quadrupole linear ion trap–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1193 (2008) 50–59, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.029>.
- [68] A. Murata, H. Takada, K. Mutoh, H. Hosoda, A. Harada, N. Nakada, Nationwide monitoring of selected antibiotics: distribution and sources of sulfonamides, trimethoprim, and macrolides in Japanese rivers, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 5305–5312, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.014>.
- [69] A. Pena, D. Chmielova, C.M. Lino, P. Solich, Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using a monolithic column, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2924–2928, <https://doi.org/10.1002/jssc.200700363>.
- [70] S. Kurwadkar, V. Sicking, B. Lambert, A. McFarland, F. Mitchell, Preliminary studies on occurrence of monensin antibiotic in Bosque River Watershed, *J. Environ. Sci.* 25 (2013) 268–273, [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60041-2](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60041-2).
- [71] P. Sun, D. Barmaz, M.L. Cabrera, S.G. Pavlostathis, C.-H. Huang, Detection and quantification of ionophore antibiotics in runoff, soil and poultry litter, *J. Chromatogr. A* 1312 (2013) 10–17, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.044>.
- [72] M. Zrnčić, M. Gros, S. Babić, M. Kaštelan-Macan, D. Barcelo, M. Petrović, Analysis of anthelmintics in surface water by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry, *Chemosphere* 99 (2014) 224–232, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.091>.
- [73] M. Wagil, J. Maszkowska, A. Białk-Bielińska, P. Stepnowski, J. Kumirska, A comprehensive approach to the determination of two benzimidazoles in environmental samples, *Chemosphere* 119 (2015) S35–S41, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.106>.
- [74] M. Wagil, A. Białk-Bielińska, J. Maszkowska, P. Stepnowski, J. Kumirska, Critical points in the evaluation of analytical methods based on liquid chromatography separation for the determination of doramectin in different environmental samples, *Chemosphere* 119 (2015) S9–S15, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.137>.
- [75] M. Wagil, J. Maszkowska, A. Białk-Bielińska, M. Caban, P. Stepnowski, J. Kumirska, Determination of metronidazole residues in water, sediment and fish tissue samples, *Chemosphere* 119 (Supplement) (2014) 28–34, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.061>.
- [76] F.-Y. Hu, L.-M. He, J.-W. Yang, K. Bian, Z.-N. Wang, H.-C. Yang, Y.-H. Liu, Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC–MS/MS, *J. Chromatogr. B* 949–950 (2014) 79–86, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.008>.
- [77] N. Watanabe, B.A. Bergamaschi, K.A. Loftin, M.T. Meyer, T. Harter, Use and environmental occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manured forage fields, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 6591–6600, <https://doi.org/10.1021/es100834s>.
- [78] X. Hu, Q. Zhou, Y. Luo, Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 2992–2998, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.05.023>.
- [79] M.J. García-Galán, T. Garrido, J. Fraile, A. Ginebreda, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Simultaneous occurrence of nitrates and sulfonamide antibiotics in two ground water bodies of Catalonia (Spain), *J. Hydrol.* 383 (2010) 93–101, <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.06.042>.
- [80] F. Balzer, S. Zuhlke, S. Hannappel, Antibiotics in groundwater under locations with high livestock density in Germany, *Water Sci. Technol. Water Supply* 16 (2016) 1361–1369, <https://doi.org/10.2166/ws.2016.050>.
- [81] N. Watanabe, T.H. Harter, B.A. Bergamaschi, Environmental occurrence and shallow ground water detection of the antibiotic monensin from dairy farms, *J. Environ. Qual.* 37 (2008) S-78, <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0371>.
- [82] ANSES (French Agency for Environmental and Occupational Health Safety), Campagne nationale d'occurrence des résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine, (2011) <https://www.anses.fr/fr/system/files/LABO-Ra-EtudeMédicamentsEaux.pdf>.
- [83] Y.M. Awad, S.-C. Kim, S.A.M. Abd El-Azeem, K.-H. Kim, K.-R. Kim, K. Kim, C. Jeon, S.S. Lee, Y.S. Ok, Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility, *Environ. Earth Sci.* 71 (2014) 1433–1440, <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2548-z>.
- [84] A. Jaffrézic, E. Jardé, A. Soulier, L. Carrera, E. Marengue, A. Cailleau, B. Le Bot, Veterinary pharmaceutical contamination in mixed land use watersheds: from agricultural headwater to water monitoring watershed, *Sci. Total Environ.* 609 (2017) 992–1000, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.206>.
- [85] D.J. Lapworth, N. Baran, M.E. Stuart, R.S. Ward, Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence, *Environ. Pollut.* 163 (2012) 287–303, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.034>.
- [86] D.D. Snow, S.L. Bartelt-Hunt, S.E. Saunders, S.L. Devivo, D.A. Cassada, Detection, occurrence and fate of emerging contaminants in agricultural environments, *Water Environ. Res.* 80 (2008) 868–2092, <https://doi.org/10.2175/106143008X328518>.
- [87] Food and Drug Administration (FDA), Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-producing Animal, (2017).
- [88] Y. Hu, H. Cheng, Health risk from veterinary antimicrobial use in China's food animal production and its reduction, *Environ. Pollut.* 219 (2016) 993–997, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.099>.
- [89] European Medicines Agency (EMA), European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption. Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 30 European Countries in 2015 (EMA/184855/2017), (2017).
- [90] European Commission (EC), Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition, (2003).
- [91] D. Méheust, A. Chevance, G. Moulin, Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2016. Rapport annuel, Anses, (2017).
- [92] Veterinary Medicines Directorate, UK Veterinary Antibiotic Resistance and Sales Surveillance Report, 2016, (2017).
- [93] P. Collignon, A. Voss, China, what antibiotics and what volumes are used in food production animals? *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 4 (2015), <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0056-5>.
- [94] W.Y. Mo, Z. Chen, H.M. Leung, A.O.W. Leung, Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 8978–8989, <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5607-z>.
- [95] Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA), Monitoring and Characterization of Antimicrobial Resistance of Bacteria From Livestock Products, (2015).
- [96] Ministry of Agriculture, Forestry & Fisheries (MAFF), Sales Amounts and Sales Volumes (Active Substance) of Antibiotics, Synthetic Antibacterials, Anthelmintics and Antiprotozoals, (2015).
- [97] Ministry of Agriculture, Forestry & Fisheries (MAFF), Sales Amounts and Sales Volumes (Active Substance) of Antibiotics, Synthetic Antibacterials, Anthelmintics and Antiprotozoals, (2007).
- [98] Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA), Quantity of Antimicrobial Products Sold for Veterinary Use in Australia 2005–2010, (2014).
- [99] Ministry for Primary Industries, 2011–2014 Antibiotic Sales Analysis, (2016).
- [100] D. Dong, L. Zhang, S. Liu, Z. Guo, X. Hua, Antibiotics in water and sediments from Liao River in Jilin Province, China: occurrence, distribution, and risk assessment, *Environ. Earth Sci.* 75 (2016), <https://doi.org/10.1007/s12665-016-6008-4>.
- [101] D. Cheng, X. Liu, S. Zhao, B. Cui, J. Bai, Z. Li, Influence of the natural colloids on the multi-phase distributions of antibiotics in the surface water from the largest lake in North China, *Sci. Total Environ.* 578 (2017) 649–659, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.012>.
- [102] K. Schauss, A. Focks, H. Heuer, A. Kotzerke, H. Schmitt, S. Thiele-Bruhn, K. Smalla, B.-M. Wilke, M. Matthies, W. Amelung, J. Klasmeyer, M. Schloter, Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems, *TRAC Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 612–618, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.02.009>.
- [103] S. Jechalke, H. Heuer, J. Siemens, W. Amelung, K. Smalla, Fate and effects of veterinary antibiotics in soil, *Trends Microbiol.* 22 (2014) 536–545, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>.
- [104] Q. Li, J. Gao, Q. Zhang, L. Liang, H. Tao, Distribution and risk assessment of antibiotics in a typical river in North China Plain, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 98 (2017) 478–483, <https://doi.org/10.1007/s00128-016-2023-0>.
- [105] J.-F. Yang, G.-G. Ying, J.-L. Zhao, R. Tao, H.-C. Su, F. Chen, Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC–MS/MS, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 3424–3432, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.049>.
- [106] S.-C. Kim, K. Carlson, Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 50–57.
- [107] X. Liang, B. Chen, X. Nie, Z. Shi, X. Huang, X. Li, The distribution and partitioning of common antibiotics in water and sediment of the Pearl River Estuary, South China, *Chemosphere* 92 (2013) 1410–1416, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.044>.
- [108] D. Cheng, X. Liu, L. Wang, W. Gong, G. Liu, W. Fu, M. Cheng, Seasonal variation and sediment–water exchange of antibiotics in a shallower large lake in North China, *Sci. Total Environ.* 476–477 (2014) 266–275, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.010>.
- [109] L.-J. Zhou, G.-G. Ying, J.-L. Zhao, J.-F. Yang, L. Wang, B. Yang, S. Liu, Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in northern China, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 1877–1885, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.03.034>.
- [110] M. Schaffer, T. Licha, A framework for assessing the retardation of organic molecules in groundwater: implications of the species distribution for the sorption-influenced transport, *Sci. Total Environ.* 524–525 (2015) 187–194, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.006>.
- [111] L. Ge, J. Chen, X. Qiao, J. Lin, X. Cai, Light-source-Dependent effects of main water constituents on photodegradation of phenolic antibiotics: mechanism and kinetics, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3101–3107, <https://doi.org/10.1021/es8031727>.
- [112] R. Li, C. Zhao, B. Yao, D. Li, S. Yan, K.E. O'Shea, W. Song, Photochemical transformation of aminoglycoside antibiotics in simulated natural water, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 2921–2930, <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05234>.
- [113] L. Ge, J. Chen, X. Wei, S. Zhang, X. Qiao, X. Cai, Q. Xie, Aquatic photochemistry of

- fluoroquinolone antibiotics: kinetics, pathways, and multivariate effects of main water constituents, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 2400–2405, <https://doi.org/10.1021/es902852v>.
- [114] S. Babić, M. Periša, I. Škorić, Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media, *Chemosphere* 91 (2013) 1635–1642, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.072>.
- [115] Y. Chen, C. Hu, J. Qu, M. Yang, Photodegradation of tetracycline and formation of reactive oxygen species in aqueous tetracycline solution under simulated sunlight irradiation, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 197 (2008) 81–87, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.12.007>.
- [116] D. Prabhakaran, P. Sukul, M. Lamshöft, M.A. Maheswari, S. Zühke, M. Spiteller, Photolysis of difloxacin and sarafloxacin in aqueous systems, *Chemosphere* 77 (2009) 739–746, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.031>.
- [117] Y. Li, J. Niu, W. Wang, Photolysis of Enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products, *Chemosphere* 85 (2011) 892–897, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.008>.
- [118] M. Sturini, A. Speltini, F. Maraschi, L. Pretali, A. Profumo, E. Fasani, A. Albini, R. Migliavacca, E. Nucleo, Photodegradation of fluorquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts, *Water Res.* 46 (2012) 5575–5582, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.043>.
- [119] Y. Li, J. Niu, E. Shang, M. Zheng, T. Luan, Effects of nitrate and humic acid on enrofloxacin photolysis in an aqueous system under three light conditions: kinetics and mechanism, *Environ. Chem.* 11 (2014) 333, <https://doi.org/10.1071/EN13192>.
- [120] R. Xuan, L. Arisi, Q. Wang, S.R. Yates, K.C. Biswas, Hydrolysis and photolysis of oxytetracycline in aqueous solution, *J. Environ. Sci. Health B* 45 (2009) 73–81, <https://doi.org/10.1080/036012309033404556>.
- [121] S. Bahnmüller, U. von Gunten, S. Canonica, Sunlight-induced transformation of sulfadiazine and sulfamethoxazole in surface waters and wastewater effluents, *Water Res.* 57 (2014) 183–192, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.019>.
- [122] B. Xu, D. Mao, Y. Luo, L. Xu, Sulfamethoxazole biodegradation and biotransformation in the water–sediment system of a natural river, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 7069–7076, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.086>.
- [123] M. Radke, C. Lauwigi, G. Heinkele, T.E. Mürdter, M. Letzel, Fate of the antibiotic sulfamethoxazole and its two major human metabolites in a water sediment test, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3135–3141, <https://doi.org/10.1021/es900300u>.
- [124] T. Su, H. Deng, J.P. Benskin, M. Radke, Biodegradation of sulfamethoxazole phototransformation products in a water/sediment test, *Chemosphere* 148 (2016) 518–525, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.049>.
- [125] E. Adamek, W. Baran, A. Sobczak, Assessment of the biodegradability of selected sulfa drugs in two polluted rivers in Poland: effects of seasonal variations, accidental contamination, turbidity and salinity, *J. Hazard. Mater.* 313 (2016) 147–158, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.064>.
- [126] K. Kümmerer (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, Springer, Berlin, 2008 with 62 tables, 3., rev. and enl. ed.
- [127] A. Białk-Bielińska, S. Stolte, M. Matzke, A. Fabiańska, J. Maszkowska, M. Kołodziejska, B. Liberek, P. Stepnowski, J. Kumirska, Hydrolysis of sulfonamides in aqueous solutions, *J. Hazard. Mater.* 221–222 (2012) 264–274, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.044>.
- [128] M.J. García-Galán, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Kinetic studies and characterization of photolytic products of sulfamethazine, sulfapyridine and their acetylated metabolites in water under simulated solar irradiation, *Water Res.* 46 (2012) 711–722, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.035>.
- [129] N.D.H. Khaleel, W.M.M. Mahmoud, G.M. Hadad, R.A. Abdel-Salam, K. Kümmerer, Photolysis of sulfamethoxypyridazine in various aqueous media: aerobic biodegradation and identification of photoproducts by LC-UV-MS/MS, *J. Hazard. Mater.* 244–245 (2013) 654–661, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.059>.
- [130] X.-Z. Niu, J. Gladly-Croué, J.-P. Croué, Photodegradation of sulfathiazole under simulated sunlight: kinetics, photo-induced structural rearrangement, and antimicrobial activities of photoproducts, *Water Res.* 124 (2017) 576–583, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.019>.
- [131] K.H. Wammer, K.C. Anderson, P.R. Erickson, S. Kliegman, M.E. Moffatt, S.M. Berg, J.A. Heitzman, N.C. Pflug, K. McNeill, D. Martinovic-Weigelt, R. Abagyan, D.M. Cwiertny, E.P. Kolodziej, Environmental photochemistry of alrenogest: photoisomerization to a bioactive product with increased environmental persistence via reversible photohydration, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 7480–7488, <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02608>.
- [132] Z. Ye, H.S. Weinberg, M.T. Meyer, Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1135–1144, <https://doi.org/10.1021/ac060972a>.
- [133] H.W. Leung, L. Jin, S. Wei, M.M.P. Tsui, B. Zhou, L. Jiao, P.C. Cheung, Y.K. Chun, M.B. Murphy, P.K.S. Lam, Pharmaceuticals in tap water: human health risk assessment and proposed monitoring framework in China, *Environ. Health Perspect.* 121 (2013) 839–846, <https://doi.org/10.1289/ehp.1206244>.
- [134] N. Li, K.W.K. Ho, G.-G. Ying, W.-J. Deng, Veterinary antibiotics in food, drinking water, and the urine of preschool children in Hong Kong, *Environ. Int.* 108 (2017) 246–252, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.08.014>.
- [135] M.R. Boleda, M.T. Galceran, F. Ventura, Behavior of pharmaceuticals and drugs of abuse in a drinking water treatment plant (DWTP) using combined conventional and ultrafiltration and reverse osmosis (UF/RO) treatments, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 1584–1591, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.02.051>.
- [136] N. Cimetiere, I. Soutrel, M. Lemasle, A. Laplanche, A. Crocq, Standard addition method for the determination of pharmaceutical residues in drinking water by SPE–LC–MS/MS, *Environ. Technol.* 34 (2013) 3031–3041, <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.800563>.
- [137] M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1248 (2012) 104–121, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.084>.
- [138] T. Qiao, Z. Yu, X. Zhang, D.W.T. Au, Occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products in drinking water in southern China, *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 3097, <https://doi.org/10.1039/c1em10318k>.
- [139] E. Vulliet, C. Cren-Olivé, M.-F. Grenier-Loustalot, Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters, *Environ. Chem. Lett.* 9 (2011) 103–114, <https://doi.org/10.1007/s10311-009-0253-7>.
- [140] P. Paíga, L.H.M.L.M. Santos, C. Delerue-Matos, Development of a multi-residue method for the determination of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in aqueous environmental matrices by SPE-UHPLC–MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 135 (2017) 75–86, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.013>.
- [141] M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, Determination of veterinary penicillin antibiotics by fast high-resolution liquid chromatography and luminescence detection, *Talanta* 170 (2017) 343–349, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.032>.
- [142] K.V. Plakas, A.J. Karabelas, Removal of pesticides from water by NF and RO membranes — a review, *Desalination* 287 (2012) 255–265, <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.08.003>.
- [143] D. Dolar, A. Vuković, D. Ašperger, K. Košutić, Effect of water matrices on removal of veterinary pharmaceuticals by nanofiltration and reverse osmosis membranes, *J. Environ. Sci.* 23 (2011) 1299–1307, [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60545-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60545-1).
- [144] X. Zhang, W. Guo, H.H. Ngo, H. Wen, N. Li, W. Wu, Performance evaluation of powdered activated carbon for removing 28 types of antibiotics from water, *J. Environ. Manage.* 172 (2016) 193–200, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.038>.
- [145] J. Rivera-Utrilla, M. Sánchez-Polo, M.Á. Ferro-García, G. Prados-Joya, R. Ocampo-Pérez, Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review, *Chemosphere* 93 (2013) 1268–1287, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.059>.
- [146] N.K. Shammam, L.K. Wang, G.M. Fair, J.C. Geyer, D.A. Okun, *Water Engineering: Hydraulics, Distribution and Treatment*, 1st ed., Wiley, Hoboken, NJ, 2016.
- [147] T. Lin, S. Yu, W. Chen, Occurrence, removal and risk assessment of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in an advanced drinking water treatment plant (ADWTP) around Taihu Lake in China, *Chemosphere* 152 (2016) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.109>.
- [148] K.-J. Choi, S.-G. Kim, S.-H. Kim, Removal of antibiotics by coagulation and granular activated carbon filtration, *J. Hazard. Mater.* 151 (2008) 38–43, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.059>.
- [149] F. Dong, C. Li, G. He, X. Chen, X. Mao, Kinetics and degradation pathway of sulfamethazine chlorination in pilot-scale water distribution systems, *Chem. Eng. J.* 321 (2017) 521–532, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.03.130>.
- [150] V.M.F. Frade, M. Dias, A.C.S.C. Teixeira, M.S.A. Palma, Environmental contamination by fluoroquinolones, *Braz. J. Pharm. Sci.* 50 (2014) 41–54, <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100004>.
- [151] T. Garoma, S.K. Umamaheshwar, A. Mumper, Removal of sulfadiazine, sulfamethazole, sulfamethoxazole, and sulfathiazole from aqueous solution by ozonation, *Chemosphere* 79 (2010) 814–820, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.060>.
- [152] H.W. Sun, Comparison on permanganate and ozone as pre-oxidation agents, *Adv. Mater. Res.* 955–959 (2014) 3408–3413, <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.955-959.3408>.
- [153] X. Zhong, C. Cui, S. Yu, Seasonal evaluation of disinfection by-products throughout two full-scale drinking water treatment plants, *Chemosphere* 179 (2017) 290–297, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.103>.
- [154] W. Ben, Y. Shi, W. Li, Y. Zhang, Z. Qiang, Oxidation of sulfonamide antibiotics by chlorine dioxide in water: kinetics and reaction pathways, *Chem. Eng. J.* 327 (2017) 743–750, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.157>.
- [155] A. Azzouz, E. Ballesteros, Influence of seasonal climate differences on the pharmaceutical, hormone and personal care product removal efficiency of a drinking water treatment plant, *Chemosphere* 93 (2013) 2046–2054, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.037>.
- [156] A.M.D. de Oliveira, M.G. Maniero, C. Rodrigues-Silva, J.R. Guimarães, Antimicrobial activity and acute toxicity of ozonated lomefloxacin solution, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 6252–6260, <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8319-0>.
- [157] M. SUI, Kinetics of ozonation of typical sulfonamides in water, *Biomed. Environ. Sci.* 24 (2011) 255–260.
- [158] J. Liu, Q. Sun, C. Zhang, H. Li, W. Song, N. Zhang, X. Jia, Removal of typical antibiotics in the advanced treatment process of productive drinking water, *Desalination Water Treat.* 57 (2016) 11386–11391, <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1040848>.
- [159] R. Daghrir, P. Drogui, Tetracycline antibiotics in the environment: a review, *Environ. Chem. Lett.* 11 (2013) 209–227, <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0404-8>.
- [160] H. Fu, X. Li, J. Wang, P. Lin, C. Chen, X. Zhang, I.H. (Mel) Suffet, Activated carbon

- adsorption of quinolone antibiotics in water: performance, mechanism, and modeling, *J. Environ. Sci.* 56 (2017) 145–152, <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.09.010>.
- [161] S. Metsämuuronen, M. Sillanpää, A. Bhatnagar, M. Mänttari, Natural organic matter removal from drinking water by membrane technology, *Sep. Purif. Rev.* 43 (2014) 1–61, <https://doi.org/10.1080/15422119.2012.712080>.
- [162] A. Ogutverici, L. Yilmaz, U. Yetis, F.B. Dilek, Triclosan removal by NF from a real drinking water source – effect of natural organic matter, *Chem. Eng. J.* 283 (2016) 330–337, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.07.065>.
- [163] I. Koyuncu, O.A. Arıkan, M.R. Wiesner, C. Rice, Removal of hormones and antibiotics by nanofiltration membranes, *J. Membr. Sci.* 309 (2008) 94–101, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.10.010>.
- [164] M.-Y. Lutskiy, S. Avneri-Katz, N. Zhu, M. Itsko, Z. Ronen, C.J. Arnschur, R. Kasher, A microbiology-based assay for quantification of bacterial early stage biofilm formation on reverse-osmosis and nanofiltration membranes, *Sep. Purif. Technol.* 141 (2015) 214–220, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.12.003>.
- [165] S. Navalon, M. Alvaro, H. Garcia, Reaction of chlorine dioxide with emergent water pollutants: product study of the reaction of three  $\beta$ -lactam antibiotics with ClO<sub>2</sub>, *Water Res.* 42 (2008) 1935–1942, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.023>.
- [166] P. Wang, Y.-L. He, C.-H. Huang, Oxidation of fluoroquinolone antibiotics and structurally related amines by chlorine dioxide: reaction kinetics, product and pathway evaluation, *Water Res.* 44 (2010) 5989–5998, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.053>.
- [167] S. Snowberger, H. Adejumo, K. He, K.P. Mangalgi, M. Hopanna, A.D. Soares, L. Blaney, Direct photolysis of fluoroquinolone antibiotics at 253.7 nm: specific reaction kinetics and formation of equally potent fluoroquinolone antibiotics, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 9533–9542, <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01794>.
- [168] H. Yao, P. Sun, D. Minakata, J.C. Crittenden, C.-H. Huang, Kinetics and modeling of degradation of ionophore antibiotics by UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 4581–4589, <https://doi.org/10.1021/es3052685>.
- [169] C. Cui, L. Jin, L. Jiang, Q. Han, K. Lin, S. Lu, D. Zhang, G. Cao, Removal of trace level amounts of twelve sulfonamides from drinking water by UV-activated peroxymonosulfate, *Sci. Total Environ.* 572 (2016) 244–251, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.183>.
- [170] P.E. Stackelberg, J. Gibs, E.T. Furlong, M.T. Meyer, S.D. Zaugg, R.L. Lippincott, Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds, *Sci. Total Environ.* 377 (2007) 255–272, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.095>.
- [171] C.J. Houtman, J. Kroesbergen, K. Lekkerkerker-Teunissen, J.P. van der Hoek, Human health risk assessment of the mixture of pharmaceuticals in Dutch drinking water and its sources based on frequent monitoring data, *Sci. Total Environ.* 496 (2014) 54–62, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.022>.
- [172] B. Le Bot, J.-P. Lucas, F. Lacroix, P. Glorennec, Exposure of children to metals via tap water ingestion at home: contamination and exposure data from a nationwide survey in France, *Environ. Int.* 94 (2016) 500–507, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.009>.
- [173] S. Fingler, G. Mendaš, M. Dvoršćak, S. Stipičević, Ž. Vasilčić, V. Drevenkar, Herbicide micropollutants in surface, ground and drinking waters within and near the area of Zagreb, Croatia, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 11017–11030, <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7074-6>.
- [174] M. Jiang, L. Wang, R. Ji, Biotic and abiotic degradation of four cephalosporin antibiotics in a lake surface water and sediment, *Chemosphere*. 80 (2010) 1399–1405, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.048>.
- [175] X. Li, W. Zheng, M.L. Machesky, S.R. Yates, M. Katterhenry, Degradation kinetics and mechanism of antibiotic ceftiofur in recycled water derived from a beef farm, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 10176–10181, <https://doi.org/10.1021/jf202325c>.
- [176] H. Pouliquen, R. Delépée, M. Larhantec-Verdier, M.-L. Morvan, H. Le Bris, Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions, *Aquaculture* 262 (2007) 23–28, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.014>.
- [177] S.M. Mitchell, J.L. Ullman, A.L. Teel, R.J. Watts, Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: chloramphenicol, florfenicol, spiramycin, and tylosin, *Chemosphere* 134 (2015) 504–511, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.050>.
- [178] P. Bohn, S.A. Bak, E. Björklund, K.A. Krogh, M. Hansen, Abiotic degradation of antibiotic ionophores, *Environ. Pollut.* 182 (2013) 177–183, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.040>.
- [179] A. Längin, R. Alexy, A. König, K. Kümmerer, Deactivation and transformation products in biodegradability testing of  $\beta$ -lactams amoxicillin and piperacillin, *Chemosphere* 75 (2009) 347–354, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.032>.
- [180] S.M. Mitchell, J.L. Ullman, A.L. Teel, R.J. Watts, pH and temperature effects on the hydrolysis of three  $\beta$ -lactam antibiotics: ampicillin, cefalotin and cefoxitin, *Sci. Total Environ.* 466–467 (2014) 547–555, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.027>.
- [181] I. Braschi, S. Blasioli, C. Fellet, R. Lorenzini, A. Garelli, M. Pori, D. Giacomini, Persistence and degradation of new  $\beta$ -lactam antibiotics in the soil and water environment, *Chemosphere* 93 (2013) 152–159, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.016>.
- [182] R. Nassar, A. Trivella, S. Mokh, M. Al-Iskandarani, H. Budzinski, P. Mazellier, Photodegradation of sulfamethazine, sulfamethoxypyridazine, amitriptyline, and clomipramine drugs in aqueous media, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 336 (2017) 176–182, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.12.008>.
- [183] K.A. Loftin, C.D. Adams, M.T. Meyer, R. Surampalli, Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics, *J. Environ. Qual.* 37 (2008) 378, <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0230>.
- [184] D. Hu, J.R. Coats, Aerobic degradation and photolysis of tylosin in water and soil, *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (2007) 884–889.
- [185] D. Dolar, Photolysis of enrofloxacin and removal of its photodegradation products from water by reverse osmosis and nanofiltration membranes, *Sep. Purification Technol.* 8 (2013).

## **1.2. Synthèse bibliographique des outils de détermination de la contamination fécale dans les ressources en eau**

La DCE (Directive 2000/60/CE, 2000) vise à donner une cohérence à l'ensemble de la législation avec une politique communautaire globale dans le domaine de l'eau. Elle définit un cadre pour la gestion et la protection des eaux par grand bassin hydrographique au plan européen avec une perspective de développement durable. Pour améliorer la qualité de l'eau sur des bassins versants impactés par des sources de contaminations ponctuelles ou diffuses, les plans de gestion et d'assainissement nécessitent des méthodes d'identification des sources de contaminations fécales (Gourmelon et al., 2010). La Directive européenne de 2006 sur la qualité des eaux de baignade (Directive 2006/7/CE, 2006) impose l'identification et la hiérarchisation des sources de contamination microbiologiques via la réalisation de « profils de baignades ». Des outils de diagnostic et de gestion doivent pour cela permettre d'identifier les sources de contaminations susceptibles d'avoir un impact sur la qualité microbiologique des eaux de baignades et de proposer des mesures de gestion pour prévenir les contaminations à court terme. Ainsi, ces outils ont été initialement développés et utilisés pour déterminer l'origine des contaminations microbiologiques (bactéries, virus, parasites, champignons) dans les eaux de baignades mais aussi dans les eaux destinées à la consommation humaine. Les contaminations microbiologiques peuvent en effet avoir des impacts sur la santé humaine mais également sur les activités économiques de la zone concernée (Shah et al., 2007).

Dans le cadre de ce travail de thèse, certains de ces outils d'identification de contaminations fécales ont été testés en tant qu'outils d'aide à la détermination de l'origine des résidus médicamenteux à usage mixte (utilisés à la fois en médecine humaine et en médecine vétérinaire).

Bien que la pollution fécale en présence dans les rivières puisse être en partie due aux animaux sauvages ou aux animaux domestiques, elle relève majoritairement des contaminations d'origine humaine via les rejets des stations d'épuration et des contaminations dues à l'élevage via le lessivage des parcelles pâturées et des sols agricoles notamment en période d'épandages (Gourmelon et al., 2010).

Les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) et entérocoques sont classiquement utilisés comme indicateurs de contamination fécale dans les eaux, et permettent d'évaluer le

niveau de cette contamination et de réaliser les classements de qualité microbiologique des eaux selon la réglementation en vigueur. Cependant, ces deux indicateurs ne permettent pas de distinguer si l'origine de la contamination est humaine ou animale (Gourmelon et al., 2010; Jeanneau et al., 2011; Shah et al., 2007; Tyagi et al., 2009). En effet, les bactéries *E. coli* et entérocoques sont présentes dans les fèces de la plupart des animaux à sang chaud (mammifères, oiseaux) (Derrien et al., 2012).

Pour identifier les sources de contaminations fécales, des méthodes de suivi des sources microbiennes, regroupées sous la terminologie de « Microbial Source Tracking » (MST) (Scott et al., 2002), aussi appelées méthodes de suivi de la contamination fécale (« Fecal Source Tracking » ou FST) (Devane et al., 2018) ont été développées. Ces outils ont pour objectif d'identifier l'origine des contaminations fécales dans les eaux (Devane et al., 2018; Gourmelon et al., 2010; Jardé et al., 2018; Solecki et al., 2011). Il est généralement admis que l'utilisation d'un seul de ces outils ne suffit pas pour identifier l'origine des contaminations fécales dans les eaux naturelles (eaux de surface ou eaux souterraines), particulièrement pour des masses d'eau impactées par plusieurs sources de pollution diffuses (Tran et al., 2015; Tyagi et al., 2009).

Les outils de MST développés peuvent être des outils microbiologiques et / ou des outils chimiques (Devane et al., 2018; Field and Samadpour, 2007; Harrault et al., 2014; Seurinck et al., 2005). L'utilisation combinée de ces traceurs va permettre d'affiner l'identification des sources de contaminations (Shah et al., 2007).

Il est essentiel que le choix des traceurs à intégrer dans une ToolBox tienne compte des caractéristiques du site d'étude. Un marqueur applicable à une région ne le sera pas nécessairement dans une autre région. Il faut ainsi tenir compte du type d'activités sur le site d'étude (zone urbaine, zone rurale etc.), de la densité de population humaine, du ou des types d'élevage(s) en présence etc. (Tran et al., 2015).

Les traceurs chimiques font souvent preuve d'une spécificité plus élevée dans la détermination de l'origine de la contamination fécale (Tran et al., 2015). Ceux-ci peuvent être divisés en deux catégories : les traceurs chimiques directs et les traceurs chimiques indirects.

Les traceurs chimiques directs correspondent aux traceurs naturellement présents dans les fèces des humains et des animaux (Jeanneau et al., 2011; Solecki et al., 2011), c'est le cas des stanols fécaux.

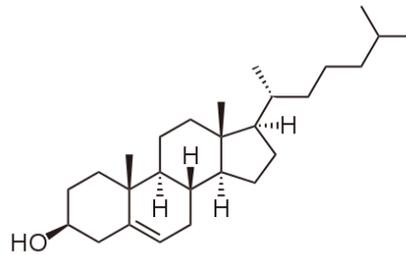
Les traceurs chimiques indirects ne sont pas présents naturellement dans les fèces. Ils sont soit administrés aux organismes dans le cas des pharmaceutiques ou d'autres

produits liés à la consommation humaine (caféine, nicotine, édulcorants artificiels), soit largement associés aux rejets des stations d'épuration et témoignent alors d'une contamination d'origine humaine (les produits d'hygiène et d'entretien par exemple).

### **1.2.1. Traceurs chimiques directs : Les stérols et les stanols fécaux**

Les stérols et les stanols appartiennent à la famille des stéroïdes. Les stéroïdes sont des composés organiques avec une structure chimique formée de quatre cycles. Du fait de cette structure hydrocarbonée, ce sont des composés lipophiles et apolaires.

Les stérols sont des molécules qui composent les membranes cellulaires animales ou des membranes cellulaires végétales, on parle dans ce dernier cas de phytostérols. Les stérols sont également des composés précurseurs de nombreuses réactions biochimiques dans les organismes vivants, et tout particulièrement le cholestérol. La figure 1 présente la structure du cholestérol.



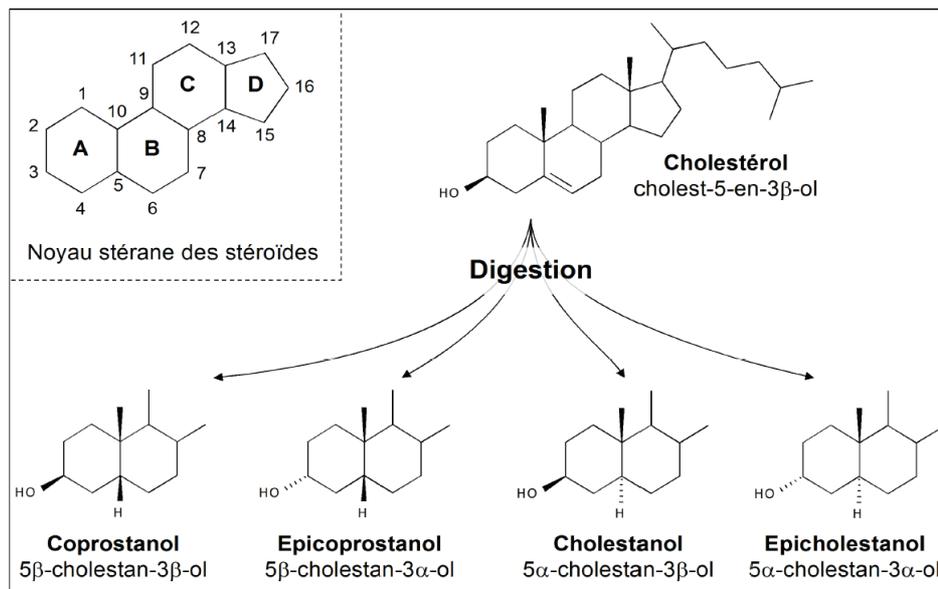
**Figure 1: Structure du cholestérol.**

Les stanols sont issus d'une réaction de bio-hydrogénation des stérols dans le tractus digestif des organismes. Les stérols et stanols sont excrétés dans les matières fécales en des proportions spécifiques dépendant de trois facteurs:

- 1). Le régime alimentaire de l'espèce. Les profils en stérols ingérés seront différents entre carnivores, omnivores ou herbivores. Par exemple, les ruminants comme les vaches ingèrent de grandes quantités de végétaux contenant des phytostérols de type 24-ethylcholestérol, que des omnivores ou carnivores ingèreront moins ou pas.
- 2). Le métabolisme endogène des stérols, c'est-à-dire la capacité de l'espèce à biosynthétiser des stérols. Ainsi, une personne dont le régime alimentaire serait faible en cholestérol est quand même capable de synthétiser du cholestérol de façon endogène.
- 3). La présence et le type de bactéries anaérobies dans les tractus intestinal de l'espèce considérée. Ce sont ces bactéries qui sont à l'origine de la bio-hydrogénation des stérols

en stanols de différentes configurations isomériques (Jeanneau et al., 2011; Leeming et al., 1996; Shah et al., 2007; Solecki et al., 2011).

De ces trois facteurs vont résulter des différences en termes de composition de stérols et de stanols présents dans les fèces de chaque espèce. Un stérol donné, issu de l'alimentation ou du métabolisme endogène, peut être bio-hydrogéné en 4 stanols de configuration isomérique différente, selon la flore bactérienne en présence. Cette bio-transformation est illustrée dans la figure 2. De ce phénomène découle l'obtention d'une « empreinte stérols » et/ou « empreinte stanols » (Harrault et al., 2014; Solecki et al., 2011) caractéristique et spécifique pour chaque espèce animale (humain, bovin, porcin, volaille etc). Ces empreintes sont suffisamment distinctes entre elles pour conclure quant à l'origine d'une contamination fécale.



**Figure 2: Formation de 4 stanols de configuration isomérique différente à partir du cholestérol.**

#### 1.2.1.1. Les profils en stérols et stanols par espèce

Les figures 3 ; 4 et 5 présentent les profils de stéroïdes obtenus à partir de fèces humaines, bovines, porcines et avicoles, dans les études de Shah et al. 2007, de Leeming et al. 1996 et de Derrien et al. 2012 respectivement.

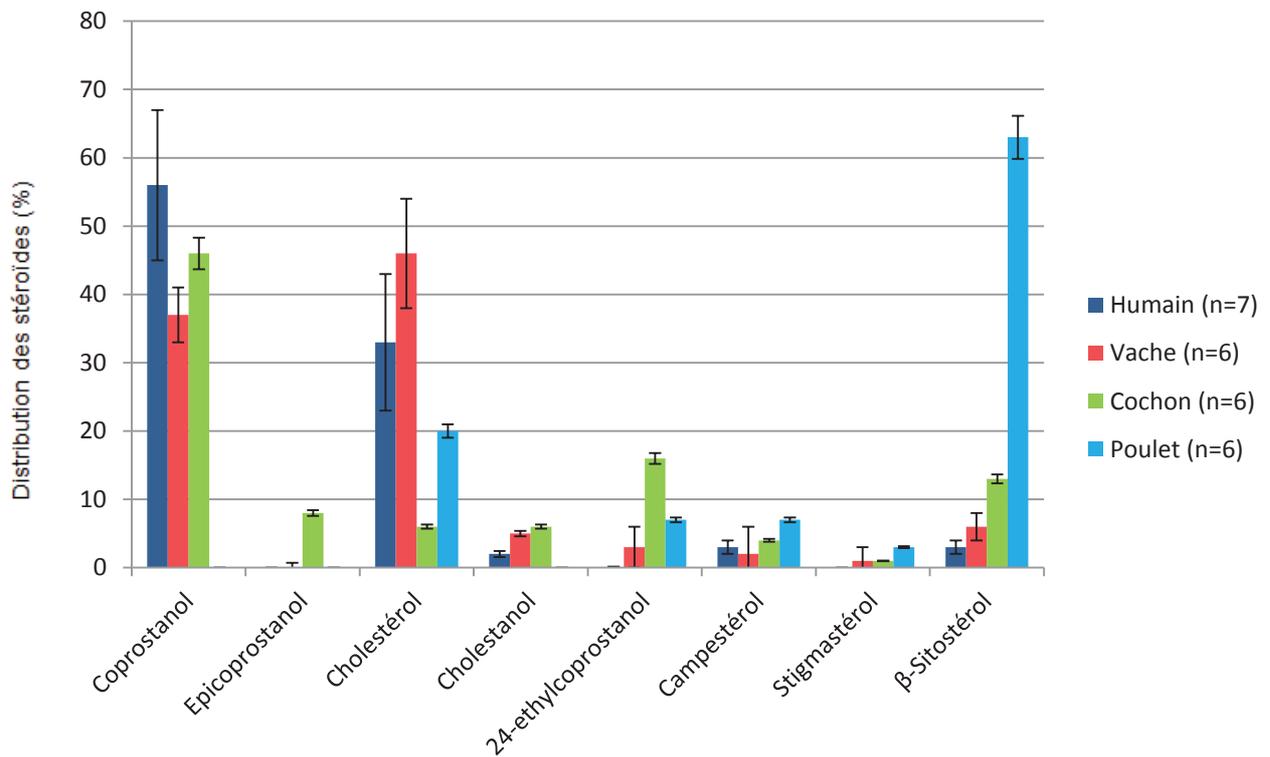


Figure 3: Distribution des stéroïdes (en %) dans les fèces de quatre espèces (d'après Shah et al. 2007).

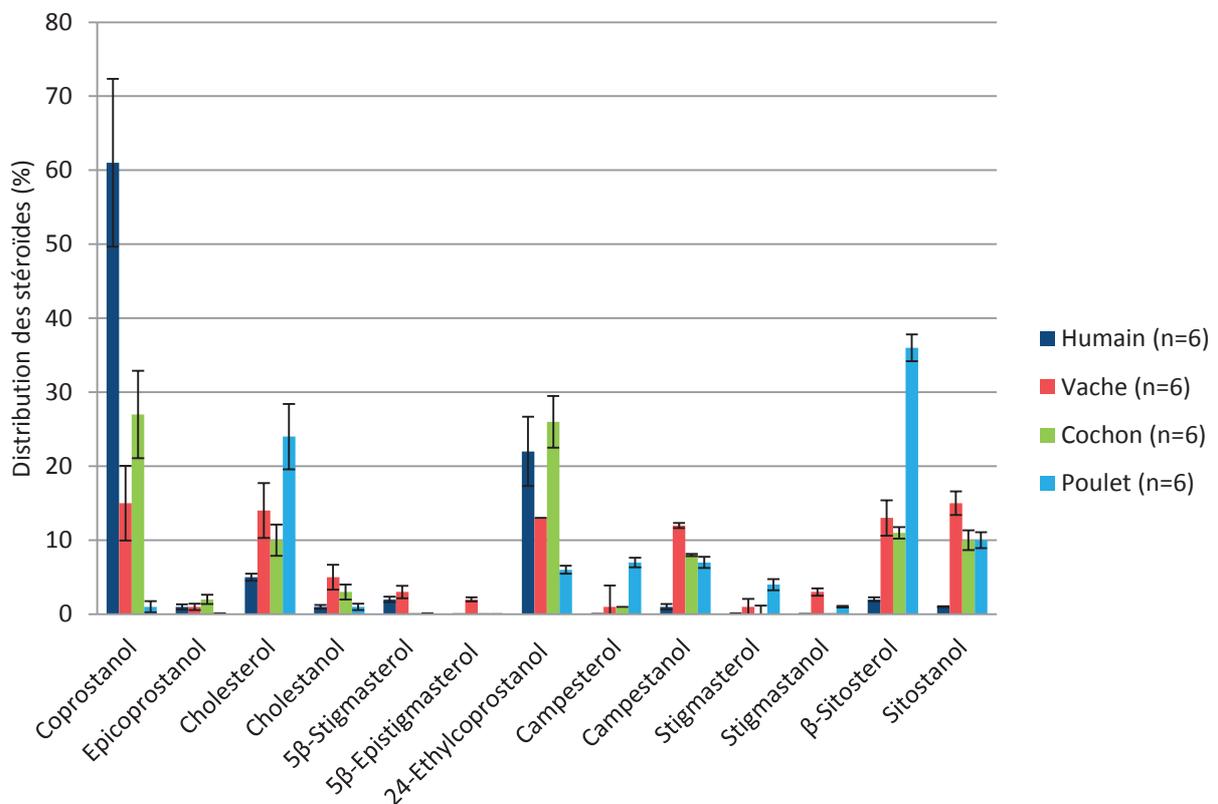
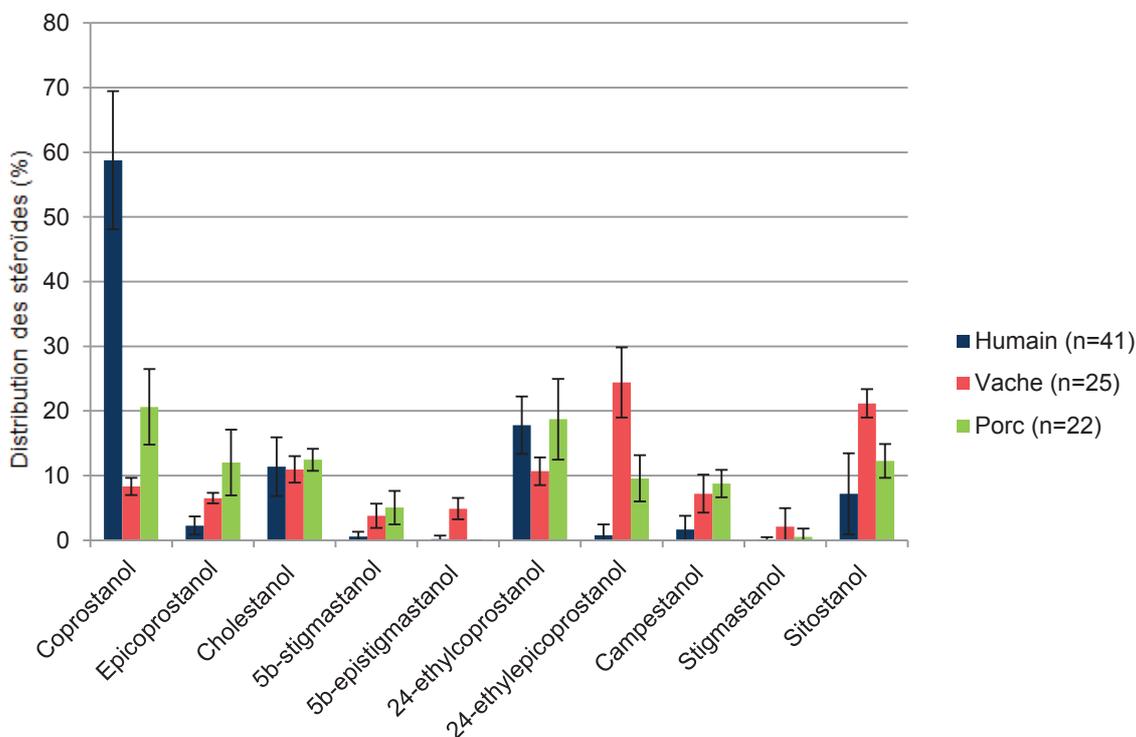


Figure 4: Distribution des stéroïdes (en %) dans les fèces de quatre espèces (d'après Leeming et al. 1996).



**Figure 5: Distribution des stéroïdes (en %) dans les fèces de trois espèces (d'après Derrien et al. 2012).**

Le coprostanol est le stanol majoritaire retrouvé dans les matières fécales humaines, et en concentrations supérieures aux autres espèces. Il représente 60% du profil des stéroïdes retrouvés dans les fèces humaines.

Le 24-éthylcoprostanol est le second stanol qui se démarque dans l'empreinte fécale humaine, représentant entre 15% (Harrault et al., 2014) et 22% (Leeming et al., 1996) des stérols totaux. Cependant, il n'est pas représenté dans le profil décrit par Shah et al. (2007).

Dans les fèces humaines, le ratio de concentration des stanols par rapport à leurs précurseurs stérols est généralement supérieur à 10, ce qui signifie que les populations bactériennes présentes dans le tractus digestif humain ont une activité intense de transformation des stérols en stanols (Leeming et al., 1996).

Chez les porcins, les stanols fécaux majoritaires sont le coprostanol et le 24-éthylcoprostanol mais dans des proportions différentes par rapport aux fèces humaines. Le coprostanol et le 24-éthylcoprostanol représentent entre 16 et 27% des stérols fécaux totaux (Gourmelon et al., 2010; Leeming et al., 1996; Shah et al., 2007).

D'autres stérols et stanols ont été retrouvés dans du fumier de porcs lors d'études. Il s'agit de l'épicoprostanol du campestanol, du sitostérol, du sitostanol (et du cholestérol (Gourmelon et al., 2010; Jardé et al., 2018; Leeming et al., 1996; Solecki et al., 2011).

Concernant les herbivores, et plus spécifiquement les bovins, les stérols et stanols fécaux se démarquant sont le 24-ethylcoprostanol, le sitostérol, le sitostanol ou encore le 24-éthylépicoprostanol. D'autres stanols ont également été détectés dans les fèces de bovins: le campestanol, le cholestérol et le coprostanol) (Bull et al., 2002; Devane et al., 2018; Gourmelon et al., 2010; Jardé et al., 2007; Leeming et al., 1996; Shah et al., 2007).

Enfin, une très grande variabilité de stérols a été observée au sein de la famille des oiseaux au sens large (volaille, oiseaux sauvages, marins etc.). Cette variabilité semble très dépendante du régime alimentaire (Leeming et al. 1996). Il est cependant à signaler que le coprostanol est absent de leurs fèces ou présent à de très faibles concentrations (Leeming et al., 1996; Shah et al., 2007). Si on considère uniquement la volaille d'élevage, on trouve principalement le sitostérol et le cholestérol (Leeming et al., 1996; Shah et al., 2007). De manière générale, les bactéries anaérobies semblent être absentes ou peu nombreuses dans le tractus intestinal des oiseaux car les stérols sont majoritaires.

#### *1.2.1.2. Comportement des stanols dans l'environnement*

Afin qu'un marqueur soit considéré comme tel, il est important d'évaluer son comportement dans l'environnement depuis la source d'émission jusqu'au milieu aquatique (Solecki et al., 2011).

Il a été montré que la distribution des stanols n'est pas modifiée lors de leur transfert du sol vers l'eau (Gourmelon et al., 2010; Jaffrezic et al., 2011). Leur profil est donc exploitable dans le milieu aquatique pour tracer les sources de contamination fécale (Jadas-Hécart et al., 2012). Dans la colonne d'eau en milieu aquatique, les stanols sont soumis à une dégradation bactérienne aérobie dans les deux semaines suivant leur introduction dans le milieu (Devane et al., 2018; Leeming et al., 1996). Par exemple, Matsumoto (1983) (Matsumoto, 1983) rapportait des demi-vies comprises entre 2,6 et 4,3 jours pour des stérols et stanols dans une eau de rivière non filtrée incubée dans l'obscurité. Dans l'étude de Jeanneau et al. (2012), les demi-vies des stanols étaient comprises entre 4 et 5 jours dans un microcosme composé d'un mélange d'eau douce et d'effluent de station d'épuration (Jeanneau et al., 2011). Enfin, Solecki et al. (2011) ont calculé des T90 (dégradation de 90% des stanols) de 29 à 32 jours dans des

microcosmes constitués d'eau douce et de fumier de porc. Ceci démontre que la présence de stanols dans la colonne d'eau témoigne d'une contamination fécale récente. D'un autre côté, du fait de leur caractère très hydrophobe (log Kow environ 8), les stanols vont fortement s'adsorber aux colloïdes, à la phase particulaire et aux sédiments. Dans la fraction particulaire, Isobe et al. (2002) ont rapporté une demi-vie de moins de 10 jours pour le coprostanol dans une eau de surface à 20°C (Isobe et al., 2002). En revanche, une fois adsorbés aux sédiments la dégradation des stanols va être très limitée voire inexistante, d'autant plus si les sédiments sont en conditions d'anoxie (Leeming et al., 1996; Tran et al., 2015).

Il est aussi intéressant de noter qu'une fois dans l'environnement, les stérols issus de la contamination fécale peuvent se mélanger avec des stérols issus d'autres sources comme des algues ou d'autres matières autochtones (Leeming et al., 1997). Au contraire, à ce jour, aucune formation de coprostanol n'a été reportée dans l'environnement aquatique, ce qui rend l'empreinte stanols plus robuste et fiable à utiliser que l'empreinte stérols dans le cadre d'échantillons d'eaux naturelles (Devane et al., 2018). Il est donc judicieux de privilégier l'étude de l'empreinte stanols dans le cadre d'une contamination fécale dans le milieu aquatique.

#### 1.2.1.3. *Exploitation des « empreintes stanols »*

La simple quantification des stanols ne permet pas d'établir un diagnostic sur l'origine de la contamination fécale. Aucun stanol n'est spécifique à lui seul d'une espèce donnée. Pour un stérol donné, quatre stanols différents peuvent être formés en des proportions qui sont fonction de l'espèce animale. Deux méthodes ont été, et sont encore, développées de manière à illustrer la variabilité de l'empreinte stérol d'une espèce à une autre.

La première méthode consiste à calculer des rapports entre molécules. Ces rapports ont été développés pour (1) illustrer le degré de contamination par les eaux usées et (2) différencier les sources de contamination fécale.

Quelques ratios testés et validés dans la littérature scientifique sont rapportés dans le tableau 1.

Rapport	Bornes	Signification
$\frac{cop}{cop + cholestanol}$	[0,7 - 1,0] [0,0- 0,3]	Contamination par des eaux usées Sites non contaminés
$\frac{cop}{chol}$	[0,2 – 1,0] > 1,0	Contamination par des eaux usées Niveau élevé de contamination
$\frac{cop}{chol + cholestanol}$	< 0,06 > 0,06	Niveau faible de contamination par des eaux usées Niveau élevé de contamination par des eaux usées
$\frac{cop}{24etcop}$	< 1,5 > 1,5	Déjections d'animaux herbivores Déjections humaines
$\frac{cop}{cop + 24etcop}$	< 0,38 > 0,73	Déjections d'animaux herbivores Déjections humaines
$\frac{sito}{cop}$	< 1,0 > 1,0	Déjections humaines ou porcines Déjections bovines

*cop*: coprostanol; *chol*: cholestérol; *epicop*: epicoprostanol; *24etcop*: 24-éthylcoprostanol; *sito*: sitostanol

**Tableau 1: Signification des rapports moléculaires calculés pour les stérols et les stanols.**

Cependant l'utilisation de certains de ces ratios a été remise en cause (Derrien et al., 2011), puisqu'il y a, pour certains ratios, des chevauchements entre les valeurs seuils définies pour les pôles porcins et bovins, par exemple.

La deuxième approche consiste à prendre en compte toutes ou partie des molécules de l'empreinte stanol et d'illustrer la variabilité inter-espèce via un traitement statistique. Ce type de traitement permet de visualiser la variabilité de l'empreinte stanol via une représentation en deux dimensions. Les projections, sur ce graphique, des empreintes stanols de déjections provenant d'espèces différentes permettent (1) de définir des zones caractéristiques de chaque type de déjections, (2) de calculer les coordonnées du barycentre de chaque zone et (3) de créer des modèles de mélange (Derrien et al., 2012, 2011; Jardé et al., 2018). C'est cette deuxième approche qui a été utilisée pendant cette thèse.

En 2011, Derrien et al. (2011) publiaient un modèle d'interprétation des empreintes stanols par Analyse en Composantes Principales (ACP) applicable au contexte breton. L'ACP appartient au groupe des méthodes descriptives multidimensionnelles appelées méthodes factorielles. L'ACP permet l'exploration des liaisons entre un nombre  $n$  d'individus et un nombre  $p$  de variables. Elle permet de construire un nouveau système

de représentation géométrique et synthétique de ces individus et variables en perdant le moins d'information possible. Le principe consiste à remplacer une famille de variables par de nouvelles variables de variance maximale, non corrélées deux à deux et qui sont les combinaisons linéaires des variables d'origine. Ces nouvelles variables, appelés composantes principales, définissent des plans factoriels qui servent de base à la représentation graphique plane des variables initiales.

Les représentations des individus permettent de voir s'il existe une ou des structures sur cet ensemble d'individus, et de définir des groupes ou « clusters » via les distances entre ces individus. Chaque plan factoriel est caractérisé par un pourcentage qui correspond au pourcentage d'explication de la variance. Ainsi la combinaison des pourcentages des plans factoriels donne la variance totale expliquée. Par convention, la fiabilité d'une ACP est validée à partir du moment où l'explication de la variance totale exprimée est supérieure à 60%.

Le modèle de Derrien et al. (2011) s'est construit sur la distribution de 6 stanols fécaux (le coprostanol, l'épicoprostanol, le 24-éthylcoprostanol, le 24-éthylépicoprostanol, le campéstanol et le sitostanol) dans 88 échantillons de diverses matrices d'origine porcine et bovine (matières fécales, fumiers, lisiers) et d'origine humaine (effluents de stations d'épuration dilué ou non, boues d'épuration).

Le coprostanol et l'épicoprostanol sont les deux composantes majoritaires, qui expliquent 77% de la variance totale du modèle. Trois clusters représentant les empreintes stanols humaine, porcine et bovine ont pu être déterminées, et peuvent servir à la détermination de l'origine de la contamination fécale pour de nouveaux échantillons.

L'année suivante, Derrien et al. (2012) appliquaient ce modèle avec succès sur des échantillons d'eaux de surface en contexte breton pour discriminer les contaminations humaine, porcine et bovine. Ce modèle par ACP a également fait ses preuves pour l'analyse de la contamination fécale dans les huîtres, toujours en contexte breton (Harrault et al. 2014).

La figure 6 présente l'ACP des 88 échantillons analysés par Derrien et al. (2011) à l'aide des 6 stanols fécaux les plus discriminants. L'axe F1 constitue la composante principale (le coprostanol, 61,7% de la variance totale) et l'axe F2 la seconde composante (l'épicoprostanol, 16,5% de la variance totale).

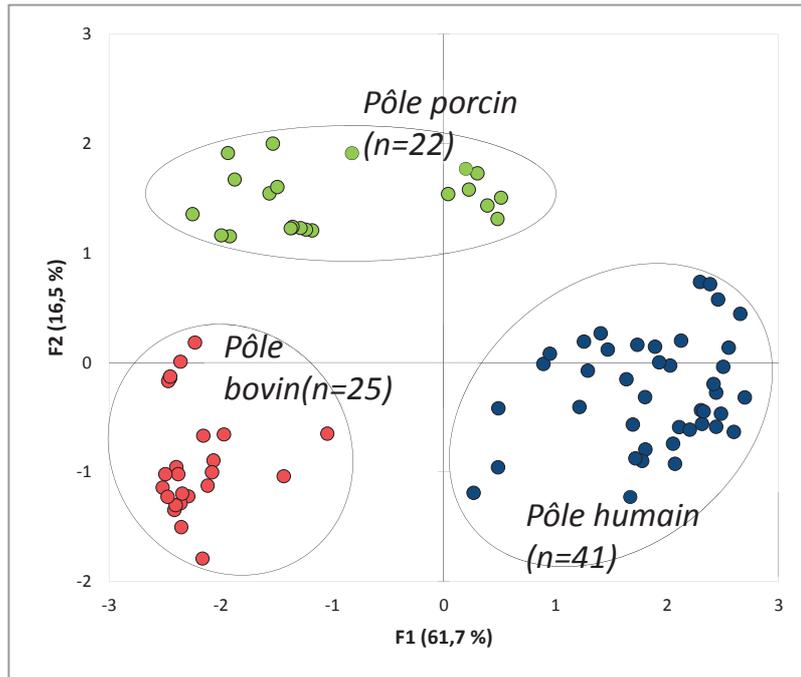


Figure 6: ACP des 88 échantillons analysés par Derrien et al. (2011) (source: Derrien et al. 2012).

### 1.2.1. Traceurs chimiques directs : Les acides biliaires

Les acides biliaires sont des stéroïdes à 24 ; 27 ou 28 atomes de carbones produits dans le système digestif des mammifères (Bull et al., 2002). Les fèces humaines contiennent plus de 20 acides biliaires différents formés à partir des acides biliaires primaires que sont l'acide cholique, l'acide hyocholique et l'acide chénodéoxycholique (Bull et al., 2002; Tyagi et al., 2009). Ces acides sont générés par le foie à partir du cholestérol et sécrétés avec la bile vers les intestins. Les micro-organismes présents dans l'intestin transforment ces acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires. La plupart des acides biliaires secondaires sont absorbés dans l'intestin (95%) et retournent vers le foie, mais une petite fraction d'entre eux est excrétée dans les selles. L'acide lithocholique et l'acide déoxycholique sont les principaux acides biliaires secondaires excrétés dans les selles des humains et de certains animaux supérieurs (Tyagi et al., 2009). Les acides biliaires peuvent être utilisés comme traceurs de contamination fécale car il est possible de différencier une contamination selon le type d'acides biliaires excrétés. En effet, les ruminants comme les bovins produisent majoritairement de l'acide déoxycholique tandis que les omnivores excrètent également des quantités importantes d'acide lithocholique. Les porcins, eux, n'excrètent pas d'acide déoxycholique mais leurs fèces contiennent par ailleurs des acides hyocholiques.

L'utilisation des acides biliaires comme traceurs de contamination fécale a peu été exploitée dans les eaux naturelles et uniquement dans la phase particulaire (Elhmmali et al., 2000), bien que cette technique semble prometteuse lorsqu'elle est appliquée de façon complémentaire avec les stanols. L'étude des acides biliaires a été appliquée dans le cadre d'analyse de fèces (Tyagi et al., 2007), d'effluents de stations d'épuration (Elhmmali et al., 1997), de sols (Bull et al., 2003) ou de sédiments (Bull et al., 2003; Elhmmali et al., 1997), notamment à des fins archéologiques (Bull et al., 2003; Guillemot et al., 2015; Zocatelli et al., 2017).

### **1.2.2. Traceurs chimiques indirects : les résidus pharmaceutiques**

Parmi les traceurs chimiques indirects largement utilisés, on trouve les résidus de médicaments, les édulcorants artificiels, la caféine, les composés détergents, les fragrances (pour les parfums), des composés présents dans des encres d'imprimeries etc. (Derrien et al., 2012; Gourmelon et al., 2010; Shah et al., 2007; Tran et al., 2015).

Dans le cadre de ce travail seront détaillés uniquement les traceurs chimiques médicamenteux. En effet, seule l'étude des médicaments peut permettre d'établir à la fois une contamination d'origine humaine et une contamination d'origine animale, car il existe des médicaments à usage spécifiquement humain et d'autres utilisés uniquement en médecine vétérinaire. Les autres traceurs chimiques indirects permettent seulement de mettre en lumière une contamination d'origine humaine.

A ce jour, les études ont plutôt mis en avant les médicaments à usage humain qui pouvaient être de bons traceurs potentiels de contamination humaine via les rejets de stations d'épuration. Pour constituer un bon marqueur, un médicament à usage humain doit:

- 1) Etre largement utilisé dans la population et ce quel que soit la période de l'année,
- 2) Etre peu dégradé lors des procédés de traitement mis en œuvre dans les stations d'épuration,
- 3) Etre relativement hydrophile pour pouvoir être quantifié dans la phase aqueuse des eaux de surface, et dans les eaux souterraines,
- 4) Persister dans l'environnement (Tran et al., 2015).

Certains composés ont déjà été identifiés comme de bons traceurs, comme la carbamazépine, un anti-épileptique et neuroleptique (Madoux-Humery et al., 2013; Wade et al., 2015), le paracétamol, l'acide acétylsalicylique ou encore l'iopromide, un agent de contraste iodé.

Dans le cadre de ce travail de thèse, deux composés pharmaceutiques à usage humain ont été utilisés : la carbamazépine et le diclofénac.

La carbamazépine est l'un des résidus pharmaceutiques les plus ubiquistes et persistants dans l'environnement (Wade et al., 2015). Elle n'appartient cependant pas à la liste des molécules les plus utilisées en France selon l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM, 2014) mais sa grande persistance justifie son utilisation comme marqueur. Elle est excrétée par les humains dans les urines sous forme inchangée (2-3%) et sous forme de métabolites. Une partie de la carbamazépine est également excrétée sous forme inchangée dans les fèces (28%) (Zhang et al., 2008). La carbamazépine n'est pas sensible à la biodégradation. En conséquence, elle n'est pas significativement éliminée au sein des stations d'épuration qui utilisent généralement des procédés par boues activées. Ses taux d'élimination sont ainsi souvent inférieurs à 10% (Zhang et al., 2008). Elle peut donc atteindre les eaux naturelles, et étant plutôt polaire ( $\log K_{ow} = 2,45$ ) elle sera largement présente dans la phase dissoute. La carbamazépine est soumise à la photo-dégradation, mais sa demi-vie estimée est variable selon les études et va de plusieurs heures à plusieurs semaines (Wade et al., 2015). Ainsi, la carbamazépine est largement détectée et quantifiée dans les eaux de surface à travers le monde (en Europe, en Asie, en Amérique), et elle a également été quantifiée dans les eaux souterraines, notamment en Europe.

Le diclofénac est un anti-inflammatoire non stéroïdien dont l'occurrence dans les eaux naturelles à travers le monde a aussi largement été mise en avant. En 2013, le diclofénac était la 12<sup>ème</sup> molécule la plus vendue en pharmacie de ville (en quantité, ANSM, 2014). Après administration à l'Homme, le diclofénac est en partie métabolisé mais 6% du dosage est excrété sous forme inchangée dans l'urine. Les taux d'élimination du diclofénac lors des traitements de stations d'épuration sont plus variables que ceux de la carbamazépine mais sont généralement inclus entre 20-40% (Zhang et al., 2008). Le diclofénac est assez rapidement sujet à la photo-dégradation directe, avec des demi-vies rapportées d'environ une heure (Zhang et al., 2008), mais la matière organique présente dans l'eau peut ralentir ce phénomène. Le diclofénac a été quantifié dans les eaux de surface aussi largement que la carbamazépine, mais à des

concentrations moindres dans les eaux souterraines. Ceci peut s'expliquer par son logKow (4,51), plus élevé que celui de la carbamazépine, qui limite probablement son infiltration du sol vers les eaux souterraines. Le diclofénac avait été intégré en 2015 à la liste des substances soumises à surveillance dans les milieux aquatiques établie par la Commission Européenne. Cependant, il en a été exclu lors de la mise à jour de la liste au printemps 2018 car la Commission Européenne estime que suffisamment de données ont été recueillies sur ce composé au cours des deux années de suivi (2016-2017) pour effectuer une évaluation des risques (Décision d'exécution UE 2018/840 Journal officiel de l'Union Européenne, 2018).

## CHAPITRE 2 : MATÉRIELS & MÉTHODES

Ce chapitre a pour objet de présenter la méthodologie appliquée pour répondre aux objectifs identifiés lors de l'introduction. Ils sont rappelés ci-dessous :

- (i) identifier les résidus à usage vétérinaire susceptibles d'être présents dans les ressources et eaux distribuées au robinet,
- (ii) développer une méthode d'analyse pour la liste de composés retenus,
- (iii) acquérir des premières données de contamination par les RMV dans les EDCH en Bretagne (composés, niveaux de concentrations),
- (iv) identifier les sources de cette contamination à l'aide de l'étude de la contamination fécale associée dans les eaux brutes.

### 2.1. Méthodologie générale

Dans un premier temps, la région de l'étude, la Bretagne, est décrite ainsi que la stratégie d'échantillonnage et les protocoles d'échantillonnage.

Ensuite est présentée la méthode de priorisation utilisée pour sélectionner les RMV d'intérêt dans ce contexte breton.

Sur la base de cette liste, une étude de la bibliographie analytique et le développement d'une première méthode d'analyse multi-résidus ont été réalisés. Les performances de cette méthode d'analyse multi-résidus ont été évaluées. La seconde méthode d'analyse développée pour deux RMV pour étoffer la liste d'étude est ensuite décrite. Le stage de Master 2 de Quentin Goyat a été co-encadré dans le cadre des développements analytiques pour les RMV (Goyat, 2017).

Enfin sont décrites les méthodes d'analyses de la contamination fécale, du carbone organique dissous, et la récupération des données de débits.

## 2.2. Stratégie d'échantillonnage

Le projet a pour objectif d'obtenir une première image de la contamination des EDCH par les RMV à l'échelle de la région Bretagne. A cette fin, une stratégie d'échantillonnage adéquate a été définie afin (1) de sélectionner les sites de production d'eau potable à prélever et (2) de définir les périodes et fréquences des prélèvements.

### 2.2.1. La région Bretagne

#### 2.2.1.1. *Production d'eau potable en Bretagne et qualité de la ressource*

La région Bretagne, située dans le nord-ouest de la France, possède une superficie totale de 27 208 km<sup>2</sup>. Elle fait partie du bassin Loire-Bretagne, qui se divise en six sous-bassins, dont le sous bassin 'Vilaine et côtiers bretons' qui nous intéresse ici. La figure 7 présente les limites géographiques du sous-bassin 'Vilaine et côtiers bretons' et sa situation dans le bassin Loire-Bretagne.

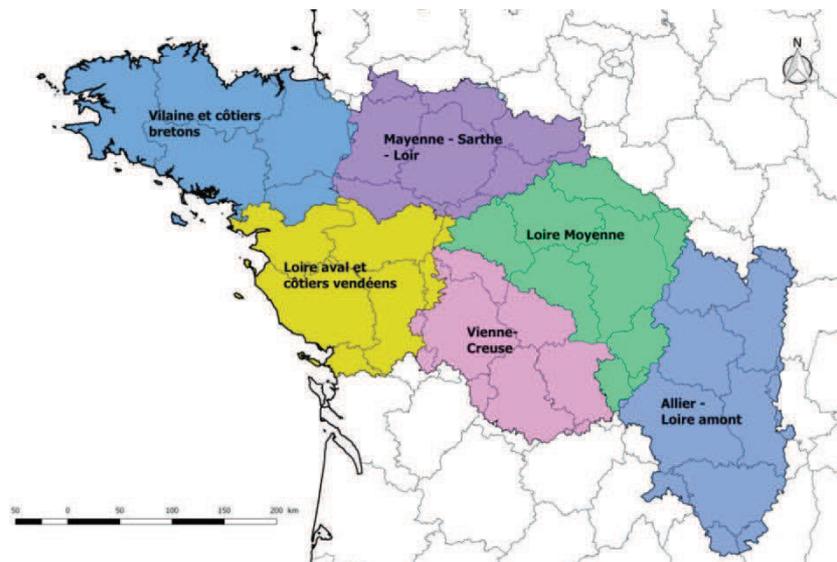
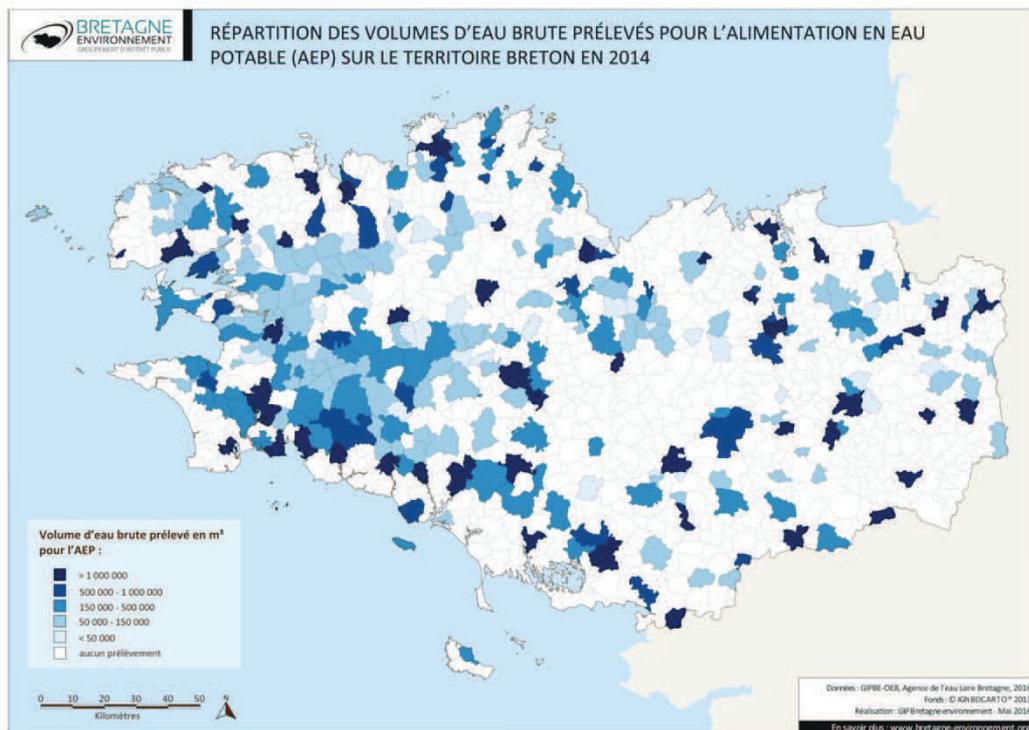


Figure 7: Sous-bassin versant Vilaine et côtiers bretons au sein du bassin Loire-Bretagne.

Le sous-bassin 'Vilaine et côtiers bretons' couvre le sous-bassin de la Vilaine ainsi que tous les sous-bassins des cours d'eaux côtiers de Bretagne, totalisant ainsi 391 cours d'eau sur 30 000 km<sup>2</sup> (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL) Bretagne, 2016).

En Bretagne, 3 208 376 habitants sont desservis par le réseau d'adduction, à travers 109 stations de pompage d'eaux de surface et 578 captages d'eaux souterraines,

représentant 288 millions de m<sup>3</sup> d'eaux collectés annuellement (ARS Bretagne, 2017). Ces captages sont pris en charge par 392 usines pour produire de l'eau potable. Parmi ces usines, 237 traitent des eaux souterraines, 84 traitent des eaux superficielles, 70 traitent un mélange d'eaux superficielles et d'eaux souterraines et 1 usine traite de l'eau de mer (Agence Régionale de Santé (ARS) Bretagne, 2017). La figure 8 présente la répartition des volumes d'eau brute prélevés pour l'alimentation en eau potable sur le territoire breton en 2014 (données les plus récentes accessibles).



**Figure 8: Répartition des volumes d'eau brute prélevés pour l'alimentation en eau potable sur le territoire breton en 2014 (Source: bretagne-environnement.org).**

La Bretagne reçoit des précipitations supérieures à la moyenne française mais elle ne possède que peu de ressources en eaux souterraines exploitables du fait d'un substrat géologique composé de roches de socle très peu perméables par nature, principalement du granite et du schiste. Ainsi, il existe certes un grand nombre de forages d'eaux souterraines en Bretagne, mais ce sont uniquement des petits aquifères indépendants les uns des autres, situés dans des fractures du socle. Les débits pompés sur ces forages souterrains sont faibles. C'est pourquoi 75% de l'eau potable en Bretagne

provient d'eaux superficielles, alors que le ratio au niveau national est en faveur d'une production à partir d'eau souterraines à 64% (ARS Bretagne, 2017).

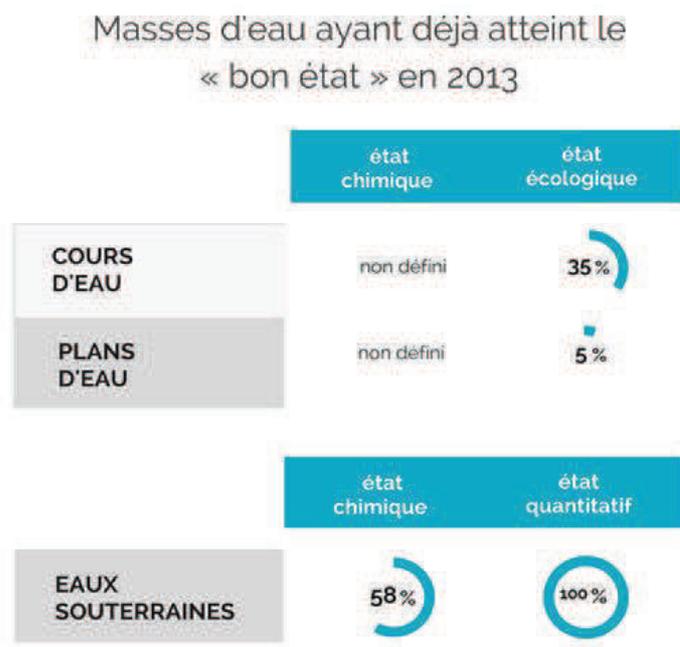
Pour ce qui est des eaux superficielles, l'imperméabilité des roches de socle favorise un réseau hydrographique très dense et réactif qui peut provoquer, au cours d'une même année, des inondations hivernales et des étiages prononcés en été car il n'y a que peu d'échanges entre ESO et ESU. Ensuite, les ressources en eaux superficielles sont vulnérables, en particulier à la pollution anthropique d'origine agricole, industrielle et domestique, car les captages se situent souvent en aval de ces activités. L'eau souterraine subit également ces pressions car les captages se situent majoritairement en sub-surface (75% des captages sont prélevés à moins de 12 mètres de profondeur) (Groupe de Travail du Plan Régional Santé Environnement 2, 2015).

Parmi les eaux de surface dans le cadre de la DCE, 37% des eaux de surface (cours d'eau, retenues et eaux littorales) du sous-bassin 'Vilaine et côtiers bretons' sont en « bon état » écologique selon une évaluation réalisée en 2013 par l'Agence de l'Eau Loire-Bretagne (Agence de l'Eau Loire Bretagne (AELB), 2017; DREAL Bretagne, 2016) Selon la DCE, une eau en bon état est définie comme une masse d'eau qui permet une vie animale et végétale variée (état écologique), exempte de produits toxiques (état chimique) et une eau disponible en quantité suffisante pour satisfaire tous les usages (état quantitatif). Le sous-bassin 'Vilaine et côtier bretons' est le plus peuplé de Loire-Bretagne mais aussi l'un des moins dégradés du point de vue écologique (AELB, 2017). Les cours d'eaux du bassin sont classés en « bon état » écologique à 35%, et en état « moyen » pour 41% d'entre eux (AELB, 2017). D'autre part, parmi les 35 plans d'eaux de plus de 50 hectares que compte la Bretagne, seuls 2 étaient en bon état en 2013 (DREAL Bretagne, 2016). L'eutrophisation, i.e. la prolifération d'algues vertes, constitue la principale cause de dégradation des masses d'eau en Bretagne. Cette eutrophisation est provoquée dans la majorité des cas par un excès de phosphore dans les eaux (Secrétariat technique de bassin Loire-Bretagne, 2015).

Pour ce qui est des 25 masses d'eaux souterraines étudiées en 2013, l'état quantitatif de toutes les masses d'eau est « bon ». Le bon état quantitatif d'une eau souterraine est atteint lorsque les prélèvements ne dépassent pas la capacité de renouvellement de la ressource disponible, compte tenu de la nécessaire alimentation des écosystèmes aquatiques et des zones humides directement dépendantes. Pour ce qui est de l'état chimique, 10 masses d'eau sont déclassées en « médiocre », 9 à cause de leurs

concentrations en nitrates et une à cause de ses concentrations en pesticides (AELB, 2017).

La figure 9 présente les pourcentages de masses d'eau classées comme ayant un « bon état » en Bretagne en 2013.



**Figure 9: Pourcentages de masses d'eau (par type d'eau) classées en "bon état" en 2013 (Source: bretagne-environnement.org).**

#### 2.2.1.2. Une terre d'élevage

L'agriculture occupe une place importante en Bretagne, tant sur le plan économique (production agricole ou agroalimentaire) que sur le plan de l'utilisation des sols. Environ 60% du territoire breton est consacré aux activités agricoles (1 630 536 hectares sur 2 750 667 hectares) et la Bretagne se classe comme première région française productrice de denrées d'origine animale (Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt (DRAAF) Bretagne, 2017b). Les principaux secteurs sont les bovins laitiers, les porcs et les volailles de boucherie, mais le bœuf, le veau et les poules pondeuses sont également bien représentés.

En 2016, 56 % du porc français était produit en Bretagne, avec 5082 élevages porcins et 7 042 030 animaux (Chambres d'Agriculture de Bretagne, 2017; DRAAF Bretagne,

2017a). A titre de comparaison, la population humaine en Bretagne était estimée à 3 323 130 personnes au 1er janvier 2017 (INSEE, 2018), soit la moitié du nombre de porcs élevés en 2016 sur le même territoire.

Un poulet français sur trois est produit en Bretagne (Chambres d'Agriculture de Bretagne, 2017), ce qui représente 33% de la production nationale, et 41% des œufs de consommation de France (DRAAF Bretagne, 2017a). Au total, 88 850 000 volailles, y compris les volailles de chair et les poules pondeuses, ont été signalées en 2016 (dont 51 060 000 pour la viande de poulet et 19 775 000 pour la production d'œufs) (DRAAF Bretagne, 2017a).

Par ailleurs, le cheptel bovin breton comprenait 2 057 641 animaux en 2016, soit 11% du cheptel bovin français (DRAAF Bretagne, 2017a). En 2016, 164 500 tonnes de viande bovine ont été produites en Bretagne.

Le tableau 2 présente les densités par type d'élevage en Bretagne et en France, exprimées en nombre d'animal par kilomètre carré de Surface Agricole Utilisée (SAU).

Type élevage	Densité Bretagne (Nombre d'animaux/SAU* Bretagne, km <sup>2</sup> )	Densité France (Nombre d'animaux/SAU France, km <sup>2</sup> )
Porcin	427	45
Bovin	120	65
Avicole	5303	845
Ovin	4	24
Caprin	2	4
Equin	1	1
Lapin	7	3

**Tableau 2: Densités par type d'élevage sur le territoire breton et le territoire national (données Agreste 2017).**

La Bretagne présente des densités respectivement 9 ; 2 et 6 fois plus élevées en porcins, bovins et volailles qu'au niveau national.

La Bretagne est également l'une des régions françaises où les activités d'aquaculture sont les plus importantes, notamment l'élevage des salmonidés (Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt Bretagne, 2017b).

### **2.2.2. Sélection des sites de prélèvements**

La sélection des sites d'intérêt parmi les nombreuses installations existantes s'est basée sur les travaux menés par le groupe de travail du Plan Régional Santé Environnement 2

(GDT PRSE 2, 2015). Le GDT PRSE2 travaillant sur les résidus pharmaceutiques à usage humains et vétérinaires a permis de déterminer 51 ressources en eau potentiellement contaminées par des résidus médicamenteux.

A partir de la liste des 51 points, un premier tri a été effectué afin de se focaliser uniquement sur les points potentiellement à risque d'un point de vue RMV. 28 points ont été retenus car étant soumis à une pression d'élevage importante (bovins, porcins, volailles ou pisciculture) et destinés à la production d'eau de consommation. Sur ces 28 sites, 26 sont des ESU et 2 des ESO. Trois captages d'ESU ont été retirés de la liste car ils ne sont plus utilisés. Au final, ce sont donc 25 captages dont 23 sites d'ESU et 2 sites d'ESO qui sont retenus pour ce travail de thèse.

Parmi les ressources en eau de surface, une priorisation a été réalisée au cours de la thèse.

Cette priorisation des installations d'eaux superficielles s'est basée sur deux critères:

- La pression d'élevage au niveau du point de captage
- Le débit de pompage journalier (m<sup>3</sup>/j) sur le captage

#### *2.2.2.1. La pression d'élevage*

Dans l'idéal, la pression d'élevage devrait être estimée par les effectifs d'animaux par espèces et par bassins versants, afin d'avoir un reflet de la contamination pour le cours d'eau considéré. L'information n'a pas été obtenue par bassins versants mais par unités géographiques, en l'occurrence par cantons.

Ainsi, dans un premier temps, la pression d'élevage a été estimée à partir des effectifs d'animaux recensés par espèce et par canton par la DREAL. Cependant, les données étaient manquantes pour 10 des 26 points choisis. Pour les 10 points pour lesquelles les données étaient manquantes, il n'a pas été possible d'obtenir les effectifs animaux par canton (les données ont été obtenues à l'échelle du département).

De fait, pour pouvoir prioriser les sites entre eux, c'est un autre paramètre disponible pour la totalité des 26 points de captages qui a été retenu. Il s'agit de l'Unité Gros Bétail (UGB) par canton. Les données datent de 2010 et sont disponibles sur le site du Service de la statistique et de la prospective du Ministère de l'agriculture et de l'alimentation (<http://agreste.agriculture.gouv.fr/>). Une Unité Gros Bétail est une unité employée pour pouvoir comparer ou agréger des effectifs animaux d'espèces ou de catégories différentes. On définit des équivalences basées sur les besoins alimentaires de ces

animaux. Par exemple, 1 vache de 600 kg produisant 3 000 litres de lait par an = 1,45 UGB ; 1 veau de boucherie 0,6 UGB ; 1 truie = 2,1 UGB ; un poulet de chair = 0,011 UGB ; une poule pondeuse d'œufs de consommation = 0,014 ...

L'utilisation de ce paramètre permet d'estimer globalement les effectifs animaux par canton, en les pondérant selon les besoins alimentaires des espèces. Les UGB ont ensuite été rapportées à la superficie du canton, pour estimer la pression d'élevage.

Le tableau 3 présente les résultats de la priorisation selon la pression d'élevage pour les captages d'eaux superficielles.

Les captages et usines sont codifiés afin de respecter une confidentialité pour les traitiers d'eau.

Classement	Captage ESU	Dominante élevage	Cheptel en UGB par canton en 2010	Superficie du canton (km <sup>2</sup> )	UGB/superficie canton
1	Captage D	Porcine	71 272	180	396,0
2	Captage J	Porcine	37 573	112	335,5
3	Captage X	Avicole/porcine	70 363	226	311,3
4	Captage G	Piscicole	36 405	127	286,7
5	Captage K	Piscicole	80 865	288	280,8
6	Captage B	Avicole	52 288	191	273,8
7	Captage E	Porcine	41 337	161	256,8
8	Captage Q	Porcine/avicole	26 089	107	243,8
9	Captage R	Porcine	29 234	120	243,6
10	Captage H	Avicole	44 687	213	209,8
11	Captage Y	Avicole/porcine	45 228	221	204,7
12	Captage P	Bovine	31 402	170	184,7
13	Captage S	Bovine	16 978	97	175,0
14	Captage V	Avicole/porcine	42 443	243	174,7
15	Captage A	Piscicole/avicole	19 727	120	164,4
16	Captage Z	Avicole	29 660	188	157,8
17	Captage L	Piscicole	22 192	150	147,9
18	Captage M	Avicole/porcine	16 018	116	138,1
19	Captage N	Bovine	20 053	147	136,4
20	Captage C	Avicole	14 447	106	136,3
21	Captage F	Bovine	15 216	146	104,2
22	Captage W	?	22 333	217	102,9
23	Captage I	Avicole	11 159	130	85,8

**Tableau 3: Classement des captages selon la pression d'élevage.**

Le tableau 4 présente ces mêmes données pour les deux captages d'eaux souterraines.

Captage ESO	Dominante élevage	Cheptel en UGB par canton 2010	Superficie du canton (km <sup>2</sup> )	UGB / superficie
Captage U	Bovine	36 204	241	150,2
Captage O	Bovine	20 053	147	136,4

**Tableau 4: Pression d'élevage au niveau des captages d'eaux souterraines.**

#### *2.2.2.2. Les débits d'eau journaliers destinés à la production d'eau potable*

L'eau des captages est pompée à un débit journalier défini et réglementé, elle est ensuite acheminée vers une usine de potabilisation, également appelée Unité de Traitement, et une fois traitée, cette eau potable est acheminée vers une ou plusieurs Unité de Distribution (UDI). Au sein de chaque UDI est incluse une part définie de la population (= un nombre de personnes défini). Ici, ce sont les débits journaliers pompés des captages qui ont été étudiés pour hiérarchiser les sites. Les données ont été fournies par l'ARS Bretagne, partenaire de ce travail de thèse. Il est à noter que certaines prises d'eau ne sont pas utilisées toute l'année. Toujours dans un souci d'anonymat, le tableau des débits n'est pas présenté dans ce manuscrit.

#### *2.2.2.3. Priorisation finale des sites*

Pour obtenir l'ordre de priorité final, les classements des sites pour les deux critères ont été additionnés, car les deux critères sont considérés d'importance égale. Ainsi, le captage avec le plus petit score est le plus « à risque », c'est-à-dire le plus susceptible d'entraîner une exposition de la population bretonne aux RMV via l'eau du robinet. De même, le site avec le plus haut score est le moins « à risque ».

Le tableau 5 présente les scores finaux pour les sites avec captages d'ESU.

Ordre de priorité	Captage	Département	Score élevage	Score Eau	Total
1	J	Finistère	2	3	5
2	E	Côtes d'Armor	7	1	8
3	B	Côtes d'Armor	6	5	11
4	X	Morbihan	3	9	12
5	K	Finistère	5	8	13
5	R	Côtes d'Armor	9	4	13
6	Q	Ille-et-Vilaine	8	7	15
6	G	Finistère	4	11	15
7	D	Côtes d'Armor	1	19	20
7	Y	Morbihan	11	9	20
8	V	Morbihan	14	7	21
9	S	Ille-et-Vilaine	13	10	23
10	W	Morbihan	22	2	24
10	Z	Morbihan	16	9	25
10	N	Ille-et-Vilaine	19	6	25
11	P	Ille-et-Vilaine	12	14	26
12	A	Côtes d'Armor	15	12	27
13	H	Finistère	10	20	30
14	L	Finistère	17	15	32
15	F	Côtes d'Armor	21	13	34
16	M	Finistère	18	18	36
16	C	Côtes d'Armor	20	16	36
17	I	Finistère	23	17	40

\*Prise d'eau non utilisée toute l'année

**Tableau 5: Résultats de la hiérarchisation des captages d'ESU.**

### **2.2.3. Définition des périodes et fréquences d'échantillonnage**

Ce projet de thèse a pour objectif d'effectuer un état des lieux de la contamination des EDCH par les RMV à l'échelle d'une région et sur une année, sur les sites sélectionnés. Un des sous-objectifs est également d'essayer, dans la mesure du possible, d'identifier les déterminants de la contamination. Pour cela, cet état des lieux de la contamination devra prendre en compte les possibles variabilités saisonnières. Pour cela, il convient de définir des périodes et fréquences d'échantillonnage.

L'objectif est que les prélèvements soient effectués de manière à inclure les paramètres suivants:

- Variations hydrologiques : périodes de hautes eaux et périodes d'étiages.

- Variations dans les prescriptions vétérinaires : différences de pratiques thérapeutiques, que ce soit sur les molécules utilisées ou leur dosage selon les saisons (Hamscher, 2000; Shi et al., 2014).
- Épandages : les périodes d'épandages de fumiers ou lisiers dans les champs sont suspectées d'être plus à risque que les périodes sans épandage, bien que les RMV puissent être adsorbés dans le sol et remobilisés lors d'épisodes pluvieux en dehors des périodes d'épandages. Ces calendriers sont actuellement définis par le 5<sup>ème</sup> Programme d'Actions Régional Directive Nitrate (PARDN). Les PARDN font suite à la directive européenne 91/676/CEE de 1991 dite « Directive Nitrates » ayant pour objectif la diminution de la pollution des milieux aquatiques par les nitrates d'origine agricole. En France, la Bretagne a été classée comme une « région vulnérable » selon les dispositions de cette directive depuis 1994 (DREAL Bretagne, 2014).

La figure 10 présente un tableau tiré de ce 5<sup>ème</sup> PARDN définissant les périodes d'interdiction d'épandages. Celles-ci varient selon le type de culture considérée et le type de fertilisant azoté. De manière générale, les épandages sont autorisés de février à juin-août. Pour compléter, le tableau 6 donne la définition des différents types de fertilisants mentionnés dans la figure 11.

La stratégie d'échantillonnage a été établie sur la base des résultats du retour d'expérience du projet REMEDES (Soulier et al., 2015). Dans cette étude, des prélèvements ont été réalisés dans deux bassins versants bretons, le Néal qui alimente la Rance (35), et Kervidy-Naizin (56), en période de crues et en prélèvements ponctuels (tous les 15 jours quelles que soit les conditions météorologiques). Les fréquences de détection se sont révélées semblables quelles que les conditions hydrologiques. Des molécules très prescrites n'ont pas été retrouvées dans l'eau (par exemple l'amoxicilline et la dihydrostreptomycine) et à l'inverse certaines molécules peu prescrites comme la fluméquine ont été détectées (Soulier et al., 2015). Les résultats du projet REMEDES montrent qu'il existe une variabilité journalière des molécules et de leurs concentrations lors des crues. Ce phénomène peut être dû aux parcelles connectées ou à la remobilisation de molécules stockées dans les sols et/ou sédiments au fur et à mesure des crues. Au vu des variations, il faudrait dans l'idéal réaliser au moins 10 prélèvements par point par an. Cependant, d'un point de vue logistique et financier, il a été statué de réaliser 4 campagnes de prélèvements au cours d'une année.

En prenant en compte ces restrictions, les préconisations retenues pour la stratégie d'échantillonnage sont :

- En reprise d'écoulement à l'automne
- En période de hautes eaux
- En période d'épandage de printemps
- En période d'étiage

	Type d'effluent	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre
<b>Grandes cultures</b>	Sols non cultivés, CIPAN*, légumineuses												
	Cultures implantées à l'automne ou en fin d'été (autre que colza, cultures dérobées et prairies de moins de 6 mois)												
	Colza d'hiver implanté à l'automne												
	Cultures dérobées et prairies de moins de 6 mois implantées à l'automne ou en fin d'été												
Cultures implantées au printemps (autres que maïs) y compris les prairies implantées depuis moins de 6 mois	Type I												
	Type II (1)									(3)			
	Type III												
Maïs	Type I												
	Type II (1)												
	Type III												
<b>Prairies</b>													
Prairies implantées depuis plus de 6 mois dont prairies permanentes, luzerne	Type I (2)												
	Type II (2)												
	Type III												
<b>Autres cultures</b>													
Autres cultures (cultures pérennes-vergers, vignes, cultures légumières et cultures porte-graines)	Type I												
	Type II												
	Type III												

**Périodes d'interdiction d'épandage pour la région Bretagne**

\*CIPAN : Culture intermédiaire piège à nitrates

- (1) Les effluents peu chargés issus d'un traitement d'effluents bruts (contenant moins de 0,5kg d'azote/m<sup>3</sup>) peuvent être épandus sur culture de printemps jusqu'au 31 août dans la limite de 50kg d'azote par hectare
- (2) L'épandage d'effluents peu chargés issus d'un traitement d'effluents bruts (contenant moins de 0,5kg d'azote/m<sup>3</sup>) est autorisé dans la limite de 20kg d'azote efficace par hectare durant les périodes d'interdiction fixées pour ces types de cultures, et dans le respect des autres règles d'épandages en vigueur
- (3) L'épandage d'effluents peu chargés issus d'un traitement d'effluents bruts (contenant moins de 0,5kg d'azote/m<sup>3</sup>) est autorisé du 1<sup>er</sup> au 30 septembre dans la limite de 20kg d'azote efficace par hectare

**Figure 10: Périodes d'interdiction d'épandage pour la région Bretagne (Source: DREAL Bretagne, Plaquette Directive Nitrates : 5<sup>ème</sup> programme d'actions en Bretagne, 2014).**

Fertilisant de type I	Fertilisant de type II	Fertilisant de type III
<p>Fertilisant contenant majoritairement de l'azote organique et en faible proportion de l'azote minéral (caractérisé par un coefficient C/N supérieur ou égal à 8).</p> <p>Correspond à tous les fumiers sauf ceux de volailles (fumiers de ruminants, porcs, équidés, etc), aux composts d'effluents d'élevage, et à certains produits homologués ou normés d'origine organique (en fonction du coefficient C/N).</p>	<p>Fertilisant contenant de l'azote organique et une proportion d'azote minéral variable (caractérisé par un coefficient C/N inférieur ou égal à 8).</p> <p>Correspond aux lisiers (bovins, porcins, lisiers ou fientes de volaille, etc.), aux eaux résiduaires urbaines et effluents peu chargés, aux digestats bruts de méthanisation et à certains produits homologués ou normés d'origine organique (en fonction du coefficient C/N).</p>	<p>Fertilisants minéraux et uréiques de synthèse.</p> <p>Correspond aux engrais azotés simples, binaires, ternaires (urée, ammonitrate, etc) et engrais en fertirrigation.</p>

**Tableau 6: Définitions des types de fertilisants (Source: DREAL Bretagne, Plaquette Directive Nitrates : 5<sup>ème</sup> programme d'actions en Bretagne, 2014.**

## **2.2.4. Campagnes de prélèvements, protocole d'échantillonnage et paramètres analysés**

### *2.2.4.1. Déroulement des campagnes de prélèvements*

Conformément à la stratégie d'échantillonnage établie, quatre campagnes de prélèvements ont été réalisées sur une année, entre mars 2017 et février 2018.

La première campagne de prélèvement a été réalisée entre le 2 mars et le 6 avril 2017, théoriquement pendant la période de « hautes eaux ». Tous les échantillons prévus ont été prélevés et analysés soit 25 eaux brutes (EB) et 23 eaux traitées (ET).

La seconde campagne de prélèvement a été réalisée entre le 2 mai et le 16 juin 2017, pendant la période des épandages. Suite à un problème de stockage des échantillons de cette campagne (congélateur défectueux), 15 échantillons (8 EB et 7 ET) n'ont pas pu être analysés. Les résultats pour 17 EB et 17 ET correspondantes ont pu être exploités lors de cette campagne.

La troisième campagne de prélèvement a eu lieu entre le 4 septembre 2017 et le 12 octobre 2017, en période d'étiage, à l'exception d'une usine qui a été prélevée le 10 juillet 2017. En effet, cette usine allait définitivement fermer fin juillet, en raison du faible niveau de la ressource qui empêchait la production d'eau potable par l'usine (usine du captage D). D'autre part, deux usines n'étaient pas en fonctionnement sur les captages d'intérêt, et une autre usine était en rénovation. Ainsi, 25 EB et 20 ET ont été prélevées pendant cette campagne.

La quatrième campagne, en période de hautes eaux, a débuté le 18 décembre 2017 et s'est achevée le 8 février 2018. Durant celle-ci, 24 échantillons d'EB et 22 ET correspondantes ont été prélevées.

Enfin, une campagne supplémentaire a été effectuée lors des épandages au printemps 2018, entre le 2 mai 2018 et le 13 juin 2018. Cette campagne supplémentaire vise à re-prélever les échantillons ayant été perdus lors de la seconde campagne de prélèvement, réalisée à la même période l'année précédente. Ainsi, la totalité des sites n'a pas été prélevée, ce sont 14 EB et 13 ET qui ont été collectés lors de cette campagne.

Le tableau 7 fait un récapitulatif du déroulement des campagnes.

Campagne	Période visée	Date prélèvement	Nombre d'échantillons analysés	
			EB	ET
#1	Hautes eaux	2/03/2017 au 6/04/2017	25	23
#2	Epandage	2/05/2017 au 16/06/2017	17	17
#3	Etiage	4/09/2017 au 2/10/2017	25	20
#4	Hautes eaux	18/12/2017 au 8/02/2018	24	22
#5	Epandage	2/05/2018 au 13/06/2018	14	13

**Tableau 7: Récapitulatif du déroulement des campagnes.**

Au total, lors de ces cinq campagnes de prélèvements, 199 échantillons ont été prélevés, et plus précisément 105 EB et 94 ET.

#### 2.2.4.2. Protocole d'échantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés manuellement dans les usines de potabilisation ou à proximité. Les prélèvements d'eau brute en entrée d'usine ont été effectués directement au robinet dans l'usine ou directement dans la ressource en eau au niveau du captage. Les prélèvements dans la ressource ont été effectués à l'aide d'une perche au bout de laquelle était fixé un flacon en plastique ou à l'aide d'un sceau attaché à une corde.

- Prélèvement de 1 L d'eau dans un flacon en verre brun contenant 200 µL d'acide ascorbique pour l'analyse des résidus de médicaments vétérinaires.
- Prélèvement de 1 L d'eau (eau de surface) ou 2 L (eau souterraine) dans un flacon en plastique blanc pour l'analyse des stanols fécaux.
- Prélèvement de 500 mL dans un flacon en plastique blanc pour l'analyse du COD.
- Prélèvement de 450 mL environ pour l'analyse des indicateurs microbiologiques (*E. coli* et entérocoques) dans un flacon en plastique de 500 mL avec 60 mg de thiosulfate de sodium.

Les échantillons d'eau traitée ont été directement prélevés au robinet de sortie d'usine de production d'eau potable.

- Prélèvement de 1 L d'eau dans un flacon en verre brun contenant 200 µl d'acide ascorbique pour l'analyse des résidus de médicaments vétérinaires.
- Prélèvement de 2 L dans un flacon en plastique blanc pour l'analyse des stanols fécaux.

Les échantillons pour l'analyse des RMV sont filtrés à 0,7 µm à réception au laboratoire. L'extraction doit être réalisée de préférence dans les 48h, en conservant les échantillons à 5°C (+/- 3°C). Dans le cas où l'extraction ne pourrait être réalisée dans les 48h, les échantillons sont conservés au congélateur à -20°C. C'est le cas des campagnes 1 et 2.

#### 2.2.4.3. Paramètres analysés

Dans les échantillons d'eau brute sont analysés : les RMV, les indicateurs et traceurs de contamination fécale associée et le carbone organique dissous (COD). Le pH est mesuré au laboratoire.

Dans les échantillons d'eaux traitées, seuls les RMV ont été analysés, à l'exception de la campagne supplémentaire au printemps 2018 où les stanols fécaux ont été analysés dans les ET.

## **2.3. Sélection des résidus de médicaments vétérinaires d'intérêt**

### **2.3.1. Liste initiale de résidus vétérinaires considérée**

La sélection des résidus d'intérêt a été effectuée sur la base de précédents travaux. D'une part à partir du travail mené par le GDT du PRSE 2 Bretagne au cours de l'année 2013, et d'autre part sur les résultats du projet REMEDES (Soulie et al., 2015).

Les travaux du GDT PRSE 2 portaient à la fois sur les résidus de médicaments à usage humain et sur les résidus de médicaments à usage vétérinaire. Concernant les RMV, le projet avait sélectionné en tout 54 molécules, sur la base de trois critères : les ventes, les molécules recherchées dans la littérature, et les molécules détectées dans la littérature. L'annexe 1 présente la liste des RMV sélectionnés par le GDT PRSE 2.

Dans le cadre du projet REMEDES, 46 molécules à usage vétérinaire avaient été sélectionnées, suite à des enquêtes menées auprès de vétérinaires bretons pour évaluer les niveaux de prescription à partir d'une liste de 80 molécules. L'annexe 2 présente la liste des molécules évaluées comme prioritaires à étudier à l'échelle de la région bretonne suite à ces entretiens.

La liste initiale des molécules sélectionnées pour ce travail regroupe 73 molécules vétérinaires dont 27 en commun entre les travaux du GDT PRSE2 et du projet REMEDES. Le tableau 8 présente cette liste initiale pour le travail de hiérarchisation.

Classe thérapeutique	Famille chimique	Molécules sélectionnées
Antibiotiques	Aminoglycosides	Apramycine
		Dihydrostreptomycine
		Gentamicine
		Néomycine
		Spectinomycine
	Cephalosporines	Cefalexine
		Cefalonium
		Cefquinome
		Ceftiofur
	Diaminopyrimidines	Triméthoprime
	Fluoroquinolones (FQs)	Enrofloxacin
		Marbofloxacin
	Lincosamides	Lincomycine
	Macrolides (MLs)	Erythromycine
		Spiramycine
		Tilmicosine
		Tylosine
	Penicillines	Amoxicilline
		Ampicilline
		Cloxacilline
		Benzylpénicilline
		Phénoxyéthylpénicilline
	Phénicolés	Florfénicol
	Pleuromutilines	Tiamuline
	Polypeptides	Colistine
	Quinolones (QLs)	Acide oxolinique
		Flumequine
	Sulfonamides (SAs)	Sulfadiazine
		Sulfadiméthoxine
		Sulfadoxine
		Sulfaguanidine
		Sulfaméthazine
		Sulfaméthoxy-pyridazine
Tétracyclines (TCs)	Chlortétracycline	
	Doxycycline	
	Oxytétracycline	

Classe thérapeutique	Molécules sélectionnées
Antiparasitaires	Albendazole
	Amitraz
	Clorsulon
	Closantel
	Deltaméthrine
	Diazinon
	Dicyclanil
	Eprinomectine
	Fenbendazole
	Fenvalérate
	Flubendazole
	Ivermectine
	Lévamisole
	Mebendazole
	Nitroxinil
	Oxibendazole
	Oxyclozanide
	Phoxim
Pipérazine	
Triclabendazole	
Anticoccidiens	Amprolium
	Décoquinate
	Diclazuril
	Toltrazuril
Anti-inflammatoires	Acide acétylsalicylique
	Déxaméthasone
	Flunixin
	Kétoprofène
	Méloxicam
Phénylbutazone	
Antalgiques	Paracétamol
Hormones	Altrénogest
	Dinoprost
	Cloprosténol
	Oxytocine
PMSG	
Désinfectant	Formaldéhyde

Tableau 8: Liste initiale de RMV sur la base des travaux REMEDS et GDT PRSE2.

Parmi ces 73 composés vétérinaires, 3 ont été retirés de la liste initiale avant le début du travail de hiérarchisation.

- Le formaldéhyde est une molécule utilisée comme désinfectant en pisciculture. Cependant, le formaldéhyde peut provenir de très nombreuses autres sources, à la fois naturelles (oxydation photochimiques de composés organiques volatils d'origine naturelle, combustion de biomasses) et anthropiques (industrie du bois pour la fabrication de panneaux de particules ou de contreplaqués, industrie du papier, industrie de la finition textile, désinfectant hospitalier etc...) (Institut national de recherche et de sécurité, 2008). Il serait donc difficile dans le cadre de cette étude de déterminer la part de la contamination dû à son usage piscicole. De plus, le formaldéhyde nécessiterait une méthode d'analyse spécifique. Pour ces deux raisons, il n'a pas pu être considéré dans ce travail de thèse.
- Le paracétamol et l'acide acétylsalicylique ont été retirés de la liste du fait de leur usage très important en médecine humaine.

Ainsi, la priorisation a été réalisée sur 70 molécules à usage vétérinaire.

### **2.3.2. Méthodologie du travail de hiérarchisation**

L'objectif de la hiérarchisation est d'estimer quels composés vétérinaires possèdent un fort potentiel de contamination des ressources en eau en Bretagne. C'est pourquoi la hiérarchisation a été menée sur la base de 3 critères reflétant la mobilité des RMV dans l'environnement. La Bretagne étant une région d'élevage à dominantes porcines, bovines et volailles, la hiérarchisation s'est focalisée sur le traitement de ces animaux.

Les 3 critères étudiés sont les suivants, depuis l'animal jusqu'au milieu aquatique :

- 1). Le potentiel d'entrée dans l'environnement des molécules,
- 2). Le potentiel de mobilité des molécules du sol vers l'eau,
- 3). La persistance de ces composés dans l'eau.

Pour chacun des 3 critères, un score est attribué à chaque molécule, et les scores obtenus sont additionnés afin d'obtenir un score final.

D'autre part, il y a des activités piscicoles non négligeables en Bretagne et cet usage spécifique des RMV doit être pris en compte du fait de sa criticité pour l'environnement. En effet, les molécules utilisées en pisciculture sont introduites directement dans le

milieu aquatique sans être soumises à un éventuel effet « tampon » par passage par les sols. Les molécules sont généralement administrées aux poissons par voie orale dans un support alimentaire et peuvent diffuser dans l'eau. In fine, ce sont 80% des antibiotiques administrés qui se retrouvent dans le milieu aquatique sous forme dissoute ou associés à des particules alimentaires ou fécales. En effet, 20% des mélanges alimentaires ne sont pas ingérés par les poissons et 60% des antibiotiques sont excrétés sous forme inchangés dans les matières fécales des poissons (Haug and Hals, 2000; Hektoen et al., 1995; Martinsen and Horsberg, 1995; Samuelsen et al., 2000).

Il faut modérer le propos car une partie des molécules ne va pas rester dans la phase dissoute mais s'adsorber à la phase particulaire et/ou rejoindre la phase sédimentaire.

Sur la base de ces éléments, un point de criticité supplémentaire a été attribué aux molécules prescrites en pisciculture. Six molécules sont concernées : l'oxytétracycline, la fluméquine, l'acide oxolinique, le florfenicol, la sulfadiazine et le triméthoprime.

#### *2.3.2.1. Le potentiel d'entrée dans l'environnement*

Pour estimer le potentiel d'entrée dans l'environnement des 70 RMV pré-sélectionnés, plusieurs paramètres ont été pris en compte. L'établissement de ces composantes s'est inspiré des travaux de priorisation réalisés par Boxall et al. (2003) ; Capleton et al. (2006) et Kim et al. (2008) (Boxall, 2010; Capleton et al., 2006; Kim et al., 2008).

##### *2.3.2.1.1. Cible animale et voie d'administration.*

La consultation des fiches de Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP) du site de l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV) (<http://www.ircp.anmv.anses.fr/>) a permis de déterminer les animaux cibles ainsi que les voies d'administration pour les différentes spécialités contenant les molécules présélectionnées.

Pour ce qui est de la cible animale, quatre catégories ont été élaborées sur la base 1) des types d'élevage dominants en Bretagne et 2) de la distribution d'antibiotiques (en tonnages) par espèce au niveau national.

Comme décrit dans la partie stratégie d'échantillonnage, les porcins, les bovins et la volaille constituent les élevages dominants en Bretagne. Pour rappel, les cheptels bretons de ces espèces représentent respectivement 56% ; 11% et 37% du cheptel national (DRAAF Bretagne, 2017a).

Concernant les ventes d'antibiotiques en France, une large part du tonnage des antibiotiques vétérinaires est destinée aux porcs (36%). Ensuite, 23% des tonnages d'antibiotiques sont destinés aux bovins et 20% sont destinés aux volailles (ANSES, 2017).

Ces données ont permis d'établir la classification suivante des cibles animales (par ordre d'importance croissante) :

- 1- Molécule non administrée aux porcins, aux bovins ou à la volaille.
- 2- Molécule administrée soit aux bovins, soit à la volaille, ou les deux.
- 3- Molécule administrée aux porcins + bovins OU volailles.
- 4- Molécule administrée aux porcins + bovins ET volailles.

La voie d'administration est, elle, divisée en deux catégories : la voie cutanée (aussi appelée voie topique) opposée aux autres voies d'administration. En effet, par voie topique, la molécule ne passe pas ou peu la barrière cutanée de l'animal et la majeure partie de la molécule peut se retrouver dans l'environnement par simple rinçage de l'animal (qu'il soit dû à la pluie, ou à un lavage de l'animal par l'agriculteur). Par le biais des autres voies d'administration, que ce soit la voie orale ou parentérale, le médicament peut subir une métabolisation plus ou moins intense au niveau du foie de l'animal.

En couplant la cible animale et la voie d'administration, chaque molécule a été répartie dans l'une des 5 catégories suivantes, par ordre de criticité croissant :

<p><b>Catégorie 1 : Molécules non administrées aux bovins, porcins ou volailles</b></p> <p>Dicyclanil, Mébendazole, Phénylbutazone</p>
<p><b>Catégorie 2 : Molécules administrées aux bovins et/ ou volailles (pas en cutané)</b></p> <p>Albendazole, Amprolium, Cefalexine, Céfalonium, Clorsulon, Closantel, Cloxacilline, Decoquinatate, Diclazuril, Nitroxynil, Oxyclozanide, Phénoxyméthylpénicilline</p>
<p><b>Catégorie 3 : Molécules administrées aux porcins + bovin ou volailles (pas en cutané)</b></p> <p>Altrénogest, Apramycine, Benzylpénicilline, Ceftiofur, Cloprosténol, Dihydrostreptomycine, Dinoprost, Fenbendazole, Florfénicol, Flubendazole, Gentamicine, Kétoprofène, Marbofloxacin, Méloxicam, Oxytocine, Pipérazine, PMSG, Sulfadoxine, Sulfaguanidine, Tiamuline, Triméthoprime</p>
<p><b>Catégorie 4 : Molécules administrées à la fois porcins et bovins et volailles (pas en cutané)</b></p> <p>Acide oxolinique, Amoxicilline, Ampicilline, Colistine, Dexaméthasone, Doxycycline, Enrofloxacin, Erythromycine, Fluméquine, Lincomycine, Spectinomycine, Sulfadiazine, Sulfadiméthoxine, Sulfaméthazine, Sulfaméthoxy-pyridazine, Tilmicosine, Toltrazuril, Tylosine</p>
<p><b>Catégorie 5 : Molécules administrées par voie cutanée sur les troupeaux (porcins ou bovins ou volailles)</b></p> <p>Amitraz, Cefquinome, Chlortétracycline, Deltaméthrine, Diazinon, Eprinomectine, Fenvalérate, Flunixin Ivermectine, Lévamisole, Néomycine, Oxytétracycline, Phoxim, Spiramycine, Triclabendazole</p>

**Tableau 9: Catégories établies par cibles animales et voies d'administration.**

#### 2.3.2.1.2. Niveau de prescription des molécules.

Le niveau de prescription des molécules a été considéré à une échelle régionale, pour tenir compte des spécificités des pratiques vétérinaires en Bretagne.

Pour cela, ce sont les entretiens menés auprès de vétérinaires bretons dans le cadre du projet REMEDES qui ont été utilisés. En tout, 10 vétérinaires ont participé aux enquêtes ; 5 vétérinaires spécialisés bovins lait exerçant en cliniques libérales, et 5 vétérinaires spécialisés porcins exerçant en libéral ou appartenant à des groupements. Ceux-ci ont également répondu aux questions sur les prescriptions à destination de la volaille.

Les résultats de ces enquêtes ont montré une disparité entre les usages nationaux et les pratiques des vétérinaires bretons interrogés pour la filière bovine (Soulier et al. 2015). Il est donc crucial lorsque l'on s'attache aux RMV de tenir compte des pratiques et prescriptions pour le territoire étudié.

Les entretiens avec les vétérinaires ont été réalisés en semi-quantitatif c'est-à-dire que chaque vétérinaire a alloué un niveau de prescription sur la forme de « +++ », « ++ »,

« + » ou « 0 » (Soulie et al., 2016, 2015). Les informations recueillies pour les trois espèces ont ensuite été moyennées pour obtenir un niveau de prescription global.

Le tableau 10 présente les catégories élaborées pour les niveaux de prescription, et les molécules classées dans ces catégories :

<p><b>Catégorie 1 : Très peu prescrit</b> (que des « 0 » et/ou des « + »)</p> <p>Acide oxolinique, Apramycine, Dicyclanil Flumequine, Gentamicine, Phoxim, Pipérazine, Sulfadoxine, Tiamuline</p>
<p><b>Catégorie 2 : Peu prescrit</b> (un « ++ » et un « + »)</p> <p>Albendazole, Amitraz, Cefalonium, Cefquinome, Chlortétracycline, Décoquate, Diclazuril, Kétoprofène, Spectinomycine, Sulfaguanidine, Sulfaméthazine, Tilmicosine</p>
<p><b>Catégorie 3 : Moyennement prescrit</b> (que des « ++ » OU un « +++ » et des « + »)</p> <p>Altrénogest, Ampicilline, Benzylpénicilline, Céfalexine, Ceftiofur, Cloxacilline, Deltaméthrine, Doxycycline, Eprinomectine, Fenbendazole, Florfénicol, Flubendazole, Flunixin, Ivermectine, Lincomycine, Oxibendazole, Oxytétracycline, Oxytocine, PMSG, Spiramycine</p>
<p><b>Catégorie 4 : Très prescrit</b> (Un « +++ » et un « ++ »)</p> <p>Cloprosténol, Déxaméthasone, Dihydrosteptomycine, Dinoprost, Enrofloxacin, Marbofloxacin, Meloxicam, Néomycine, Sulfadiazine, Sulfadiméthoxine, Toltrazuril, Tylosine</p>
<p><b>Catégorie 5 : RMV les plus prescrits</b> (Deux « +++ »)</p> <p>Amoxicilline, Colistine, Lévamisole, Triméthoprime</p>

**Tableau 10: Catégories établies par niveaux de prescription.**

Les données ne sont pas disponibles pour 13 molécules de la liste des 70 molécules car ces molécules n'étaient pas incluses dans la liste lors des entretiens vétérinaires. Ces molécules sont principalement des antiparasitaires (antiparasitaires : amprolium, clorsulon, closantel, diazinon, fenvalérate, mebendazole, nitroxinil, oxyclozanide, triclabendazole ; antibiotiques: erythromycine, phénoxyméthylpénicilline et sulfaméthoxy-pyridazine et anti-inflammatoire: phenylbutazone).

Des données sur les tonnages de prescription ou de vente en Bretagne ont été recherchées pour ces molécules. Il se révèle que les tonnages ne sont disponibles qu'au niveau national et uniquement pour les antibiotiques.

### 2.3.2.2. *Potentiel de mobilité du sol vers l'eau*

Les RMV vont pouvoir pénétrer dans l'environnement, en l'occurrence dans le sol, soit par voie directe via les animaux en pâturage (et l'aquaculture, bien que non considérée pour ce critère de la hiérarchisation) ou par voie indirecte via les épandages de fumiers

ou de lisiers contaminés. Il convient donc de considérer le potentiel de ces RMV à être mobilisés du milieu solide vers le milieu aquatique, que ce soit vers les eaux de surface par ruissellement ou vers les eaux souterraines par infiltration.

L'adsorption est le procédé prédominant dans la réduction de la biodisponibilité et la mobilité des RMV vers les eaux naturelles (Du and Liu, 2012; Goulas et al., 2017; Jechalke et al., 2014; Kemper, 2008; Kim et al., 2011; Wegst-Uhrich et al., 2014). L'adsorption va dépendre des propriétés physico-chimiques du RMV telles que le poids moléculaire, la solubilité, la polarité, ou la lipophilie (Jechalke et al., 2014; Jeon et al., 2014; Kemper, 2008; Kim et al., 2011; Schauss et al., 2009; Tasho and Cho, 2016; Wegst-Uhrich et al., 2014) mais également pour une grande partie de ses constantes d'acidité ( $pK_a$ ) associées aux fonctions chimiques (Kümmerer, 2009). En effet, les résidus de médicaments sont des composés ionisables et leur sorption au sol ne va pas seulement avoir lieu via des interactions hydrophobes à la matière organique. Ils subissent également des interactions hydrogènes, des échanges cationiques, des interactions électrostatiques ou des interactions de Van Der Waals (Boxall, 2010; Wegst-Uhrich et al., 2014).

Les phénomènes de sorption dépendent aussi des propriétés du sol tels que la teneur en matière organique, la force ionique, la texture, la teneur en argile, la teneur en humidité, le type et la concentration des cations divalents, la valeur du pH (Boxall, 2010; Du and Liu, 2012; Jechalke et al., 2014; Kemper, 2008; Khan et al., 2008; Kim et al., 2011; Schauss et al., 2009; Tasho and Cho, 2016; Wegst-Uhrich et al., 2014) mais aussi des conditions climatiques comme la température (Boxall, 2010; Jechalke et al., 2014; Kemper, 2008; Schauss et al., 2009; Tasho and Cho, 2016).

A partir de ces propriétés, un coefficient d'adsorption entre le sol et l'eau du sol à l'équilibre ( $K_d$ ) ou un coefficient de partage entre le carbone organique du sol et l'eau du sol ( $K_{oc}$ ) peuvent être mesurés ou estimés pour évaluer la mobilité du sol vers l'eau des RMV (Tasho et al. 2016).

Le  $K_d$  se définit comme le rapport de la concentration du composé d'intérêt dans la phase solide du sol ( $C_{sol}$ ) sur la concentration du composé d'intérêt dans la phase aqueuse du sol ( $C_{aq}$ ) à l'état d'équilibre.

$$K_d = \frac{C_{sol}}{C_{aq}}$$

Pour certains composés à tendance hydrophobes, le  $Kd$  dépend très largement de la teneur en carbone organique du sol considéré. Dans ce cas, la sorption peut être évaluée par le  $Koc$ , qui se définit comme le ratio entre le  $Kd$  et la teneur en carbone organique du sol ( $foc$ ).

$$Koc = \frac{Kd}{foc}$$

Ces deux coefficients s'expriment en litre par kilogramme (L/kg) et donne une indication sur la tendance de la molécule à être adsorbée ou désorbée du sol. Plus la valeur du  $Kd$  ou du  $Koc$  sera élevée plus la substance aura tendance à être retenue par le sol.

D'après la littérature scientifique (Tolls, 2001), l'utilisation du  $Kd$  paraît plus appropriée pour les résidus de médicaments vétérinaires, notamment les antibiotiques. En effet, comme décrit plus haut dans le paragraphe, les RMV sont des composés plutôt polaires et possèdent de nombreuses fonctions chimiques. Selon le pH du sol, les RMV subissent des réactions de protonation/déprotonation impliquant des changements de spéciation, entre forme ionisée (positivement ou négativement) et forme zwitterionique. Ainsi la sorption entre les RMV et le sol ne dépend que pour une partie de réactions hydrophobes avec la matière organique contenue dans le sol. Il conviendrait de prendre en compte les interactions polaires (liaisons hydrogènes, échange de cations etc.) qui interviennent de façon conséquente dans la sorption des RMV au sol.

Cependant, il n'a pas été trouvé d'outil permettant d'estimer les  $Kd$  de façon homogène pour toutes les molécules d'intérêt. Hors, pour comparer la mobilité des composés du sol vers l'eau, il est pertinent d'utiliser un paramètre établi via la même méthode, et disponible pour le plus grand nombre de composés possible. Cela n'a pas été possible avec le  $Kd$  car les méthodes expérimentales mises en place sont variables d'une étude à l'autre, et il n'existe pas d'outil d'estimation de  $Kd$ .

En revanche, ce type d'outil d'estimation existe pour calculer le  $Koc$ . Le logiciel EPISuite, développé par l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis (US EPA) permet de déterminer un  $Koc$  selon la structure chimique du composé, à l'aide du programme KocWin (US EPA). KocWin calcul un  $Koc$  selon deux méthodologies différentes :

- la méthode traditionnelle basée sur le log Kow (indice de lipophilie)

- la méthode de connectivité moléculaire Sabljic avec des facteurs de correction améliorés

La méthode traditionnelle utilisant le log Kow pour calculer le *Koc* a déjà largement été remise en cause dans la littérature pour les RMV. La prédiction du *Koc* via le log Kow aboutit à une sous-estimation significative du *Koc* (Kümmerer, 2009; Thiele-Bruhn, 2003; Tolls, 2001).

La méthode de connectivité moléculaire de Sabljic est une méthode de comptage des liaisons, à partir de laquelle des indices topologiques peuvent être dérivés des structures chimiques des composés. Cette méthode appartient au modèles dit QSAR, de relation quantitative structure à activité. Pour une structure moléculaire donnée, plusieurs types et ordres d'Indices de Connectivité Moléculaire (ICM) peuvent être calculés. L'information sur la taille moléculaire, la ramification, la cyclisation, l'insaturation et le contenu hétéroatomique d'une molécule est codée dans ces divers indices (Kier and Hall, 1976).

Cette méthode par indices de connectivité moléculaire permet d'excellentes corrélations pour des composés non-polaires de plusieurs classes chimiques (Sabljic, 2001; Wen et al., 2012). Cependant, il a été remarqué que les composés polaires ne répondent pas aussi bien à la méthode développée à la base pour les composés hydrophobes. Afin de pallier à cela, des facteurs de correction de polarité ont été développés par la suite et introduits dans le modèle pour obtenir un modèle de corrélation commun entre les composés apolaires et polaires.

C'est pourquoi il a été décidé d'utiliser le *Koc* pour pouvoir comparer les composés d'intérêt malgré les limites soulignées de l'utilisation de ce critère. Enfin, la méthode par indices de connectivité moléculaire de Sabljic avec facteurs de corrections améliorés a été préférée à la méthode de calcul basée sur le log de Kow.

Selon le Pesticide Data Requirements Handbook (Pesticide Safety Directorate, 2005), le *Koc* peut être interprété comme suit :

$Koc < 15$  : Très mobile

$15 < Koc < 75$  : Mobile

$75 < Koc < 500$  : Modérément Mobile

$500 < Koc < 4000$  : Peu mobile

$Koc > 4000$  : Non mobile

Ces différents groupes ont été réutilisés afin d'établir les scores pour ce critère de mobilité du sol vers l'eau.

Le potentiel de mobilité des RMV étudiés, par ordre croissant de risque, est présenté dans le tableau 11.

<p><b>Catégorie 1 :</b> Non mobile (<math>K_{oc} &gt; 4000</math>)</p> <p>Altrénogest (7557 L/kg), Amitraz (<math>2,6 \times 10^5</math> L/kg), Amprolium (7761 L/kg), Cefquinome (<math>3,3 \times 10^4</math> L/kg), Closantel (<math>1,3 \times 10^5</math> L/kg), Colistine (<math>5,4 \times 10^8</math> L/kg), Decoquinatate (<math>2,9 \times 10^5</math> L/kg), Deltaméthrine (<math>8 \times 10^4</math> L/kg), Diclazuril (<math>1,5 \times 10^4</math> L/kg), Eprinomectine (<math>2,7 \times 10^5</math> L/kg), Fenbendazole (<math>2,4 \times 10^4</math> L/kg), Fenvalérate (<math>3,2 \times 10^5</math> L/kg), Flubendazole (4801 L/kg), Ivermectine (<math>4,6 \times 10^5</math> L/kg), Oxytocine (<math>1 \times 10^{10}</math> L/kg), Oxyclozanide (8910 L/kg), Tiamuline (<math>3,6 \times 10^4</math> L/kg), Tilmicosine (<math>1,1 \times 10^4</math> L/kg), Toltrazuril (<math>1,7 \times 10^4</math> L/kg), Triclabendazole (<math>8,4 \times 10^4</math> L/kg)</p>
<p><b>Catégorie 2 :</b> Peu Mobile (<math>500 &lt; K_{oc} &lt; 4000</math>)</p> <p>Albendazole (3900 L/kg), Cloprosténol (771 L/kg), Cloxacilline (646 L/kg), Diazinon (3034 L/kg), Erythromycine (567 L/kg), Flunixin (540 L/kg), Lévamisole (3764 L/kg), Mebendazole (2992 L/kg), Oxibendazole (816 L/kg), Phenylbutazone (2274 L/kg), Phoxim (3477 L/kg), Triméthoprim (719 L/kg), Tylosine (746 L/kg)</p>
<p><b>Catégorie 3 :</b> Modérément mobile (<math>75 &lt; K_{oc} &lt; 500</math>)</p> <p>Ampicilline (84 L/kg), Amoxicilline (108 L/kg), Benzylpénicilline (82 L/kg), Cefalexine (104 L/kg), Cefalonium (128 L/kg), Ceftiofur (454 L/kg), Clorsulon (125 L/kg), Dexaméthasone (291 L/kg), Dinoprost (371 L/kg), Kétoprofène (385 L/kg), Nitroxinil (320 L/kg), Spiramycine (145 L/kg), Sulfaméthazine (191 L/kg).</p>
<p><b>Catégorie 4 :</b> Mobile (<math>15 &lt; K_{oc} &lt; 75</math>)</p> <p>Chlortétracycline (72 L/kg), Dihydrostreptomycine (17 L/kg), Doxycycline (49 L/kg), Florfénicol (58 L/kg), Flumequine (38 L/kg), Lincomycine (69 L/kg), Meloxicam (45 L/kg), Oxytétracycline (74 L/kg), Phenoxy-méthylpénicilline (31 L/kg), Pipérazine (21 L/kg), Sulfadiazine (74 L/kg), Sulfadiméthoxine (31 L/kg), Sulfadoxine (32 L/kg), Sulfaguanidine (50 L/kg), Sulfaméthoxy-pyridazine (48 L/kg).</p>
<p><b>Catégorie 5 :</b> Très mobile (<math>K_{oc} &lt; 15</math>)</p> <p>Acide oxolinique (10 L/kg), Apramycine (10 L/kg), Dicyclanil (10 L/kg), Enrofloxacin (14,93 L/kg), Gentamicine (10 L/kg), Marbofloxacin (10 L/kg), Neomycine (10 L/kg), Spectinomycine (10 L/kg)</p>

**Tableau 11 : Catégories établies en fonction du  $K_{oc}$  des composés.**

Il n'a pas été possible d'obtenir de valeur de  $K_{oc}$  par l'utilisation du KocWin pour deux molécules, la colistine (antibiotique) et l'hormone PMSG. De plus, l'utilisation du logiciel sur l'ensemble des molécules montrent les limites de celui-ci. En effet, les fluoroquinolones (enrofloxacin et marbofloxacin) sont classées comme très mobiles avec le KocWIN, alors que les données expérimentales de la littérature scientifique

s'accordent à conclure sur leur très forte sorption aux sols. Le tableau 12 présente quelques  $K_{oc}$  et  $K_d$  de la littérature pour les fluoroquinolones.

Molécule	$K_d$ (L/kg)	$K_{oc}$ (L/kg)	Référence
Enrofloxacin	260-5612	16506 - 768740	Nowara et al. 1997
	2000 - 4000	/	Teixodo et al. 2013
	544 - 251430	/	Leal et al. 2013
	3400	315000	(Sturini et al., 2012)
Marbofloxacin	2500	234000	(Sturini et al., 2012)

**Tableau 12:  $K_d$  et  $K_{oc}$  de l'enrofloxacin et la marbofloxacin reportés dans la littérature.**

### 2.3.2.3. La persistance des RMV dans le milieu aquatique

Une fois que les RMV ont pénétré le milieu aquatique, il est important de considérer leur persistance. Comme démontré dans l'état de l'art, une fois dans le milieu aquatique les RMV peuvent être sensibles à la photolyse (directe ou indirecte), l'hydrolyse ou encore la biodégradation.

Pour évaluer de manière simple et comparative la persistance dans le milieu aquatique, un outil d'estimation développé par l'US EPA (de même que pour le  $K_{oc}$ ) a été utilisé : le PBT (Persistance, Bioaccumulation et Toxicité) profiler. Le PBT profiler a été rendu disponible gratuitement au grand public sur internet en 2002. Cependant, à la date de rédaction de ce manuscrit, le logiciel n'est plus accessible en ligne pour des raisons non spécifiées.

Ce programme estime la persistance d'un produit chimique dans l'air, l'eau, le sol et les sédiments (P), son potentiel de bioaccumulation dans les écosystèmes aquatiques (B) et sa toxicité chronique pour les poissons (T). L'utilisateur saisit le numéro d'enregistrement CAS ou la formule d'un produit chimique, et le logiciel utilise des bases de données internes pour générer des estimations de la persistance, la bioaccumulation et la toxicité. Les résultats sont présentés qualitativement avec un code de couleur (vert, orange ou rouge selon le niveau de risque) et quantitativement avec des valeurs spécifiques pour P, B et T. Les résultats en orange ou rouge indiquent que les critères de l'EPA ont été dépassés. La figure 11 montre les résultats du PBT profiler pour la chlortétracycline.

<b>Results</b>					
Orange or red highlights indicate that the EPA criteria have been exceeded					
Persistence		Bioaccumulation		Toxicity	
<b>57-62-5 Chlortetracycline</b>					
PBT profiler estimate= PBT					
Media	Half-life (days)	Percent in each medium	BCF	Fish ChV (mg/L)	
Water	180	21%	3.2	3.9	
Soil	360	79%			
Sediment	1,600	0%			
Air	0.067	0%			

Figure 11: Résultats du PBT profiler pour l'antibiotique chlortétracycline.

Parmi les données produites par le PBT profiler, c'est le paramètre de demi-vie dans l'eau (DT 50) qui a été retenu ici, soit le temps nécessaire à la dégradation de 50% de la molécule dans l'eau. Ce paramètre est évalué grâce au module BIOWIN. BIOWIN estime la biodégradation aérobie et anaérobie des composés organiques à l'aide de 7 modèles différents.

Le PBT profiler proposant cinq DT 50 possibles, la classification a été faite en 5 catégories (par ordre croissant de persistance estimée dans l'eau) :

<p><b>Catégorie 1 :</b> DT 50 &lt;10 jours</p> <p>Dinoprost</p>
<p><b>Catégorie 2 :</b> 10 jours &lt;DT 50 &lt; 15 jours</p> <p>Apramycine, Cloprosténol, Dihydrostreptomycine, Kétoprofène, Lévamisole, Néomycine, Phenylbutazone, Pipérazine</p>
<p><b>Catégorie 3 :</b> 15 jours &lt; DT 50 &lt; 40 jours</p> <p>Acide oxolinique, Albendazole, Amitraz, Amoxicilline, Ampicilline, Amprolium, Benzylpénicilline, Céfalexine, Céfalonium, Ceftiofur, Décoquinatone, Diazinon, Dicyclanil, Fenbendazole, Gentamicine, Lincomycine, Mebendazole, Méloxicam, Nitroxinil, Oxibendazole, Phénoxyéthylpénicilline, Phoxim, Spectinomycine, Sulfadiazine, Sulfadiméthoxine, Sulfadoxine, Sulfaguanidine, Sulfaméthazine, Sulfaméthoxy-pyridazine</p>
<p><b>Catégorie 4 :</b> 40 jours &lt;DT 50 &lt; 60 jours</p> <p>Altrénogest, Cefquinome, Ceftiofur, Cloxacilline, Deltaméthrine, Déxaméthasone, Doxycycline, Fenvalérate, Florfénicol, Flubendazole, Fluméquine, Marbofloxacin, Oxytétracycline, Triméthoprime</p>
<p><b>Catégorie 5 :</b> 60 jours &lt;DT 50 &lt; 200 jours</p> <p>Chlortétracycline, Clorsulon, Closantel, Diclazuril, Enrofloxacin, Eprinomectine, Erythromycine, Flunixin, Ivermectine, Oxyclozanide, Spiramycine, Tiamuline, Tilmicosine, Toltrazuril, Triclabendazole, Tylosine</p>

Tableau 13: Catégories établies selon la demi-vie dans l'eau estimée par l'outil PBT profiler (US EPA).

L'outil PBT profiler ne peut pas s'appliquer pour tous les composés chimiques. Ainsi, le logiciel indique qu'il ne doit pas être utilisé pour les composés suivants : les produits chimiques inorganiques, les produits naturels comme les huiles ou les enzymes, les sels organiques, les composés dont le poids moléculaire est supérieur à 1 000 Daltons, les mélanges, les surfactants et des composés hautement fluorés; sous peine de donner de faux résultats. Dans notre cadre, le PBT profiler est un outil estimatif, donc à considérer avec précaution, mais il permet de comparer la très grande majorité des molécules étudiées (exceptée la colistine, de poids moléculaire trop élevé ou des hormones comme l'oxytocine et la Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG)).

De même que pour le *Koc*, c'est le manque d'informations disponibles dans la littérature et procédant d'une méthodologie expérimentale homogène qui a entraîné le choix de l'utilisation d'un logiciel d'estimation, permettant d'effectuer une comparaison entre les composés. Des données expérimentales comparables entre elles auraient été préférées si elles avaient existées. Enfin, l'outil BIOWIN se focalise sur des modèles de biodégradation, et ne prend donc pas en compte les autres voies de dégradations possibles des RMV que (photolyse et hydrolyse).

#### *2.3.2.4. Classement final des composés vétérinaires*

Pour l'établissement du classement final, les composés se sont vu attribuer un score pour chaque critère (cible + voie d'administration; niveau de prescription en Bretagne ; mobilité potentielle; persistance dans l'eau), sur le modèle suivant : Catégorie 1 = 1 point ; Catégorie 2 = 2 points etc. Un point supplémentaire a été attribué aux composés utilisés en aquaculture. Les scores obtenus sur chacun des paramètres ont ensuite été additionnés entre eux pour obtenir un score final.

Le tableau 14 présente les différents groupes de criticité pour les composés pour lesquels les informations pour chacun des critères ont pu être obtenues.

Groupes de criticité	RMV inclus dans le groupe
Criticité 1 (Score 18)	Enrofloxacin
Criticité 2 (Score 17)	Oxytétracycline
Criticité 3 (Score 16)	Chlortétracycline, Marbofloxacin, Néomycine, Spiramycine, Sulfadiazine
Criticité 4 (Score 15)	Amoxicilline, Dexaméthasone, Doxycycline, Florfénicol, Flunixin, Sulfadiméthoxine, Triméthoprime, Tylosine
Criticité 5 (Score 14)	Acide oxolinique, Eprinomectine, Flumequine, Ivermectine, Lévamisol, Lincomycine, Méloxicam, Spectinomycine, Toltrazuril
Criticité 6 (Score : 13)	Ampicilline, Ceftiofur, Deltaméthrine, Dihydrostreptomycine
Criticité 7 (Score : 12)	Benzylpénicilline, Cefquinome, Gentamicine, Sulfaguanidine, Sulfaméthazine, Tilmicosine
Criticité 8 (Score 11)	Altrénogest, Amitraz, Apramycine, Céfalexine, Cloprosténol, Cloxacilline, Dinoprost, Flubendazole, Phoxim, Oxibendazole, Sulfadoxine
Criticité 9 (Score 10)	Cefalonium, Diclazuril, Dicyclanil, Fenbendazole, Kétoprofène, Pipérazine, Tiamuline
Criticité 10 (Score 9)	Albendazole
Criticité 11 (Score 8)	Decoquinat

Tableau 14: Scores finaux du travail de hiérarchisation (4 critères).

L'application de cette méthodologie a permis de classer 54 molécules.

Les scores obtenus pour les RMV pour lesquels 3 critères ont pu être déterminés sont présentés dans le tableau 15.

Criticité 1 (Score 11)	Erythromycine, Sulfaméthoxy-pyridazine, Triclabendazole
Criticité 2 (Score 10)	Clorsulon, Diazinon, Fenvalérate
Criticité 3 (Score 9)	Phénoxy-méthyl-pénicilline
Criticité 4 (Score 8)	Nitroxinil, Closantel, Oxy-clozanide
Criticité 5 (Score 7)	Oxytocine
Criticité 6 (Score 6)	Amprolium, Mebendazole
Criticité 7 (Score 5)	Phénylbutazone

Tableau 15: Scores finaux des molécules à trois critères.

Les scores de 2 critères ont pu être établis pour l'antibiotique colistine et l'hormone PMSG. La colistine obtient un score de 9 et la PMSG un score de 6.

Les molécules sélectionnées pour la suite de l'étude sont celles possédant un score global supérieur à 11. Pour les molécules à 3 paramètres, elles sont incluses si elles possèdent un score supérieur à 9, et pour les molécules à deux critères manquants,

elles sont incluses si elles ont un score supérieur à 8. Ces choix ont été faits pour inclure environ 40 molécules dans un souci de faisabilité analytique.

#### 2.3.2.5. Métabolisme des RMV retenus

Une fois les RMV d'intérêt sélectionnés, le métabolisme des molécules dans l'animal a été étudié pour chaque composé, afin de définir sous quelle forme il est plus pertinent de rechercher les composés (molécules mères et/ou métabolites).

Les médicaments vétérinaires administrés à l'animal par voie orale ou par voie parentérale subissent un métabolisme au niveau hépatique, afin d'être transformés en métabolites plus hydrophiles et éliminés plus facilement de l'organisme via l'urine. Il a été jugé important dans ce travail de considérer le ou les métabolites produits lorsque la molécule mère est métabolisée, voir la molécule mère et ses métabolites dans le cas d'un métabolisme incomplet.

Pour cela, les fiches Résumé des Caractéristiques du Produit disponibles sur le site de l'ANSES ont de nouveau été mises à profit. Cependant, il est notable que parfois bien qu'il soit indiqué qu'une métabolisation a lieu, il n'y a pas toujours d'indication sur les métabolites produits et sur la proportion à laquelle ils sont produits.

Le tableau 16 présente les métabolites répertoriés dans les fiches RCP.

Molécule mère	Métabolites
Ceftiofur	Desfuroylceftiofur
Spiramycine	Néospiramycine
Enrofloxacin	Ciprofloxacine
Florfenicol	Florfenicol amine
Triclabendazole	Triclabendazole sulfoxyde Triclabendazole sulfone
Toltrazuril	Toltrazuril sulfoxyde Toltrazuril sulfone

**Tableau 16: Métabolites répertoriés dans les fiches Résumés des Caractéristiques du Produit des RMV.**

Pour le cas de l'enrofloxacin, seule la molécule mère sera conservée car la ciprofloxacine est une molécule utilisée en médecine humaine.

Les métabolites acétylés des sulfonamides ne sont pas reportés dans le tableau car ils sont instables. La littérature scientifique démontre qu'une fois excrétées dans l'environnement, les formes acétylés sont clivées et reprennent la forme de molécules mères (Kemper, 2008; Sarmah et al., 2006).

La liste finale des molécules sélectionnées est présentée dans le tableau 17 ci-dessous.  
Les métabolites sont également indiqués dans la liste, en **gras et souligné**.

Classe thérapeutique	Famille chimique	Molécules sélectionnées	Classe thérapeutique	Molécules sélectionnées	
Antibiotiques (26)	Aminoglycosides	Dihydrostreptomycine	Antiparasitaires (13)	Amitraz	
		Néomycine		Clorsulon	
	Cephalosporines	Desfuroylceftiofur		Deltaméthrine	
	Diaminopyrimidines	Triméthoprime		Diazinon	
	Fluoroquinolones	Enrofloxacin		Dicyclanil	
		Marbofloxacin		Eprinomectine	
	Lincosamides	Lincomycine		Fenvalérate	
	Macrolides	Erythromycine		Flubendazole	
		Spiramycine		Ivermectine	
		<b><u>Néospiramycine</u></b>		Lévamisole	
		Tilmicosine		Triclabendazole	
		Tylosine		<b><u>Triclabendazole sulfone</u></b>	
	Pénicillines	Amoxicilline		<b><u>Triclabendazole sulfoxide</u></b>	Anticoccidiens (3)
		Ampicilline	<b><u>Toltrazuril sulfone</u></b>		
		Benzylpénicilline	<b><u>Toltrazuril sulfoxide</u></b>		
	Phénicolés	Florfenicol	Anti-inflammatoires (4)	Déxaméthasone	
		<b><u>Florfenicol amine</u></b>		Flunixin	
	Polypeptides	Colistine		Kétoprofène	
	Quinolones	Acide oxolinique		Méloxicom	
		Flumequine			
		Sulfadiazine			
	Sulfonamides	Sulfadiméthoxine			
		Sulfaméthazine			
		Tétracyclines	Chlortétracycline		
	Doxycycline				
	Oxytétracycline				

**Tableau 17: Liste finale des RMV sélectionnés pour le travail de thèse.**

Certaines différences entre la liste exposée ci-dessous et le classement du tableau 16 sont notables. Trois d'entre elles, résultent malheureusement d'erreurs lors de calculs de scores initiaux, suite au changement du paramètre étudié pour le critère mobilité du sol vers l'eau (initialement basé sur des résultats expérimentaux puis modifié au profit du *Koc* estimé afin de comparer les molécules entre elles). Ainsi, la sulfaguanidine, la gentamicine et la spectinomycine auraient dû être intégrées au développement sur la

base de leur score (cf tableau 16). Ces molécules pourront être ajoutées ultérieurement à la méthode d'analyse si possible.

Ensuite, 4 molécules non retenues de par leurs scores ont été étudiées pour plusieurs raisons. L'amitraz, le dicyclanil et le flubendazole ont été étudiés d'une part car leurs standards analytiques étaient disponibles au laboratoire, et afin de discuter la méthodologie appliquée (i.e. est-ce que ces composés non sélectionnés via la méthodologie appliquée vont être quantifiés quand même ou pas). Enfin, le kétoprofène était déjà analysé dans la méthode existante au laboratoire.

En tout 46 molécules sont ainsi sélectionnées pour le développement analytique, molécules mères et métabolites confondus.

## **2.4. Méthodes d'analyses de RMV**

Plusieurs étapes sont nécessaires à l'analyse des résidus vétérinaires dans les échantillons d'eau :

- 1 : La préparation des échantillons et l'extraction des composés d'intérêt présents dans ces échantillons.
- 2 : La séparation chromatographique de ces composés.
- 3 : La détection et la quantification de ces composés.

### **2.4.1. Recherche bibliographique sur l'analyse des RMV**

Le tableau 18 résume les techniques utilisées dans le cadre de méthodes multi-résidus dédiées à l'analyse des RMV dans les eaux naturelles (eaux de surface et eaux souterraines) dans la littérature scientifique entre 2007 et 2017, ainsi que les composés analysés.

RMV analysés	Extraction	Séparation	Détection	Référence
8 anticoccidiens	Extraction sur phase solide (SPE)	Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)	Martínez-Villalba et al., 2009
8 antiparasitaires (ionophores, avermectines)	SPE	HPLC	MS/MS	Thompson et al., 2009
13 antibiotiques (SAs, FQs, TCs, chloramphénicol)	SPE	HPLC	MS/MS	Tong et al., 2009
10 antibiotiques (SAs, TCs, cyromazine)	SPE	HPLC	MS/MS	Wei et al., 2011
21 RMV: antibiotiques, antifongiques, corticostéroïdes, anticoccidiens	SPE	HPLC	MS/MS	Iglesias et al., 2012
26 antibiotiques (MLs, pleuromutilines, TCs, lincosamides, QLs, SAs)	Lyophilisation et reconstitution des échantillons	HPLC	MS/MS	Hu et al., 2014
7 antihelminthiques	SPE	HPLC	MS/MS	Krogh et al., 2008
19 antibiotiques (SAs, QLs, TCs, MLs, Triméthoprime)	SPE	HPLC	MS/MS	Tong et al., 2014
12 antibiotiques (SAs, FQs, TCs)	SPE	HPLC	MS/MS	Zhang et al., 2014
10 antihelminthiques	SPE	HPLC	MS/MS	Zrnčić et al., 2014
35 antibiotiques (SAs, QLs, TCs, MLs, lincomycine, chloramphénicol)	SPE	Chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC)	MS/MS	Xue et al., 2015
25 antibiotiques (TCs, SAs, QLs, MLs)	SPE	HPLC	MS/MS	Yao et al., 2017, 2015
92 antibiotiques	SPE	HPLC	MS/MS	Gao et al., 2016

**Tableau 18 : Méthodes d'analyse multi-résidus des RMV dans les eaux naturelles.**

A notre connaissance, il n'existe pas à ce jour dans la littérature scientifique de méthode consacrée à l'analyse des RMV dans l'eau du robinet. C'est pourquoi le tableau 19 décrit quelques méthodes multi-résidus dans l'eau du robinet incluant à la fois des résidus de médicaments à usage humain et à usage vétérinaire.

RMV analysés	Extraction	Séparation	Détection	Référence
24 antibiotiques : SAs, FQs, TCs, MLs, Triméthoprime	SPE	HPLC	MS/MS	Ye et al., 2007
81 résidus de médicaments à usage humain et/ou vétérinaire	SPE	HPLC	MS/MS	Gros et al., 2012
25 résidus de médicaments à usage humain et 4 résidus de médicaments à usage vétérinaire	SPE	UHPLC	MS/MS	Cimetiere et al., 2013
33 résidus de médicaments à usage humain et/ou vétérinaire	SPE	HPLC	MS/MS	Paíga et al., 2017

**Tableau 19 : Exemples de méthodes d'analyse multi-résidus de médicaments humains et vétérinaires dans les eaux du robinet.**

Les tableaux 18 et 19 mettent en évidence une homogénéité dans le choix des techniques d'analyse des RMV dans les matrices aqueuses.

L'extraction est une étape cruciale qui vise à isoler et à concentrer les résidus d'intérêt, et à éliminer les espèces interférentes qui peuvent avoir un impact sur la quantification en provoquant une exaltation ou une suppression du signal des ions, également appelés effets de matrice (Tong et al., 2009; Zrnčić et al., 2014). Comme montré dans les tableaux 18 et 19, la méthode d'extraction la plus utilisée sur les matrices aqueuses est l'extraction sur phase solide (SPE).

Les méthodes de séparation et de détection répertoriées dans la littérature scientifique mettent en avant la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

En effet, la plupart des résidus médicamenteux étant polaires et peu volatiles, ils sont peu à même d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse (Zhou et al., 2012). Différents types de chromatographies en phase liquide sont répertoriées : l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) et l'UHPLC (Ultra-high Performance Liquid Chromatography).

D'autres méthodes de détection que la spectrométrie de masse ont également pu être utilisées par le passé, comme par exemple la détection par ultraviolet (UV) (Blackwell et al., 2004; Sun et al., 2009) ou par fluorescence (Prat et al., 2004; Raich-Montiu et al., 2007). La spectrométrie de masse les a depuis largement remplacées. La spectrométrie de masse en tandem ou triple quadripolaire est aujourd'hui préférée à la spectrométrie de masse simple car elle induit une détection plus spécifique grâce à la fragmentation des ions précurseurs en ions produits dans le deuxième quadripôle. De plus, elle permet

d'augmenter le rapport signal sur bruit, tout en diminuant les interférences (Le Bizec et al., 2009).

Les paragraphes suivants détaillent plus avant chacune des étapes de l'analyse des RMV (préparation de l'échantillon et extraction, séparation, détection) sur la base de la littérature scientifique.

#### *2.4.1.1. Pré-traitement de l'échantillon et extraction des RMV*

Les tableaux 20 et 21 présentent les différentes préparations d'échantillons appliquées dans le cadre de l'analyse multi-résidus des RMV, ainsi que les différents paramètres optimisés en SPE pour les eaux naturelles et les eaux traitées, respectivement.

Volume de l'échantillon	Filtration de l'échantillon	Additif éventuel	pH de l'échantillon	Caractéristiques de la cartouche	Conditionnement	Lavage/séchage	Elution	Référence
200 mL	Information non fournie	/	0,1% d'acide formique	C <sub>18</sub> (3 cc, 60 mg, Varian)	MeOH (3 mL), EUP (3 mL)	Lavage : EUP (5 mL) Séchage : Non	MeOH acidifié (5 mL)	Martínez-Villalba et al., 2009
250 mL (eau de surface) 500 mL (eau souterraine)	0,45 µm	EDTA	4	Oasis HLB (60 mg, 3 mL, Waters)	Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE) (3 mL), methanol (MeOH) (3 mL), eau ultrapure (EUP) (3 mL) pH 4	Lavage : 5% MeOH-EUP (3 mL) Séchage : 30 min	1:9 (v/v) MeOH/MTBE (2x3 mL)	Tong et al., 2009
200 mL	0,65 µm	EDTA	7	Oasis HLB (500 mg, 6 mL, Waters)	MeOH (6 mL), EUP (6 mL), solution de Na <sub>2</sub> EDTA à pH 7 (6 mL)	Lavage : EUP (10 mL) Séchage : Non	MeOH (8 mL)	Wei et al., 2011
500 mL	0,47 µm	/	3	Strata X (60 mg, 3 mL, Phenomenex)	MeOH (4 mL), EUP (4 mL)	Lavage : Non Séchage : 30 min	MeOH (2x4 mL)	Iglesias et al., 2012
100 mL	Information non fournie	/	7	Oasis HLB (200 mg, 6 mL, Waters)	n-heptane (6 mL), acétone (2 mL), MeOH (6 mL) et EUP pH 7 (6 mL)	Lavage : MeOH (5 mL) Séchage : Non	MeOH (2x2 mL), acétone (2x2 mL)	Krogh et al., 2008
1 L (eau de surface) 2 L (eau souterraine)	0,45 µm	EDTA	4	Oasis HLB (200 mg, Waters)	MeOH (5 mL), EUP pH 4 (5 mL)	Lavage : 5% MeOH-EUP (3 mL) Séchage : 30 min	MeOH (6 mL)	Tong et al., 2014
2 L (eau de surface)	0,45 µm	EDTA	3	Oasis HLB (500 mg, 6 mL Waters)	?	?	MeOH + 0,1% d'acide formique (10 mL)	Zhang et al., 2014
100 mL	0,45 µm	/	7	Oasis HLB (60 mg, 3 mL, Waters)	MeOH (5 mL), EUP (5 mL)	Lavage : EUP (3 mL) Séchage : Non	MeOH (3 mL)	Zrnčić et al., 2014
1 L	Information non fournie	/	4,5 - 5	Oasis HLB (500 mg, 6 mL, Waters)	MeOH (6 mL), solution de Na <sub>2</sub> EDTA à 0,1 g/L (6 mL)	Lavage : EUP (10 mL) Séchage : 30 min	Solution aqueuse ammoniacale / méthanol (5/95, v/v) (6 mL)	Xue et al., 2015
500 mL (eau de surface) 1 L (eau souterraine)	0,45 µm	EDTA	4	Oasis HLB (200 mg, 6 mL, Waters)	MeOH (6 mL), EUP (6 mL)	Lavage : EUP (6 mL) Séchage : 10 min	MeOH (12 mL)	Yao et al., 2017, 2015
500 mL	0,45 µm	/	5	Strata X (200 mg, 6 mL, Phenomenex)	?	?	acétone (5 mL), acétone/EUP (90:10, v/v)	Burke et al., 2016
100 mL	0,45 µm	/	8	Oasis HLB (60 mg, 3 mL, Waters)	MeOH (3 mL), EUP (3 mL)	Lavage : solution à 0,1% d'acide chlorhydrique (4 mL), MeOH (4 mL) Séchage : 15 min	MeOH/EUP (90:10, v/v) (6 mL)	Gao et al., 2016

Tableau 20 : Préparation des échantillons et méthodes d'extraction des RMV dans les eaux naturelles.

Volume de l'échantillon	Filtration de l'échantillon	Additif éventuel	pH de l'échantillon	Caractéristiques de la cartouche	Conditionnement	Lavage/séchage	Elution	Référence
500 mL	Pas de filtration	Acide ascorbique (25 mg/L)	3	Oasis HLB (200 mg, 3 mL, Waters)	MeOH (6 mL), MeOH +0,1% d'acide formique; (5 mL), EUP (2x6 mL)	Lavage : EUP (2x6 mL) Pas de séchage	MeOH acidifié (2x4 mL)	Ye et al., 2007
200 mL	0,45 µm	EDTA	Non ajusté	Oasis HLB (60 mg, 3 mL, Waters)	MeOH (5 mL), EUP (5 mL)	Lavage : EUP (6 mL) Séchage : 5 min	MeOH (6 mL)	Gros et al., 2012
200 mL	0,45 µm	/	2 ou neutre	Oasis HLB (6 cc, 150 mL, Waters)	MeOH (5 mL), EUP (5 mL)	Lavage : EUP pH 2 (5 mL) Pas de séchage	MeOH (4 mL)	Cimetiere et al., 2013
250 mL	0,22 µm	EDTA	2	Strata-X (200 mg, 3 mL, Phenomenex)	MeOH (5 mL), EUP (5 mL), EUP pH 2 (5 mL)	Lavage : EUP (5 mL) Séchage : 60 min	MeOH (10 mL)	Paiga et al., 2017

**Tableau 21 : Préparation des échantillons et méthodes d'extraction de résidus pharmaceutiques dans les eaux du robinet.**

#### 2.4.1.1.1. Pré-traitement des échantillons

L'étape de pré-traitement des échantillons est très importante car elle peut impacter le résultat final et est souvent en fonction de l'objectif de la mesure. Cette étape inclut la stabilisation, le conditionnement, les conditions de conservation, la filtration.

Pour la stabilisation des RMV, différents agents peuvent être ajoutés dans les échantillons, avec des objectifs spécifiques. De l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) est parfois ajouté aux échantillons d'eaux naturelles comme d'eaux traitées. L'EDTA constitue un agent chélatant, empêchant certains antibiotiques comme les tétracyclines de se lier aux ions métalliques (par exemple  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) présents dans l'échantillon ou à la surface de la verrerie (Mompelat et al., 2013). Dans Tong et al. (2009), l'EDTA a permis d'améliorer les taux de recouvrement de 20% pour les tétracyclines et de 10% pour les autres analytes. Dans l'étude de Hu et al. (Hu et al., 2014), c'est de l'acide citrique qui a été ajouté pour éliminer les éléments métalliques en présence. Pour l'analyse de l'eau potable, Ye et al. (Ye et al., 2007) a ajouté de l'acide ascorbique dans l'échantillon comme agent de neutralisation du chlore, afin d'éviter la dégradation des composés d'intérêt et la formation de sous-produits de dégradation chlorés.

Dans un objectif de mesurer l'exposition humaine aux RMV par ingestion d'eau du robinet, uniquement la phase dissoute sera considéré. Les échantillons d'eau de surface et d'eau souterraine sont filtrés. Les filtres utilisés dans la littérature pour éliminer les particules en suspension dans les eaux naturelles possèdent des tailles de pores comprises entre 0,45  $\mu\text{m}$  (Gao et al., 2016; Hu et al., 2014; Iglesias et al., 2012; Martínez-Villalba et al., 2009; Ok et al., 2011; Tong et al., 2009; Xue et al., 2015; Zhang et al., 2014; Zrnčić et al., 2014) et 0,65  $\mu\text{m}$  (Wei et al., 2011). Concernant les eaux traitées, les pratiques sont plus variables. Les échantillons d'eau potable sont filtrés à 0,45  $\mu\text{m}$  (Cimetiere et al., 2013; Gros et al., 2012) ; 0,22  $\mu\text{m}$  (Paíga et al., 2017), voir non filtrés avant analyse (Ye et al., 2007).

#### 2.4.1.1.2. Traitement de l'échantillon

Le traitement de l'échantillon correspond à l'extraction des RMV de l'eau, parmi les techniques utilisées l'extraction sur phase solide (SPE) est le plus souvent mis en œuvre pour extraire les molécules les plus polaires ou amphotères.

La SPE utilise un principe proche de la chromatographie pour extraire par absorption/ou adsorption un ou plusieurs composés à partir d'un échantillon liquide

(eau, urine) sur une phase stationnaire (adsorbant ou absorbant). C'est d'ailleurs une étape préliminaire à la chromatographie ayant aussi pour but d'éliminer les composés interférents ou de changer la matrice contenant l'échantillon (i.e. transférer les RMV de l'eau vers un solvant). Enfin, la SPE permet de concentrer l'échantillon, ce qui est essentiel pour l'analyse d'éléments présents à de faibles concentrations de l'ordre du nanogramme par litre.

Elle présente plusieurs avantages par rapport à l'extraction liquide-liquide. En effet la SPE permet à la fois l'extraction des composés polaires et des composés apolaires, ce qui n'est pas le cas avec une extraction liquide-liquide (Kinsella et al., 2009). De plus, elle consomme peu de solvant et constitue une méthode rapide et automatisable qui aboutit à l'obtention d'éluats très purs. Enfin, la méthode peut être optimisée en modifiant la phase stationnaire ou les conditions d'extraction.

Comme on peut le voir sur la figure 12, la SPE se réalise en quatre étapes :

- ❖ Le conditionnement de la cartouche ;
- ❖ La percolation de l'échantillon à travers la cartouche ;
- ❖ Le lavage et le séchage de la cartouche ;
- ❖ L'élution des composés d'intérêt.

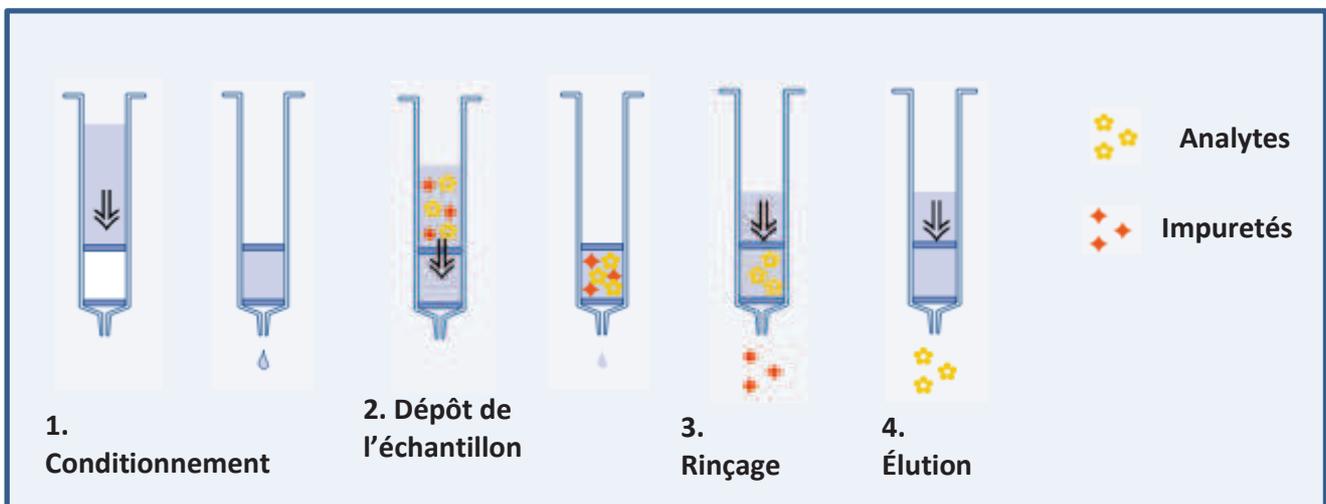


Figure 12 : Étapes de la SPE (source: Catalogue en ligne de Macherey-Nagel).

Dans un premier temps, le conditionnement de l'adsorbant. Cette étape est nécessaire afin d'assurer des interactions reproductibles avec l'analyte et d'activer le support en éliminant les contaminants qui pourraient s'y trouver. Elle consiste à imprégner l'adsorbant d'un ou plusieurs solvants passés au travers de la cartouche.

Ensuite, le dépôt de l'échantillon est réalisé par pression ou aspiration au travers de la phase solide (on parle de cartouche). Les composés d'intérêt doivent être retenus prioritairement, tandis que les impuretés le sont peu ou pas. La vitesse d'écoulement de l'échantillon est contrôlée et il est possible de percoler des échantillons allant de quelques mL jusqu'au litre selon la quantité de phase solide utilisée.

Dans un troisième temps, la cartouche peut être rincée par un solvant ayant une forte affinité avec les impuretés retenues par la cartouche et une faible affinité pour les analytes d'intérêt. Cette étape n'est pas toujours réalisée, surtout lorsqu'il est question d'analyse multi-résidus avec des mélanges de molécules polaires et apolaires. Après cette étape, le support d'estaction est généralement séché pour éliminer toute trace de solvant de lavage et améliorer le rendement d'extraction. Enfin, l'élution doit être réalisée avec un solvant adéquat pour les composés d'intérêt avec un débit pas trop rapide. Le volume de ce solvant doit être faible pour obtenir une pré-concentration importante.

Plusieurs paramètres peuvent être optimisés lors de l'étape de la SPE : (1) le pH des échantillons, (2) le choix de l'adsorbant et (3) le choix des solvants de conditionnement, de rinçage et d'élution.

Le pH des échantillons est un paramètre crucial qui influe sur la rétention et l'élution des analytes ciblés en fonction de la nature de la cartouche. La plupart des RMV ont un caractère amphotère, et pourront être présents sous différentes formes (cationique, neutre ou anionique) dans l'échantillon d'eau (pH environ de 7). Selon les méthodes indiquées dans le tableau 20, le pH acide entre 2 et 5 est généralement utilisé pour l'extraction des antibiotiques (Iglesias et al., 2012; Tong et al., 2014, 2009; Xue et al., 2015; Yao et al., 2017, 2015), et un pH plus neutre (autour de 7) pour les antiparasitaires (Krogh et al., 2008; Thompson et al., 2009; Zrnčić et al., 2014).

La cartouche doit être choisie avec soin en fonction des analytes ciblés. Pour l'analyse multi-résidus des RMV, les sorbants avec un copolymère de DiVinylBenzène lipophile et de N-vinylpyrrolidone hydrophile sont largement utilisés, comme l'Oasis HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) de Waters et la Strata X de Phenomenex.

L'élution se fait le plus souvent avec des solvants polaires. Le méthanol est le solvant de choix, utilisé seul (Cimetiere et al., 2013; Gros et al., 2012; Iglesias et al., 2012; Paíga et al., 2017, p. 201; Tong et al., 2014; Wei et al., 2011; Ye et al., 2007; Zrnčić et al., 2014) ou en mélange par exemple avec du méthyl-tert-butyléther (Tong et al., 2009), de

l'acétone (Krogh et al., 2008) ou avec des solutions aqueuses (Gao et al., 2016; Xue et al., 2015).

#### *2.4.1.2. Séparation des RMV par chromatographie en phase liquide haute performance*

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange en phase liquide ou gazeuse. Le principe repose sur les équilibres de partage des composés entre deux phases non miscibles, une phase dite mobile et une phase dite stationnaire constituée ici d'une colonne. La séparation est effectuée selon l'affinité des composés pour l'une ou l'autre de ces deux phases. Les composés sont transportés par la phase mobile jusqu'à la phase stationnaire qui va les retenir plus ou moins longtemps selon leur affinité pour celle-ci. On parle de rétention. En chromatographie liquide, cette séparation s'effectue sous pression, ce qui justifie son appellation de chromatographie haute performance, ou haute pression (HPLC) ou de chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC). Les colonnes UHPLC utilisent des particules de diamètres inférieurs à 2  $\mu\text{m}$ , tandis que les phases stationnaires HPLC utilisent généralement des particules d'un diamètre d'environ 3-5  $\mu\text{m}$ . Le diamètre réduit en UHPLC permet de travailler à un débit élevé, ce qui diminue le temps d'analyse tout en conservant une efficacité de séparation similaire et permet même d'améliorer la résolution. Ainsi, les équipements UHPLC sont conçus pour supporter des pressions plus élevées dues à des débits plus élevés (Gros et al., 2012; Guillaume et al., 2010; Steene and Lambert, 2008). Différents paramètres peuvent être optimisés afin d'obtenir une séparation optimale des composés, c'est-à-dire la meilleure sélectivité et résolution possible.

Il convient de choisir une phase stationnaire (colonne chromatographique) adéquate pour les composés d'intérêt, ainsi qu'une phase mobile adaptée à la phase stationnaire et aux composés.

Le tableau 22 détaille les différents paramètres sélectionnés dans les méthodes d'analyse des RMV de la littérature scientifique.

Phase stationnaire	Phase mobile	Volume d'injection Débit	Référence
Pursuit C <sub>18</sub> (15 mm x 2 mm, 3 µm) + pré-colonne Pursuit C <sub>18</sub> (300 mm x 2 mm, 3 µm)	EUP acidifiée à 0,1% d'acide formique + ACN	Volume d'injection : 20 µL Débit : 0,2 mL/min	Ye et al., 2007
Thermo Hypersil Gold C <sub>18</sub> (50 mm x 2,1 mm, 1,9 µm) Température : 50°C	EUP acidifiée à 0,1% d'acide formique + acétonitrile (ACN) acidifié à 0,1% d'acide formique	Volume d'injection : 5 µL Débit : 0,5 mL/min	Martínez-Villalba et al., 2009
Dionex Acclaim C <sub>18</sub> (150 mm x 2,1 mm, 4,6 µm) Température : 35°C	EUP acidifiée à 0,1% d'acide formique ou non acidifiée + ACN	Volume d'injection : 10 µL Débit : 0,2 mL/min	Tong et al., 2009
Zorbax RX-C <sub>8</sub> (2,1 x 150 mm, 5 µm) + une pré-colonne (Zorbax 300SB-C <sub>8</sub> , 2,1 x 12,5 mm, 5 µm) Température : 30°C	EUP acidifiée à 0,1% d'acide formique + ACN acidifié à 0,1% d'acide formique	Volume d'injection : Non connu Débit : 0,3 mL/min	Wei et al., 2011
Synergi Polar-RP 100A (50 x 2 mm, 2,5 µm) et une pré-colonne Polar-RP (4 x 2 mm)	EUP acidifiée à 0,1% d'acide formique + ACN acidifié à 0,1% d'acide formique	Volume d'injection : 10 µL Débit : 0,15 mL/min	Iglesias et al., 2012
Acquity C <sub>18</sub> BEH (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) Température : 45°C	EUP acidifiée à 0,1% d'acide formique ou non + ACN acidifié à 0,1% d'acide formique ou non	Volume d'injection : 5 µL Débit : 0,4 mL/min	Cimetiere et al., 2013
Zorbax Eclipse XDB-C <sub>8</sub> (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Solution tampon ammonium à 10 mM ajustée à pH 4 avec de l'acide formique + ACN	Volume d'injection : 50 µL Débit : 0,8 mL/min	Krogh et al., 2008
Colonne C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm; Akzo Nobel)	EUP acidifiée à 0,1% d'acide formique + MeOH	Non connu	Zhang et al., 2014
Waters Acquity UPLC BEH, C <sub>18</sub> (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) Température : 35°C	Solution tampon d'ammonium à 10 mM + ACN	Volume d'injection : 5 µL Débit : 0,2 mL/min	Zrnčić et al., 2014
Acquity UPLC BEH-C <sub>18</sub> (50 mm x 2,1 mm, 5 µm) + une pré-colonne (12,5 mm x 2,1 mm, 5 µm) Température : 40 °C.	EUP acidifiée à 0,1% d'acide formique + mélange MeOH/ACN (1:1 v/v) acidifié à 0,1% d'acide formique	Volume d'injection : 1 µL Débit : 0,2 mL/min	Xue et al., 2015
Extend-C <sub>18</sub> (2,1 mm x 100 mm, 1,8 µm) Température : 40 °C.	EUP acidifiée à 0,1% d'acide formique et à 5 mM d'acétate d'ammonium + ACN	Volume d'injection : 5 µL Débit : 0,25 mL/min	Yao et al., 2017, 2015
Kinetex C <sub>18</sub> (150 x 2,1 mm, 2,6 µm) Température : 40°C	EUP acidifiée à 0,1% d'acide formique + mélange ACN/MeOH (2:1 v/v)	Volume d'injection : 10 ou 20 µL Débit : 0,25 mL/min	Burke et al., 2016
Thermo Hypersil Gold C <sub>18</sub> (150 mm x 2,1 mm, 5 µm) Température : 35°C	EUP acidifiée à 0,1% d'acide formique + ACN	Volume d'injection : 10 µL Débit : 0,2 mL/min	Gao et al., 2016

**Tableau 22 : Conditions chromatographiques de l'analyse des RMV dans la littérature scientifique.**

D'après le tableau 22, les phases stationnaires les plus couramment utilisées sont les colonnes dites en phase inverse, et plus spécifiquement phase inverse greffées par des chaînes linéaires d'atomes de carbone C<sub>18</sub> (Gao et al., 2016; Martínez-Villalba et al., 2009; Thompson et al., 2009; Tong et al., 2009; Xue et al., 2015; Zrnčić et al., 2014). Les colonnes en phase inverse sont apolaires et vont retenir plus longtemps les composés apolaires que les composés polaires. Les composés les plus polaires seront donc les premiers élués.

L'utilisation d'une colonne en phase inverse apolaire implique l'utilisation d'une phase mobile polaire tel que c'est le cas dans le tableau 22, où les phases mobiles sont généralement composées d'un mélange d'eau ultra pure et d'acétonitrile parfois acidifié à 0,1% d'acide formique (Gao et al., 2016; Hu et al., 2014; Iglesias et al., 2012; Martínez-Villalba et al., 2009; Tong et al., 2009). Cet ajout d'un faible pourcentage d'acide formique (0,01%-0,3%) dans la phase mobile peut améliorer la résolution des pics et la stabilité des temps de rétention (Norme XP T90-223, Afnor, 2013). Les débits identifiés pour l'analyse multi-résidus des RMV varient de 0,15 mL/min (Iglesias et al., 2012) à 0,8 mL/min (Krogh et al., 2008).

#### *2.4.1.3. Détection par spectrométrie de masse en tandem*

La spectrométrie de masse est une méthode de détection régulièrement utilisée en sortie de chromatographie pour identifier et quantifier de façon spécifique les résidus séparés au préalable. Cette méthode est basée sur le rapport masse sur nombre de charges ( $m/z$ ) de molécules individuelles ionisées et de leurs produits de fragmentation.

Pour déterminer ce rapport, plusieurs étapes doivent avoir lieu dans le spectromètre de masse. Ces étapes sont retranscrites par la figure 13.

Tout d'abord, les molécules doivent être ionisées. Ce phénomène se déroule au sein de la source d'ionisation. Les ions sont ensuite accélérés et focalisés vers l'analyseur par le biais de lentilles ioniques. C'est dans l'analyseur que les ions vont ensuite être séparés en fonction de leur rapport  $m/z$ . Il doit régner un vide suffisant dans l'appareil pour que les ions ne soient pas déviés ou détruits par collision.

Dans le cadre de la spectrométrie de masse en tandem, deux analyseurs sont couplés l'un à l'autre. Une fois séparés, les ions vont être détectés et le signal obtenu sera amplifié et enregistré.

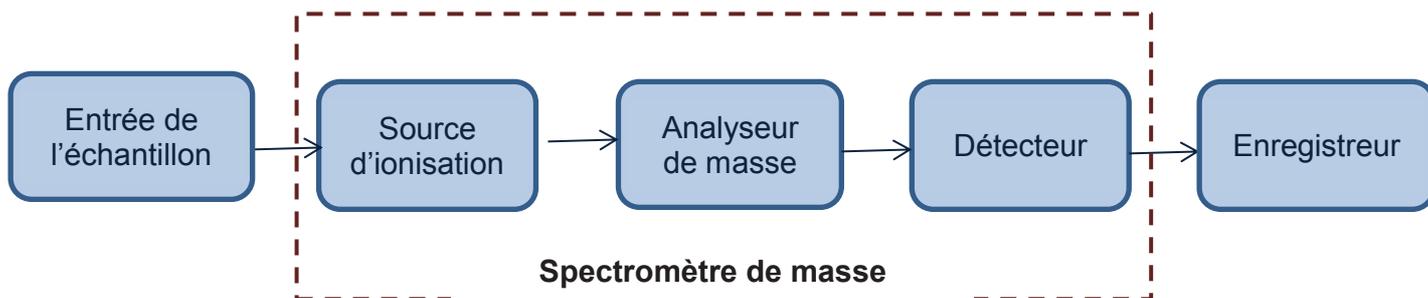


Figure 13 : Principe général du fonctionnement d'un spectromètre de masse.

#### 2.4.1.3.1. L'ionisation:

En HPLC-MS, Les sources d'ionisations sont dites « douces » car utilisées à pression atmosphérique et génèrent des ions moléculaires à nombre pair d'électrons, qui seront suffisamment stables pour arriver jusqu'à l'analyseur.

Dans le cadre de l'analyse des RMV, des systèmes d'ionisation douce de type électrospray (ESI) sont utilisés.

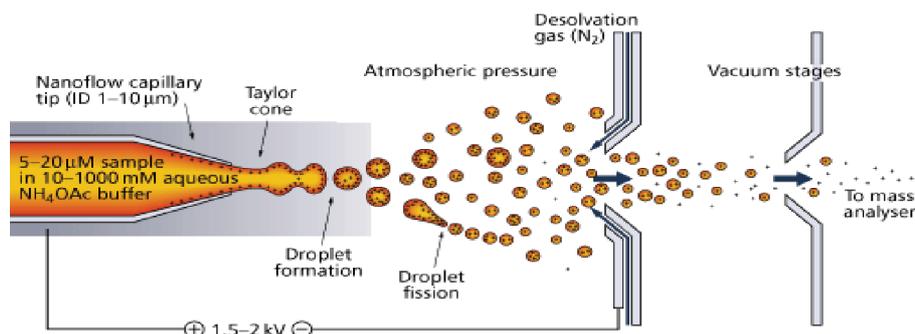


Figure 14 : Principe de l'électrospray (source : *ThermoFisher.com*).

L'ionisation par électrospray (figure 14) consiste en la formation de gouttelettes chargées sous l'effet d'un champ électrique. En effet, l'échantillon arrive dans la source d'ionisation grâce à un capillaire porté à haut potentiel électrique. Sous l'action du champ électrique et d'un courant gazeux co-axial, la solution forme un cône dynamique en sortie du capillaire, appelé cône de Taylor. Ce cône s'allonge pour former un filament liquide jusqu'à finir par se disperser en gouttelettes chargées de petit diamètre. Sous l'effet d'un second courant d'air chauffé, le solvant contenu dans les gouttelettes va s'évaporer progressivement jusqu'à ce que les gouttelettes deviennent instables du fait d'une tension superficielle inférieure à la répulsion électrostatique. Les gouttelettes éclatent par explosion coulombienne pour former une multitude de microgouttelettes. Ce phénomène se répète jusqu'à l'obtention de microgouttelettes ne contenant plus qu'une

seule charge. Durant ce parcours, les gouttelettes vont également entrer en collision avec des molécules de gaz ou de solvant, ce qui va compléter leur désolvatation.

Ce type d'ionisation peut conduire à la formation d'ions monochargés de type  $[M+H]$  en mode positif ou  $[M-H]$  en mode négatif, mais également à la formation d'ions multichargés  $[M+nH]^{n+}$  ou  $[M-nH]^{n-}$ . Des adduits peuvent parfois être formés avec des impuretés comme par exemple des ions sodium  $Na^+$ .

#### 2.4.1.3.2. L'analyseur de masse

L'analyse des RMV (voir Tableau 18) s'effectue par la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), avec un triple quadripôle (QqQ-MS) dans la majorité des cas (Gao et al., 2016; Krogh et al., 2008, 2008; Thompson et al., 2009; Tong et al., 2009, 2014; Wei et al., 2011; Xue et al., 2015; Yao et al., 2015, 2017; Zhang et al., 2014) ou avec un piège à ions (IT-MSn) (Martínez-Villalba et al., 2009; Tong et al., 2009). D'autres analyseurs de masse innovants apparaissent dans la littérature comme le temps de vol (TOF) ou les analyseurs de masse Orbitrap, conduisant parfois à des technologies hybrides comme le quadripôle - temps de vol (Q-tof), le piège à ions - Orbitrap ou le quadripôle – piège à ion QqLIT (Gros et al., 2012; Iglesias et al., 2012; Zrnčić et al., 2014). Ces instruments modernes fournissent les masses exactes des analytes et des informations sur les masses de fragments qui peuvent être utilisées pour identifier la structure des composés (Martínez-Villalba et al., 2009).

Nous détaillons ci-dessous le principe de l'analyseur triple quadripolaire utilisé dans la méthode d'analyse développée pour ce travail de thèse.

La dénomination de triple quadripôle s'explique par le fait qu'il s'agit de trois analyseurs dont deux de type quadripôle (Q1 et Q3) reliés entre eux par un analyseur type hexapôle utilisé comme cellule de collision (Q2) comme le montre la figure 15. Le premier quadripôle Q1 permet de sélectionner un ou plusieurs ions précurseurs issus de la source d'ionisation. La cellule de collision Q2 va être le lieu de la fragmentation des ions précurseurs en ions produits par le biais de collisions avec un gaz, en l'occurrence d'azote. Ce processus s'effectue en deux étapes, la première étant la collision entre l'ion cible et le gaz qui amène une partie de l'énergie cinétique de l'ion à se transformer en énergie interne et conduisant l'ion à un état d'excitation. La deuxième étape consiste en une décomposition unimoléculaire de l'ion. Les ions produits seront sélectionnés et analysés par le troisième quadripôle Q3.

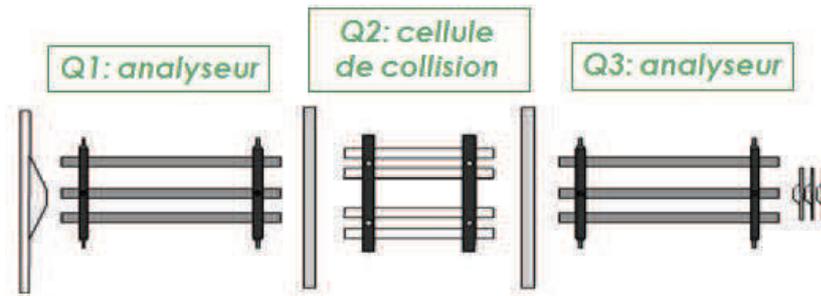


Figure 15 : Représentation du triple quadripôle.

Il existe plusieurs modes d'acquisition avec un triple quadripôle :

- ✓ Le mode Full scan (figure 16) : tout l'intervalle possible  $m/z$  est balayé, et les analyseurs laissent passer toutes les masses. Ce mode équivaut à de la spectrométrie de masse simple.

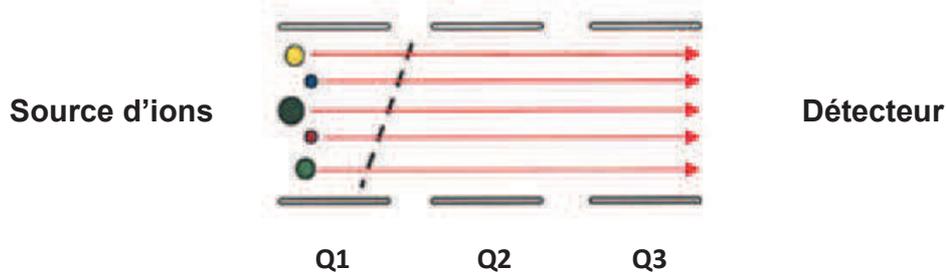


Figure 16 : Mode Full Scan.

- ✓ Le mode SIM (Single Ion Monitoring, figure 17) : L'un des quadripôles, par exemple Q1, sera fixé sur un ou plusieurs rapports  $m/z$  précis. La cellule de collision et le troisième quadripôle seront éteints et laisseront passer tous les ions. Un chromatogramme correspondant à la ou les masses choisies est ainsi enregistré.

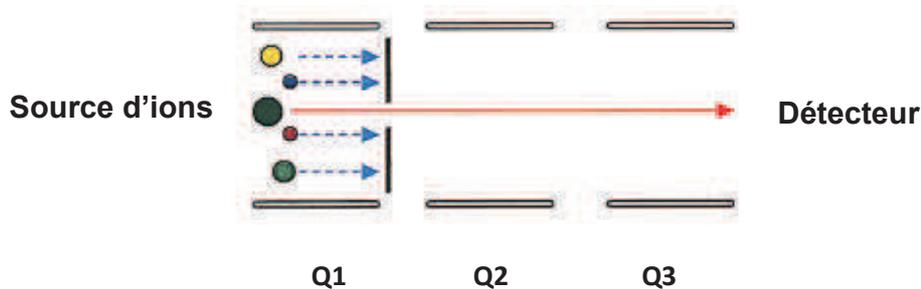


Figure 17 : Mode SIM.

- ✓ Le mode balayage des ions de fragmentation (Product Ion Scan, figure 18) : Q1 sélectionne un ou plusieurs ions précurseurs, qui seront par la suite fragmentés dans la cellule de collision Q2. Q3 va balayer tous les ions produits obtenus.

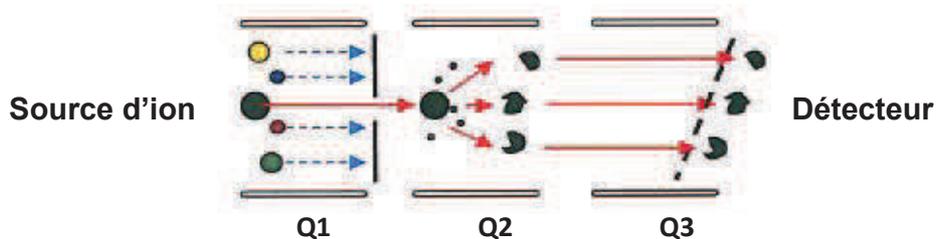


Figure 18 : Mode Product Ion Scan.

- ✓ Le mode balayage des ions précurseurs (Precursor Ion Scan, figure 19) : Ce mode permet de rechercher les ions précurseurs capables d'aboutir à un ion produit donné. Q1 balaye tous les ions précurseurs tandis que Q3 est fixé sur une masse précise.

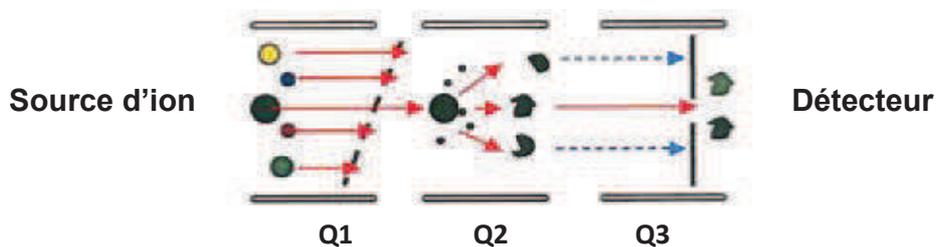


Figure 19 : Mode Precursor Ion Scan.

- ✓ Le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring, figure 20) : Ce mode permet le suivi de transitions particulières entre les ions précurseurs et leurs produits de fragmentation. Q1 et Q3 sélectionnent chacun un ion bien précis. C'est ce mode qui est généralement utilisé lors de l'analyse multi-résidus quantitative de micropolluants.

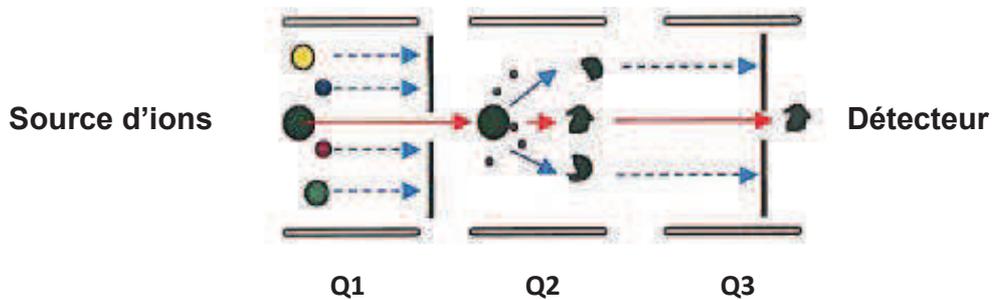


Figure 20 : Mode Multiple Reaction Monitoring.

## 2.4.2. Développement de la méthode d'analyse multi-résidus des RMV

La méthode d'analyse multi-résidus des RMV dans les eaux naturelles et les eaux traitées a été développée d'une part sur la base de la recherche bibliographique et d'autre part sur la base des systèmes d'analyse disponibles au LERES.

### 2.4.2.1. Pré-traitement des échantillons

L'ajout de l'agent chélatant EDTA n'a pas été appliqué dans le cadre de cette méthode d'analyse, car son impact avait été testé lors de précédents travaux au laboratoire sur les RMV, dont des tétracyclines, et les résultats obtenus concluaient à des recouvrements semblables avec ou sans EDTA (Levêque, 2011).

L'ajout d'acide ascorbique pour bloquer l'action d'oxydants présents dans l'eau du robinet (tel que le chlore) a lui été évaluée selon le protocole suivant :

Un échantillon d'eau traitée sans acide ascorbique a été comparé au même échantillon auquel ont été ajoutés 40 µL d'une solution d'acide ascorbique à 20 g/L. Ces deux volumes d'eau traitée ont ensuite été dopés à 250 ng/L avec une solution mélange des RMV à 0,5 mg/L. Les taux de recouvrement ont ensuite été comparés entre l'échantillon sans acide ascorbique et l'échantillon avec acide ascorbique selon le calcul suivant :

$$R = \left( \frac{C}{C_{acide}} \right) * 100$$

$R$  = Taux de recouvrement en l'absence d'acide ascorbique

$C$  = concentration dans l'échantillon sans acide ascorbique

$C_{acide}$  = concentration dans l'échantillon avec ajout d'acide ascorbique

Cette expérience a permis d'établir quels sont les RMV impactés par le chlore (Tableau 23), et ceux qui ne le sont pas.

L'acide ascorbique est également ajouté dans la verrerie des échantillons d'eaux brutes dans un souci d'homogénéité des conditions de la méthode d'analyse quel que soit l'échantillon.

<b>Composé</b>	<b>Taux de recouvrement sans acide ascorbique dans l'eau traitée</b>
Amoxicilline	0%
Dicyclanil	107%
Cefquinome	100%
Lincomycine	0%
Ampicilline	0%
Lévamisole	99%
Sulfadiazine	0%
Triméthoprime	0%
Marbofloxacin	94%
Oxytétracycline	0%
Sulfaméthazine	0%
Enrofloxacin	98%
Spiramycine	0%
Néospiramycine	0%
Chlortétracycline	0%
Florfenicol	101%
Doxycycline	0%
Tilmicosine	0%
Acide oxolinique	103%
Clorsulon	85%
Sulfadiméthoxine	0%
Erythromycine	75%
Tylosine	0%
Carbamazépine	0%
Dexaméthasone	100%
Fluméquine	134%
Flubendazole	98%
Kétoprofène	99%
Toltrazuril sulfoxide	97%
Méloxicam	0%
Flunixin	101%
Triclabendazole sulfoxide	181%
Toltrazuril sulfone	96%
Diclofénac	0%
Triclabendazole sulfone	125%
Toltrazuril	105%
Triclabendazole	48%
Diazinon	79%
Eprinomectine	0%
Ivermectine	0%

**Tableau 23: Taux de recouvrement des RMV en l'absence d'acide ascorbique.**

Dix-neuf RMV sont dégradés par le résiduel de chlore contenus dans l'eau du robinet. La présence ou l'absence de ces composés dans les ET va dépendre de leur cinétique de dégradation et de la quantité d'oxydants en présence. Des expériences de réactivité de ces composés, par exemple vis-à-vis du procédé de chloration, pourraient être réalisées à l'avenir pour affiner les connaissances sur leur cinétique de dégradation à cette étape du traitement, et aussi pour déterminer les sous-produits de dégradation formés.

Les échantillons d'eaux brutes sont filtrés à 0,7 µm, dans un souci d'homogénéité suivant les préconisations de la norme XP T90-223 relative à l'analyse de résidus médicamenteux dans la fraction dissoute des eaux par SPE suivi de LC-MS/MS publiée en février 2013 (Norme XP T90-223, Afnor, 2013).

#### 2.4.2.2. *Optimisation de l'étape d'extraction*

L'objectif de cette étape, qui constitue aussi le principal challenge en multi-résidus, est d'obtenir des rendements d'extraction acceptables pour l'ensemble des substances étudiées. Cela passe par le choix du support d'extraction et l'optimisation du protocole d'extraction. Différents tests ont été réalisés pour déterminer les meilleures conditions d'extraction, sur des matrices d'eau d'Évian® dopés à 250 ng/L avec une solution mélange. Les extractions sont réalisées sur un appareil ASPEC GX-274 de chez Gilson. Les principaux paramètres à prendre en compte sont :

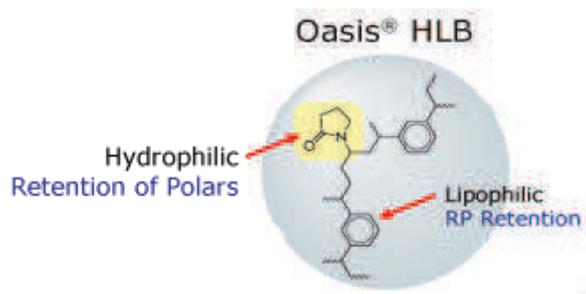
- Les cartouches d'extraction ;
- Le pH ;
- Les solvants d'élution et de rinçage ;
- Les débits d'air et d'écoulement de l'échantillon.

Actuellement, un très grand nombre de cartouches d'extraction sont disponibles sur le marché. Les supports d'extraction utilisent des interactions très diversifiées (polaires, apolaires, échanges d'ions) et peuvent avoir pour but d'être spécifiques à un composé ou à un type de composés ou au contraire de couvrir une vaste gamme de composés. C'est l'objectif recherché dans le cadre des résidus vétérinaires du fait de grandes différences de structures entre les molécules et donc leurs propriétés physico-chimiques. Les deux cartouches répertoriées dans la littérature scientifique ont été testées dans le cadre du développement analytique :

- Cartouches Oasis HLB (Waters)

Les cartouches Oasis HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) possèdent un support hydrophile-lipophile en phase inverse utilisable pour l'extraction de composés variés.

Elles sont stables à tout pH (0-14). Comme le montre la figure 21, la cartouche est composée d'un support en phase inverse utilisant un co-polymère. La partie hydrophile du support permet la rétention des composés polaires, il s'agit de la N-vinylpyrrolidone. La partie lipophile permet la rétention des composés peu ou non polaires : le divinylbenzène.



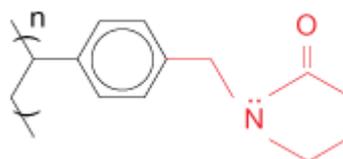
**Figure 21 : Support des cartouches Oasis HLB (source: [www.waters.com](http://www.waters.com)).**

Caractéristiques des cartouches testées :

- ❖ Quantité de support : 200 mg ;
- ❖ Volume : 6 mL ;
- ❖ Diamètre des particules : 30  $\mu\text{m}$  ;
- ❖ Diamètre des pores : 80 Å ;
- ❖ Surface spécifique : 810  $\text{m}^2/\text{g}$ .

- Cartouches Strata X (Phenomenex)

Ces cartouches sont destinées à retenir aussi bien les composés acides que neutres ou basiques. Elles possèdent le même type de co-polymère que les cartouches Oasis HLB permettant des interactions par trois mécanismes : des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogène (interaction dipôle-dipôle) et des liaisons  $\pi$ - $\pi$ . La figure 22 présente le polymère support de la cartouche Strata X.



**Figure 22 : Support des cartouches Strata X (source : [www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com)).**

Caractéristiques des cartouches utilisées :

- ❖ Quantité de support : 200 mg ;
- ❖ Volume : 6 mL ;
- ❖ Diamètre des particules : 33 µm ;
- ❖ Diamètre des pores : 85 Å ;
- ❖ Surface spécifique : 800 m<sup>2</sup>/g.

Ce sont les cartouches Strata X qui ont été retenues pour la méthode finale. Les performances en termes de rendement d'extraction étaient comparables entre les deux cartouches, cependant les cartouches Strata X ont présenté une plus grande reproductibilité des rendements d'extraction que les cartouches Oasis HLB lors des essais réalisés. Divers pH et solvants d'élution ont également pu être testés lors du développement de l'étape d'extraction. Des pH acides et neutres ont été testés (2, 3 et 6) et pour l'élution des mélanges d'ACN et de MeOH en proportions différentes : ACN/MeOH 90:10 ; ACN/MeOH 95:5 ; ACN/MeOH 90:10 ; ACN/MeOH 80:20 ; ACN/MeOH 50:50.

Les conditions opératoires retenues pour l'étape d'extraction sont les suivantes :

Conditionnement des cartouches :

- 6 mL d'un mélange 90% CH<sub>3</sub>CN - 10% MeOH à 5 mL/min + 2 mL d'air à 6 mL/min
- 6 mL d'EUP acidifiée (pH 2) à 6 mL/min + 2 mL d'air à 6 mL/min

Dépôt de l'échantillon :

- 200 mL d'échantillon à 10 mL/min + 5 mL d'air à 6 mL/min

Lavage :

- 10 mL d'EUP non acidifiée à 6 mL/min + 1 mL d'air à 6 mL/min

Séchage des cartouches :

- séchage par un gaz extérieur (azote) pendant 15 minutes

Elution des cartouches :

- 4 x 2,5 mL d'un mélange 90% CH<sub>3</sub>CN - 10% MeOH à 2 mL/min + 4 mL d'air à 2 mL/min

Une fois l'extraction réalisée, l'éluat obtenu est évaporé à la goutte au bain-marie à 30°C sous jet d'azote et repris dans 0,5 mL de la phase mobile initiale utilisée lors de la séparation chromatographique. Le choix de la température du bain-marie, et de l'évaporation à la goutte plutôt que de l'évaporation à sec est basé sur les travaux de

thèse de Sophie Mompelat (Mompelat, 2011) sur les résidus pharmaceutiques à usage humain dans les EDCH.

Le traceur d'injection pentabromophénol est ajouté à l'extrait (25 µL d'une solution de pentabromophénol à 10 mg/L) afin de vérifier le bon déroulement de l'étape d'analyse instrumentale (LC-MS/MS).

#### 2.4.2.3. Optimisation de la séparation chromatographique

La séparation chromatographique doit être optimisée afin d'obtenir les pics les plus fins et les plus symétriques possibles, et afin de limiter les co-élutions et ainsi les éventuelles interférences. Le système utilisé est un système chromatographique 1200 Series de chez Agilent Technologies. Il s'agit d'un système de chromatographie liquide à résolution rapide (RRLC) permettant de travailler à des pressions allant jusqu'à 600 bars.

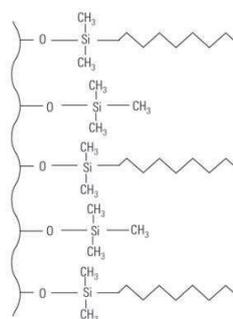
Lors de l'étape de séparation, plusieurs paramètres peuvent être optimisés :

- La nature de la colonne et sa température
- La phase mobile et son débit
- Le gradient d'élution

Concernant le choix de la phase stationnaire, différentes colonnes en phase inverse C<sub>18</sub> ont été testées lors du développement:

- Colonne ZORBAX Eclipse plus C<sub>18</sub> (Agilent)

Cette colonne a été conçue pour la séparation de composés acides, basiques et hautement polaires sur une phase inverse. Ainsi, elle est constituée d'une phase de silice greffée C<sub>18</sub> à haute densité, ou affublée d'une double post-silanisation (endcapping). Cette technique de l'endcapping consiste à fixer des petits groupements sur les silanols libres, pour augmenter la stabilité de la phase stationnaire en évitant les interactions de ces silanols avec les analytes très polaires. La figure 23 présente ces groupements.



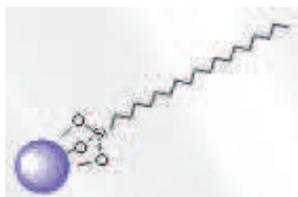
**Figure 23 : Phase stationnaire Zorbax Eclipse plus avec double post-silanisation (source : [www.agilent.com](http://www.agilent.com)).**

La colonne Zorbax Eclipse plus C<sub>18</sub> testée est d'une longueur de 100 mm pour un diamètre interne de 2,1 mm. Les particules qui la composent ont un diamètre de 1,8 µm et la taille des pores de la colonne est de 95 Å. Cette colonne est conçue pour travailler sur une vaste gamme de pH pouvant aller de 2 à 9, et peut être utilisée jusqu'à une température de 60°C.

- Colonne XBridge BEH (Waters)

La colonne XBridge BEH est constituée tout comme la Zorbax d'une phase stationnaire de silice greffée par des groupements C<sub>18</sub> trifonctionnalisés. Elle possède un diamètre de 2,1 mm pour une longueur de 100 mm. Les particules de silice ont un diamètre de 2,5 µm et les pores de la colonne ont une taille de 130 Å. Ces particules sont créés suivant la technologie BEH « Bridge Ethylene Hybrid » dans laquelle deux monomères sont utilisés pour la synthèse de celles-ci : le tétraéthoxysilane et le bis(triéthoxysilyl)éthane.

La colonne XBridge peut être utilisée sur une très vaste gamme de pH de phase mobile : entre 1 et 12, et à des températures allant jusqu'à 80°C. La figure 24 représente la phase stationnaire de la colonne XBridge BEH.



**Figure 24 : Phase stationnaire XBridge BEH avec tri-fonctionnalisation**  
(source : [www.waters.com](http://www.waters.com)).

- Colonne Xselect HSST3 (Waters)

Cette colonne se compose également d'une phase stationnaire en C<sub>18</sub> trifonctionnalisée. Elle est basée sur la technologie HSS (High Strength Silica) soit des particules constituées à 100% de silice de haute résistance permettant de travailler en UHPLC, et avec des composés polaires. Elle possède un diamètre de 2,1 mm pour une longueur de 100 mm, avec des particules d'un diamètre de 2,5 µm. Sa surface est chargée à 11% en chaînes C<sub>18</sub> et la taille des pores est de 100 Å. Elle peut être utilisée sur une gamme de pH étendue (de 2 à 8) mais ne peut être exploitée à une température supérieure à 45°C. Suite à l'injection de solutions mélange des RMV d'intérêt dans le système chromatographique, la colonne Xselect HSST3 a été retenue car offrant un meilleur

pouvoir séparatif pour les molécules les plus polaires sortant en début de chromatogramme.

Pour ce qui est de la phase mobile, c'est l'utilisation d'EUP et d'ACN tous deux acidifiés à 0,01% d'acide formique (pour optimiser l'ionisation) qui a été retenue sur la base de la littérature et des conditions en place au laboratoire sur le système d'analyse LC-MS/MS utilisé. Différents gradients d'éluion ont été testés, avec des pourcentages de départ inclus entre 85:15 EUP/ACN et 95:5 EUP/ACN.

Les conditions opératoires retenues après ces différents essais sont les suivantes :

Volume d'injection : 10 µL

- Séparation :
  - Colonne X Select HSST3 C<sub>18</sub> (Waters) (dimensions : 2,1 x 100 mm ; taille des particules : 2,5 µm)
  - Température du four : 40°C
  - Phase mobile :

Voie A : eau ultra pure + 0,01 % acide formique

Voie B : acétonitrile + 0,01 % acide formique

Débit : 0,4 mL/min

Gradient linéaire :

Temps (min)	Voie A (%)	Voie B (%)
0	87	13
1	87	13
10	13	87
15	13	87
17	87	13

**Tableau 24 : Gradient d'éluion retenu pour la séparation chromatographique méthode multi-résidus.**

- Durée de l'acquisition : 17 min

Le tableau récapitulatif 26 indique les temps de rétention de chacun des composés avec cette méthode de séparation.

Une fois les transitions et les temps de rétention identifiés, le chromatogramme est découpé en plusieurs fenêtres dans lesquelles sont réparties les transitions en fonction de leur temps de rétention. Chaque fenêtre est caractérisée par un « dwell-time » (temps d'acquisition par transition). Ce dernier paramètre est important car il a un impact sur le nombre de points de mesure par pic. En effet, plus le système passe de temps sur une transition, plus le nombre de points par pic est faible. Or, il faut au minimum 10 points de mesure pour bien définir un pic. Le nombre de points par pic est également lié à la

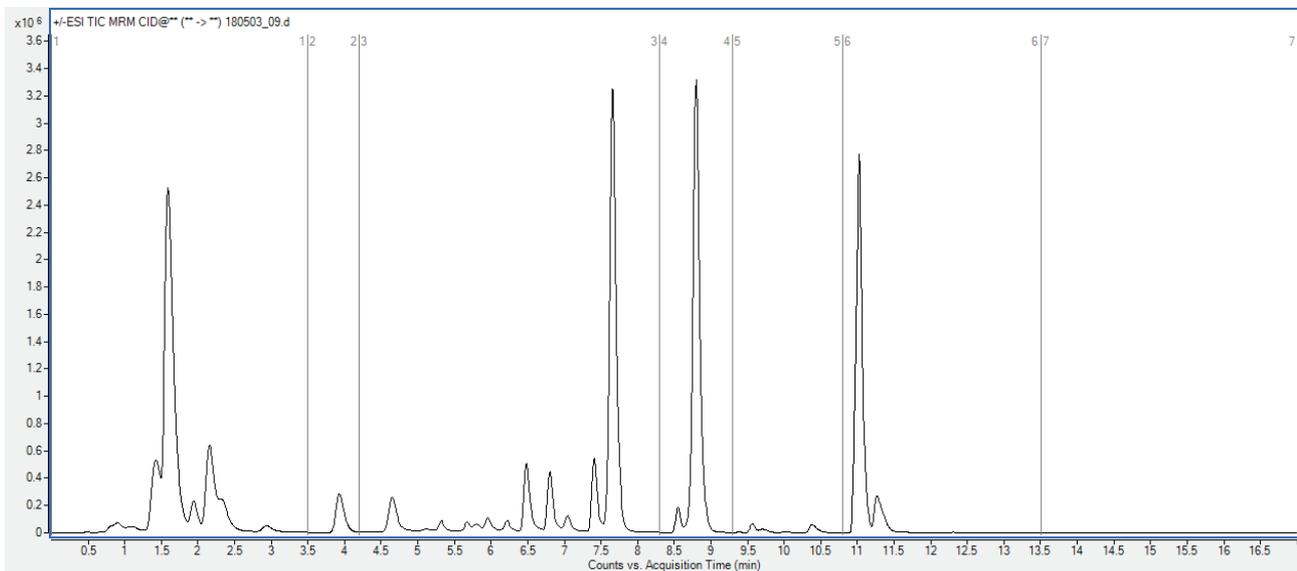
largeur du pic (plus les pics sont larges plus le nombre de points est important) et au nombre de transitions dans la fenêtre (plus il y a de transitions, plus le nombre de points par pic est faible). Il s'agit donc de trouver un compromis entre « dwell-time », nombre de transitions et largeurs des pics.

Le chromatogramme a ainsi été découpé en sept fenêtres d'acquisition :

Fenêtres d'acquisition	Composés	Dwell-time
0 – 3,5 minutes	Amoxicilline, dicyclanil, cefquinome, lincomycine, ampicilline, lévamisole, sulfadiazine, triméthoprime, marbofloxacin, oxytétracycline	10 ms
3,5 – 4,2 minutes	Sulfaméthazine	50 ms
4,2 – 8,3 minutes	Enrofloxacin, spiramycine, néospiramycine, chlortétracycline, florfenicol, doxycycline, tilmicosine, acide oxolinique, clorsulon, sulfadiméthoxine, érythromycine, tylosine, dexaméthasone, fluméquine, flubendazole	10 ms
8,3 – 9,15 minutes	Flunixin, méloxicam, kétoprofène, toltrazuril sulfoxyde	30 ms
9,15 – 10,8 minutes	Triclabendazole sulfoxyde, toltrazuril sulfone, diclofénac, triclabendazole sulfone, toltrazuril, triclabendazole	20 ms
10,8 – 13,5 minutes	Diazinon, éprinomectine	30 ms
13,5 – 17 minutes	Ivermectine	70 ms

**Tableau 25 : Fenêtres d'acquisition du chromatogramme et "dwell-time" associés.**

Le chromatogramme obtenu avec une solution mélange dopée à 500 ng/L est présenté en figure 25.



**Figure 25 : chromatogramme de la méthode d'analyse des RMV (solution mélange à 500 ng/L).**

#### 2.4.2.4. Optimisation de la détection

La détection et la quantification des RMV sont effectuées par un spectromètre de masse en tandem 6460 TripleQuad de chez Agilent, équipé avec une source d'ionisation électrospray JetStream.

##### 2.4.2.4.1. Paramètres de la source d'ionisation

Le « gas flow » (azote est réglé à une température de 200°C et à un débit de 5 mL/min. Le « sheath gas » est également l'azote, réglé à une température de 380°C et un débit de 11 mL/min. La tension du capillaire est de 4000 V en mode positif et en mode négatif, et le « nozzle voltage » est fixé à 500 V. Le nébuliseur est réglé à 45 psi.

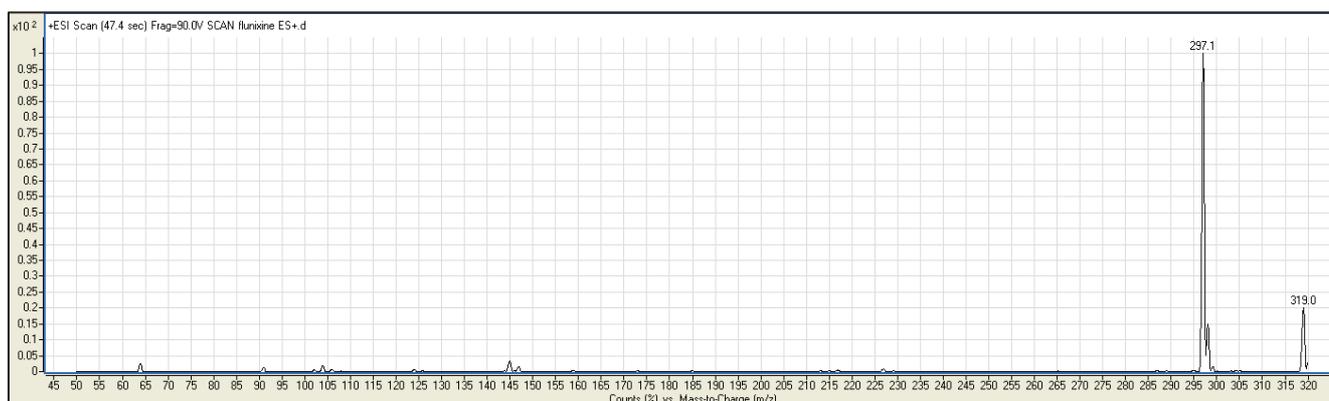
##### 2.4.2.4.2. Sélection des transitions

L'optimisation de la détection par spectrométrie de masse en tandem consiste en la détermination des transitions les plus spécifiques et les plus sensibles pour chaque substance investiguée et la détermination de l'énergie de collision optimale pour chaque transition. Ce processus se déroule en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les ions précurseurs sont déterminés, à la fois en mode d'ionisation positif et en mode d'ionisation négatif. Dans un deuxième temps, la tension de cône est optimisée. Ensuite, les ions produits sont identifiés et pour finir les énergies de collision sont choisies pour aboutir à la sensibilité la plus élevée pour chaque transition déterminée. Au moins deux transitions par substances sont retenues et testées par la suite sur des échantillons réels.

En pratique, des solutions à 1 mg/L ont été préparées pour chacun des composés, dans un mélange adapté constitué de 90% d'ACN et 10% d'EUP, acidifié par de l'acide formique (0,01%). Ces solutions ont été injectées dans le système LC-MS/MS pour être éluées par une phase mobile de la même composition. Ce choix de phase mobile est justifié car elle permet d'éluier rapidement les composés, et de pouvoir déterminer leurs paramètres de fragmentation en un temps réduit. La méthode utilisée pour déterminer ces composés est la FIA (Flow Injection Analysis).

Cette méthode est une méthode manuelle se déroulant en plusieurs étapes, et qui se réalise à la fois en mode positif et en mode négatif. Afin d'expliquer le déroulement de la FIA, l'exemple de la flunixin (anti-inflammatoire) est utilisé dans les paragraphes suivants.

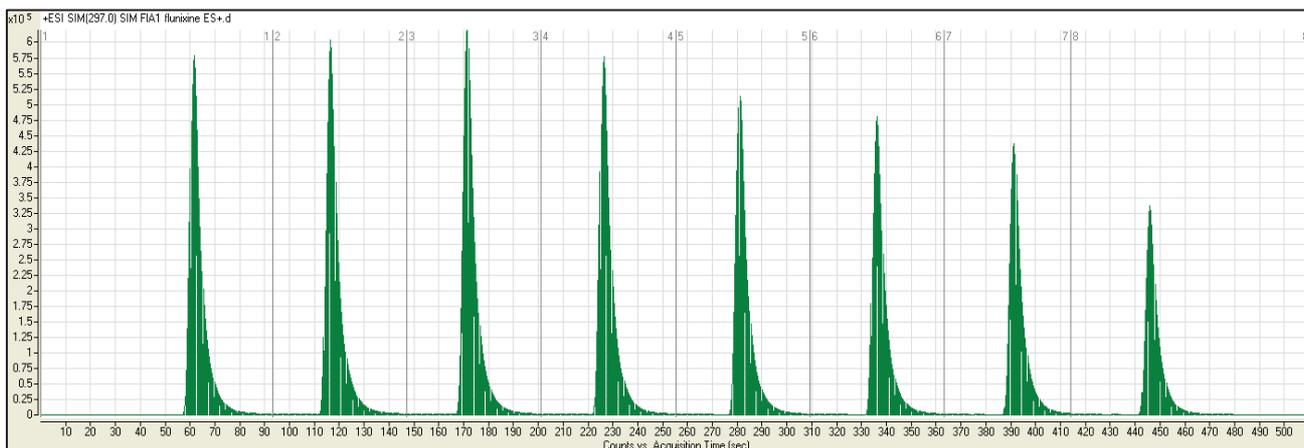
Tout d'abord, il faut déterminer quels peuvent être les différents ions précurseurs issus de la molécule. En effet, il n'y a pas qu'un ion précurseur possible, du fait de la formation possible d'adduits, par exemple  $[M+Na]^+$  en mode positif, et ensuite car les molécules peuvent subir des cassures spontanées lors de leur passage dans l'appareil. Pour avoir une vue d'ensemble de toutes ces possibilités, un SCAN est réalisé.



**Figure 26 : SCAN de la flunixin en mode positif.**

Dans la figure 26, on observe deux ions précurseurs possibles, le majoritaire à 297 correspondant à  $[M+H]^+$  et le minoritaire à 319 correspondant à un adduit  $[M+Na]^+$ . L'ion  $[M+H]^+$  est préféré aux autres ions adduits.

Une fois que les ions précurseurs possibles sont sélectionnés, on détermine avec la FIA1 la tension de cône produisant un signal optimal de l'ion précurseur. Pour cela, l'appareil est en mode SIM et le composé est injecté plusieurs fois dans le système, à différentes valeurs de tension de cône.

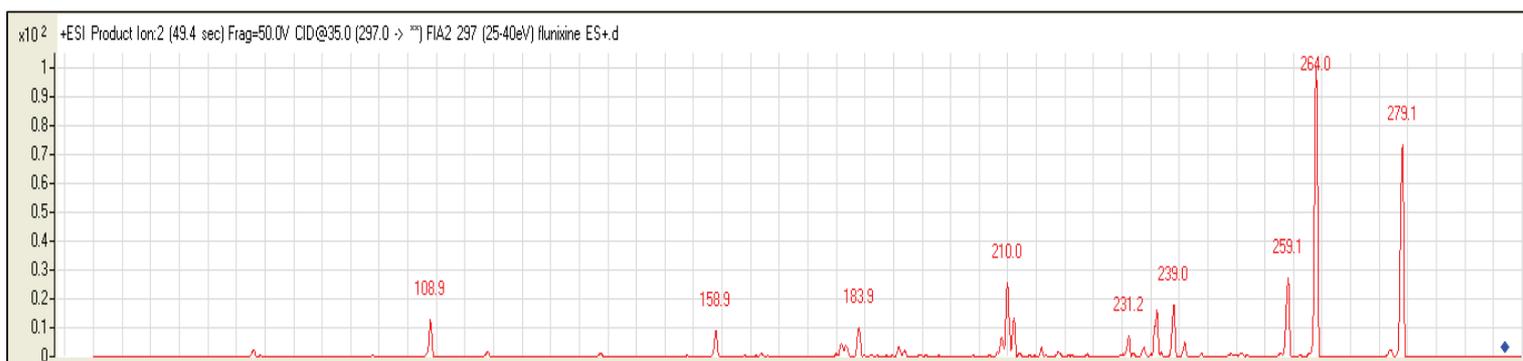


**Figure 27 : FIA1 pour la flunixin [M+H].**

Comme on peut le voir sur la figure 27, différentes tensions de cône sont testées pour lesquelles la molécule réagit de façon plus ou moins sensible. Ici, la tension de cône à sélectionner est 90 V, tension pour laquelle la plus grande sensibilité est obtenue.

Une fois la tension de cône sélectionnée, la FIA2 permet de déterminer les ions produits. La solution est injectée en mode « product ion scan » pour balayer les ions produits. Plusieurs énergies de collision sont testées, comprises entre 5 et 40 eV. Pour chacune de ces énergies un spectre composé des ions produits formés lors de cette fragmentation est obtenu.

Sur la figure 28, l'ion précurseur 297 de la flunixin peut générer plusieurs ions produits, les deux plus abondants étant le 264 et le 279 pour une énergie de collision de 35 eV.



**Figure 28 : FIA2 pour la flunixin (énergie de collision 35eV).**

Une fois les ions produits identifiés, la FIA3 permet de déterminer l'énergie de collision optimale pour chaque transition. Les solutions sont injectées plusieurs fois en mode MRM dans le système, et plusieurs énergies de collision sont testées pour chaque transition. Sur la figure 29, qui s'attache à la transition 297->239, l'énergie de collision optimale en termes de sensibilité est 28 eV.

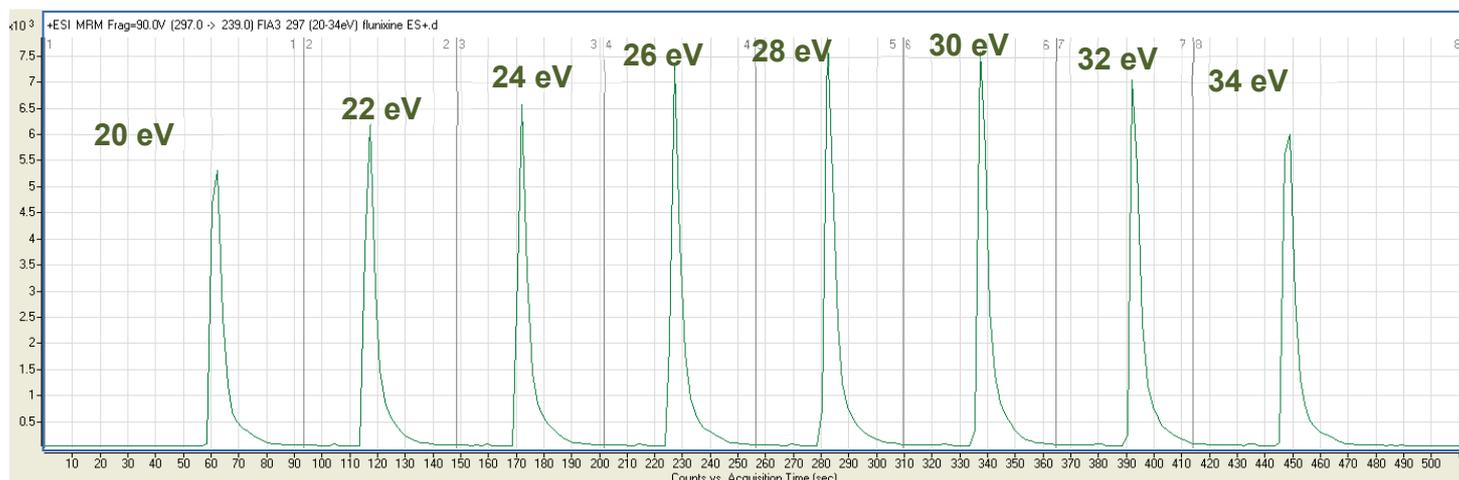


Figure 29 : FIA3 pour la flunixin (transition 297->239).

Les transitions obtenues suite à l'optimisation des RMV d'intérêt sont décrites dans le tableau récapitulatif 26.

Composé	Temps de rétention (min)	Transitions retenues	Tension de cône (V)	Energies de collision (eV)	Ionisation	Etalon interne
Amoxicilline	0,78	366-114	90	16	ES+	Amoxicilline-(phenyl-C <sup>13</sup> ) (372-114)
Dicyclanil	0,92	191-150 191-67	110	17 41	ES+	Dexaméthasone d4 (397--377)
Cefquinome	0,95	134-106 134-77	130	28 42	ES+	Pentabromophénol (488-488)
Lincomycine	1,54	407-359 407-126	150	16 38	ES+	Triclabendazole d3 365-347
Ampicilline	1,60	350-174 350-106	115	10 14	ES+	Ampicilline d5 (355-111)
Lévamisole	1,70	205-178 205-91	130	20 44	ES+	Lévamisole-d5 (210-183)
Sulfadiazine	1,94	251-156 251-92	105	12 28	ES+	Sulfadiazine-(phenyl-C <sup>13</sup> ) (257-162)
Triméthoprim	2,29	291-261 291-230	130	22 20	ES+	Lévamisole-d5 (210-183)
Marbofloxacin	2,48	363-320 363-72	90	8 22	ES+	Enrofloxacin-d5 (365-321)
Oxytétracycline	3,06	461-444 491-426	105	16 8	ES+	Déméclocycline (465-448)
Sulfaméthazine	3,95	279-186 279-124	120	0 16	ES+	Sulfaméthazine-(phenyl-C <sup>13</sup> ) (285-186)
Enrofloxacin	4,77	360-342 360-316	110	18 14	ES+	Enrofloxacin-d5 (365-321)
Spiramycine	5,75	843-174 843-101	130	36 38	ES+	Spiramycine-d3 (847-174)
Néospiramycine	5,78	700-540 700-174	170	16 26	ES+	Spiramycine-d3 (847-174)

Composé	Temps de rétention (min)	Transitions retenues	Tension de cône (V)	Energies de collision (eV)	Ionisation	Etalon interne
Florfénicol	5,95	356-336 356-185	150	0 12	ES-	Florfénicol-d3 (359-339)
Doxycycline	6,01	445-428	150	16	ES+	Déméclocycline (465-448)
Tilmicosine	6,33	870-696 870-174	190	46 48	ES+	Pentabromophénol (488-488)
Acide oxolinique	6,49	262-244 262-216	110	14 28	ES+	Carbamazépine-6C <sup>13</sup> (243-171.5)
Clorsulon	6,66	377,5-342	150	3	ES-	Clorsulon- (phenyl C <sup>13</sup> ) (383-348)
Sulfadiméthoxine	6,82	311-245 311-65	150	16 58	ES+	Sulfadiméthoxine- (phenyl-C <sup>13</sup> ) (317-156)
Erythromycine	6,92	734,4-158 734,4-83	170	30 55	ES+	Erythromycine d6 (741-122.5)
Tylosine	7,25	916-772 916-174	90	30 40	ES+	Spiramycine-d3 (847-174)
Carbamazépine	7,46	237-192 237-179	170	22 34	ES+	Carbamazépine-6C <sup>13</sup> (243-171.5)
Dexaméthasone	7,66	393-373 393-147	110	14 28	ES+	Dexaméthasone d4 (397-377)
Fluméquine	7,71	262-244 262-202	110	16 18	ES+	Enrofloxacin-d5 (365-321)
Flubendazole	7,73	314-282 314-123	170	22 38	ES+	Flubendazole d3 (317-282)
Kétoprofène	8,64	255-209 255-77	130	8 40	ES+	Kétoprofène-d3 (258-212)
Toltrazuril sulfoxide	8,74	440-440 440-371	130	0 10	ES-	Toltrazuril d3 427-427
Méloxiam	8,79	352-141 352-115	130	24 24	ES+	Méloxiam d3 355-115
Flunixin	8,87	297-279 297-239	90	22 28	ES+	Flunixin-d3 (300-282)
Triclabendazole sulfoxide	9,47	372,6-358 372,6-213	120	8 28	ES-	Triclabendazole d3 365-347
Toltrazuril sulfone	9,63	456-456	110	0	ES-	Toltrazuril sulfone d3 459-459
Diclofénac	9,83	294-250 294-214	70	2 12	ES-	Diclofénac (acetophenyl C <sup>13</sup> ) (300-256)
Triclabendazole sulfone	10,08	389-310 389-244	180	22 22	ES-	Triclabendazole d3 365-347
Toltrazuril	10,44	424-424	120	0	ES-	Toltrazuril d3 427-427
Triclabendazole	10,52	357-342 357-197	80	16 28	ES-	Triclabendazole d3 365-347
Diazinon	11,10	305-169 305-153	110	16 16	ES+	Diazinon D10 315-170
Eprinomectine	12,38	914,4-298 914,4-186	110	16 14	ES+	Emamectine (886-158)
Ivermectine	15,48	897,5-753 897,5-329	330	46 60	ES+	Emamectine (886-158)

**Tableau 26: Temps de rétention et transitions de la méthode d'analyse multi-résidus des RMV.**

#### 2.4.2.5. *Correction des effets matrices*

Un des problèmes couramment rencontrés lors de l'analyse par LC-MS/MS est celui des effets matrices, qui biaisent la quantification des composés étudiés. Les effets matrices sont des phénomènes d'exaltation ou de suppression ionique dus à la co-élution de composés interférents présents dans la matrice de l'échantillon. Ces phénomènes d'exaltation ou de suppression du signal se déroulent dans la source d'ionisation et constitue l'un des désavantages majeurs de l'ionisation par electrospray.

Afin de corriger au mieux les effets matrices, des étalons internes ont été attribués à un maximum de composés d'intérêt. Des analogues marqués ont été choisis quand ils étaient disponibles, et quand ce n'était pas le cas, des étalons internes de structure chimique proche ou présentant une bonne correction des effets matrices lors des tests d'attribution.

Pour assurer une double correction des effets matrices, notamment pour les substances pour lesquelles l'analogue marqué n'était pas disponible commercialement, la méthode des ajouts dosés a été utilisée lors de l'analyse des échantillons. Cette méthode consiste à analyser chaque échantillon deux fois :

- Une fois « brut » ;
- Une seconde fois dopé avec une solution mélange des RMV d'intérêt en concentration connue (dans le cadre des analyses de cette thèse, 250 ng/L).

Des facteurs de correction peuvent être établis sur la base de la quantification de l'échantillon dopé, et appliqués à l'échantillon non dopé.

#### 2.4.2.6. *Composés exclus de la méthode d'analyse*

Au final, ce sont 9 molécules qui n'ont pu être intégrées à la méthode d'analyse sur la liste des 46 composés d'intérêt établie lors du travail de priorisation :

- La néomycine, la dihydrostreptomycine (qui sont toutes deux de la famille chimique des aminoglycosides) ainsi que le florfénicol amine (métabolite du florfénicol) qui se sont révélés être des composés trop polaires pour pouvoir être séparés de façon satisfaisante dans les conditions chromatographiques retenues ; de plus ils présentaient de faibles rendements d'extraction dans les conditions utilisées ;

- La deltaméthrine et le fenvalérate pour lesquelles la séparation est généralement réalisée par chromatographie en phase gazeuse selon la littérature (Feo et al., 2010; Nesser et al., 2016) et l'expérience du LERES ;
- Le desfuoylceftiofur, la benzylpénicilline et l'amitraze qui sont instables en solution mélange, ce qui rend la quantification impossible ;
- La colistine, qui est une molécule extrêmement complexe de par sa taille et ses nombreux groupements fonctionnels, et qui nécessite une méthode d'analyse dédiée.

### **2.4.3. Contrôle qualité et performances de la méthode d'analyse**

#### *2.4.3.1. Contrôle qualité de la méthode*

##### - Identification

Les composés sont identifiés en comparant leurs temps de rétention avec ceux d'une solution extraite injectée dans les mêmes conditions que les échantillons.

##### - Quantification

L'analyse quantitative est effectuée par étalonnage interne.

La gamme de calibrage est extraite dans les mêmes conditions que les échantillons.

Pour cette méthode, la gamme d'étalonnage est composée de 7 ou 8 points de gamme selon les composés, et couvre les domaines d'application suivant :

Gamme 1	Gamme 2
Point 1 : 5 ng/L	Point 1 : 12,5 ng/L
Point 2 : 12,5 ng/L	Point 2 : 25 ng/L
Point 3 : 25 ng/L	Point 3 : 50 ng/L
Point 4 : 50 ng/L	Point 4 : 100 ng/L
Point 5 : 100 ng/L	Point 5 : 150 ng/L
Point 6 : 150 ng/L	Point 6 : 250 ng/L
Point 7 : 250 ng/L	Point 7 : 500 ng/L
Point 8 : 500 ng/L	

**Tableau 27: Gammes d'étalonnages.**

Ainsi selon les composés la limite de quantification est de 5 ng/L ou 12,5 ng/L.

La courbe d'étalonnage est établie à la fin de la séquence, en mode quadratique, et chaque échantillon est quantifié par rapport à cette courbe. La calibration se fait avec 4 points de gamme au minimum.

Une correction des concentrations obtenues est ensuite apportée par ajouts dosés pour pallier aux effets matrices selon le calcul suivant :

**Concentration RMV = Aire du pic (échantillon sans ajout dosé) \* concentration théorique de l'ajout dosé / (Aire du pic (échantillon + ajout dosé) - Aire du pic (échantillon sans ajout dosé))**

Avec « Aire du pic » = aire du pic corrigée par rapport à l'**étalonnage interne**.

- Validation des résultats

La validation du résultat comprend :

- la vérification des surfaces du traceur d'injection et des standards internes d'extraction (les valeurs doivent être comprises entre +/- 50 % par rapport aux surfaces obtenues dans la gamme) ;
- la vérification du coefficient de détermination des courbes d'étalonnage pour chaque composé : il doit être supérieur à 0,99 ;
- la vérification du point de gamme correspondant à la limite de quantification : la quantification du point de gamme correspondant à la LQ ne doit pas s'écarter de plus de 50 % de la valeur théorique ;
- la vérification du blanc : il ne doit pas dépasser 50% en signal de la limite de quantification ;
- une reconnaissance des composés par comparaison du temps de rétention ;
- la quantification de chaque composé selon la concentration de l'ajout :
  - Si l'ajout est retrouvé entre 50 et 150% (soit entre 125 et 375 ng/L), la quantification se fait par ajouts dosés sans modifier la limite de quantification;
  - Si l'ajout est retrouvé entre 20 et 50% (soit entre 50 et 125 ng/L), la quantification se fait par ajouts dosés et la limite de quantification est multipliée par 2 ;

- Si l'ajout est supérieur à 150% (supérieur à 375 ng/L), il faut voir au cas par cas ;
- Si l'ajout est retrouvé entre 10 et 20% (entre 25 et 50 ng/L), la quantification se fait par ajouts dosés et la limite de quantification est multipliée par 4 ;
- Si l'ajout est inférieur à 10% alors le résultat est invalidé.

#### 2.4.3.2. *Evaluation des performances de la méthode*

L'évaluation des performances de la méthode s'effectue dans un contexte normatif défini. Le protocole des essais a été mené en accord avec les préconisations de la norme NF T90-210 (NF T90-210, Afnor, 2009) : « Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire ».

Les essais décrits ont pour objet de définir les performances d'une méthode d'analyse quantitative, employée dans un laboratoire, dans le domaine de l'analyse physico-chimique de l'eau. Le mode opératoire mis en œuvre lors des études d'évaluation doit être le même que celui qui sera utilisé en routine. La norme NF T90-210 fournit également les outils statistiques pertinents à mettre en œuvre pour évaluer les points suivants :

- la fonction d'étalonnage appliquée dans un domaine d'étalonnage
- la limite de quantification
- l'influence de l'étape de préparation de l'échantillon lorsque qu'elle n'est pas prise en compte dans l'étude d'étalonnage. Dans ce travail, la préparation est prise en compte. En effet, les gammes étant extraites dans les mêmes conditions que les échantillons.
- l'exactitude de la méthode sur des échantillons associés à une valeur de référence

##### 2.4.3.2.1. La fonction d'étalonnage appliquée dans un domaine d'étalonnage

L'évaluation de l'applicabilité de la fonction d'étalonnage dans le domaine étudié a été effectuée sur 5 gammes, à 7 ou 8 niveaux, réalisées dans des conditions de fidélité intermédiaire.

La fidélité est l'étroitesse d'accord entre des résultats d'essais indépendants obtenus sous des conditions stipulées (NF ISO 5725-1, Afnor, 1994) et la fidélité intermédiaire exprime la variabilité intra-laboratoire. Dans ces conditions de fidélité intermédiaire, les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans le même laboratoire avec des changements de conditions, parmi

lesquelles : personne, étalonnage, équipements, environnement, temps écoulé entre mesures (NF ISO 5725-3, Afnor, 1994). En pratique au laboratoire, les conditions de fidélité intermédiaire sont satisfaites si au minimum deux changements de conditions sont satisfaites, parmi lesquelles : personne, étalonnage, jours différents.

La fonction d'étalonnage est évaluée dans le domaine d'étalonnage en comparant les biais observés à des écarts maximum acceptables (EMA). Les EMA sont les valeurs extrêmes d'une erreur acceptable sur un résultat. L'EMA peut être imposé par une exigence réglementaire ou normative ou fixé par le laboratoire lui-même (NF T90-210, Afnor, 2009). Ici, les EMA sont fixés par le laboratoire. Les EMA sont de 50% à la limite de quantification et de 30% aux autres niveaux de concentration.

Ainsi, les biais observés pour chaque composé sont acceptables s'ils sont inférieurs à l'EMA fixé au niveau de la concentration considérée. Dans le cas contraire, la fonction d'étalonnage ne peut pas être utilisée dans le domaine étudié.

Les tableaux 28, 29 et 30 présentent respectivement les grandeurs retrouvées, les biais absolus et les biais relatifs pour la flunixin (transition 297-239).

<b>Concentration attendue (ng/L)</b>	5	12,5	25	50	100	150	250	500
<b>Gamme 1</b>	5,760	12,84	24,03	50,14	99,41	150,1	250,4	499,9
<b>Gamme 2</b>	5,999	12,69	24,04	48,80	101,4	149,7	250,0	490,5
<b>Gamme 3</b>	4,810	14,81	23,28	48,52	99,92	150,5	249,9	506,7
<b>Gamme 4</b>	5,940	12,58	24,43	48,19	100,87	152,4	248,4	491,8
<b>Gamme 5</b>	5,499	11,80	23,69	49,79	100,72	151,6	248,2	505,00

**Tableau 28: Grandeurs retrouvées pour les 5 gammes de la flunixin 297-239.**

<b>Gamme 1</b>	0,760	0,335	-0,966	0,140	-0,586	0,056	0,409	-0,065
<b>Gamme 2</b>	0,999	0,185	-0,959	-1,200	1,394	-0,329	-0,039	-9,457
<b>Gamme 3</b>	-0,190	2,313	-1,718	-1,478	-0,081	0,480	-0,085	6,729
<b>Gamme 4</b>	0,940	0,076	-0,575	-1,810	0,863	2,408	-1,611	-8,194
<b>Gamme 5</b>	0,499	-0,699	-1,307	-0,209	0,716	1,613	-1,781	4,993

**Tableau 29: Biais absolus pour les 5 gammes de la flunixin 297-239.**

<b>EMA</b>	50%	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%
<b>Gamme 1</b>	15,2%	2,7%	3,9%	0,3%	0,6%	0,0%	0,2%	0,0%
<b>Gamme 2</b>	20,0%	1,5%	3,8%	2,4%	1,4%	0,2%	0,0%	1,9%
<b>Gamme 3</b>	3,8%	18,5%	6,9%	3,0%	0,1%	0,3%	0,0%	1,3%
<b>Gamme 4</b>	18,8%	0,6%	2,3%	3,6%	0,9%	1,6%	0,6%	1,6%
<b>Gamme 5</b>	10,0%	5,6%	5,2%	0,4%	0,7%	1,1%	0,7%	1,0%

**Tableau 30: Biais relatifs pour les 5 gammes de la flunixin 297-239.**

On observe dans le tableau 30 que tous les biais relatifs obtenus pour la transition 297-239 de la flunixin sont inférieurs aux EMA fixés, à tous les niveaux de concentrations. Ainsi, la fonction d'étalonnage de la flunixin 297-239 est acceptable dans le domaine étudié.

Cette étape a permis de définir une limite de quantification pour chacun des composés. La limite de quantification est la plus petite grandeur d'un analyte à examiner dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une exactitude définie (Afnor, 2009). Cette limite de quantification a été testée plus en avant lors des tests d'exactitude et d'incertitude.

#### 2.4.3.2.2. L'exactitude de la méthode

L'exactitude se définit comme l'étroitesse d'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée (NF ISO 5725-1, Afnor, 1994). Celle-ci a été étudiée via la prise en compte de trois paramètres : la **justesse**, le **coefficient de variation en conditions de fidélité intermédiaire** et l'**incertitude de mesure élargie relative**.

La **justesse** correspond à l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et la valeur de référence. A noter que la mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de biais.

L'**incertitude de mesure** est un paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande (grandeur que l'on veut mesurer), à partir des informations utilisées.

L'**incertitude élargie, U**, est rapportée soit sous forme de valeur d'incertitude absolue, soit sous forme de valeur d'incertitude relative. Lorsque les résultats sont proches de la limite de quantification, l'incertitude est souvent constante et peut donc être exprimée sous forme de valeur absolue. Lorsque les résultats sont largement supérieurs à la limite de quantification, l'incertitude est souvent proportionnelle à la concentration de l'analyte et peut donc être exprimée sous forme de valeur relative (NF ISO 11352, Afnor, 2013).

L'exactitude de la mesure a été évaluée à 3 niveaux de concentrations : la LQ, un point milieu de gamme (100 ng/L) et le point haut de gamme (500 ng/L). Pour cela 6 échantillons représentatifs de matrices différentes (deux eaux de surface, une eau

souterraine et trois eaux du robinet) ont été dopés avec une solution mélange des composés aux trois niveaux de concentration mentionnés ci-dessus.

La norme NF T90-210 (Afnor, 2009) préconise l'utilisation d'un même échantillon par matrice d'eau représentative pour réaliser les différents plans d'expérience. Cependant, afin de faire varier les caractéristiques de l'eau utilisée pour la validation de la méthode, le laboratoire recommande d'utiliser des échantillons différents d'une même matrice représentative. C'est pourquoi trois eaux naturelles et trois eaux traitées ont été utilisées dans le plan d'expérience.

Les analyses ont été effectuées en 3 séries de mesure (1 EB + 1 ET par série). Pour chacune des matrices et à chaque niveau de concentration, l'analyse a été faite en conditions de répétabilité (duplicat). Des conditions de répétabilité sont des conditions dans lesquelles les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps (NF ISO 5725-1, Afnor, 1994).

Le tableau 31 présente les taux de récupérations, les coefficients de variations de fidélité intermédiaire et les incertitudes élargies obtenues lors de l'évaluation des performances pour chaque transition.

Ces incertitudes sont celles à considérer dans le cas du travail de recherche exploratoire de thèse. Par la suite, les limites de quantifications ont été rehaussées pour une grande partie des composés. Seule la carbamazépine et la flunixin conservent une limite de quantification à 5 ng/L, et les autres composés ont maintenant une limite de quantification à 12,5 ng/L. Sur cette nouvelle base, la méthode a été auditée COFRAC en septembre 2018. Pour l'audit, les EMA fixés pour l'incertitude relative élargie étaient de 60% à la LQ et de 40% aux autres niveaux de concentration.

Ces différents essais ont permis d'établir le domaine d'application de la méthode d'analyse, c'est-à-dire la combinaison entre les différents types de matrice et la gamme de concentration en analyte couverte (NF T90-210, Afnor, 2009). Les matrices couvertes par la méthode sont donc les eaux naturelles (superficielles et souterraines) ainsi que les eaux traitées. La gamme des concentrations couverte va, selon les composés, de 5 ng/L à 500 ng/L ou de 12,5 ng/L à 500 ng/L.

Molécule	Transitions	LQ (ng/L)	A la LQ				En milieu de gamme (100ng/L)				Au point haut de gamme (500ng/L)			
			Taux de récupération	Justesse	CV de fidélité intermédiaire (%)	Incertitude élargie relative	Taux de récupération	Justesse	CV de fidélité intermédiaire (%)	Incertitude élargie relative	Taux de récupération	Justesse	CV de fidélité intermédiaire (%)	Incertitude élargie relative
Acide oxolinique	262-216	12,5	70 – 106%	-2%	16,1	34%	74 – 124%	+2%	17,8	39%	88 – 112%	+2%	9,3	21%
	262-244		67 – 110%	-1%	18,3	39%	75 – 124%	+2%	16,9	37%	88 – 108%	+2%	8,2	18%
Amoxicilline	366-114	12,5	42 -98%	-18%	25,5	58%	46-122%	-8%	29,7	61%	38 – 105%	-12%	29,2	60%
	350-106		83 – 94%	-10%	6,1	23%	74 – 110%	+1%	11,6	25%	76 – 112%	-1%	2,6	6%
Ampicilline	350-174	12,5	83-95%	-8%	6,0	20%	91 – 123%	-0,04%	13,0	28%	98 – 101%	-0,23%	2,3	5%
	237-179		108-128%	+17%	9,7	43%	95 – 99%	-3%	2,0	7%	98 – 104%	+2%	2,1	5%
Carbamazépine	237-192	5	89 – 137%	+19%	15,8	55%	96 – 102%	-1%	1,8	5%	101 – 104%	+3%	1,8	6%
	134-77		0 – 99%	-45%	92,3	141%	86 – 150%	+9%	21,3	53%	90 – 110%	-1%	12,5	27%
Cefquinome	134-106	12,5	74 – 112%	-5%	16,5	35%	84 – 145%	+8%	19,4	48%	94 – 115%	+1%	11,7	26%
	479-444		103 – 122%	+11%	8,2	30%	103 – 122%	+8%	9,3	26%	92 – 109%	+2%	8,6	19%
Chlortétracycline	479-462	12,5	94 – 162%	+15%	23,8	66%	91 – 117%	+4%	11,1	26%	85 – 11%	-1%	9,4	20%
	377-342		0 – 144%	-8%	52,3	105%	81 – 156%	+11%	33,3	82%	59 – 148%	-10%	35,2	71%
Dexaméthasone	393-147	12,5	90 – 117%	+3%	8,9	20%	95 – 134%	+4%	14,6	34%	97 – 104%	+1%	2,4	6%
	393-373		81 – 128%	-1%	19,3	41%	100 – 124%	+7%	9,6	26%	100 – 103%	+2%	6,2	14%
Diazinon	305-153	12,5	90 – 104%	-2%	7,2	15%	91 – 119%	-0,1%	9,7	21%	96 – 102%	-0,14%	2,2	5%
	305-169		89 – 103%	-2,3%	6,6	15%	88 – 114%	-0,1%	9,7	21%	95 – 103%	-0,1%	3,1	7%
Diclofénac	294-250	5	82 – 185%	+7%	26,2	93%	94 – 115%	+3%	6,6	14%	97 – 102%	+1%	8,7	19%
	191-67		0 – 109%	-10%	78,4	130%	74 – 125%	-1%	19,1	41%	87 – 121%	-1%	12,8	27%
Dicyclanil	191-150	12,5	80 – 105%	-5%	12,6	28%	70 – 141%	-1%	26,7	57%	85 – 121%	+0,1%	14,8	32%
	445-428		71 – 113%	-10%	23,1	49%	80 – 125%	-2%	20,6	44%	68 – 109%	-7%	19,1	41%
Doxycycline	360-316	12,5	86 – 110%	+2%	10	22%	89 – 120%	+0,23%	2,1	7%	98 – 102%	+1%	2,2	7%
	360-342		83 – 108%	+1%	9,7	21%	85 – 111%	-2%	4,6	10%	99 – 104%	+1%	4,3	15%
Eprinomectine	914-186	5	87 – 107%	+2%	16,1	35%	69 – 106%	-10%	16,2	37%	81 – 112%	-6%	12,7	29%
	914-298		69 – 142%	+11%	41,9	102%	61 – 108%	-9%	22,4	48%	76 – 104%	-7%	12,7	29%
Erythromycine	734-83	12,5	86 – 130%	+4%	17,0	39%	80 – 128%	+1%	15,8	34%	92 – 108%	+1%	5,9	13%
	734-158		82 – 113%	-4%	14,8	32%	89 – 120%	+2%	12,5	28%	97 – 108%	+1%	5,5	12%
Florfenicol	356-185	5	0 -170%	+20%	61,1	171%	102 – 141%	+12%	15,1	41%	91 – 101%	-8%	4,5	12%
	356-336		0 – 233%	+34%	61,3	190%	91 – 149%	+10%	19,0	55%	93 – 110%	-6%	7,7	23%
Flubendazole	314-123	12,5	94 – 105%	+0,32%	4,6	10%	97 – 103%	+0,87%	2,5	6%	101 – 107%	+1%	2,1	8%
	314-282		90 – 105%	-2%	5,7	13%	96 – 102%	+2%	2,6	7%	102 – 107%	+2%	1,9	9%
Fluméquine	262-202	5	106 – 202%	+38%	36,4	133%	92 – 118%	+5%	10,1	25%	78 – 115%	+0,46%	13,1	28%
	262-244		116 – 232%	+38%	39,1	158%	92 – 123%	+6%	11,7	29%	80 – 115%	+1%	11,7	25%
Flunixin	297-239	5	110 – 120%	+14%	4,8	31%	96 – 99%	-3%	1,5	6%	101 – 105%	+4%	1,4	8%
	297-279		113 – 124%	+18%	5,4	38%	97 – 99%	-2%	1,1	5%	104 – 107%	+6%	1,1	11%
Ivermectine	897-329	5	81 – 171%	+1%	36,0	78%	89 – 128%	-9%	12,2	30%	81 – 126%	-6%	21,4	45%
	897-753		75 – 165%	+11%	38,4	95%	83 – 123%	-4%	16,1	34%	82 – 151%	+0,27%	26,5	57%
Kétoprofène	255-77	5	109 – 147%	+24%	12,8	59%	96 – 127%	-2%	4,1	10%	98 – 109%	+2%	4,2	10%
	255-209		103 - 187%	+23%	21,5	73%	95 – 118%	-3%	3,4	10%	97 – 106%	+2%	3,5	8%
Lévamisole	205-91	5	107 – 165%	+47%	14,5	105%	97 – 113%	-1%	1,5	3%	100 – 103%	+2%	1,2	4%
	205-178		106 – 166%	+45%	14,4	101%	96 – 108%	-1%	1,4	3%	101 – 103%	+2%	1,1	5%

Molécule	Transitions	LQ (ng/L)	A la LQ				En milieu de gamme (100ng/L)				Au point haut de gamme (500ng/L)			
			Taux de récupération	Justesse	CV de fidélité intermédiaire (%)	Incertitude élargie relative	Taux de récupération	Justesse	CV de fidélité intermédiaire (%)	Incertitude élargie relative	Taux de récupération	Justesse	CV de fidélité intermédiaire (%)	Incertitude élargie relative
Lincomycine	407-126	5	106 – 166%	+45%	14,4	101%	96 – 108%	-1%	1,4	3%	101 – 103%	+2%	1,1	5%
	407-359		50 – 1471%	+234%	254,4	1187%	0 – 143%	-28%	68,2	120%	0 – 168%	-23%	83,5	145%
Marbofloxacine	363-72	12,5	47 – 1471%	+213%	271,9	1878%	0-138%	-30%	68,2	119%	0 – 168%	-24%	83,7	145%
	363-320		87 – 106%	-6%	11,2	25%	85-115%	-2%	13,4	28%	92 – 120%	+3%	10,0	23%
Méloxican	352-115	12,5	86 – 116%	-4%	13,4	29%	87 – 108%	-3%	11,3	24%	99 – 115%	+4%	6,0	16%
	352-141		82 – 100%	-4%	7,9	18%	91 – 105%	-1%	5,1	11%	98 – 102%	-0,43%	1,9	4%
Néopiramide	699-174	12,5	81 – 101%	-5%	8	19%	92 – 105%	+0,22%	5,0	11%	97 – 102%	+0,22%	1,8	4%
	699-540		19 – 176%	-7%	72,4	145%	23 – 242%	-0,47%	84,5	181%	32 – 221%	-4%	89,0	185%
Oxytétracycline	461-426	12,5	18 – 205%	+3%	72,4	160%	22 – 229%	-0,22%	78,5	168%	32 – 243%	+1%	96,2	210%
	461-444		96 – 106%	+1%	10,9	24%	83 – 110%	+2%	11,3	25%	85 – 120%	+4%	16,7	38%
Spiramycine	843-101	12,5	97 – 107%	+4%	21,4	47%	82 – 111%	-1%	12,3	26%	84 – 134%	+8%	18,8	46%
	843-174		0 – 236%	-11%	120,8	231%	98 – 124%	+6%	9,5	25%	93 – 112%	+1%	11,3	25%
Sulfadiazine	251-92	5	0 – 118%	-25%	75,7	132%	89 – 112%	+1%	11,2	25%	92 – 103%	-1%	11,8	25%
	251-156		73 – 256%	+69%	39,2	199%	98 – 115%	-2%	5,7	13%	93 – 106%	-1%	4,5	10%
Sulfadiméthoxine	311-65	12,5	102 – 165%	+44%	21,4	109%	95 – 115%	-3%	4,1	10%	93 – 112%	+1%	6,5	14%
	311-245		91 – 112%	-1%	8,2	18%	96 – 115%	+1%	5,0	11%	99 – 102%	+1%	8,2	18%
Sulfaméthazine	279-124	5	88 – 113%	-1%	10,3	22%	93 – 112%	+0,48%	3,9	10%	100 – 102%	+1%	6,2	13%
	279-186		15 – 66%	+9%	38,6	93%	96 – 124%	-6%	2,7	13%	99 – 101%	-0,12%	3,9	8%
Tilmicosine	869-174	5	43 – 114%	+16%	17,2	54%	96 – 133%	-5%	3,1	11%	91 – 102%	-1%	3,9	8%
	869-696		107 – 357%	131%	49,8	360%	80 – 102%	-10%	12,8	32%	80 – 114%	-3%	19	40%
Toltrazuril	424-424	12,5	108 – 329%	120%	51,1	341%	74 – 104%	-11%	14,2	35%	79 – 118%	-2%	20,8	44%
	456-456		120 – 212%	+51%	28,9	139%	102 – 116%	+7%	1,4	5%	96 – 100%	-1%	1,5	3%
Toltrazuril sulfonate	440-371	12,5	94 – 134%	+11%	17,3	47%	94 – 125%	+4%	10,5	25%	97 – 100%	-1%	1,6	4%
	440-440		95 – 133%	+13%	11,3	37%	100 – 138%	+12%	13,1	39%	90 – 100%	-5%	5,4	14%
Triclabendazole	357-197	5	99 – 105%	+3%	9,4	21%	97 – 135%	+6%	13,9	34%	91 – 101%	-4%	4,3	11%
	357-342		111 – 138%	+23%	9,2	52%	91 – 120%	+1%	7,9	7%	93 – 112%	+2%	7,7	18%
Triclabendazole sulfonate	389-244	12,5	110 – 135%	+23%	8,6	52%	90 – 117%	+1%	9,1	20%	92 – 112%	+2%	7,5	17%
	389-310		143 – 212%	+22%	16,4	176%	102 – 124%	+10%	7,8	28%	82 – 99%	-10%	9,1	27%
Triméthoprime	372-213	5	143 – 203%	+20%	14,7	167%	103 – 115%	+10%	5,3	23%	82 – 100%	-10%	9,2	27%
	291-230		96 – 150%	30%	19,0	80%	97 – 106%	+12%	4,1	10%	80 – 101%	-5%	9,5	23%
Tylosine	916-174	5	100 – 147%	34%	16,9	83%	94 – 112%	+11%	6,7	23%	79 – 101%	-5%	9,8	19%
	916-772		80 – 131%	11%	15,9	44%	99 – 110%	+3%	4,0	11%	97 – 105%	+1%	2,5	6%
			83 – 127%	10%	17,5	39%	98 – 142%	+10%	15,8	42%	96 – 114%	+2%	6,6	15%
			75 – 241%	36%	61,4	194%	30 – 89%	-37%	37,9	84%	41 – 92%	-36%	38,0	84%
			55 – 220%	43%	64,5	216%	29 – 90%	-37%	42,7	85%	45 – 84%	-36%	39,3	83%

Tableau 31: Résultats de l'évaluation des performances de la méthode d'analyse des RMV multi-résidus.

#### 2.4.3.2.3. Essai inter-laboratoire

Un essai inter-laboratoire AGLAE mené en avril 2018 sur trois échantillons a également été réalisé pour 3 composés inclus dans la méthode : les deux traceurs humains (carbamazépine et diclofénac) et la sulfaméthazine. Les valeurs obtenues avec la méthode développée, les valeurs réelles ainsi que la justesse obtenues sont présentées dans le tableau 32. Cet essai inter-calibration a permis de vérifier la robustesse de la méthode, bien que peu de paramètres soient couverts, du fait de l'émergence récente de la problématique pour les molécules à usage exclusivement vétérinaire.

Composés	Valeur réelle (ng/l)	Valeurs obtenue avec la méthode du laboratoire (ng/l)	Justesse (%)
Carbamazépine	96,3	86,4	-10%
Diclofénac	153	167	+9%
Sulfaméthazine	36,9	28,8	-22%

**Tableau 32: Résultats de l'essai inter-laboratoire.**

#### 2.4.4. Seconde méthode d'analyse des RMV

Une seconde méthode a été développée ayant pour objectif d'analyser les trois composés très polaires qui n'avaient pu être inclus dans la méthode 1. En effet, ces trois RMV sont classés parmi des groupes de priorité haute selon la méthode de hiérarchisation décrite en 2.3. la néomycine (groupe de criticité 3), le florfénicol amine qui est le métabolite du florfénicol (groupe de criticité 4) et la dihydrostreptomycine (groupe de criticité 6). La dihydrostreptomycine, la néomycine et le florfénicol amine possèdent tous deux des groupements amines (Figures 30 ; 31 et 32).

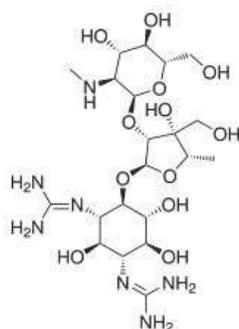


Figure 30 : Structure de la dihydrostreptomycine.

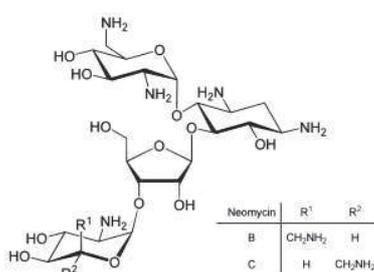


Figure 31: Structure de la néomycine.

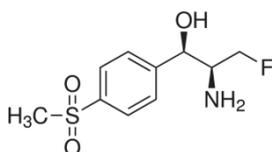


Figure 32 : Structure du florfénicol amine.

Les différentes étapes du développement de cette seconde méthode ne sont pas détaillées dans le manuscrit, mais les paramètres optimisés et retenus à chacune des étapes de l'analyse sont décrits dans les paragraphes suivants.

#### 2.4.4.1. *Pré-traitement de l'échantillon*

De même que pour la première méthode d'analyse, 40 µL d'une solution d'acide ascorbique à 20 mg/L sont ajoutés dans la verrerie avant prélèvement. A réception au laboratoire, les échantillons sont filtrés à 0,7 µm et le pH est ajusté à 4,5 en vu du traitement de l'échantillon.

#### 2.4.4.2. *Traitement de l'échantillon*

Les extractions sont réalisées sur le même appareil que pour la première méthode (ASPEC GX-274 de chez Gilson). Les conditions opératoires retenues sont les suivantes :

- Cartouches : Cartouches Strata-X-CW - 6 mL, 200 mg (Phenomenex)

Les cartouches Strata-X-CW sont des cartouches à échanges de cations faibles qui possèdent des groupements fonctionnels de type acides carboxyliques. Ce type de cartouches permet de retenir des composés fortement basiques avec des groupements amines quaternaires, mais également des composés avec des groupements amines primaires, secondaires ou tertiaires si le pH de l'échantillon est ajusté entre 4,5 et 6.

- Ajustement du pH des échantillons à 4,5
- Conditionnement des cartouches :
  - 5 mL de MeOH à 5 mL/min + 2 mL d'air à 5 mL/min
  - 5 mL d'EUP à 5 mL/min + 2 mL d'air à 5 mL/min
- Dépôt de l'échantillon :
  - 200 mL d'échantillon à 5 mL/min + 5 mL d'air à 5 mL/min
- Séchage des cartouches :
  - séchage par un gaz extérieur (azote) pendant 30 minutes
- Elution des cartouches :
  - 4 x 2,5 mL d'un mélange 90 % ACN – 10 % acide formique à 2 mL/min + 4 mL d'air à 2 mL/min

Une fois l'extraction réalisée, l'éluat obtenu est évaporé à la goutte au bain-marie à 30 °C sous jet d'azote et repris dans 0,5 mL de la phase mobile initiale utilisée lors de la séparation chromatographique.

#### 2.4.4.3. Séparation par chromatographie en phase liquide ultra haute performance

Le système utilisé est un système chromatographique Acquity UPLC de chez Waters.

La phase stationnaire sélectionnée est la suivante :

- la colonne Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (Waters)

Cette colonne possède des groupements tri-fonctionnalisés et permet une utilisation sur une plage de pH allant de 1 à 12. Sa surface est chargée à 18% en chaînes C<sub>18</sub> et la taille des pores est de 130 Å. Elle possède un diamètre de 2,1 mm pour une longueur de 50 mm, avec des particules de taille 1,7 µm, adaptées pour travailler à des débits et pressions élevées.

Les conditions opératoires de la séparation sont les suivantes :

- Injection : 20 µL
- Séparation :
  - Colonne Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 1.7 µm (Waters) (dimensions : 2,1 x 50 mm ; taille des particules : 1,7 µm)
  - Température du four : 40°C
  - Phase mobile :
    - voie A : eau ultra pure + 10 mM d'acide heptafluorobutyrique (HFBA)
    - voie B : acétonitrile + 10 mM HFBA
    - voie C : 100 % acétonitrile
    - voie D : 100 % eau ultra pure
      - Débit : 0,4 mL/min
      - Gradient:

Temps (min)	Voie A (%)	Voie B (%)
0	90	10
1	90	10
5	60	40
6	0	100
7	0	100
7,1	90	10
10	90	10

Tableau 33: Gradient de la phase mobile de la seconde méthode d'analyse.

- Durée de l'acquisition : 10 min

L'ajout d'HFBA dans la phase mobile permet de faire de la chromatographie de paires d'ions. Une paire d'ions est l'entité qui va se former de par l'association de deux ions de charges opposés, ici les RMV d'intérêt ionisés qui vont venir s'associer avec l'HFBA de charge opposée. Cette paire d'ions présente des propriétés plus hydrophobes que les RMV seuls, ce qui va permettre de retenir les composés polaires sur la colonne en phase inverse.

#### 2.4.4.4. Détection par spectrométrie de masse en tandem

La détection et la quantification des RMV sont effectuées sur un spectromètre de masse en tandem Quattro Micro API Micromass de chez Waters, équipé avec une source d'ionisation electrospray.

##### 2.4.4.4.1. Paramètres de la source d'ionisation

- Capillaire : 3,5 kV
- « Extractor » : 3 V
- « RF Lens » : 0,1 V
- Température de la source : 130 °C
- « Desolvatation temperature » : 450 °C
- « Gas flow » :
  - « Desolvation » : 650 L/heure
  - Cône : 50 L/heure

##### 2.4.4.4.2. Sélection des transitions

Le tableau 34 présente les transitions retenues.

Composé	Temps de rétention (min)	Transitions retenues	Tension de cône (V)	Energies de collision (eV)	Ionisation	Etalon interne
Florfénicol amine	1,50	248 - 130 248 - 230	20	20 12	ES+	Florfénicol amine d3 (251,1-233,1)
Dihydrostreptomycine	3,06	584,2 – 246,2 584,2 – 263,2	60	40 30	ES+	/

**Tableau 34: Transition du florfénicol amine et de la dihydrostreptomycine.**

La néomycine n'a pas pu être optimisée car elle n'a pas été détectée sur le spectromètre de masse quelle que soit la concentration testée.

#### 2.4.4.5. Application sur échantillons réels

Deux eaux brutes superficielles et deux eaux traitées ont été dopées à 200 µg/L et analysées avec la méthode des ajouts dosés et étalonnage interne (pour le florfénicol amine). Le tableau 35 présente les taux de recouvrement obtenus pour chaque transition de la dihydrostreptomycine et du florfénicol amine. En vert sont indiqués les taux de recouvrement inclus entre 70% et 130% et en rouge les taux de recouvrement inférieurs à 70% ou supérieurs à 130%.

Taux de recouvrement	Florfénicol amine 248 - 230	Florfénicol amine 248 - 130	Dihydrostreptomycine 584,2 – 246,2	Dihydrostreptomycine 584,2 – 263,2
Eau brute 1	98%	70%	284%	137%
Eau brute 2	79%	82%	114%	169%
Eau traitée 1	89%	72%	40%	43%
Eau traitée 2	123%	73%	114%	102%

**Tableau 35 : Taux de recouvrement sur échantillons réels de la dihydrostreptomycine et du florfénicol amine.**

Les taux de recouvrement du florfénicol amine sont compris entre 70% et 123% ce qui est acceptable. Les taux de recouvrement de la dihydrostreptomycine sont compris entre 40% et 284% du fait d'effet matrice importants non corrigés car la dihydrostreptomycine n'a pas d'étalon interne associé. En effet, aucun analogue marqué ou étalon interne marqué de la famille chimique des aminoglycosides n'a été trouvé chez les fournisseurs au moment de l'étude.

#### 2.4.4.6. Contrôle qualité de la méthode d'analyse

##### - Identification

Les composés sont identifiés en comparant leurs temps de rétention avec ceux d'une solution extraite ou diluée de standards, injectée dans les mêmes conditions que les échantillons.

##### - Quantification

L'analyse quantitative est effectuée par étalonnage interne pour le florfénicol amine et par étalonnage externe pour la dihydrostreptomycine.

La gamme d'étalonnage est extraite dans les mêmes conditions que les échantillons.

Pour cette méthode, la gamme d'étalonnage est composée de 5 points de gamme selon les composés, et couvre les domaines d'application suivant :

- Point 1: 50 ng/L
- Point 2: 125 ng/L
- Point 3: 500 ng/L

- Point 4: 1250 ng/L
- Point 5: 5000 ng/L

La courbe d'étalonnage est établie à la fin de la séquence, en mode quadratique, et chaque échantillon est quantifié par rapport à cette courbe. La calibration se fait avec 4 points de gamme au minimum.

La limite de quantification de 50 ng/L, relativement élevée par rapport aux limites de quantification de la première méthode d'analyse, est due aux limites de sensibilité de du spectromètre de masse utilisé. À des concentrations inférieures à 50 ng/L, la dihydrospectromycine n'est plus détectée.

Les échantillons sont quantifiés par ajouts dosés selon le calcul suivant :

**Concentration échantillon = aire du pic (échantillon sans ajout) \* concentration théorique de l'ajout / (aire du pic (échantillon + ajout) - aire du pic (échantillon sans ajout))**

Avec « aire du pic » = aire du pic en étalonnage externe ou aire du pic corrigée par rapport à l'étalon interne d'extraction en étalonnage interne.

La concentration de l'ajout est de 200 ng/L.

- Validation des résultats

La validation du résultat comprend :

- la vérification des surfaces du traceur d'injection et des standards internes d'extraction (les valeurs doivent être comprises entre +/- 50 % par rapport aux surfaces obtenues dans la gamme) ;
- la vérification du coefficient de détermination des courbes d'étalonnage pour chaque composé : il doit être supérieur à 0,99 ;
- la vérification du point de gamme correspondant à la limite de quantification : la quantification du point de gamme correspondant à la LQ ne doit pas s'écarter de plus de 50 % de la valeur théorique ;
- la vérification du blanc : il ne doit pas dépasser 50% en signal de la limite de quantification ;

- une reconnaissance des composés par comparaison du temps de rétention ;
- la quantification de chaque composé selon la concentration de l'ajout :
  - Si l'ajout est retrouvé entre 50 et 150% (soit entre 100 et 300 ng/L), la quantification se fait par ajouts dosés ;
  - Si l'ajout est retrouvé entre 20 et 50% (soit entre 40 et 100 ng/L), la quantification se fait par ajouts dosés et le seuil de détection est multiplié par 2 ;
  - Si l'ajout est supérieur à 150% (supérieur à 300 ng/L), il faut voir au cas par cas ;
  - Si l'ajout est retrouvé entre 10 et 20% (entre 20 et 40 ng/L), la quantification se fait par ajouts dosés et le seuil de détection est multiplié par 4 ;
  - Si l'ajout est inférieur à 10% alors le résultat est invalidé.

## **2.5. Analyse de la contamination fécale associée dans les ressources en eaux**

### **2.5.1. Analyse de la contamination fécale bactériologique**

Les analyses microbiologiques ont été réalisées au LERES par l'unité microbiologie.

Dans les échantillons d'eau de surface, les indicateurs fécaux microbiens *Escherichia coli* et entérocoques ont été dénombrés selon les méthodes des microplaques EN ISO 9308-3 (Anonymous, 1999a) et EN ISO 7899-1 (Anonymous, 1999b), respectivement. Les résultats sont exprimés en nombre le plus probable (NPP) par 100mL d'échantillon.

Dans les eaux souterraines et les eaux traitées, *Escherichia coli* et les entérocoques ont été selon les méthodes membranaires EN ISO 9308-1 (Anonyme, 2000a) et EN ISO 7899-2 (Anonymous, 2000b), respectivement. Les résultats sont exprimés en unité formant colonie (UFC) par 100 mL d'échantillon d'eau.

### **2.5.2. Analyse des stanols**

Les analyses des stanols fécaux ont été réalisées à l'UMR6118 - Géosciences Rennes par Marine Liotaud (IE CNRS) et Emilie Jardé. Le volume des échantillons est de 1 L pour les échantillons d'eau de surface et de 2 L pour les échantillons d'eaux souterraines et d'eaux traitées.

Les échantillons sont filtrés à 0,7 µm et une quantité connue de l'étalon interne cholestérol-d6 est ajoutée aux échantillons. Le pH de l'échantillon est ensuite ajusté à pH 1 avec une solution d'acide chlorhydrique à 1 M et 100 mL d'isopropanol sont ajoutés dans l'échantillon. Ensuite, le mélange est extrait en phase solide à l'aide d'un disque d'extraction (ayant été au préalable lavé au dichlorométhane et activé au méthanol). Les stanols retenus par le disque sont élués au dichlorométhane et concentrés avant analyse. Les stanols sont dérivés à 60 °C pendant 20 minutes avec un mélange de N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) et de triméthylchlorosilane (TMCS) (99/1, v/v) pour convertir les groupes hydroxyle en groupes éther triméthylsilyle. L'analyse est ensuite effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS, Shimadzu QP2010+, Shimadzu, Tokyo, Japon) avec ionisation électronique à 70 eV. La phase stationnaire est une colonne de silice greffée de SLB-5 MS (Supelco, 60 m, i.d. 0,25 mm, épaisseur de film 0,25 µm) et le gaz porteur est l'hélium, à un débit de 1 mL/min. Lors de la séparation, la température du four est

maintenue à 70 °C pendant 1 min, puis augmentée jusqu'à 130 °C avec un gradient de 15 °C/min, puis à 300 °C selon un gradient de 3 °C/min et maintenu à cette température pendant 15 min. La détection est réalisée en mode SIM (voir en **2.4.1.3.2**). La quantification est basée sur la méthode de l'étalonnage interne (à l'aide de l'ISTD 5 $\alpha$ -cholestane) et la courbe d'étalonnage externe comporte cinq points de gamme. Les étalons utilisés en étalonnage externe sont les suivants : coprostanol, épicholestanol, épiscoprostanol, épiscoprostanol, cholestanol et sitostanol. Les limites de quantification de la méthode sont de 0,01  $\mu\text{g/L}$ . Concernant l'exploitation des données, les empreintes stanols des échantillons d'eau sont étudiées à l'aide d'une analyse en composantes principales (ACP) développée par Derrien et al, (2012) pour distinguer les sources humaines, porcines et bovines de contamination fécale. Le logiciel utilisé est XLSTAT Version 2011.1.05 (Addinsoft).

## **2.6. Carbone organique dissous, débits des ressources en eaux et pluviométrie**

### **2.6.1. Carbone organique dissous (COD)**

Les analyses de COD ont été effectuées au LERES par le pôle chimie. Le COD est la somme du carbone organique contenu dans l'eau, provenant des composés de porosité inférieure à 0,45 µm. L'analyse est effectuée par oxydation chimique en respect des lignes directrices de la norme NF EN 1484 (NF EN 1484, Afnor, 1997). L'appareil utilisé est un COT-mètre TOC-VWP de chez Shimadzu.

### **2.6.2. Débits de ressources en eaux**

Les débits de ressources en eaux de surface sont obtenus à posteriori du prélèvement sur le site de la Banque Hydro ([www.hydro.eaufrance.fr](http://www.hydro.eaufrance.fr)). Pour chacun des captages d'intérêt, c'est le point de suivi le plus proche et situé sur la même ressource qui est retenu sur le site de la Banque Hydro.

### **2.6.3. Pluviométrie dans les 72 heures avant prélèvement**

La pluviométrie au cours de 72 heures avant réalisation des prélèvements à été obtenue via le site de Météo France ([www.meteofrance.com](http://www.meteofrance.com)). Les données de la station météorologique la plus proche de chaque captage ont été prises en compte.

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont en partie présentés sous la forme d'un article en vue d'une soumission à *Science of The Total Environment*.

Dans cet article sont présentés :

- (i) Les données d'occurrence des RMV dans les eaux brutes (méthode d'analyse multi-résidus).
- (ii) L'étude de la contamination fécale associée avec la Toolbox stanols + résidus pharmaceutiques pour déterminer l'origine de la contamination pour les molécules à usage mixte.
- (iii) Les variations saisonnières et l'étude des déterminants de la contamination.
- (iv) Les données d'occurrence des RMV dans les eaux traitées (méthode d'analyse multi-résidus).

Ces résultats sont par la suite développés et discutés dans le manuscrit.

Tout d'abord sont présentés les résultats obtenus avec la seconde méthode d'analyse, incluant le florfenicol amine et la dihydrostreptomycine, dans les EB et les ET de la 5<sup>ème</sup> campagne de mesure. En effet, cette méthode n'a pas pu être mise en œuvre lors des campagnes de mesure précédentes.

Ensuite, les résultats sont mis en perspective avec :

- Les hiérarchisations, à la fois des composés d'intérêt et des sites.
- La conservation des échantillons lors de la congélation.

Pour rappel, comme indiqué dans la partie traitant du déroulement des campagnes de prélèvements (voir **2.2.4**), les échantillons des deux premières campagnes de mesures ont été congelés sur des durées pouvant aller de 1 à 5 mois selon les échantillons.

- Les performances de la méthode d'analyse multi-résidus.

### **3.1. Veterinary pharmaceutical residues in water resources and tap water in an intensive husbandry area in France**

#### **Veterinary pharmaceutical residues in water resources and tap water in an intensive husbandry area in France**

Lise Charuaud<sup>a</sup>, Emilie Jardé<sup>b</sup>, Anne Jaffrezic<sup>c</sup>, Marine Liotaud<sup>b</sup>, Quentin Goyat<sup>a</sup>, Fabien Mercier<sup>a</sup>, Barbara Le Bot<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR\_S 1085, F-35000 Rennes, France

<sup>b</sup>Univ Rennes, CNRS, Géosciences Rennes, UMR6118, 35000 Rennes, France

<sup>c</sup>UMR SAS, Agrocampus Oust, INRA 35000 Rennes, France

\*Corresponding author:

E-mail address: [barbara.lebot@ehesp.fr](mailto:barbara.lebot@ehesp.fr)

Postal address: EHESP/LERES, 15, avenue du Pr. Léon-Bernard, CS 74 312, 35043  
Rennes cedex, France

Tel.: +33 (0)2 99 02 29 24

## KEY WORDS

Veterinary pharmaceutical residues; natural waters; tap water; stanols

## 1. INTRODUCTION

Agriculture holds an important place in Brittany (northwest France), both economically (agricultural or agro-alimentary production) and in terms of land use. About 60% of the territory of Brittany is dedicated to agricultural activities (1 630 536 hectares out of a total regional area of 2 750 667 hectares), and is the first French region for livestock production (Chambres d'Agriculture de Bretagne, 2017). In 2016, there were approximately 7 million pigs, 2.1 million head of cattle and 89 million poultry, representing respectively 56%; 11% and 33% of the national production (Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt Bretagne, 2017a). Brittany is also one of the French regions where aquaculture activities are important, particularly for salmonid farming (Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt Bretagne, 2017b).

This intensive livestock breeding lead to greater vulnerability of the animals to develop and spread diseases as they are often confined together (Hu and Cheng, 2016). To limit this issue, veterinary pharmaceuticals (VPs) are often used not only for a curative goal, but also for prophylactic purposes (Kumar et al., 2012; Van Boeckel et al., 2015; Van Epps and Blaney, 2016). Only veterinary drugs containing a critical antibiotic (3rd and 4th generation cephalosporins, fluoroquinolones) are banned for prophylactic use since 2016 (Code de la Santé Publique, 2016). When administered to the animal, VPs may be partially metabolized in the organism. Then they are excreted in urine or feces as the parent compounds or/and as metabolites. For veterinary antibiotics, excretion rates can vary from 40% for tetracyclines to 90% for sulfonamides (Kemper, 2008; Tasho and Cho, 2016). Thus, veterinary pharmaceutical residues (VPRs) can be released to the

environment either directly with urine and feces of animals in pastures or indirectly during the spreading of contaminated manure and slurry as fertilizers on fields (Bártíková et al., 2016; Boxall, 2010; Jeon et al., 2014; Kim et al., 2011; Kools et al., 2008). Then, VPRs can reach natural waters, i.e. surface water and groundwater, via run off, erosion and leaching (Jaffrézic et al., 2017; Jeon et al., 2014; Kemper, 2008; Kim et al., 2011).

A previous study performed on VPRs in waters from nested watershed from agricultural headwater to water framework management outlet in Brittany (Jaffrézic et al., 2017), demonstrated that contamination by VPRs is an actual issue, as animal-specific pharmaceuticals were detected at all sampling dates upstream and downstream from a wastewater treatment plant and at concentrations higher than those of human-specific pharmaceuticals (i.e. maximum concentrations of 181 ng/L and 1450 ng/L for sulfamethazine and flunixin respectively). VPRs also have been widely quantified worldwide in natural waters (either surface water or groundwater) from ng/L to µg/L during the last decade (García-Galán et al., 2010; Hu et al., 2014; Iglesias et al., 2014; Kim et al., 2016; Luo et al., 2011; Ok et al., 2011; Tong et al., 2009, 2014; Wei et al., 2011; Yao et al., 2015, 2017; Zhou et al., 2016). As data on VPRs behavior in drinking water treatment plants (DWTPs) is scarce (Charuaud et al., 2019), there is a public health concern as human population may be exposed to these compounds via tap water, especially when tap water is produced with surface water resources. In Brittany, Surface water is the major resource (75%) for water production; while the national ratio is 64% groundwater and 36% surface water (ARS Bretagne, 2017). However, no data is available concerning the occurrence of VPRs in tap water even though it is a high-risk region. This lack of information is also true at the international level, where very few studies have been conducted on VPRs in tap waters (Leung et al., 2013; Ye et al., 2007). Due to the highly various physico-chemical properties of VPRs, their low concentration levels in the environment and the complexity of environmental matrices, it is difficult to

develop an optimal multi-residue analysis method for a large number of compounds. Especially since in this study the compounds belong to different therapeutic classes. There are many analytical methods dedicated to veterinary antibiotics (Gao et al., 2016; Hu et al., 2014; Tong et al., 2009; Wei et al., 2011; Xue et al., 2015; Yao et al., 2017; Zhang et al., 2014) and some dedicated to antiparasitic drugs (Krogh et al., 2008; Thompson et al., 2009; Zrnčić et al., 2014) but few include different therapeutic classes (Iglesias et al., 2012). There is therefore a need to develop specific analysis methods and the selection of the VPRs needs to be performed according to the veterinarian uses on the study site (Soulier et al. 2015).

Also, the contamination originating from veterinary medicine cannot always be distinguished from the contamination arising from human medicine, since several identical compounds are used both in veterinary and human medicine. Therefore, it is necessary to develop tools to help determine the origin of contamination in the case of mixed-use molecules. The monitoring of fecal contamination in natural water samples may be of interest.

Several tools have been developed and efficiently applied to distinguish human and animal fecal contamination in environmental matrices, such as microbiological markers (Ahmed et al., 2016; Derrien et al., 2012; Gourmelon et al., 2010; Heaney et al., 2015; Ohad et al., 2015; Raith et al., 2013; Seurinck et al., 2005; Solecki et al., 2011), viral markers (Cole et al., 2003; Gourmelon et al., 2010; Jofre et al., 2014; Lee et al., 2009; Muniesa et al., 2009; Tyagi et al., 2009) or chemical markers such as fecal stanols (Biache and Philp, 2013; Derrien et al., 2012; Gourmelon et al., 2010; Harrault et al., 2014; Jardé et al., 2018; Jeanneau et al., 2011; Leeming et al., 1996; Shah et al., 2007; Tran et al., 2015; Tyagi et al., 2009), pharmaceuticals or others compounds related to human consumption (caffeine, nicotine, artificial sweeteners) (Madoux-Humery et al., 2013; Tran et al., 2015; Wade et al., 2015). Markers of fecal contamination are often

used in association in what is called “Fecal Source Tracking (FST) Toolbox” (Gourmelon et al., 2010; Tran et al., 2015; Devane et al., 2018) in order to gain more certainty.

This study focuses on the occurrence of veterinary pharmaceutical residues in water resources and corresponding tap water at the regional scale of Brittany.

The main objective of this study is to assess the occurrence of VPRs in water resources, and corresponding tap water, in watersheds characterized by intensive livestock farming and recycling of animal waste on soils. The second objectives are to identify the sources of contamination through use chemical markers (stanols and pharmaceuticals) to determine the origin of the fecal contamination associated with the presence of VPRs and identify the factors related to the occurrence of VPRs. For these purposes, several stages were necessary as selecting the drinking water treatment plants with high husbandry pressure in Brittany and VPRs of interest, then to develop a suitable method of analysis.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### ***2.1. Sampling sites and sampling strategy***

The investigated area is the region of Brittany located in the northwest of France. The climate is temperate oceanic, with mean annual rainfall included between 617 mm and 1490 mm depending on the considered station. The morphogeological characteristics of Brittany make it a unique region for the production of drinking water. The granite and the schists, basement rocks, only contain aquifers with little capacity. These superficial resources are vulnerable, especially to anthropogenic pollution from agricultural, industrial and domestic sources, as sites are often located downstream of these activities. Groundwater also experiences these pressures because most of the drinking water treatment plants pump at shallow depths (75% of the groundwaters are collected

at a depth of less than 12 meters) (Groupe de Travail du Plan Régional Santé Environnement 2, 2015).

Water resources samples were collected from 25 sites (23 surface waters and 2 ground waters) used for tap water production and located in watersheds considered as sensitives due to intensive husbandry activities. These 25 sites are geographically distributed over the territory of Brittany and are likely to cover all local specificities in terms of breeding. Surface water samples were taken from 21 different rivers. Besides, 23 corresponding tap water sites were sampled. There are less tap water sites (23) than water resources (25), as some DWTPs operate on several sites. In practice, the samples were collected in 23 DWTPs, at the inlet and the outlet of the plant. The table S1 shows the surrounding livestock pressure on the selected sites.

Five sampling campaign were performed (March 2017, May 2017, September 2017, January 2018 and May 2018). Sampling strategy's purpose was to reflect variations in water regime (low water or high water) and to collect during manure/slurry spreading times. Table 1 shows the sampling periods and the characteristics of the five sampling campaigns.

[Table 1]

A total of 200 samples were collected for analysis, including 105 natural waters (97 surface waters and 8 groundwaters) and 95 tap waters.

For VPRs analysis, water resources or tap water are sampled in 1 L amber glass bottles containing 200  $\mu$ L of a stabilizing agent (ascorbic acid; 20 g/L) in order to block the effect of oxidants like free chlorine. 1 L of surface water or 2 L of groundwater or tap water were sampled in sterilized plastic bottles for stanols analysis. 500 mL of water resources were sampled in sterilized plastic bottles for dissolved organic carbon (DOC) analysis. 500 mL of water resources were sampled in sterilized plastic bottles with 60

mg of thiosulfate sodium for microbiological analyses. All samples were kept in ice boxes during the transport to the laboratory.

## **2.2. VPRs of interest**

A list of 38 VPRs of interest was defined according to veterinary practices in Brittany, animal targets, routes of administration, pharmacokinetics, mobility from soil to water, persistence in water and analytical feasibility (Charuaud et al., 2016).

Those 38 VPRs include several therapeutic classes such as antibiotics (21: amoxicillin (AMOX), ampicillin (AMP), cefquinome (CEF), chlortetracycline (CTC), doxycycline (DXC), enrofloxacin (ENR), erythromycin (ERY), florfenicol (FF), flumequine (FLM), lincomycin (LIN), marbofloxacin (MAR), neospiramycin (NEO), oxolinic acid (OXA), oxytetracycline (OTC), spiramycin (SPI), sulfadiazine (SDZ), sulfadimethoxine (SDM), sulfamethazine (SMZ), tilmicosin (TIL), trimethoprim (TMP), tylosin (TMP)), antiparasitic drugs (10: clorsulon (CLS), diazinon (DZ), dicyclanil (DCY), eprinomectin (EPR), flubendazole (FLB), ivermectin (IVER), levamisole (LEV), triclabendazole (TRI), triclabendazole sulfone (TRI sulfone), triclabendazole sulfoxide (TRI sulfoxide)), anticoccidians (3: toltrazuril (TOL), toltrazuril sulfone (TOL sulfone), toltrazuril sulfoxide (TOL sulfoxide)) and anti-inflammatory drugs (4: dexamethasone (DEX), flunixin (FLX), ketoprofen (KET), meloxicam (MLX)). Among these 38 residues, 5 are metabolites (neospiramycin, toltrazuril sulfone, toltrazuril sulfoxide, triclabendazole sulfone, triclabendazole sulfoxide). Moreover, carbamazepine and diclofenac have been integrated into the method as tracers for inputs of human medicine. Chemical structures of VPRs and their physico-chemical properties are described in Table S2.

#### **2.4. VPRs analysis**

Chemicals, reagents and stock solutions are described in Supplementary information S3.

At the laboratory, 200 mL of water samples are filtered through glass fiber filters of 0.7  $\mu\text{m}$  diameter (Millipore) and stored at 4 °C when the extraction could be performed in the next 48h. However, the samples from the first two sampling campaigns were stored at – 20 °C over a period of between 1 and 5 months before analysis. Samples from the other three sampling campaigns were extracted within 48 hours after sampling, according to XP T90-223 guidelines (Afnor, 2013) and analysed within 14 days.

Right prior to the extraction, sample pH is adjusted to pH2 with nitric acid (67%, VWR), and 100  $\mu\text{L}$  of a mixed solution of internal standards (0.5 mg/L) is added in each sample. Samples were extracted by solid phase extraction with a robot GX-274 ASPEC™ (Gilson) on Strata-X cartridge (200 mg, 6 mL, Phenomenex). The cartridges were conditioned with 6 mL of acetonitrile (ACN) / methanol (MeOH) (90:10 v/v) followed by 6 mL of acidified ultrapure water (pH2). Each 200 mL sample was loaded onto a cartridge at a flow rate of 10 mL/min. Cartridges were then rinsed with 10 mL of ultrapure water to get rid of the impurities, and vacuum-dried for 15 minutes. Analytes were eluted with 10 mL of ACN/MeOH (90:10 v/v) fractioned in four portions (4 x 2.5 mL). Eluates were then transferred into glass tubes to be evaporated until the drop under  $\text{N}_2$  at the temperature of 30 °C. The residues were reconstituted with 0.5 mL of  $\text{H}_2\text{O}$ /ACN (87:13 v/v) and 25  $\mu\text{L}$  of an injection tracer solution (pentabromophenol; 10 mg/L) were then added. The mixtures were ultrasonicated for 5 minutes and then transferred to 2 mL glass vial. The 38 target compounds were analysed by rapid resolution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (RRLC-MS/MS). The separation of the compounds was performed with an Agilent 1200 series system on a Xselect HSST3 column (2.1 mm x 100 mm; 2.5  $\mu\text{m}$ ; Waters). The column temperature was maintained at 40 °C. Mobile

phase was composed of A). Ultrapure water + 0.01% formic acid and B). acetonitrile + 0.01% formic acid and the flow rate was 0.4 mL/min. Initial gradients was composed of 87% (A) – 13% (B) during the first minute, followed by a linear gradient from 87% to 13% of A between 1 and 10 minutes, then maintained at 13% (A) – 87% (B) during 5 minutes and finally returning linearly to the initial gradient of 87% (A) – 13% (B) during the last two minutes. Total run time is 17 minutes. Mass spectrometric detection was performed with a triple quadrupole mass spectrometer 6460 from Agilent Technologies equipped with an electrospray ion source (ESI) operating both in the positive and negative modes during the analysis. The gas flow is nitrogen and its temperature was set to 200 °C for a flow of 5 mL/min. The sheat gas is also nitrogen with a temperature of 380 °C and a flow of 11 mL/min. Capillary voltage is 4000 V either in positive or negative mode and nozzle voltage is set at 500 V. Nebulizer is set at 45 psi. Quantification of each of VPRs of interest was performed in the multiple reaction monitoring mode (MRM). Masshunter software (Agilent) was used for instrument control, data acquisition and data analysis. The MS/MS parameters were optimized individually for each compound by Flow Injection Analysis, with standard solutions at 1 mg/L. Table 1 describes the optimal MS/MS conditions and internal standards.

[Table 1]

For each series of analysis, one blank and 8 calibration solutions prepared in Evian<sup>®</sup> water are extracted under the same conditions as the samples. An internal calibration curve is then established in quadratic mode including 7 or 8 points depending on the compound within the range limit of quantification (LOQ) – 500 ng/L. Correlation coefficients of the quadratic calibration curves must be superior or equal to 0.99. The limits of quantification (LOQ) were determined as the minimum detectable amount of analyte with a signal-to-noise ratio of 10. LOQ is either 5 ng/L or 12.5 ng/L depending on the compound.

The multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for the quantification. The most intensive and specific ion pairs, together with retention time are used to identify the VPR of interest.

Quantitative analysis is based on peak area and is performed by i) internal standard calibration and by ii) standard addition method (i.e. each sample is divided into two aliquots and one of them is spiked at 250 ng/L with the VPRs of interest to assess matrix effects and apply a correction factor).

The two MRM transition were used for quantification:

- The two results must be averaged, on condition that the difference between these two results is less than 10% in proportion to the lowest result;
- Or if the two results differ by more than 10%, the lower value is retained.

When concentration levels of VPR are beyond the calibration range, the sample is diluted, re-analysed and a dilution coefficient is applied to obtain the initial concentration.

The VPRs recoveries were assessed at three concentrations levels (LOQ, 100 ng/L and 500 ng/L) in 6 different environmental matrices (2 surface waters, 1 groundwater and 3 tap waters). Table S5 in supplementary information resumes the LOQs, the recoveries and the relative standard deviations obtained for all compounds with the transition with the lowest performance. At the LOQs, all recoveries are included between 69% and 187% except for 14 VPRs (AMOX, CEF, CLS, DCY, FF, FLM, LIN, NEO, SPI, SMZ, TIL, TOL, TRI sulfone, TYL) which were subjected to important matrix effects. At 100 ng/L and 500 ng/L, all recoveries were included between 59% and 156% except for 4 VPRs (AMOX, LIN, NEO, TYL).

## **2.5. Stanols analysis**

Fecal stanols were extracted from filtered (0.7 µm glass-fiber) water samples (1 L) by solid phase extraction and quantified by gas chromatography coupled to mass

spectrometry using an internal calibration as described by Jeanneau et al. (2011). The procedure is described in detail in the S3 in supplementary information.

### **2.6. *Escherichia coli* (*E. coli*) analysis**

Microbial fecal indicator *E. coli* in surface water samples were counted using microplate methods (EN ISO 9308-3 (Anonymous, 1999a) with a detection limit of 15 most probable number (MPN) per 100 mL of water sample. In groundwater, *E. coli* was counted using membrane methods (EN ISO 9308-1 (Anonymous, 2000a) with a detection limit of 1 colony forming unit (CFU) per 100 mL of water sample.

### **2.7 Dissolved organic carbon (DOC) analysis, daily flow rates and rainfall**

The samples are filtered at 0.45 µm and the analysis is carried out by chemical oxidation according to standard NF EN-1484 (1997) on a Total Organic Carbon analyzer TOC-VWP (Shimadzu).

Daily flow rates data were collected after sampling on the website of the hydrological data bank (<http://hydro.eaufrance.fr/>). The closest site on the same water resource was chosen to assess the daily flow rates of the selected sites.

Rainfall during the 72 hours before sampling was collected after sampling on the website Meteo France ([www.meteofrance.com/](http://www.meteofrance.com/)). The closest weather station of the water resources was chosen to gather the data.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 *Veterinary pharmaceutical residues occurrences in water resources*

In 32% of water resources samples at least one VPR was quantified (i.e. 34 out of the 105 samples analysed). Within the positive samples of water resources, two were groundwater (8 groundwater samples analysed) and the other samples were surface waters. Quantified VPRs and their concentration levels are shown in Figure 1.

[Figure 1]

17 VPRs were quantified out of 38 compounds analysed. Nine antibiotics were quantified (FF, FLUM, LIN, NEO, OTC, SDZ, SMZ, TIL, TMP), six anti-parasitic drugs (EPR, IVER, LEV, TRI, TRI sulfone, TRI sulfoxide) and two anti-inflammatory drugs, KET). Among these compounds, eight are mixed-use compounds (FLM, KET, LEV, LIN, NEO, OTC, SDZ, TMP) and nine are only used in veterinary medicine (EPR, FF, FLX, IVER, SMZ, TIL, TRI, TRI sulfone, TRI sulfoxide). LIN and TIL were quantified at concentrations close to limit of quantification with significant uncertainties (1878% for LIN and 360% for TIL) of measurement but the information were retained. 21 VPRs were never quantified in water resources during this study (13 antibiotics: AMOX, AMP, CEF, CTC, DXC, ENR, ERY, MAR, OXA, SDM, SPI, TYL; 4 antiparasitic drugs: CLS, DCY, DZ, FLB; the anticoccidian TOL and its metabolite TOL sulfone and TOL sulfoxide; 2 anti-inflammatory drugs: DEX, MLX). Among these 21 compounds not detected, some could be degraded by freezing. As samples have been frozen before analysis in sampling campaign SC1 and SC2, the conservation of VPRs during freezing was tested on two water samples (one surface water sample and one tap water sample) spiked with all compounds. At -20 °C, penicillins (AMOX and AMP) were completely degraded in less than two weeks in both matrices (data not shown). Tetracyclines (CTC, DXC, OTC) were completely degraded in tap water matrix within 48 hours (data not shown). No information could be interpreted for the other compounds, and supplementary experiments are needed for validate the

conservation of compounds by freezing. However, concentration levels may be underestimated. In addition,  $\beta$ -lactams AMOX, AMP and CEF may have been hydrolyzed in the aquatic environment (Braschi et al., 2013; Jiang et al., 2010; Li et al., 2011; Mitchell et al., 2014). The antiparasitic drugs DCY and FLB were reported to be the less prescribed of the studied VPRs in Brittany, which may explain that they were not detected. Individual detection frequencies of VPRs in water resources are below 10% for all compounds (figure 1). 82% of the quantified compounds have concentrations below 80 ng/L, 16% of VPRs concentrations are included between 100 ng/L and 1  $\mu$ g/L and only one VPR was quantified at concentration above 1  $\mu$ g/L. Among the 5 metabolites investigated, 3 were detected (NEO, TRI sulfone, TRI sulfoxide). Among the 17 VPRs quantified in water resources in this study, 11 have been previously found in natural waters at similar concentrations (FF, FLM, FLX, LEV, IVER, OTC, SDZ, SMZ, TIL, TMP, TRI) (Charuaud et al., 2019; Sinclair et al., 2007). For example, SDZ (from 508 ng/L to 2946 ng/L in this study) has been quantified in surface water up to 2313 ng/L in the Llobregat River in Spain (Iglesias et al., 2014) and FF (from 7 ng/L<sup>1</sup> to 930 ng/L in this study) was quantified in South Korea up to 340 ng/L (Kim et al., 2016) and in China up to 930 ng/L (Zhou et al., 2016). On the other hand, SDZ and TMP were quantified at lower concentrations in the other study performed in Brittany (Jaffrézic et al., 2017), with SDZ ranging from 15 ng/L to 35 ng/L and TMP ranging from 3 ng/L to 23 ng/L. However, FLX (from 35 to 1450 ng/L), FLM (from 1 ng/L to 143 ng/L) and LIN (from 6 ng/L to 163 ng/L) concentrations were higher in Jaffrézic et al. (Jaffrézic et al., 2017).

To our knowledge, this study is the first to provide data on the occurrence in natural waters of the antiparasitic drug EPR (7 ng/L to 45 ng/L) and of the three following metabolites: NEO (24 ng/L), metabolite of the antibiotic SPI, TRI sulfone (9 ng/L) and TRI sulfoxide (6 ng/L to 8 ng/L) which are metabolites of the antiparasitic drug TRI.

There were no VPRs quantified in 7 of the 25 studied sites. On a same site, a maximum of 9 VPRs were quantified. One or two VPRs were quantified in 11 sites, but in only three sites, VPRs exclusively used in veterinary medicine have been quantified. These three sites (B, I and U) have very different characteristics, two are surface waters (one river and one dam and the last one is a 20 meter depth groundwater). The main livestock is poultry on two sites (B and I) and cattle on the other one (U). TIL and FLX were quantified on site U which is consistent with the main livestock as these compounds can be administered to cattle. However, EPR, IVER and TRI sulfoxide were quantified on site I, while these VPRs are not administered to poultry. Although, swine and cattle can be found in the watershed even if poultry is the major livestock. Sites U and B have shown the presence of VPRs in only one sampling campaign, respectively SC2 (spreading time) and SC3 (low water period), and site I during both SC2 and SC3.

### **3.3. Associated fecal contamination in water resources**

#### **3.3.1. Fecal contamination in water resources**

Among the 34 natural water samples with quantified VPRs, 88% presented associated fecal contamination, according to *E. coli*.

The origin of the fecal contamination identified with fecal stanols is combined with the source of fecal contamination obtained from pharmaceutical residues to get the overall sources of fecal contamination of the sample. Among the 34 samples of water resources with quantified VPRs, 62% of fecal contaminations have a mixed origin, i.e. both human and animal; 35% is of animal origin and 3% is of human origin only. Thus, 97% of the samples have shown a fecal contamination totally or partly attributed to an animal source.

#### **3.3.2. Determination of origin of mixed-use compounds in water resources**

Mixed-use pharmaceuticals were quantified in twelve samples of water resources (35% of the samples with VPRs quantified). The sources of fecal contaminations of these 12 samples are described in the table 3.

[Table 3]

Nine samples have a mixed overall fecal contamination, thus the source of contamination for the mixed-use VPR in the samples could not be differentiate with the fecal stanols or with pharmaceuticals. The antiparasitic drug LEV was once linked to a human origin thanks to the presence of CBZ in the sample. The VPRs contamination of two samples was attributed to an animal origin and more specifically to cattle. OTC and TMP were quantified in the A sample. SDZ, TMP and NEO (spiramycin metabolite) were quantified in the G sample. The bovine origin of the contamination is plausible as all those compounds are administered to cattle. Primary livestock is aquaculture on site G and both aquaculture and poultry on site A. SDZ, OTC and TMP are compound that are administered in aquaculture. SPI (the parent compound of NEO) is administered to swine, cattle and poultry. In addition to aquaculture activities, there are also cattle, pig and poultry farms nearby the site G, thus the quantification of NEO is consistent with the breeding types.

The results obtained with the two kind of markers in this study (i.e stanols and pharmaceuticals) have been classified into the following groups according to Jardé et al. (Jardé et al., 2018)

Group 1: both markers had the same source of fecal contamination (either a single source or a combination of sources)

Group 2: one marker has assigned a source of fecal contamination (either a single source or a combination of sources) while the second markers did not provide a source of fecal contamination

Group 3: the two markers gave different assignments (no common source attributed between the stanols and the pharmaceuticals)

Group 4: none of the markers was detected or quantified.

Among the 12 samples of water resources in which mixed-used VPRs were quantified, half were attributed to group A (n=6) and the other half were attributed to group 2 (n=6). No samples with quantified VPRs were attributed to group 3 and group 4, resulting in 100% of the fecal contamination of the samples assumed to be properly assigned.

Inside group A, three scenarios have been observed. In the first one, pharmaceuticals showed a mixed source of fecal contamination of the samples and stanols showed an animal source of fecal contamination. This was observed in three samples. In the second scenario, both markers have shown a mixed fecal contamination of the sample (n=2). In the last scenario, stanols have shown a mixed source of contamination and pharmaceuticals an animal source of fecal contamination (n=1). In these six samples, *E.coli* concentrations were included between 77 /100 mL and 490 /100 mL.

Inside the group B, the absence of source was mostly due to pharmaceuticals (4 samples out of 6). Samples from site A (SC1), G (SC3) and Z (SC1) are surface water. The quantified *E.coli* concentrations were respectively 260 /100 mL; 210 /100 mL and 30 /100 mL. Sample from site O (SC5) is a groundwater and *E.coli* was quantified at 20 CFU /100 mL. Pharmaceuticals markers were composed of two compounds exclusively used in human medicine (carbamazepine, diclofenac) and of 14 compounds exclusively used in veterinary medicine in France. However, other pharmaceutical residues not analysed in this study may have been present in these samples. In the two other samples (R during SC1 and Y during SC2), fecal stanol do not provide a source of fecal contamination. In these samples the associated *E. coli* concentrations were 15/100 mL (R in SC1) and 292 /100 mL (Y in SC2). The low concentration level of *E. coli* in sample R could be linked to an old fecal contamination, explaining the difficulty to identify the

origin of fecal contamination. Also, site Y has poultry and swine as primary livestock types and the fecal stanols analysis cannot identify fecal contamination from poultry.

### **3.4. Seasonal variations and factors influencing the contamination in water resources**

The table 4 summarizes the results of VPRs occurrences during the five sampling campaigns. It also summarizes the minimum and maximum DOC concentrations, *E.coli* concentrations, and daily flow rates.

[Table 4]

The two campaigns performed during spreading periods are those with both the highest (SC2; 53%) and lowest (SC5; 19%) percentage of samples with at least one quantified VPR. The highest diversity of compounds was observed during SC3, the low-water period campaign with 10 VPRs quantified. On the other hand, the lowest diversity of VPRs was observed during SC5, with 3 VPRs quantified. VPRs were quantified in the site Y in all sampling campaigns (4 sampling campaigns per performed on this site). VPRs were quantified in site L in four out of five sampling campaigns and in site G in three out of the five sampling campaigns. VPRs occurred in eight sites in two out of the five sampling campaigns and in six sites in one of the five sampling campaigns.

The Figure 4 presents the results of fecal contamination parameters (*E.coli*, enterococci) as well as DOC, daily flow rate and rainfall 72 hours before sampling over the five sampling campaigns, on all sites. The daily flow rate was unavailable for some dams and for the two groundwaters.

[Figure 4]

With regard to fecal contamination, the campaigns conducted during spreading periods (SC2 and SC5) have higher mean values of *E. coli* concentrations. However, the

samples in which VPRs have been quantified are not necessarily samples with the highest *E. coli* concentrations. As the contribution of fecal contamination in the water resources is expressed with *E. coli* concentrations, it can be concluded that, in this study, there is no evident relationship between recent fecal contamination and the occurrence of VPRs. The amounts of DOC are relatively similar between the five sampling campaigns. Mean values are included between 4.7 mg/L and 5.8 mg/L. The samples in which VPRs have been identified are distributed relatively equally to the average DOC values in the sampling campaigns. A trend only emerges in SC2, with a majority of positive samples having lower DOC amounts below the average DOC value. This may be explained by a transfer of VPRs from soil to water during the first post-spreading rainfall events before the increase in organic matter concentrations in water resources. Daily flow rates of water resources showed variations between the sampling campaigns. SC4 has the highest daily flow rates and SC3 the lowest. This is in accordance with the hydrological periods of sampling, i.e. high water for SC4 and low water for SC3. The differences in concentrations levels of VPRs between sampling campaigns shown in Table 3 may be explained in part by daily flow rates. High daily flow rates in SC4 correspond to high water regime that may have cause dilution phenomenon and low daily flow rate in SC3 corresponds to low water that may have led to concentration phenomenon.

Finally, rainfall events in the 72 hours before sampling were observed as these events can indicate an easier soil-to-water transfer by runoff. Overall, higher rainfall is observed for samples collected during the spreading periods with mean rainfall values twice of three times superior to mean rainfalls during SC1; SC3 and SC4. These two campaigns seem to have been conducted under suitable conditions for transfer processes. However, unlike SC2, SC5 exhibited a low occurrence for VPRs. This difference can be explain in part by daily flow rates as mean daily flow rate in SC5 is 3.5 higher than mean

daily flow rate during SC2, resulting in an increased dilution phenomenon in SC5. When considering the samples in which VPRs have been quantified, most of them were collected after rainfall events superior to the mean rainfall values during both SC2 and SC3. Although SC3 was carried out apart from spreading, heavy rains can remobilize VPRs previously stored in the soils or in the sediments. In the context of this large-scale study with catchments of various characteristics, it appears difficult to determine precisely the factors impacting the occurrence of VPRs.

### **3.5. Veterinary pharmaceutical residues occurrences in tap water**

On all data expected, 6.4% of the data were invalidated for non-compliance with the quality assurance criteria. At least one VPR was quantified in 20% of tap water samples (i.e. 19 samples).

The Figure 5 shows the quantified VPRs and their concentration levels in tap waters.

[Figure 5]

Twelve VPRs have been quantified in tap waters, including 10 compounds exclusively used in veterinary medicine and 2 mixed-use compounds: the antibiotic SDZ and the anti-inflammatory drug KET. Within the 10 veterinary specific compounds, 7 are antiparasitic drugs (EPR, IVER, TOL, TOL sulfone, TRI, TRI sulfone and TRI sulfoxide) including 3 metabolites (TOL sulfone, TRI sulfone and TRI sulfoxide), and 2 are antibiotics, FF and TYL. All detection frequencies are below 10%, ranging from 1% (TOL sulfone, TYL, KET) to 8% for TRI sulfoxide. Concentration levels are inferior to 40 ng/L for all compounds with the exception of FF which have been quantified at 159 ng/L and 211 ng/L. To our knowledge, only 4 studies reported VPRs occurrences in tap water as mentioned in Charuaud et al. (2019). FF has been detected (<50 ng/L) in a french national study (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, 2011), while it is reported in this present study at significant

concentrations (from 18 to 211 ng/L). These concentrations demonstrate that FF is probably not completely removed in the treatment processes used in the studied DWTPs, whereas a previous study on a full-scale DWTP had shown a removal of more than 90% after the chlorination and filtration steps, and in the end an absence of the molecule in the water of the distribution system (Azzouz and Ballesteros, 2013). This difference is unexpected as the tap waters with FF at concentration superior to 100 ng/L come from 2 DWTPs (G and J) both equipped with advanced treatments while the DWTP studied by Azzouz and Ballesteros (2013) was composed of a pre-oxidation followed by classical clarification and disinfection steps. The DWTP G was composed of a clarification process combined with powder activated carbon, ultrafiltration and disinfection. The DWTP J is composed of a pre-ozonation step followed by clarification with granular activated carbon filtration, post-ozonation and disinfection. Thus, advanced processes such as ozonation, activated carbon and ultrafiltration are not always effective in achieving complete removal of FF. The antibiotic TYL was quantified in three studies with concentrations ranging between 4 and 20 ng/L (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, 2011; Leung et al., 2013; Ye et al., 2007) and the anti-inflammatory drug KET has been quantified at 3 ng/L in another french study (Togola and Budzinski, 2008). The concentrations levels found in this study were similar to those of the literature. The antiparasitic drugs (EPR, IVER, TOL, TOL sulfone, TRI, TRI sulfone and TRI sulfoxide) quantified in this study have never been reported before in the literature.

Among the 23 DWTPs studied, 9 (i.e. 39%) showed at least one occurrence of VPR in tap water. VPRs were quantified in the tap samples originating from DWTP L in 3 sampling campaign out of five (SC1, SC2 and SC4), with a total of 7 VPRs quantified (EPR, KET, TOL, TRI, TRI sulfone and TRI sulfoxide twice). The DWTP L was composed of clarification process (coagulation flocculation and filtration) with occasional

use of powder activated carbon if needed, followed by ozonation and disinfection by chlorination.

For SC1, SC3, SC4 and SC5, VPRs were quantified in less than 20% of tap water samples. However, in SC2, VPRs occurred in 65% of tap water samples. Less VPRs have been quantified in tap water than in water resources and at lower concentrations thanks to the treatments applied in the DWTPs.

Antibiotics had lower detection frequencies in tap water than in water resources. The processes applied in DWTPs allow the removal of a part of the VPRs as it has already been observed in the literature (Boleda et al., 2011; Liu et al., 2016; Stackelberg et al., 2007). However, the opposite phenomenon was observed for the antiparasitic drugs toltrazuril and triclabendazole and also for their metabolites. The metabolites may have been formed during the treatment processes. As this is the first data on antiparasitic drugs in tap water, it needs further investigation in the future to understand this phenomenon.

#### **4. CONCLUSION**

On the basis of a prioritization work (Charuaud et al., 2016), a specific method of analysis was developed to analyze the selected VPRs in water. Five sampling campaigns were realized between 2017 and 2018. It has to be noticed that the year 2017 was unusually dry in Brittany compared to the annual means.

According to the results of this study, water resources of Brittany are subjected to contamination by residues of veterinary drugs (31% of the water resources samples contained at least one VPR). In addition, VPRs were quantified in 20% of the tap water samples collected from DWTPs. The population of Brittany may therefore be exposed to these contaminants through tap water. These observations should be compared with the detection frequencies per compound which are all below 10% in both raw and tap water.

Nevertheless, some of the results deserve to be considered for future work. As for the exclusively veterinary antibiotic florfenicol which was found in tap water at concentrations above 100 ng/L and shows certain persistence towards the advanced treatment processes applied in drinking water treatment plants. Then, antiparasitic drugs, for which there were no data on their occurrence in tap water available in the literature, have also been found. Although the concentrations are lower than that of florfenicol, more interest should be given to this subject in the future.

The combined use of fecal stanols and specific human or specific veterinary pharmaceutical residues established a proper fecal contamination source for 70% of the water resources samples. However, a majority of the samples had a mixed overall fecal contamination, thus the source of contamination for the mixed-use VPR(s) in the samples could not be identified with the Toolbox.

Finally, this is a first study conducted at the regional scale of Brittany and the understanding of the factors influencing water resources contamination by VPRs requires further investigation. Future studies should work on a more restricted-scale to take better account of the specificities of the site(s). Indeed, the catchments present great disparities (resources on rivers, on reservoirs with medium or long storage times, etc.) that require different approaches.

#### Aknowledgements:

This work was supported by La Région Bretagne (COH15002), L'Agence Française de la Biodiversité (Project no. 224), EHESP (2015/539/DRH/EHESP), ARS and DREAL Bretagne (56/2016/277), SPL Eau du Bassin Rennais and Véolia. We thank the representatives of all DWTPs for the access to the sites. We thank SPL Eau du Bassin Rennais, the Syndicat Mixte Arguenon Penthievre and Véolia for their help for the

project. We thank Delphine Pellé for her help during the method validation and Erwann Gilles for his technical assistance on the RRLLC-MS/MS system.

## REFERENCES

- Afnor, 2013. XP T90-223 - Qualité de l'eau - Dosage de certains résidus médicamenteux dans la fraction dissoute des eaux - Méthode par extraction en phase solide et analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).
- Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, 2011. Campagne nationale d'occurrence des résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine.
- Ahmed, W., Hughes, B., Harwood, V., 2016. Current Status of Marker Genes of Bacteroides and Related Taxa for Identifying Sewage Pollution in Environmental Waters. *Water* 8, 231. <https://doi.org/10.3390/w8060231>
- Anonymous, 2000. NF EN ISO 9308-1: Water Quality. Detection and Enumeration of Escherichia coli and Coliform Bacteria in Surface and Waste Water. Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora.
- Anonymous, 1999. NF EN ISO 9308-3: Water Quality. Detection and Enumeration of Escherichia coli and Coliform Bacteria in Surface and Waste Water. Miniaturized Method (Most Probable Number) by Inoculation in Liquid Medium.
- Azzouz, A., Ballesteros, E., 2013. Influence of seasonal climate differences on the pharmaceutical, hormone and personal care product removal efficiency of a drinking water treatment plant. *Chemosphere* 93, 2046–2054. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.037>
- Bártíková, H., Podlipná, R., Skálová, L., 2016. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere* 144, 2290–2301. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.137>
- Biache, C., Philp, R.P., 2013. The use of sterol distributions combined with compound specific isotope analyses as a tool to identify the origin of fecal contamination in rivers. *Water Res.* 47, 1201–1208. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.037>
- Boleda, M.R., Galceran, M.T., Ventura, F., 2011. Behavior of pharmaceuticals and drugs of abuse in a drinking water treatment plant (DWTP) using combined conventional

- and ultrafiltration and reverse osmosis (UF/RO) treatments. *Environ. Pollut.* 159, 1584–1591. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.02.051>
- Boxall, A.B.A., 2010. Veterinary Medicines and the Environment, in: Cunningham, F., Elliott, J., Lees, P. (Eds.), *Comparative and Veterinary Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 291–314. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-10324-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-10324-7_12)
- Braschi, I., Blasioli, S., Fellet, C., Lorenzini, R., Garelli, A., Pori, M., Giacomini, D., 2013. Persistence and degradation of new  $\beta$ -lactam antibiotics in the soil and water environment. *Chemosphere* 93, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.016>
- Chambres d'Agriculture de Bretagne, 2017. *Agriculture et agroalimentaire de Bretagne en clair, les chiffres*.
- Charuaud, L., Jardé, E., Jaffrezic, A., Panaget, T., Billon, M., Le Bot, B., 2016. Prioritisation of veterinary pharmaceuticals prior to a monitoring campaign: Case of Brittany, an intensive husbandry area.
- Charuaud, L., Jarde, E., Jaffrezic, A., Thomas, M.-F., Le Bot, B., 2019. Veterinary pharmaceutical residues from natural water to tap water: Sales, occurrence and fate. *J. Hazard. Mater.* 361, 169–186. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.075>
- Cole, D., Long, S.C., Sobsey, M.D., 2003. Evaluation of F+ RNA and DNA Coliphages as Source-Specific Indicators of Fecal Contamination in Surface Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6507–6514. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6507-6514.2003>
- Derrien, M., Jardé, E., Gruau, G., Pourcher, A.M., Gourmelon, M., Jadas-Hécart, A., Pierson Wickmann, A.C., 2012. Origin of fecal contamination in waters from contrasted areas: Stanols as Microbial Source Tracking markers. *Water Res.* 46, 4009–4016. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.05.003>
- Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt Bretagne, 2017a. *Memento de la Statistique Agricole*.
- Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt Bretagne, 2017b. *Tableaux de l'Agriculture bretonne, Edition 2016*.
- Gao, J., Cui, Y., Tao, Y., Huang, L., Peng, D., Xie, S., Wang, X., Liu, Z., Chen, D., Yuan, Z., 2016. Multiclass method for the quantification of 92 veterinary antimicrobial drugs in livestock excreta, wastewater, and surface water by liquid

- chromatography with tandem mass spectrometry: Liquid Chromatography. *J. Sep. Sci.* 39, 4086–4095. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600531>
- García-Galán, M.J., Garrido, T., Fraile, J., Ginebreda, A., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2010. Simultaneous occurrence of nitrates and sulfonamide antibiotics in two ground water bodies of Catalonia (Spain). *J. Hydrol.* 383, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.06.042>
- Gourmelon, M., Caprais, M.P., Mieszkin, S., Marti, R., Wéry, N., Jardé, E., Derrien, M., Jadas-Hécart, A., Communal, P.Y., Jaffrezic, A., Pourcher, A.M., 2010. Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water Res.* 44, 4812–4824. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.061>
- Groupe de Travail du Plan Régional Santé Environnement 2, 2015. Etude sur l'occurrence des résidus médicamenteux, notamment d'origine vétérinaire, dans les eaux destinées à la consommation humaine en Bretagne.
- Harrault, L., Jardé, E., Jeanneau, L., Petitjean, P., 2014. Are fecal stanols suitable to record and identify a pulse of human fecal contamination in short-term exposed shellfish? A microcosm study. *Mar. Pollut. Bull.* 89, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.037>
- Heaney, C.D., Myers, K., Wing, S., Hall, D., Baron, D., Stewart, J.R., 2015. Source tracking swine fecal waste in surface water proximal to swine concentrated animal feeding operations. *Sci. Total Environ.* 511, 676–683. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.062>
- Hu, F.-Y., He, L.-M., Yang, J.-W., Bian, K., Wang, Z.-N., Yang, H.-C., Liu, Y.-H., 2014. Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC–MS/MS. *J. Chromatogr. B* 949–950, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.008>
- Hu, Y., Cheng, H., 2016. Health risk from veterinary antimicrobial use in China's food animal production and its reduction. *Environ. Pollut.* 219, 993–997. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.099>
- Iglesias, A., Nebot, C., Miranda, J.M., Vázquez, B.I., Cepeda, A., 2012. Detection and quantitative analysis of 21 veterinary drugs in river water using high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 3235–3249. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0830-3>

- Iglesias, A., Nebot, C., Vázquez, B.I., Miranda, J.M., Abuín, C.M.F., Cepeda, A., 2014. Detection of veterinary drug residues in surface waters collected nearby farming areas in Galicia, North of Spain. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 2367–2377. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2142-7>
- Jaffrézic, A., Jardé, E., Soulier, A., Carrera, L., Marengue, E., Cailleau, A., Le Bot, B., 2017. Veterinary pharmaceutical contamination in mixed land use watersheds: from agricultural headwater to water monitoring watershed. *Sci. Total Environ.* 609, 992–1000. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.206>
- Jardé, E., Jeanneau, L., Harrault, L., Quenot, E., Solecki, O., Petitjean, P., Lozach, S., Chev e, J., Gourmelon, M., 2018. Application of a microbial source tracking based on bacterial and chemical markers in headwater and coastal catchments. *Sci. Total Environ.* 610–611, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.235>
- Jeanneau, L., Jard e, E., Gruau, G., 2011. Influence of salinity and natural organic matter on the solid phase extraction of sterols and stanols: Application to the determination of the human sterol fingerprint in aqueous matrices. *J. Chromatogr. A* 1218, 2513–2520. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.066>
- Jeon, D.S., Oh, T.-K., Park, M., Lee, D.S., Lim, Y.J., Shin, J.S., Song, S.G., Kim, S.C., Shinogi, Y., Chung, D.Y., 2014. Reactions and Behavior Relevant to Chemical and Physical Properties of Various Veterinary Antibiotics in Soil. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 59, 391–397.
- Jiang, M., Wang, L., Ji, R., 2010. Biotic and abiotic degradation of four cephalosporin antibiotics in a lake surface water and sediment. *Chemosphere* 80, 1399–1405. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.048>
- Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., Muniesa, M., 2014. Bacteriophages infecting *Bacteroides* as a marker for microbial source tracking. *Water Res.* 55, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.006>
- Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.* 8, 1–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>
- Kim, K.-R., Owens, G., Kwon, S.-I., So, K.-H., Lee, D.-B., Ok, Y.S., 2011. Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water, Air, Soil Pollut.* 214, 163–174. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0412-2>
- Kim, Y., Lee, K.-B., Choi, K., 2016. Effect of runoff discharge on the environmental levels of 13 veterinary antibiotics: A case study of Han River and Kyungahn Stream, South Korea. *Mar. Pollut. Bull.* <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.011>

- Kools, S.A., Boxall, A., Moltmann, J.F., Bryning, G., Koschorreck, J., Knacker, T., 2008. A ranking of European veterinary medicines based on environmental risks. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4, 399–408.
- Krogh, K.A., Björklund, E., Loeffler, D., Fink, G., Halling-Sørensen, B., Ternes, T.A., 2008. Development of an analytical method to determine avermectins in water, sediments and soils using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1211, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.081>
- Kumar, R.R., Lee, J.T., Cho, J.Y., 2012. Fate, occurrence, and toxicity of veterinary antibiotics in environment. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 55, 701–709. <https://doi.org/10.1007/s13765-012-2220-4>
- Lee, J.E., Lim, M.Y., Kim, S.Y., Lee, S., Lee, H., Oh, H.-M., Hur, H.-G., Ko, G., 2009. Molecular Characterization of Bacteriophages for Microbial Source Tracking in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7107–7114. <https://doi.org/10.1128/AEM.00464-09>
- Leeming, R., Ball, A., Ashbolt, N., Nichols, P., 1996. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Res.* 30, 2893–2900. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00011-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00011-5)
- Leung, H.W., Jin, L., Wei, S., Tsui, M.M.P., Zhou, B., Jiao, L., Cheung, P.C., Chun, Y.K., Murphy, M.B., Lam, P.K.S., 2013. Pharmaceuticals in Tap Water: Human Health Risk Assessment and Proposed Monitoring Framework in China. *Environ. Health Perspect.* 121, 839–846. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206244>
- Li, X., Zheng, W., Machesky, M.L., Yates, S.R., Katterhenry, M., 2011. Degradation Kinetics and Mechanism of Antibiotic Ceftiofur in Recycled Water Derived from a Beef Farm. *J. Agric. Food Chem.* 59, 10176–10181. <https://doi.org/10.1021/jf202325c>
- Liu, J., Sun, Q., Zhang, C., Li, H., Song, W., Zhang, N., Jia, X., 2016. Removal of typical antibiotics in the advanced treatment process of productive drinking water. *Desalination Water Treat.* 57, 11386–11391. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1040848>
- Luo, Y., Xu, L., Rysz, M., Wang, Y., Zhang, H., Alvarez, P.J.J., 2011. Occurrence and Transport of Tetracycline, Sulfonamide, Quinolone, and Macrolide Antibiotics in the Haihe River Basin, China. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1827–1833. <https://doi.org/10.1021/es104009s>

- Madoux-Humery, A.-S., Dorner, S., Sauvé, S., Aboufadi, K., Galarneau, M., Servais, P., Prévost, M., 2013. Temporal variability of combined sewer overflow contaminants: Evaluation of wastewater micropollutants as tracers of fecal contamination. *Water Res.* 47, 4370–4382. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.030>
- Mitchell, S.M., Ullman, J.L., Teel, A.L., Watts, R.J., 2014. pH and temperature effects on the hydrolysis of three  $\beta$ -lactam antibiotics: Ampicillin, cefalotin and cefoxitin. *Sci. Total Environ.* 466–467, 547–555. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.027>
- Muniesa, M., Payan, A., Moce-Llivina, L., Blanch, A.R., Jofre, J., 2009. Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. *Water Res.* 43, 1559–1564. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.038>
- Ohad, S., Vaizel-Ohayon, D., Rom, M., Guttman, J., Berger, D., Kravitz, V., Pilo, S., Huberman, Z., Kashi, Y., Rorman, E., 2015. Microbial Source Tracking in Adjacent Karst Springs. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5037–5047. <https://doi.org/10.1128/AEM.00855-15>
- Ok, Y.S., Kim, S.-C., Kim, K.-R., Lee, S.S., Moon, D.H., Lim, K.J., Sung, J.-K., Hur, S.-O., Yang, J.E., 2011. Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province, Korea. *Environ. Monit. Assess.* 174, 693–701.
- Raith, M.R., Kelty, C.A., Griffith, J.F., Schriewer, A., Wuertz, S., Mieszkin, S., Gourmelon, M., Reischer, G.H., Farnleitner, A.H., Ervin, J.S., Holden, P.A., Ebentier, D.L., Jay, J.A., Wang, D., Boehm, A.B., Aw, T.G., Rose, J.B., Balleste, E., Meijer, W.G., Sivaganesan, M., Shanks, O.C., 2013. Comparison of PCR and quantitative real-time PCR methods for the characterization of ruminant and cattle fecal pollution sources. *Water Res.* 47, 6921–6928. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.061>
- Seurinck, S., Verstraete, W., Siciliano, S.D., 2005. Microbial Source Tracking for Identification of Fecal Pollution. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 4, 19–37. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-4997-7>
- Shah, V.G., Hugh Dunstan, R., Geary, P.M., Coombes, P., Roberts, T.K., Von Nagy-Felsobuki, E., 2007. Evaluating potential applications of faecal sterols in distinguishing sources of faecal contamination from mixed faecal samples. *Water Res.* 41, 3691–3700. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.006>

- Sinclair, C.J., Ramwell, C.T., Turnbull, G., Bryning, G., Lynn, R., Franey, M., Pepper, T., Fogg, L., Boxall, A.B.A., 2007. Assessment and management of inputs of veterinary medicines from the farmyard 102.
- Solecki, O., Jeanneau, L., Jardé, E., Gourmelon, M., Marin, C., Pourcher, A.M., 2011. Persistence of microbial and chemical pig manure markers as compared to faecal indicator bacteria survival in freshwater and seawater microcosms. *Water Res.* 45, 4623–4633. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.06.012>
- Stackelberg, P.E., Gibs, J., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Lippincott, R.L., 2007. Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. *Sci. Total Environ.* 377, 255–272. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.095>
- Tasho, R.P., Cho, J.Y., 2016. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. *Sci. Total Environ.* 563–564, 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.140>
- Thompson, T.S., Noot, D.K., Forrest, F., van den Heever, J.P., Kendall, J., Keenlside, J., 2009. Large volume injection for the direct analysis of ionophores and avermectins in surface water by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 633, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.024>
- Togola, A., Budzinski, H., 2008. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 1177, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.105>
- Tong, L., Huang, S., Wang, Y., Liu, H., Li, M., 2014. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment of Jiangnan Plain, central China. *Sci. Total Environ.* 497–498, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.068>
- Tong, L., Li, P., Wang, Y., Zhu, K., 2009. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* 74, 1090–1097. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.051>
- Tran, N.H., Gin, K.Y.-H., Ngo, H.H., 2015. Fecal pollution source tracking toolbox for identification, evaluation and characterization of fecal contamination in receiving urban surface waters and groundwater. *Sci. Total Environ.* 538, 38–57. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.155>

- Tyagi, P., Edwards, D.R., Coyne, M.S., 2009. Distinguishing between human and animal sources of fecal pollution in waters: a review. *Int. J. Water* 5, 15. <https://doi.org/10.1504/IJW.2009.023080>
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Van Epps, A., Blaney, L., 2016. Antibiotic Residues in Animal Waste: Occurrence and Degradation in Conventional Agricultural Waste Management Practices. *Curr. Pollut. Rep.* 2, 135–155. <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0037-1>
- Wade, C., Otero, E., Poon-Kwong, B., Rozier, R., Bachoon, D., 2015. Detection of human-derived fecal contamination in Puerto Rico using carbamazepine, HF183 Bacteroides, and fecal indicator bacteria. *Mar. Pollut. Bull.* 101, 872–877. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.016>
- Wei, R., Ge, F., Huang, S., Chen, M., Wang, R., 2011. Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere* 82, 1408–1414. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.067>
- Xue, Q., Qi, Y., Liu, F., 2015. Ultra-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for the analysis of antibiotic residues in environmental waters. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 16857–16867. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4900-1>
- Yao, L., Wang, Y., Tong, L., Deng, Y., Li, Y., Gan, Y., Guo, W., Dong, C., Duan, Y., Zhao, K., 2017. Occurrence and risk assessment of antibiotics in surface water and groundwater from different depths of aquifers: A case study at Jiangnan Plain, central China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 135, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.006>
- Yao, L., Wang, Y., Tong, L., Li, Y., Deng, Y., Guo, W., Gan, Y., 2015. Seasonal variation of antibiotics concentration in the aquatic environment: a case study at Jiangnan Plain, central China. *Sci. Total Environ.* 527–528, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.091>
- Ye, Z., Weinberg, H.S., Meyer, M.T., 2007. Trace Analysis of Trimethoprim and Sulfonamide, Macrolide, Quinolone, and Tetracycline Antibiotics in Chlorinated

- Drinking Water Using Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 79, 1135–1144. <https://doi.org/10.1021/ac060972a>
- Zhang, X., Li, Y., Liu, B., Wang, J., Feng, C., Gao, M., Wang, L., 2014. Prevalence of Veterinary Antibiotics and Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in the Surface Water of a Livestock Production Region in Northern China. *PLoS ONE* 9, e111026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111026>
- Zhou, L.-J., Wu, Q.L., Zhang, B.-B., Zhao, Y.-G., Zhao, B.-Y., 2016. Occurrence, spatiotemporal distribution, mass balance and ecological risks of antibiotics in subtropical shallow Lake Taihu, China. *Env. Sci Process. Impacts* 18, 500–513. <https://doi.org/10.1039/C6EM00062B>
- Zrnčić, M., Gros, M., Babić, S., Kaštelan-Macan, M., Barcelo, D., Petrović, M., 2014. Analysis of anthelmintics in surface water by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 99, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.091>

## TABLES and FIGURES

Table 1: Sampling periods and characteristics of the sampling campaigns

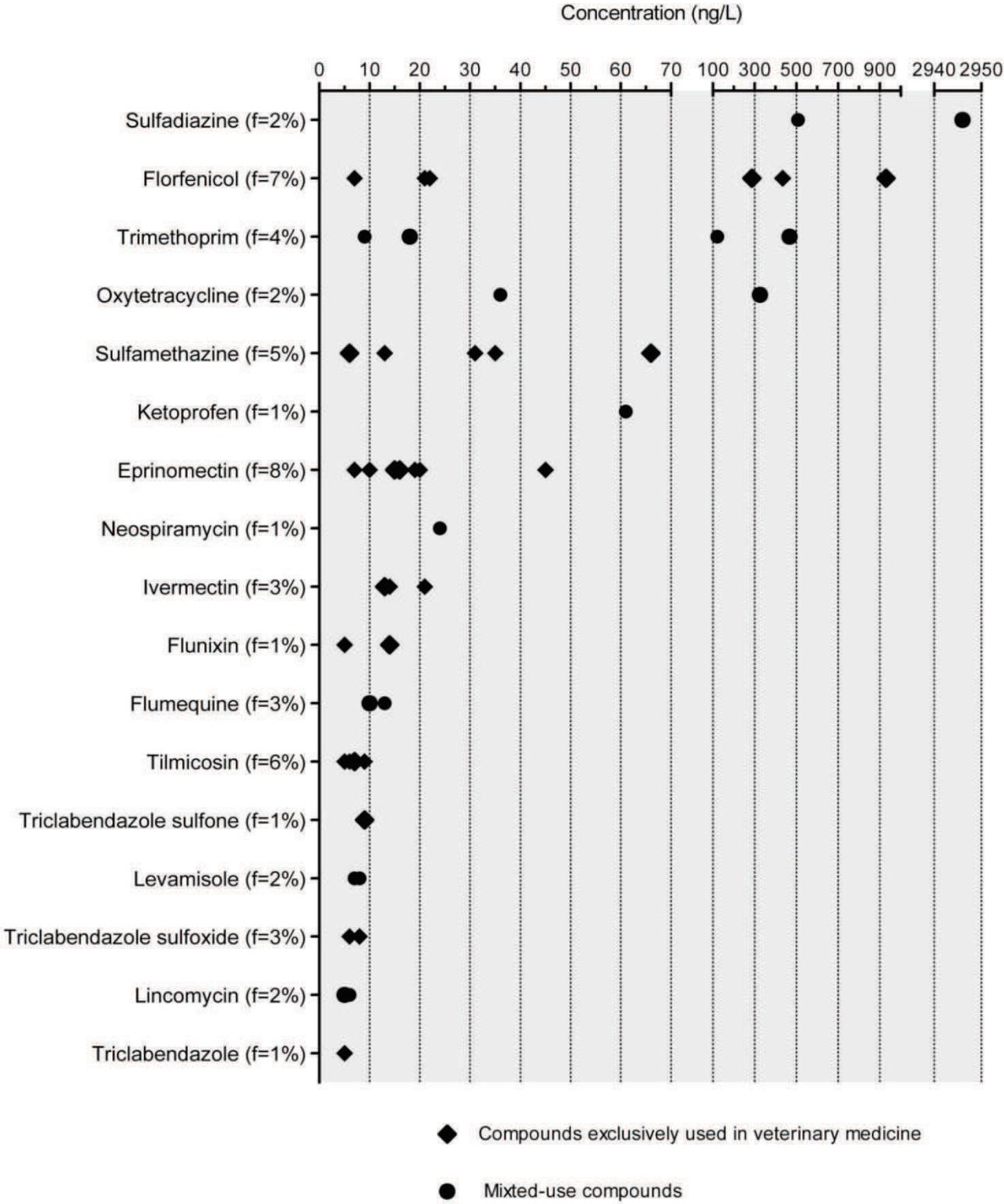
<b>Sampling campaign</b>	<b>Sampling Period</b>	<b>Characteristics</b>
1	march 2 <sup>nd</sup> -april 6 <sup>th</sup> 2017	Before animal manure spreading times
2	may 2 <sup>nd</sup> – june 13 <sup>th</sup> 2017	During manure and slurry spreading times
3	july 10 <sup>th</sup> – october 12 <sup>th</sup> 2017	Low-water period
4	january 4 <sup>th</sup> – february 10 <sup>th</sup> 2018	High-water period
5	may 2 <sup>nd</sup> – june 13 <sup>th</sup> 2018	During manure and slurry spreading times

Table 2: MS/MS conditions of the method of analysis of VPRs and selected internal standards

Compound	Precursor ions	Product ions	Capillary tension (V)	Energies Collision (eV)	ESI Polarity	Internal standard
Amoxicillin (AMOX)	366	114	90	16	+	Amoxicillin-(phenyl- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ) (372-114)
Ampicillin (AMP)	350	174	115	10	+	Ampicillin D5 (355-111)
		106		14		
Cefquinome (CEF)	134	106	130	28	+	Pentabromophénol 488-488
		77		42		
Sulfadiazine (SDZ)	251	156	105	12	+	Sulfadiazine-(phenyl- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ) (257-162)
		92		28		
Sulfadimethoxine (SDM)	311	245	150	16	+	Sulfadimethoxine-(phenyl- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ) (317-156)
		65		58		
Sulfamethazine (SMZ)	279	186	120	0	+	Sulfamethazine-(phenyl- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ) (285-186)
		124		16		
Trimethoprim (TMP)	291	230	130	20	+	Levamisole D5 (210-183)
		261		22		
Oxytetracycline (OTC)	461	444	105	8	+	Demeclocycline (465-448)
		426		16		
Chlortetracycline (CTC)	479	462	125	16	+	Demeclocycline (465-448)
		444		2		
Doxycycline (DC)	444	428	150	16	+	Pentabromophenol 488-488
Oxolinic acid (OXA)	262	216	110	28	+	Carbamazepine <sup>13</sup> C <sub>6</sub> (243-171,5)
		244		14		
Flumequine (FLM)	262	244	110	16	+	Pentabromophenol 488-488
		202		18		
Enrofloxacin (ENR)	360	342	110	18	+	Enrofloxacin D5 (365-321)
		316		14		
Marbofloxacin (MAR)	363	193	90	8	+	Enrofloxacin D5 (365-321)
		72		22		
Erythromycin (ERY)	734.4	158	170	30	+	Erythromycin D6 (741-122.5)
		83		55		
Spiramycin (SPI)	843	174	130	36	+	Spiramycin D3 (847-174)
		101		38		
Neospiramycin (NEO)	700	540	170	16	+	Spiramycin D3 (847-174)
		174		26		
Tilmicosin (TIL)	869.6	174	190	48	+	Toltrazuril D3 427-427
		696		46		
Tylosin (TYL)	916	772	90	30	+	Pentabromophenol 488-488
		174		40		
Lincomycin (LIN)	407	126	150	38	+	Triclabendazole D3 365-347
		359		16		
Florfenicol (FF)	356	185	150	12	-	Florfenicol D3 (359-339)
		336		0		
Levamisole (LEV)	205	178	130	20	+	Levamisole D5 (210-183)
		90		44		
Eprinomectin (EPR)	914.4	298	110	16	+	Emamectin (886-158)
		186		14		
Ivermectin (IVER)	897.5	753	330	46	+	Emamectin (886-158)
		329		60		

Diazinon (DZ)	305	153	110	16	+	Diazinon D10 315-170
		169		16		
Dicyclanil (DCY)	191	150	110	17	+	Dexamethasone D4 (397-377)
		67		41		
Clorsulon (CLS)	377.5	342	150	3	-	Clorsulon- (phenyl <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ) (383-348)
Flubendazole (FLB)	314	123	170	38	+	Flubendazole D3 (317-282)
		282		22		
Toltrazuril (TOL)	424	424	120	0	-	Toltrazuril D3 427-427
Toltrazuril sulfone (TOL sulfone)	456	456	110	0	-	Toltrazuril sulfone D3 459-459
Toltrazuril sulfoxide (TOL sulfoxide)	440	371	130	10	-	Ketoprofen D3 (258-212)
		440		0		
Triclabendazole (TRI)	357	197	80	28	-	Triclabendazole D3 365-347
		342		16		
Triclabendazole sulfone (TRI sulfone)	389	244	180	22	-	Toltrazuril D3 427-427
		310		22		
Triclabendazole sulfoxide (TRI sulfoxide)	372.6	213	120	28	-	Toltrazuril D3 427-427
		358		8		
Ketoprofen (KET)	255	209	130	8	+	Ketoprofen D3 (258-212)
		77		40		
Flunixin (FLX)	29	239	90	28	+	Flunixin D3 (300-282)
		279		22		
Dexamethasone (DEX)	393	147	110	28	+	Dexamethasone D4 (397-377)
		373		14		
Meloxicam (MLX)	352	115	130	24	+	Meloxicam D3 355-115
		141		24		
Diclofenac (DFC)	294	250	70	2	-	Diclofenac (acetophenyl <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ) (300-256)
Carbamazepine (CBZ)	237	179	170	34	+	Carbamazepine <sup>13</sup> C <sub>6</sub> (243-171,5)
		192		22		

Figure 1: Concentration levels of VPRs quantified in water resources (all sampling campaigns considered)



f: detection frequency of the VPR in water resources (all sampling campaigns considered)  
All concentrations are reported in Supplementary Information S3

Table 3: Sources of faecal contamination in the samples with mixed-use compounds.

Site	Mixte-use VPR	Source of faecal contamination determined by stanols	Source of faecal contamination determined by pharmaceuticals	Source of global faecal contamination
A (SC3)	Oxytetracycline Trimethoprim	Cattle	nd <sup>b</sup>	Animal (bovine)
G (SC3)	<u>Neospiramycin</u> Sulfadiazine, Trimethoprim	Cattle	nd	Animal (bovine)
J (SC3)	Sulfadiazine, Trimethoprim	Cattle (61%)/ Swine (35%)	Mixed	Mixed
L (SC3)	Oxytetracycline, Trimethoprim	Swine (65%)/ Cattle (20%)	Mixed	Mixed
O (SC5)	Ketoprofen	Cattle (44%)/Human (30%)	nd	Mixed
Q (SC1)	Levamisole	Swine (46%) / Human (42%) / Cattle (12%)	Mixed	Mixed
R (SC1)	Levamisole	- <sup>a</sup>	Human	Human
R (SC4)	Lincomycin	Cattle (33%) /Swine (20%) /Human (47%)	Human	Mixed
Y (SC1)	Flumequine	Swine (56%)/ Cattle (29%)/ Human (15%)	Mixed	Mixed
Y (SC2)	Flumequine	-	Mixed	Mixed
Y (SC3)	Flumequine	Cattle	Mixed	Mixed
Z (SC1)	Lincomycin	Swine (54%) / Cattle (31%) / Human (15%)	nd	Mixed

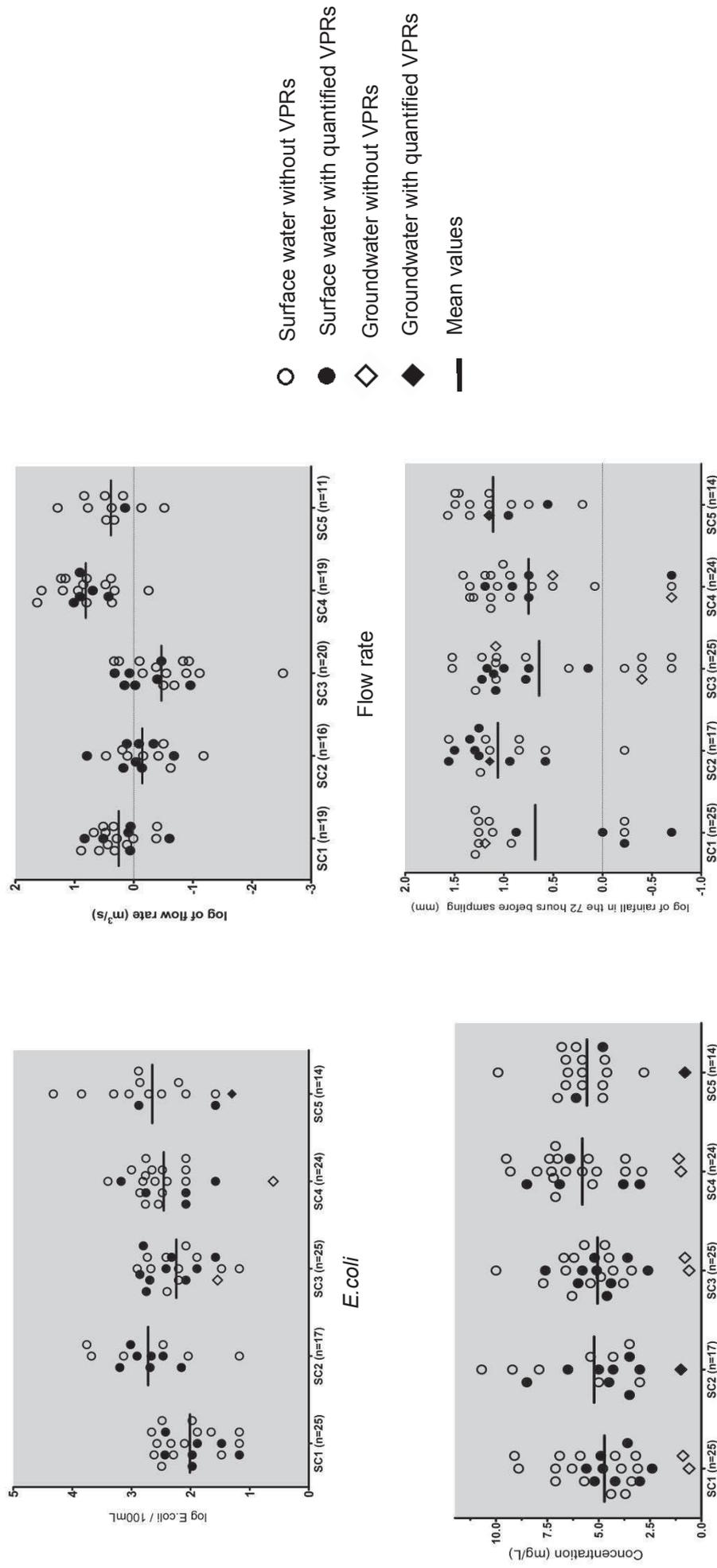
<sup>a</sup> The source of faecal contamination could not be attributed by the distribution of the stanols

<sup>b</sup> Not detected

Table 4: Summary of sampling campaign results

Sampling campaign	Percentages of samples with quantified VPRs	Number of different VPRs quantified in water resources (/38)	Concentration minimum (ng.L <sup>-1</sup> ) (VPR)	Concentration maximum (ng.L <sup>-1</sup> ) (VPR)	DOC min –max (mg/L) (surface waters)	E. coli min – max (/100mL) (surface waters)	Daily flow rate min-max (m <sup>3</sup> /s) (surface waters)
1	32% (frozen samples)	6	6 (LIN)	35 (SMZ)	2.4 – 9.1	15 - 457	0.25 – 7.78
2	53% (frozen samples)	9	5 (FLX; TRI)	436 (FF)	3.0 – 10.7	15 - 5712	0.07 – 6.18
3	36%	10	5 (TIL)	2946 (SDZ)	2.6 – 10.0	15 - 800	0.003 – 2.15
4	21%	5	5 (LIN)	16 (EPR)	2.9 – 9.5	38 - 2500	0.12 – 42.90
5	19%	3	13 (IVER)	287 (FF)	2.8 – 9.9	38 - 21000	0.30 – 19.4

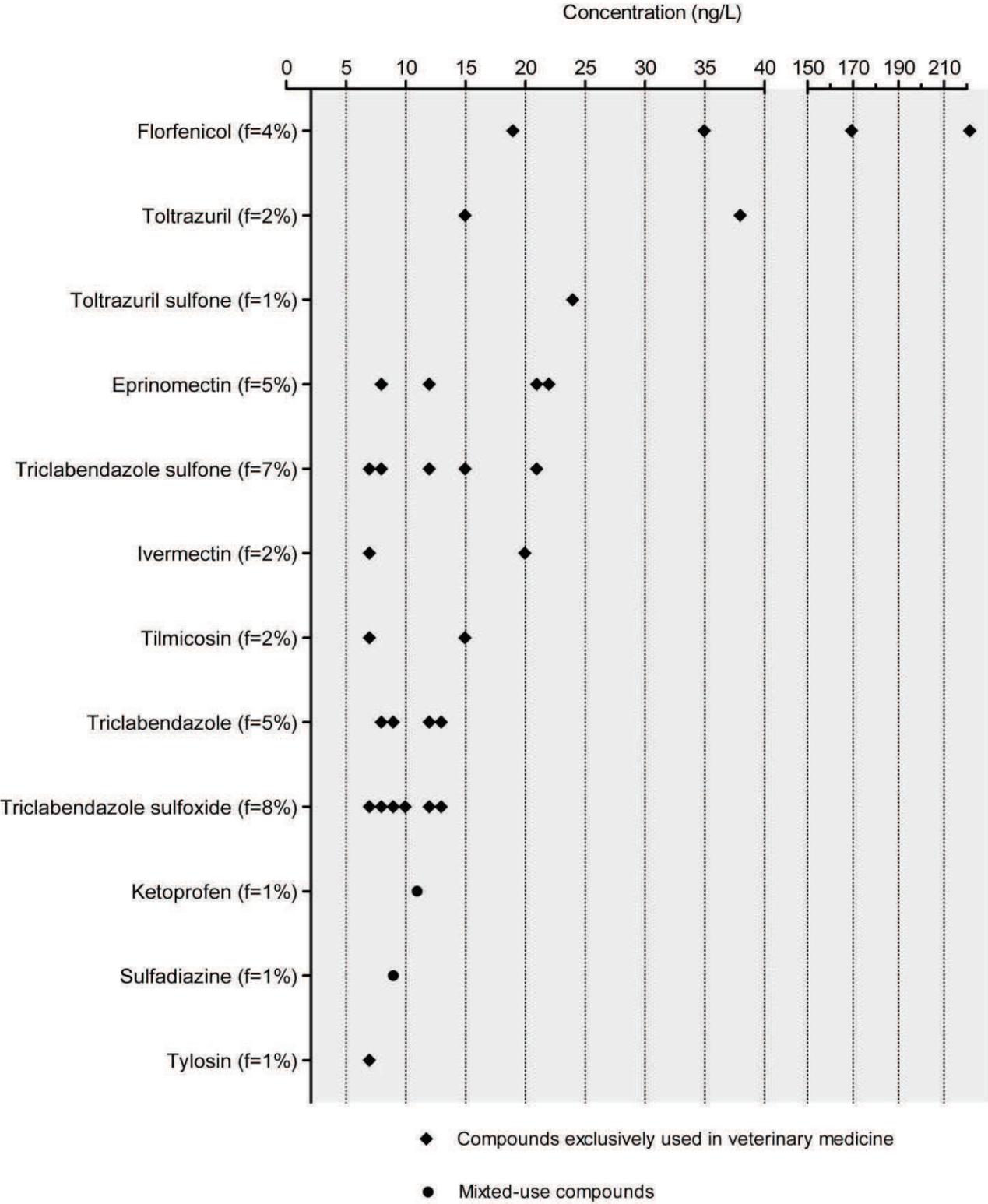
Figure 2: Results of *E.coli*, DOC, daily flow rate and rainfall during 72 hours before sampling over the five sampling campaigns (SC), all sites combined. Values below LQ were considered as zero. These zero values are not reported on the graphics expressed in logarithm.



Rainfall during the 72 hours before sampling

DOC

Figure 3: Concentration levels of VPRs quantified in tap waters



f = detection frequency of the VPR in tap water (all sampling campaigns considered)

### **3.2. Résultats obtenus avec la seconde méthode d'analyse des RMV**

La seconde méthode d'analyse à deux RMV, incluant l'antibiotique dihydrostreptomycine et le florfénicol amine (métabolite du florfénicol) n'a pu être appliquée qu'à la 5<sup>ème</sup> campagne de prélèvement, car son développement était encore en cours pendant les autres campagnes de mesure. Bien que pour des raisons de temps, il n'ait pas été possible de réaliser des tests de conservation à la congélation pour des deux molécules, 50 échantillons congelés sélectionnés parmi les quatre premières campagnes de mesure ont été analysés. Ainsi, tous les échantillons pour lesquels le florfénicol a été quantifié ont été analysés soit 9 échantillons. Pour compléter, 41 autres échantillons ont été analysés, ceux où le plus grand nombre de RMV avaient été quantifiés ou aux concentrations les plus élevées, à la fois dans les eaux brutes et les eaux traitées.

Ni la dihydrostreptomycine ni le florfénicol amine n'ont été quantifiés parmi ces 50 échantillons, il a alors été statué de ne pas analyser les autres échantillons congelés.

Pendant la 5<sup>ème</sup> campagne de mesure, le florfénicol amine a été quantifié deux fois, en entrée et en sortie de l'usine de potabilisation K. Le florfénicol a également été quantifié dans ces deux échantillons.

En entrée de l'usine, le florfénicol et le florfénicol amine ont été quantifiés à 287 ng/L et 52 ng/L respectivement. En sortie d'usine, le ratio entre les molécules s'inverse avec le florfénicol quantifié à 33 ng/L et le florfénicol amine à 71 ng/L. Il est envisageable qu'une part du florfénicol ait été transformée en florfénicol amine lors du traitement mis en œuvre dans cette usine. La filière de traitement dans cette usine est composée d'une pré-ozonation, d'une clarification (coagulation au sulfate d'alumine, floculation décantation lamellaire à contre courant) suivie d'une filtration sur sable, d'une étape d'ozonation et d'une désinfection à l'hypochlorite de soude.

La dihydrostreptomycine n'a pas été quantifiée au cours de cette 5<sup>ème</sup> campagne de mesure.

### 3.3. Mise en perspective des résultats avec les hiérarchisations des molécules d'intérêt et des sites d'études

#### 3.3.1. Mise en perspective des résultats dans les eaux brutes avec la priorisation des molécules

Le tableau 36 présente les composés quantifiés et non quantifiés dans les eaux brutes ainsi que le groupe de criticité (entre parenthèses) auquel ils ont été attribués lors de l'exercice de hiérarchisation (voir 2.3), le groupe 1 étant le groupe le plus critique. A chaque groupe correspond également un score indiqué dans la partie 2.3 (le groupe de criticité 1 = 18 ; groupe de criticité 2 = score 17 etc.).

	Résidus de médicaments vétérinaires quantifiés dans les eaux brutes	Résidus de médicaments vétérinaires non quantifiés dans les eaux brutes
Antibiotiques (n=23)	Oxytétracycline (2), <u>néospiramycine</u> (3), sulfadiazine (3) florfenicol (4), <u>florfenicol amine</u> (4), fluméquine (5), lincomycine (5), triméthoprim (5), sulfaméthazine (7), tilmicosine (7)	Enrofloxacin (1), érythromycine (1), chlortétracycline (3), marbofloxacin (3), spiramycine (3), amoxicilline (4), doxycycline (4), sulfadiméthoxine (4), tylosine (4), acide oxolinique (5), ampicilline (6), dihydrostreptomycine (6), cefquinome (7)
Antiparasitaires (n=10)	Eprinomectine (5), ivermectine (5), lévamisole (5), triclabendazole (1), <u>triclabendazole sulfoxyde</u> (1), <u>triclabendazole sulfone</u> (1)	Clorsulon (2), diazinon (2), flubendazole (8), dicyclanil (9)
Anti-coccidiens (n=3)	/	Toltrazuril (5), <u>toltrazuril sulfoxyde</u> (5), <u>toltrazuril sulfone</u> (5)
Anti-inflammatoires (n=4)	Flunixin (4), kétoprofène (9)	Déxaméthasone (4), méloxicam (5)

Les métabolites sont soulignés

n : le nombre de molécules par famille de RMV

**Tableau 36 : RMV quantifiés ou non dans les EB et criticité attribuée lors de la hiérarchisation.**

Sur la base des groupes de criticité obtenus au cours de la hiérarchisation, une criticité moyenne a été calculée, toutes classes thérapeutiques confondues dans un premier temps, puis également par classe thérapeutique.

Toutes classes thérapeutiques confondues, la criticité moyenne est de 4,3.

50% des molécules quantifiées et 55% des molécules non quantifiées ont une criticité inférieure à 4,3.

L'erythromycine et l'enrofloxacin (criticité 1) n'ont pas été quantifiées.

Cependant, pour l'enrofloxacin, son faible Koc estimé par KocWin entraine en conflit avec les données de la littérature qui vont dans le sens d'une forte adsorption au sol des composés appartenant à la famille des fluoroquinolones comme l'enrofloxacin et la marbofloxacin. La marbofloxacin (criticité 3) n'a pas non plus été quantifiée dans les eaux brutes.

Pour les antibiotiques, la criticité moyenne est de 4,2. 50% des molécules quantifiées et 69% des molécules non quantifiées ont une criticité inférieure à 4,2.

Pour les 10 antiparasitaires, la criticité moyenne est de 3,9.

60% des antiparasitaires quantifiés et 50% des antiparasitaires non quantifiés ont une criticité inférieure à 3,9. Les deux composés dicyclanil et flubendazole n'ont pas été quantifiés lors de l'étude. Pour rappel, ces composés ont été ajoutés à la méthode d'analyse bien que n'ayant pas été retenus sur la base de leur score. Ce constat participe à montrer l'intérêt de la hiérarchisation.

L'anticoccidien toltrazuril et ses métabolites sulfone et sulfoxyde (criticité 5) n'ont pas été quantifiés dans les EB.

Pour les 4 anti-inflammatoires, la criticité moyenne est de 5,5. 50% des anti-inflammatoires quantifiés et 100% des anti-inflammatoires non quantifiés ont une criticité inférieure à 5,5.

Le kétoprofène n'avait pas été retenu lors de la hiérarchisation mais étant déjà analysé au laboratoire il a été conservé pour l'étude. Cependant, sa quantification dans les EB provient vraisemblablement d'une contamination humaine, ce composé étant très largement utilisé en médecine humaine.

De façon générale, il est difficile de conclure sur la pertinence de la méthode de hiérarchisation en fonction de l'occurrence des composés dans les EB au cours des 5 campagnes de prélèvement.

Ainsi, les critères choisis pour la hiérarchisation se justifient mais ils ont des limites.

Tout d'abord, considérons les usages en Bretagne. Ceux-ci ont été estimés lors d'entretiens auprès de 10 vétérinaires bretons présents sur deux bassins versants, l'un situé dans le Morbihan et l'autre en Ille-et-Vilaine (projet REMEDES, Soulier et al., 2015). Sur ces deux bassins versants, il a été observé des pratiques vétérinaire porcines et volailles relativement homogène, et des pratiques vétérinaires-dépendantes plus marquées pour les bovins. Mais il n'est pas exclu que les pratiques des vétérinaires bovins puissent différer encore plus à l'échelle de la région entière.

D'autre part, l'estimation de  $K_{oc}$  ou de persistance dans l'eau qui bien que pratiques dans le cadre de ce genre d'exercice comparatif, peut présenter des disparités avec les données expérimentales. Et ces dernières ont aussi leurs limites selon les conditions expérimentales mises en œuvre. De plus, bien que le nombre d'études sur le comportement des RMV ait augmenté ces dernières années, ce sont souvent les mêmes familles de composés (antibiotiques de la famille des sulfonamides, tétracyclines, fluoroquinolones ou encore macrolides) qui sont majoritairement considérées (Charuaud et al., 2019), alors que les données sont encore manquantes pour d'autres composés tels que les anticoccidiens ou les antiparasitaires).

Si l'on s'intéresse aux autres travaux de hiérarchisation appliqués au domaine des RMV au niveau international, on constate que la toxicité des composés est souvent prise en compte. Dans ce travail de thèse, la toxicité n'a pas été utilisée pour deux raisons : d'une part le fait que les données ne sont pas accessibles pour un grand nombre de composés et d'autre part du fait d'un objectif différent dans ce projet. En effet, il s'agissait dans un premier temps de rechercher les composés effectivement présents dans les EDCH, pour ensuite ouvrir des perspectives quant à des études toxicologiques pertinentes à concentrations environnementales et sur des longues durées afin de s'orienter vers de l'évaluation du risque. L'originalité de ce travail de priorisation par rapport aux autres travaux, est l'intégration de métabolites (6 métabolites intégrés dans la hiérarchisation) (Boxall, 2003; Capleton et al., 2006; Kim et al., 2011). Cette démarche a démontré son intérêt, étant donné que 4 métabolites (florfénicol amine, néospiramycine, triclabendazole sulfone, triclabendazole sulfoxyde) sur les 6 recherchés ont été quantifiés dans les eaux brutes, 4 également (florfénicol amine, toltrazuril sulfone, triclabendazole sulfone, triclabendazole sulfoxyde) dans les eaux traitées.

Pour terminer sur un point de vue plus large, cette difficulté à mettre en perspective la hiérarchisation avec les résultats d'occurrences des RMV dans les ressources en eaux peut aussi s'expliquer par la discussion autour de la représentativité des résultats. Tout

d'abord, ce sont 105 échantillons d'eaux brutes qui sont pris en compte sur plus d'une année (de mars 2017 à juin 2018), ce qui n'est pas un nombre suffisant d'échantillons pour être représentatif de l'occurrence des RMV sur ce laps de temps. Ensuite, les prélèvements sont des prélèvements ponctuels. Se pose donc la question de la représentativité de nos échantillons vis-à-vis des ressources concernées sur les périodes étudiées. En effet, les concentrations dissoutes fluctuent dans le temps avec des amplitudes et des fréquences variables. Un prélèvement ponctuel ne tient pas compte de ces fluctuations et il est donc possible de passer à côté d'un pic de concentration ou au contraire de sur-évaluer les niveaux de concentrations sur une période. Pour remédier à ce biais, il existe plusieurs options. D'abord, il est possible de réaliser des prélèvements ponctuels rapprochés, mais les coûts d'analyse seront alors démultipliés. Les autres approches possibles sont le prélèvement moyenné, avec un cumul de prélèvements successifs à des fréquences définies sur une durée également définie afin d'obtenir un échantillon composite représentatif de cette durée. C'est l'approche qui nécessite une logistique non négligeable. Enfin, le prélèvement passif avec des préleveurs comme les Polar Organic Chemicals Integrative Sample (POCIS) qui permettent d'échantillonner in situ et de façon intégrative des contaminants organiques hydrophiles comme les résidus pharmaceutiques. La représentativité temporelle de l'échantillonnage est alors améliorée (Li et al., 2010; Miège et al., 2012).

### **3.3.2. Mise en perspective des résultats dans les eaux brutes avec la hiérarchisation des sites d'étude**

Le classement des sites par pression d'élevage a été mis en regard avec les contaminations effectivement déterminées sur ceux-ci lors des campagnes de mesures. Ainsi le tableau 37 met en parallèle les différents captages d'eau de surface, classés par pression d'élevage, et la présence de RMV dans les EB sur chaque campagne et toutes campagnes confondues.

Ordre de priorité	Captage	Département	Dominante élevage	C1	C2	C3	C4	C5	Nombre total de molécules quantifiées
1	D	Côtes d'Armor	Porcine	0	0	0	- <sup>a</sup>	-	0
2	J	Finistère	Porcine	0	2	3	0	-	5
3	X	Morbihan	Avicole/porcine	0	-	0	0	0	0
4	G	Finistère	Piscicole	1	1	3	0	0	5
5	K	Finistère	Piscicole	0	0	0	0	2	2
6	B	Côtes d'Armor	Avicole	0	0	1	0	-	1
7	E	Côtes d'Armor	Porcine	0	0	0	0	0	0
8	Q	Ille-et-Vilaine	Porcine/avicole	1	-	0	0	0	1
9	R	Côtes d'Armor	Porcine	1	-	0	1	0	2
10	H	Finistère	Avicole	0	0	0	0	-	0
11	Y	Morbihan	Avicole/porcine	2	2	2	1	-	7
12	P	Ille-et-Vilaine	Bovine	0	0	0	1	0	1
13	S	Ille-et-Vilaine	Bovine	0	-	0	0	0	0
14	V	Morbihan	Avicole/porcine	0	-	0	0	0	0
15	A	Côtes d'Armor	Piscicole/avicole	0	1	2	0	-	3
16	Z	Morbihan	Avicole	1	2	0	0	-	3
17	L	Finistère	Piscicole	1	4	3	1	0	9
18	M	Finistère	Avicole/porcine	0	1	0	2	-	3
19	N	Ille-et-Vilaine	Bovine	0	-	1	0	0	1
20	C	Côtes d'Armor	Avicole	1	0	1	0	0	2
21	F	Côtes d'Armor	Bovine	0	0	0	0	-	0
22	W	Morbihan	?	1	-	0	0	1	2
23	I	Finistère	Avicole	0	3	1	0	-	4

**Tableau 37: Nombre de RMV quantifiés par campagne (C1 à C5) et par captage dans les EB.**

<sup>a</sup> Non prélevé ou non analysé

Si on découpe le tableau en 2 parties, en séparant les 12 sites les mieux classés des 11 sites suivants, on observe 24 quantifications de RMV sur les 12 premiers sites et 27 dans les 11 derniers sites. Quatre sites parmi les 12 premiers sont exempts de

contamination, et 3 sites parmi les 11 derniers sont exempts de contamination. Ainsi, des RMV ont été quantifiés dans 66% des sites de la première moitié du classement et dans 73% des sites de la seconde moitié du classement.

Il est clair que la pression d'élevage ne suffit pas à elle seule à expliquer les résultats obtenus dans les eaux brutes au cours des 5 campagnes de prélèvements.

Le site L pour lequel le plus grand nombre de RMV a été quantifié (9) dans 4 campagnes de mesure sur les 5 réalisées est classé en position 17 / 23.

Le site Y avec 7 RMV quantifiés dans 4 campagnes de mesure est classé en position 11 / 23.

Le site D en tête de classement et le site X en 3<sup>ème</sup> position selon la pression d'élevage n'ont pas présenté de de RMV durant ce travail. Cependant il faut noter que le site D n'a été prélevé que dans 3 campagnes de prélèvements car l'usine de potabilisation a été mise définitivement à l'arrêt courant 2017. Le site I, classé en dernier de liste a comptabilisé 4 RMV quantifiés sur deux campagnes de mesure.

La pression d'élevage (quantitative) sur le canton n'a pas permis de prédire quels sites seraient les plus à risque vis-à-vis des RMV lors de l'étude. Il faut noter que le site L, bien que situé en 17<sup>ème</sup> position sur le critère pression d'élevage au niveau du canton, est en pratique situé à quelques centaines de mètres d'un élevage porcin et en aval d'une pisciculture. Des vaches sont également en pâturage en aval dans des champs à quelques centaines de mètres. Parmi les molécules quantifiées sur ce site, certaines présentent un usage en aquaculture mais également en élevage porcins et bovins (FF, OTC, TMP) d'autres sont exclusivement utilisés sur les bovins (EPR, TRI).

Ce type de rapprochement n'a pas pu être fait pour toutes les usines car les informations concernant les élevages à proximité ont rarement été obtenues.

Ce tableau 37 nous permet également de regarder si une tendance géographique s'observe quant à la répartition des ressources les plus vulnérables à la contamination pas les résidus vétérinaires. Les eaux souterraines ont été intégrées au calcul. Le nombre de RMV quantifiés a été additionné par département et pondéré par le nombre de campagnes et de sites sur le département. Les résultats sont les suivants :

- Côtes d'Armor : 0,3
- Finistère : 0,9
- Ille-et-Vilaine : 0,2
- Morbihan : 0,6

Le Finistère est le département qui semble le plus vulnérable vis-vis de la contamination de ses ressources en eaux par les RMV, suivi du Morbihan. Les élevages dominants dans le Finistère sont les élevages porcins et volailles de chair (DRAAF, 2018a, 2018b). Le Morbihan est le département qui semble le moins productif de la région en terme d'élevage, et ses activités d'élevage sont majoritairement tournées vers de la volaille de chair (DRAAF, 2018b). Les ressources en eaux des départements des Côtes d'Armor et de l'Ille et Vilaine semblent être moins sujettes à une contamination par les RMV. Le département des Côtes d'Armor est pourtant bien classé en termes d'élevages parmi les départements de la région, avec des élevages nombreux à la fois porcins, bovins viande, bovins lait et poules pondeuses (DRAAF, 2018a, 2018c, 2018d, 2018e). L'Ille-et-Vilaine est tournée vers l'élevage bovin, à la fois bovins viande et bovins lait (DRAAF, 2018c, 2018d).

Il conviendra à l'avenir d'affiner les recherches sur les élevages en présence à plus petite échelle, bien que les données soit en pratique difficiles à obtenir. D'autre part, il faut aussi considérer le fait que les effluents ne sont pas forcément épandus à côté des élevages où ils sont produits, surtout dans le cas d'élevage hors sols. Ainsi, au-delà des élevages en présence, des informations complémentaires sur les plans d'épandage à l'échelle des parcelles sont nécessaires pour mieux comprendre l'occurrence des RMV dans les ressources en eaux.

### **3.4. Conservation des RMV d'intérêt lors de la congélation**

Ce travail de thèse a été l'occasion de tester l'impact de la congélation sur la conservation des RMV. Le développement analytique n'était pas finalisé au moment des deux premières campagnes de prélèvements (mars et mai 2017), les échantillons des campagnes 1 et 2 ont donc été congelés à -20 °C après filtration le jour du prélèvement. Les durées de congélation ont varié de 1 à 5 mois avant analyse.

#### **3.5.1 Protocole de l'essai de conservation**

Afin d'évaluer l'impact de la congélation sur la conservation des RMV, des tests ont été réalisés sur une eau brute et une eau traitée prélevées lors de la 3<sup>e</sup> campagne dans lesquelles les RMV d'intérêt ont été ajoutés. 3200 mL de chaque matrice ont été prélevés, filtrés à 0,7 µm puis répartis en volumes équivalents dans 8 flacons en verre bruns d'un litre (soit 400 mL par flacon).

Chacun des flacons a été dopés avec 80 µL d'une solution avec les 38 RMV d'intérêt et les deux marqueurs d'activité humaine (carbamazépine et diclofénac), pour obtenir une concentration en résidus médicamenteux de 100 ng/L. Les échantillons d'eaux ont d'abord été analysés sans congélation, dans les 48h, puis analysés après des durées de congélation de: 7 jours, 14 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois, 4 mois et 5 mois.

Les deux échantillons d'eaux ont également été analysés avant dopage pour retrancher les éventuels résultats positifs aux résultats obtenus pour les échantillons dopés. Enfin les rendements sur les 100 ng/L initiaux ont été calculés pour chaque molécule et chaque durée de congélation, permettant d'établir des cinétiques de dégradation.

#### **3.5.2. Résultats de l'essai de conservation**

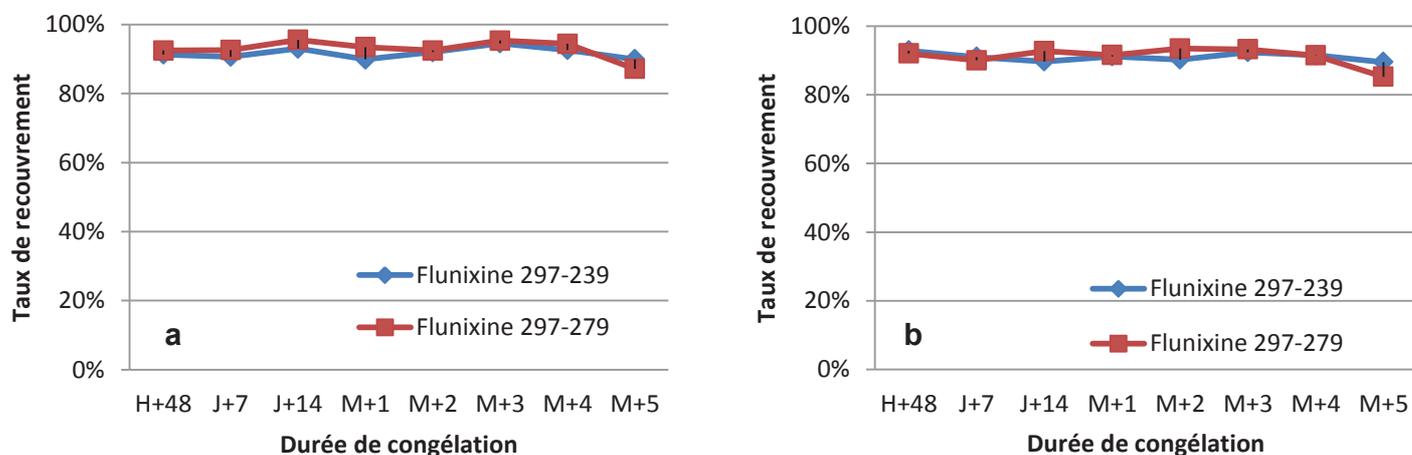
Des groupes de composés ayant des comportements similaires au cours de la congélation ont été mis en évidence.

##### **1). RMV conservés à plus de 60% dans les deux matrices**

Dix-sept composés sur les 40 sont dans cette catégorie :

Carbamazépine, dexaméthasone, diazinon, diclofénac, enrofloxacin, flubendazole, fluméquine, flunixin, kétoprofène, lévamisole, marbofloxacin, toltrazuril, toltrazuril sulfoxyde, triclabendazole, triclabendazole sulfoxyde, triclabendazole sulfone, triméthoprime.

Les cinétiques de dégradation de la flunixine dans l'eau brute et l'eau traitée sont présentées figure 33 comme représentatif de ce groupe de 17 composés. Les cinétiques de tous les composés sont présentées en Annexe 10.



**Figure 33: Taux de recouvrement de la flunixine en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b).**

## 2). RMV totalement dégradés dans les deux matrices

Les cinétiques de dégradation de l'ampicilline dans l'eau brute et l'eau traitée sont présentées figure 34. Les deux molécules de la famille des pénicillines (amoxicilline et ampicilline) sont dégradées complètement dans les 14 jours de l'expérimentation.

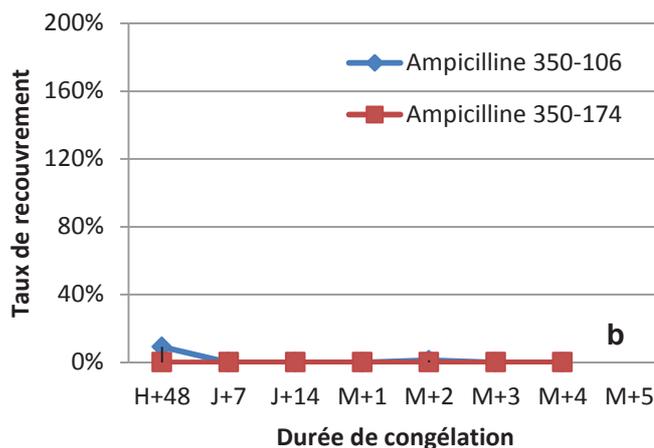
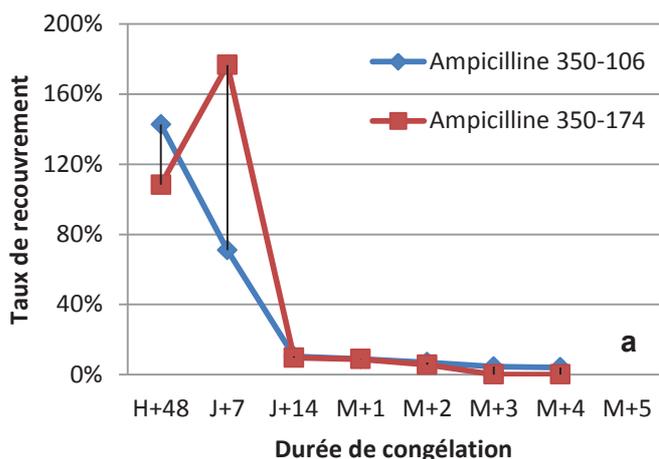


Figure 34: Taux de recouvrement de l'ampicilline en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)

### 3). RMV totalement dégradés dans l'une des matrices

Il s'agit de trois molécules de la famille des tétracyclines : la chlortétracycline, la doxycycline et l'oxytétracycline. Les cinétiques de dégradation de la chlortétracycline dans l'eau brute et l'eau traitée sont présentées figure 35. Ces composés se dégradent dès 48h dans les échantillons d'eau traitée malgré la présence d'acide ascorbique pour neutraliser le chlore.

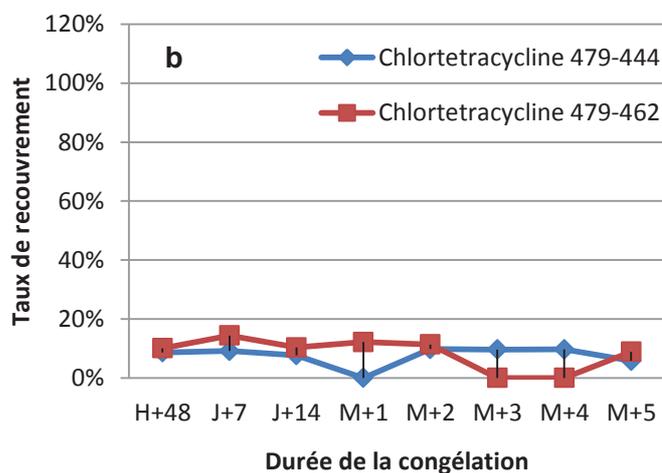
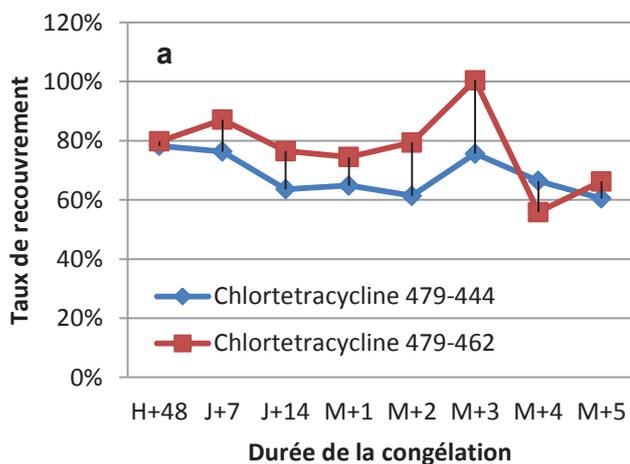


Figure 35: Taux de recouvrement de la chlortétracycline en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b).

#### 4). Dégradation régulière des RMV au cours du temps dans les deux matrices

Trois sulfonamides sont concernés : la sulfadiazine, la sulfadiméthoxine et la sulfaméthazine. Les cinétiques de dégradation de la sulfaméthazine dans l'eau brute et l'eau traitée sont présentées figure 36.

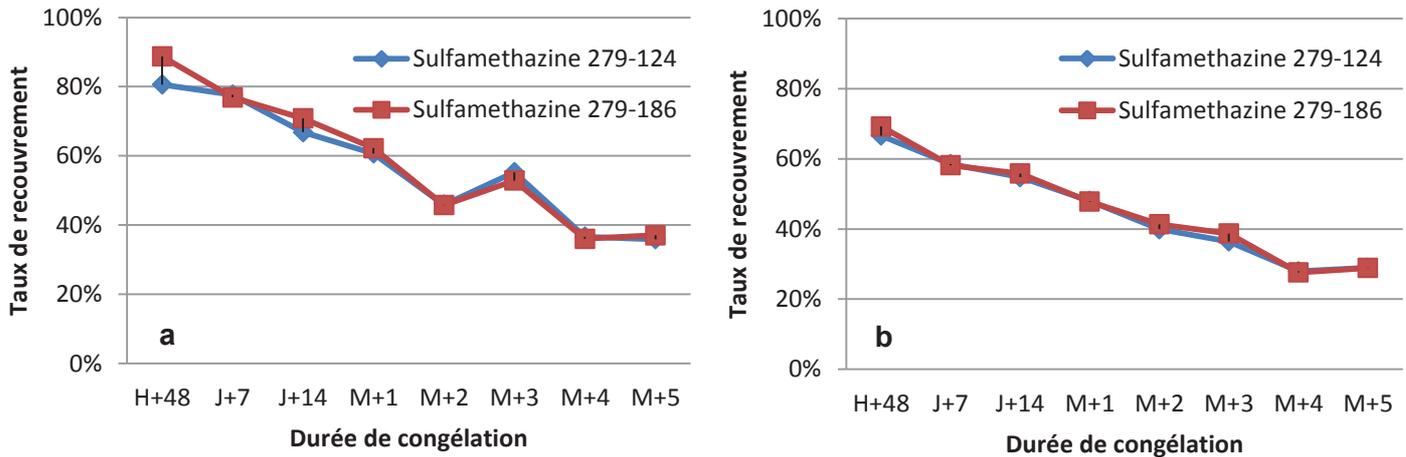


Figure 36: Taux de recouvrement de la sulfaméthazine en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b).

#### 5). Autres cinétiques de dégradation

L'érythromycine: Les cinétiques de dégradation de l'érythromycine dans l'eau brute et l'eau traitée sont présentées dans la figure 37. Celle-ci présente une dégradation lente dans l'eau brute et une dégradation d'abord rapide dans l'eau traitée (-40% en 48h) puis une stabilité avec un taux de recouvrement autour de 60%.

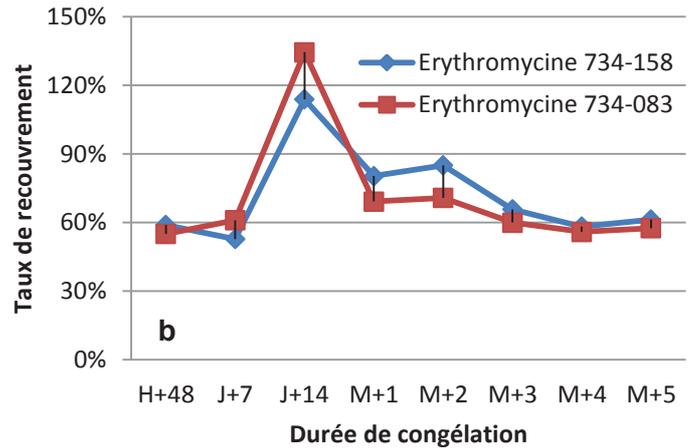
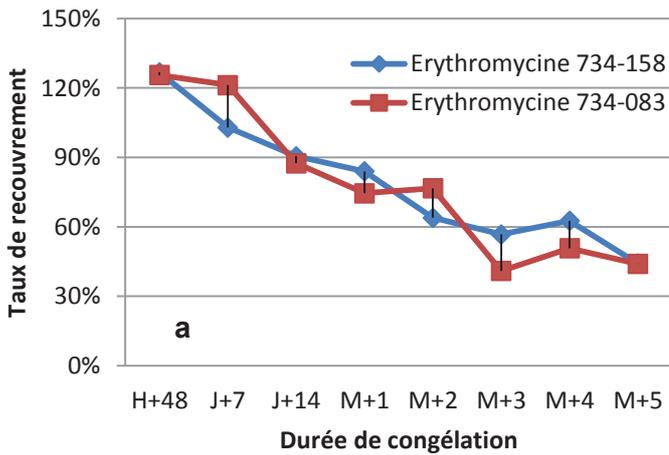


Figure 37: Taux de recouvrement de l'érythromycine en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b).

Le méloxicam : Les cinétiques de dégradation du méloxicam dans l'eau brute et l'eau traitée sont présentées dans la figure 38. Celui-ci est stable dans l'eau brute (>80%) et présente une dégradation d'abord rapide dans l'eau traitée (-40% en 48 heures) puis une stabilité avec un taux de recouvrement autour de 40-50%.

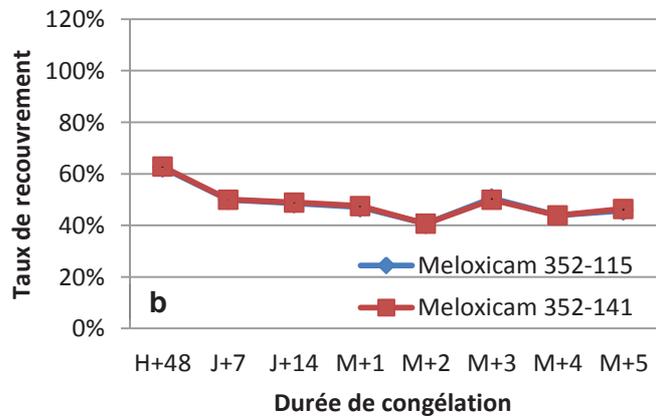
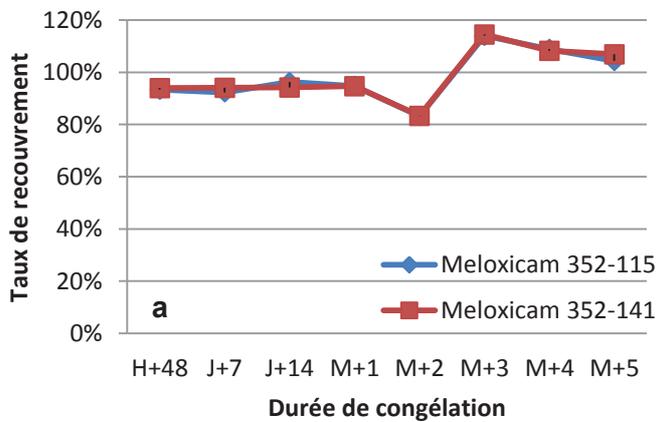


Figure 38: Taux de recouvrement du méloxicam en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b).

7). RMV pour lesquels il n'est pas possible de statuer du fait de l'invalidation de plusieurs résultats (effets matrices, dégradation de l'étalon interne etc) et donc perte d'information.

Les effets de la congélation n'ont pas pu être déterminés pour 13 RM sur les 40 étudiés. Les molécules concernées sont : l'acide oxolinique, la cefquinome, le clorsulon, le

dicyclanil, l'éprinomectine, le florfénicol, l'ivermectine, la lincomycine, la néospiramycine, la spiramycine, la tilmicosine, le toltrazuril sulfone et la tylosine.

La dégradation des RMV dans l'eau brute pourrait être expliquée par des activités résiduelles d'hydrolyse ou de biodégradation.

Pour la dégradation des RMV observée dans l'eau traitée, elle semble principalement avoir lieu dans les premières 48 heures, soit avant la congélation. Il est possible ici que la quantité d'acide ascorbique dans la verrerie n'ait pas été suffisante pour neutraliser la totalité des oxydants en présence dans l'échantillon d'eau traitée étudié. Cependant ce phénomène n'a pas été observé pour tous les composés (voir **2.4.2.1**). Par exemple, les sulfonamides ne présentent pas de dégradation rapide et élevée dans les 48h après prélèvement. La littérature scientifique rapporte que les sulfonamides, de même que l'érythromycine, les pénicillines (Charuaud et al. 2019) ou encore les tétracyclines (Wang et al. 2011) sont des composés sujets à la dégradation par oxydation via le chlore.

La cinétique de dégradation des sulfonamides par le chlore est peut-être moins rapide, ce qui expliquerait cette différence de comportement lors des premières 48 heures.

### **3.5.3. Mise en perspective avec les résultats des deux premières campagnes de mesure**

Dans les eaux brutes des campagnes 1 et 2, onze RMV différents ont été quantifiés (éprinomectine, florfénicol, fluméquine, flunixine, ivermectine, lévamisole, lincomycine, sulfaméthazine, tilmicosine, triclabendazole, triclabendazole sulfoxide). Ces résultats sont cohérents avec les données de l'essai de congélation. La fluméquine, la flunixine, le lévamisole, le triclabendazole et le triclabendazole sulfoxide présentaient des taux de recouvrement supérieurs à 60% dans les EB et la sulfaméthazine un taux de recouvrement supérieur à 20%.

5 composés pour lesquels il n'a pas été possible de déterminer une cinétique de dégradation lors de la congélation ont été identifiés dans les EB. Il s'agit de l'éprinomectine, le florfénicol, l'ivermectine, la lincomycine et la tilmicosine. Le tableau 39 mentionne les durées de congélation des échantillons d'EB dans lesquels ces cinq composés ont été quantifiés. Ainsi ces composés sont toujours présents, peut-être en concentration moindre, mais identifiables dans les eaux brutes après congélation pendant plusieurs mois.

<b>RMV</b>	<b>Durée de congélation minimale (concentration(s) associée(s))</b>	<b>Durée de congélation maximale (concentration(s) associée(s))</b>
Eprinomectine	100 jours (10 ; 19 et 45 ng/L)	150 jours (7 ng/L)
Florfenicol	94 jours (7 et 21 ng/L)	131 jours (434 ng/L)
Ivermectine	100 jours (14 et 21 ng/L)	
Lincomycine	116 jours (6 ng/L)	
Tilmicosine	116 (9 ng/L)	150 jours (6 ng/L)

**Tableau 38: Durées de congélation et concentrations pour l'éprinomectine, florfenicol, ivermectine, lincomycine et tilmicosine dans les échantillons d'eaux brutes lors des campagnes 1 et 2.**

Les eaux brutes congelées le moins et le plus longtemps ne sont pas issues des mêmes sites, il n'est donc pas possible d'établir une relation entre durée de congélation et concentration.

Dans les eaux traitées, 10 RMV différents ont été quantifiés (éprinomectine, florfenicol, ivermectine, kétoprofène, tilmicosine, toltrazuril, toltrazuril sulfone, triclabendazole, triclabendazole sulfone, triclabendazole sulfoxyde). De nouveau les résultats sont cohérents avec les données du test de conservation. Le kétoprofène, le toltrazuril, le triclabendazole et ses deux métabolites présentaient des taux de recouvrement >60% dans l'ET. La cinétique de dégradation de l'éprinomectine, du florfenicol, de l'ivermectine, de la tilmicosine et du toltrazuril sulfone n'avait pas pu être établie, mais la présence de ces 5 composés a pu être mise en évidence dans les ET malgré la congélation des échantillons (tableau 40).

<b>RMV</b>	<b>Durée de congélation minimale (concentration(s) associée(s))</b>	<b>Durée de congélation maximale (concentration(s) associée(s))</b>
Eprinomectine	100 jours (6 ; 10 et 11 ng/L)	109 (6 ng/L)
Florfenicol	80 jours (17 ng/L)	131 jours (159 ng/L)
Ivermectine	108 jours (18 ng/L)	
Tilmicosine	119 jours (13 ng/L)	
Toltrazuril sulfone	119 jours (22 ng/L)	

**Tableau 39: Durées de congélation et concentrations pour l'éprinomectine, le florfenicol, l'ivermectine, la tilmicosine et le toltrazuril sulfone dans les échantillons d'eaux traitées lors des campagnes 1 et 2.**

Au cours des deux premières campagnes de prélèvements, les pénicillines n'ont pas été quantifiées dans les EB et les ET, et les tétracyclines n'ont pas été quantifiées dans les ET, ce qui est cohérent aussi avec les résultats de conservation.

Les pénicillines n'ont pas été quantifiées dans les EB et les ET, et les tétracyclines n'ont pas été quantifiées dans les ET, ce qui est cohérent avec les résultats de conservation. Des données de contamination ont pu être perdues pour ces composés lors de la conservation des échantillons par congélation pour les 2 premières campagnes de mesure.

#### **3.5.4. Conclusions et limites de l'expérience**

Dix-sept molécules (carbamazépine, dexaméthasone, diazinon, diclofénac, enrofloxacin, flubendazole, fluméquine, flunixin, kétoprofène, lévamisole, marbofloxacin, toltrazuril, toltrazuril sulfoxide, triclabendazole, triclabendazole sulfoxide, triclabendazole sulfone et triméthoprime) peuvent toujours être détectées dans les eaux brutes et les eaux traitées avec des taux de recouvrement supérieurs à 60% après une conservation de 1 à 5 mois au congélateur.

Les sulfonamides (sulfadiazine, sulfadiméthoxine, sulfaméthazine) sont toujours quantifiables dans les deux matrices, mais à des taux de recouvrements inférieurs à 60%. Le méloxicam est toujours quantifiable dans l'eau traitée avec des recouvrements inférieurs à 60%. Les pénicillines (amoxicilline, ampicilline) ne sont jamais quantifiées mais sont dégradées dans les 14 jours dans les eaux brutes et les eaux traitées. Les tétracyclines sont dégradées dans les 48 heures dans l'eau traitée.

Ces premiers résultats doivent être validés par d'autres essais sur un plus grand nombre d'échantillons d'origines différentes. Afin d'être représentatif, des tests pourraient être réalisés sur 5 eaux brutes et 5 eaux traitées caractérisées par des charges organiques et minérales variées (COD entre 1 et 10 mg/L ; conductivité entre 200 et 1000  $\mu\text{s}/\text{m}$ ). Il serait également souhaitable de réaliser des triplicats pour chacun des échantillons.

## CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En se plaçant à l'échelle de la Bretagne, première région d'élevage française, l'objectif principal de ce travail de thèse était d'établir un premier état des lieux de la contamination des ressources en eaux et des eaux traitées correspondantes par les RMV.

Une revue de la littérature a permis de compiler les données d'occurrence des RMV au niveau international, dans les ressources en eaux (superficielles et souterraines) et dans les eaux traitées. Ces données d'occurrence ont été mises en lien avec les ventes (en tonnages) des RMV et leur devenir dans l'environnement et au cours des filières de potabilisation. Cette revue a mis au jour plusieurs constats. De nombreux RMV ont été quantifiés dans les eaux naturelles, à des concentrations allant de l'ordre du ng/L au µg/L. En revanche, il existe à ce jour très peu de données sur l'occurrence des RMV dans les eaux distribuées au robinet. Les ventes et les usages effectifs semblent être un facteur impactant qu'il est nécessaire de prendre en compte avant de réaliser toute étude d'occurrence sur ces composés. D'autre part, beaucoup d'études sur les mécanismes de dégradation des RMV au cours des traitements de potabilisation sont réalisées en laboratoire et méritent d'être testés à l'échelle réelle. Enfin, les antibiotiques sont les composés les plus étudiés, au détriment des autres classes thérapeutiques telles que les antiparasitaires ou les anticoccidiens pour lesquels il n'existe que très peu de données d'occurrence.

Les sites de l'étude et les RMV d'intérêt ont été sélectionnés par des travaux de priorisation prenant compte des spécificités de la région. Ainsi ce travail a été mené sur 25 captages dédiés à la production d'eau potable (23 eaux superficielles et 2 eaux souterraines) répartis sur les quatre départements bretons, sélectionnés dans le cadre du PRSE 2 (GDT PRSE 2, 2015). Les captages ont été hiérarchisés entre eux sur la base de deux critères, la pression d'élevage au niveau du canton et le débit de pompage journalier sur la ressource pour la production d'eau potable. La stratégie d'échantillonnage a été définie afin d'identifier les facteurs potentiellement impactant l'occurrence des RMV (régime hydrique, périodes d'épandages).

La liste de RMV d'intérêt a également été établie en tenant compte des usages des RMV en Bretagne, de leur pharmacocinétique, de leur mobilité du sol vers l'eau et de leur

persistance dans la ressource en eau. 46 composés appartenant à plusieurs classes thérapeutiques (antibiotiques, antiparasitaires, anticoccidiens, anti-inflammatoires) ont été sélectionnés. Deux méthodes d'analyses ont été développées sur la base de cette liste. La première méthode est une méthode multi-résidus en SPE-RRLC-MS/MS intégrant 38 RMV. Les performances de la méthode ont été évaluées selon la norme AFNOR NF T90-210, et la méthode a été auditée COFRAC en septembre 2018 avec succès pour 27 RMV.

Une seconde méthode a été développée pour deux composés par SPE suivi d'une séparation en UHPLC par paires d'ions couplée à la spectrométrie de masse en tandem. De par les propriétés physico-chimiques très diverses de composés comme les résidus pharmaceutiques, le développement de méthodes multi-résidus relève du challenge et il est nécessaire de faire des compromis. Ainsi, certains RMV d'intérêt n'ont pu être intégrés aux deux méthodes développées et onze RMV inclus dans la méthode d'analyse multi-résidus ont des performances insuffisantes pour être présentés à une accréditation COFRAC.

La colistine fait partie des composés écartés de l'étude pour des raisons de faisabilité analytique. La colistine est un antibiotique très largement prescrit en Bretagne à la fois pour les porcins, les bovins et la volaille (Soulier et al., 2015). De plus, une publication de 2015 décrivant le premier mécanisme de résistance à la colistine transférable par plasmide a conduit à la recommandation d'une surveillance renforcée pour cet antibiotique (ANSES, 2017; Dortet et al., 2016). Il serait souhaitable de développer une méthode dédiée à cette molécule pour entamer un suivi spécifique de son occurrence dans les EDCH.

Le développement des méthodes d'analyse à façon et une stratégie d'échantillonnage adaptée ont permis d'acquérir des données de concentrations en RMV dans les ressources en eaux et les eaux traitées correspondantes.

Au total, 105 échantillons d'eaux naturelles (97 eaux de surfaces et 8 eaux souterraines) et 94 échantillons d'eaux traitées correspondantes ont été prélevés et analysés sur 5 campagnes de mesure entre mars 2017 et juin 2018.

Les échantillons des deux premières campagnes de mesure ont été congelés avant analyse, et les tests de conservation réalisés à posteriori démontrent que certains composés ont pu être totalement dégradés lors de la conservation des échantillons. Les niveaux de concentrations quantifiés pour les autres composés peuvent être sous-évalués.

Parmi les 40 RMV recherchés, 18 composés ont été quantifiés au moins une fois dans les échantillons d'eaux brutes superficielles ou souterraines, incluant différentes classes thérapeutiques (antibiotiques, antiparasitaires, anti-inflammatoires). Un ou plusieurs résidus de médicaments vétérinaires ont été quantifiés dans 32% des échantillons d'eaux brutes. Ce pourcentage est à relativiser de par les faibles fréquences de détection individuelles des composés (inférieures à 10%). Les niveaux de concentrations observés sont variables et vont de 5 ng/L à environ 3 µg/L pour la sulfadiazine. La sulfadiazine est un antibiotique mixte, utilisé en médecine vétérinaire et en médecine humaine. Au total, 8 composés à usage mixte ont été quantifiés dans les eaux brutes et 10 à usage exclusivement vétérinaire. Pour tenter de discriminer l'origine de la contamination (médecine humaine ou médecine vétérinaire) dans le cas des molécules mixtes, la contamination fécale associée dans les échantillons d'eaux brutes a été étudié via les stanols fécaux et les résidus pharmaceutiques spécifiquement humains ou vétérinaires. Parmi les 12 échantillons dans lesquels au moins une molécule vétérinaire mixte a été quantifiée, deux échantillons présentaient une contamination fécale d'origine animale bovine, un échantillon présentait une contamination fécale d'origine humaine et les autres une contamination fécale mixte (animale et humaine).

Pour ce qui est des variations saisonnières, il s'est révélé difficile de déterminer les facteurs impactant l'occurrence des RMV dans les eaux brutes et la survenue de transfert du sol vers l'eau, du fait du large territoire géographique couvert par l'étude et des caractéristiques variées des captages.

Une variation interannuelle non négligeable a également été observée. Ainsi, les campagnes effectuées lors des épandages 2017 et 2018 ont présentées respectivement 53% et 19% d'échantillons avec au moins un RMV quantifié.

Pour ce qui est des perspectives à envisager sur la base des résultats dans les ressources en eaux, il sera nécessaire de poursuivre les travaux visant à mieux comprendre les facteurs impactant l'occurrence des RMV. Dans ce but, il conviendra d'affiner les futures études en les ciblant sur une plus petite échelle, afin de considérer dans le détail les prescriptions vétérinaires (qui sont potentiellement hétérogènes à l'échelle régionale), les élevages en présence, les plans d'épandages à l'échelle des parcelles si possible et les caractéristiques hydrogéologiques du site étudiés (cours d'eau, retenue à temps de stockage court, retenue à temps de stockage long). Dans ce sens, les Plans de gestion de la sécurité sanitaire des eaux qui sont en cours de

développement autour des usines de potabilisation permettront à terme l'identification des dangers et des informations tels que les élevages à proximité et autour de la ressource seront disponibles. Pour gagner en représentativité au niveau des données d'occurrences et les mettre en regard des caractéristiques des sites, il serait pertinent d'adopter une méthode d'échantillonnage passif de type POCIS.

Ensuite, la pisciculture pourrait être à une source à étudier de plus près lors de prochaines études. En effet, des concentrations relativement élevées de RMV utilisés en pisciculture (florfénicol, sulfadiazine, triméthoprime, oxytétracycline) ont été quantifiés sur des ressources à dominante élevage piscicole selon le GDT PRSE 2 (GDT PRSE 2, 2015).

Autre perspective faisant suite aux résultats de ce travail dans les ressources en eaux, ces niveaux de concentrations obtenues en conditions réelles pourraient être utilisées pour de futurs essais écotoxicologiques sur des espèces animales, végétales ou bactériennes présentes dans les milieux aquatiques bretons.

Dans les 94 échantillons d'eaux traitées, 13 composés différents ont été quantifiés, 11 possédant un usage exclusivement vétérinaire et 2 avec un usage mixte. Toutes les classes thérapeutiques ont été quantifiées (antibiotiques, antiparasitaires, anticoccidiens et anti-inflammatoires), avec un accent à mettre sur les antiparasitaires qui présentent les fréquences de détection les plus élevées.

Au moins un RMV a été quantifié dans 20% des échantillons d'eaux traitées. De même que dans les eaux brutes, les fréquences de détection individuelles des RMV sont inférieures à 10%. Les niveaux de concentrations dans les eaux traitées sont inférieures à 40 ng/L, à l'exception du florfénicol et de son métabolite le florfénicol amine qui ont été quantifiés jusqu'à 211 ng/L et 71 ng/L, respectivement.

Pour ce qui est des perspectives relatives aux résultats de ce travail dans l'eau traitée, les futurs travaux devront continuer à intégrer les antiparasitaires qui n'avaient jamais été recherchés dans les eaux traitées au préalable, et qui ont été quantifiés aux fréquences de détection les plus élevées au cours de ce travail (éprinomectine, triclabendazole et ses métabolites).

Il faudra également acquérir des données sur l'efficacité des différents traitements mis en place au sein des usines de potabilisation vis-à-vis des différents RMV. Les calculs d'abattement doivent en effet tenir compte du temps de résidence de l'eau dans l'usine

entre l'entrée et la sortie, ce qui n'a pas pu être effectué dans le cadre de ce travail à grande échelle.

Au final, ce travail participe à l'amélioration des connaissances nécessaires pour répondre à la question de l'exposition de la population aux RMV via l'eau de consommation.

Le florfenicol, le composé quantifié aux concentrations les plus élevées dans l'eau traitée, a fait l'objet d'une évaluation des risques menée par l'ANSES en 2013.

L'ANSES a établi des valeurs guides allant de 1,3 µg/L pour un nourrisson de 5 kg consommant 0,75 L d'eau par jour et à 6 µg/L pour un adulte de 60 kg consommant 2 L d'eau par jour. La concentration la plus élevée en florfenicol dans l'eau traitée (211 ng/L) est 6 fois plus faible que la valeur guide établie pour un nourrisson et 28 fois plus faible que la valeur guide définie pour un adulte. Ce résultat est plutôt rassurant quant au risque lié à l'exposition potentielle de la population à ce RMV considéré individuellement.

A la vue des niveaux de concentrations observés, le niveau d'exposition de la population bretonne aux RMV via l'eau de consommation est faible. Des effets toxiques aigus ne sont pas envisageables à ces doses. D'autre part, les antibiotiques, antiparasitaires et anticoccidiens ne sont **à priori** pas susceptibles d'être des perturbateurs endocriniens. Les études de toxicité pour la mise sur le marché constituent un garde-fou à ce genre de risque. Cependant, il convient de rester vigilant pour éviter qu'un drame comme celui du Distilbène® vienne à se reproduire (Fénichel et al., 2015). Plus récemment, une étude franco-danoise a fait état que la prise soutenue d'ibuprofène chez de jeunes hommes sportifs pouvait induire un déséquilibre hormonal habituellement rencontré chez les hommes âgés (Kristensen et al., 2018). Ainsi, des molécules **à priori** connues peuvent se révéler avoir des effets délétères.

D'autre part, il faut tenir compte de toutes les voies d'exposition possibles à ces composés, on parle d'exposition agrégée.

Pour l'homme, les autres voies d'expositions à considérer sont les denrées animales comme la viande ou le lait. Ce cadre alimentaire est normé, et il existe pour chaque composé des Limite Maximum de Résidus (LMR) à ne pas dépasser dans les denrées animales comme le lait et la viande. Ces LMR sont variables selon l'espèce animale et le type de tissu considéré. Par ailleurs, des études ont également démontré que certaines plantes (oignons, choux, maïs, pommes de terres, radis, céleri) cultivées à l'aide d'engrais d'origine animale sont susceptibles d'absorber les résidus de médicaments

vétérinaires (Dolliver et al., 2007; Hu et al., 2010; Kumar et al., 2005). Les cultures de tubercules, comme les pommes de terre, les carottes et les radis qui sont directement en contact avec le sol peuvent être particulièrement vulnérables à la contamination par les RMV (Tasho and Cho, 2016).

D'autre part, la population humaine est exposée à une grande variété d'autres contaminants environnementaux, déjà connus ou non, qui peuvent potentiellement interagir entre eux de façon additive ou en synergie, augmentant ainsi les risques pour la santé. Il est extrêmement difficile à ce jour d'estimer les risques pour la santé de ces mélanges de composés chimiques auxquels est exposé un individu au long de sa vie.

De nouvelles approches plus globales font leur apparition pour répondre à ces questions, comme le concept d'exposome qui renvoie à l'ensemble des facteurs environnementaux (non génétiques) auxquels l'Homme est exposé de sa conception (depuis le développement in utero) à sa mort. Pour déchiffrer l'exposome chimique, des méthodes plus holistiques comme les méthodes d'analyse non ciblées permettent d'analyser sans à priori d'une part les contaminants présents dans les matrices biologiques et d'autre part les molécules endogènes formées en réaction à une exposition à des toxiques. Ces méthodes offrent des opportunités importantes pour l'avenir de la recherche sur l'exposition de l'Homme aux micropolluants.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agence de l'Eau Loire Bretagne, 2017. Quelle qualité des eaux en Loire Bretagne ?
- Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), 2014. Analyse des ventes de médicaments en France en 2013 36.
- Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, 2011. Campagne nationale d'occurrence des résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine.
- Agence Régionale de Santé Bretagne, 2017. Soif de Santé! Qualité des eaux destinées à la consommation humaine en Bretagne Bilan 2016.
- Ahmed, W., Hughes, B., Harwood, V., 2016. Current Status of Marker Genes of Bacteroides and Related Taxa for Identifying Sewage Pollution in Environmental Waters. *Water* 8, 231. <https://doi.org/10.3390/w8060231>
- Anonyme, 2000. NF EN ISO 9308-1: Water Quality. Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Anonymous, 2000a. NF EN ISO 7899-2: Water Quality. Detection and Enumeration of Intestinal Enterococci in Surface and Waste Water. Membrane filtration method.
- Anonymous, 2000b. NF EN ISO 9308-1: Water Quality. Detection and Enumeration of Escherichia coli and Coliform Bacteria in Surface and Waste Water. Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora.
- Anonymous, 1999a. NF EN ISO 9308-3: Water Quality. Detection and Enumeration of Escherichia coli and Coliform Bacteria in Surface and Waste Water. Miniaturized Method (Most Probable Number) by Inoculation in Liquid Medium.
- Anonymous, 1999b. NF EN ISO 7899-1: Water Quality. Detection and Enumeration of Intestinal Enterococci in Surface and Waste Water. Miniaturized Method (Most Probable Number) by Inoculation in Liquid Medium.
- ANSES, 2017. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2016 108.
- Azzouz, A., Ballesteros, E., 2013. Influence of seasonal climate differences on the pharmaceutical, hormone and personal care product removal efficiency of a

- drinking water treatment plant. *Chemosphere* 93, 2046–2054.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.037>
- Bártíková, H., Podlipná, R., Skálová, L., 2016. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere* 144, 2290–2301.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.137>
- Biache, C., Philp, R.P., 2013. The use of sterol distributions combined with compound specific isotope analyses as a tool to identify the origin of fecal contamination in rivers. *Water Res.* 47, 1201–1208. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.037>
- Blackwell, P.A., Lützhøft, H.-C.H., Ma, H.-P., Halling-Sørensen, B., Boxall, A.B., Kay, P., 2004. Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography–UV detection. *J. Chromatogr. A* 1045, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.063>
- Boleda, M.R., Galceran, M.T., Ventura, F., 2011. Behavior of pharmaceuticals and drugs of abuse in a drinking water treatment plant (DWTP) using combined conventional and ultrafiltration and reverse osmosis (UF/RO) treatments. *Environ. Pollut.* 159, 1584–1591. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.02.051>
- Boxall, A., 2003. Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment. *Toxicol. Lett.* 142, 207–218. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00067-5)
- Boxall, A.B.A., 2010. Veterinary Medicines and the Environment, in: Cunningham, F., Elliott, J., Lees, P. (Eds.), *Comparative and Veterinary Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 291–314. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-10324-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-10324-7_12)
- Braschi, I., Blasioli, S., Fellet, C., Lorenzini, R., Garelli, A., Pori, M., Giacomini, D., 2013. Persistence and degradation of new  $\beta$ -lactam antibiotics in the soil and water environment. *Chemosphere* 93, 152–159.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.016>
- Bull, I.D., Elhmmali, M.M., Roberts, D.J., Evershed, R.P., 2003. The Application of Steroidal Biomarkers to Track the Abandonment of a Roman Wastewater Course at the Agora (Athens, Greece)\*. *Archaeometry* 45, 149–161.  
<https://doi.org/10.1111/1475-4754.00101>
- Bull, I.D., Lockheart, M.J., Elhmmali, M.M., Roberts, D.J., Evershed, R.P., 2002. The origin of faeces by means of biomarker detection. *Environ. Int.* 27, 647–654.  
[https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00124-6](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00124-6)

- Burke, V., Richter, D., Greskowiak, J., Mehrtens, A., Schulz, L., Massmann, G., 2016. Occurrence of Antibiotics in Surface and Groundwater of a Drinking Water Catchment Area in Germany. *Water Environ. Res.* 88, 652–659. <https://doi.org/10.2175/106143016X14609975746604>
- Cai, M.-Q., Wang, R., Feng, L., Zhang, L.-Q., 2015. Determination of selected pharmaceuticals in tap water and drinking water treatment plant by high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometer in Beijing, China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 1854–1867. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3473-8>
- Capleton, A.C., Courage, C., Rumsby, P., Holmes, P., Stutt, E., Boxall, A.B.A., Levy, L.S., 2006. Prioritising veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile. *Toxicol. Lett.* 163, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.10.023>
- Carmona, E., Andreu, V., Picó, Y., 2014. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Sci. Total Environ.* 484, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.085>
- Chambres d’Agriculture de Bretagne, 2017. Agriculture et agroalimentaire de Bretagne en clair, les chiffres.
- Charuaud, L., Jardé, E., Jaffrezic, A., Panaget, T., Billon, M., Le Bot, B., 2016. Prioritisation of veterinary pharmaceuticals prior to a monitoring campaign: Case of Brittany, an intensive husbandry area.
- Charuaud, L., Jarde, E., Jaffrezic, A., Thomas, M.-F., Le Bot, B., 2019. Veterinary pharmaceutical residues from natural water to tap water: Sales, occurrence and fate. *J. Hazard. Mater.* 361, 169–186. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.075>
- Cimetiere, N., Soutrel, I., Lemasle, M., Laplanche, A., Crocq, A., 2013. Standard addition method for the determination of pharmaceutical residues in drinking water by SPE–LC–MS/MS. *Environ. Technol.* 34, 3031–3041. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.800563>
- Cole, D., Long, S.C., Sobsey, M.D., 2003. Evaluation of F+ RNA and DNA Coliphages as Source-Specific Indicators of Fecal Contamination in Surface Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6507–6514. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6507-6514.2003>
- Décision d’exécution UE 2018/840 Journal officiel de l’Union Européenne, 2018.

- Derrien, M., Jardé, E., Gruau, G., Pierson-Wickmann, A.-C., 2011. Extreme Variability of Steroid Profiles in Cow Feces and Pig Slurries at the Regional Scale: Implications for the Use of Steroids to Specify Fecal Pollution Sources in Waters. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7294–7302. <https://doi.org/10.1021/jf201040v>
- Derrien, M., Jardé, E., Gruau, G., Pourcher, A.M., Gourmelon, M., Jadas-Hécart, A., Pierson Wickmann, A.C., 2012. Origin of fecal contamination in waters from contrasted areas: Stanols as Microbial Source Tracking markers. *Water Res.* 46, 4009–4016. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.05.003>
- Devane, M.L., Weaver, L., Singh, S.K., Gilpin, B.J., 2018. Fecal source tracking methods to elucidate critical sources of pathogens and contaminant microbial transport through New Zealand agricultural watersheds – A review. *J. Environ. Manage.* 222, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.033>
- Direction Régionale de l’Alimentation, de l’Agriculture et de la Forêt Bretagne, 2017a. Memento de la Statistique Agricole.
- Direction Régionale de l’Alimentation, de l’Agriculture et de la Forêt Bretagne, 2017b. Tableaux de l’Agriculture bretonne, Edition 2016.
- Direction Régionale de l’Environnement, de l’Aménagement et du Logement Bretagne, 2016. L’eau en Bretagne, Bilan annuel 2015.
- Directive 2000/60/CE, 2000. Directive Cadre sur l’Eau.
- Directive 2006/7/CE, 2006. Directive 2006/7/CE concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade et abrogeant la directive 76/160/CEE.
- Dolliver, H., Kumar, K., Gupta, S., 2007. Sulfamethazine Uptake by Plants from Manure-Amended Soil. *J. Environ. Qual.* 36, 1224. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0266>
- Dortet, L., Bonnin, R., Jousset, A., Gauthier, L., Naas, T., 2016. Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance ! *J. Anti-Infect.* 18, 139–159. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2016.09.003>
- DRAAF, 2018a. Filière porcine, Édition 2018.
- DRAAF, 2018b. Filière volailles de chair, Édition 2018.
- DRAAF, 2018c. Filière bovins viande, Édition 2018.
- DRAAF, 2018d. Filière lait, Édition 2018.
- DRAAF, 2018e. Filière volailles de ponte, Édition 2018.
- DREAL Bretagne, 2014. Directive Nitrates, 5eme programme d’action en Bretagne.

- Du, L., Liu, W., 2012. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 32, 309–327. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0062-9>
- Dulio, V., Andres, S., 2014. Recommandations du Comité Experts Priorisation auprès du MEDDE pour la sélection des Substances Pertinentes à Surveiller dans les Milieux Aquatiques pour le Second Cycle de la DCE (2016-2021).
- Elhmmali, M.M., Roberts, D.J., Evershed, R.P., 2000. Combined Analysis of Bile Acids and Sterols/Stanols from Riverine Particulates To Assess Sewage Discharges and Other Fecal Sources. *Environ. Sci. Technol.* 34, 39–46. <https://doi.org/10.1021/es990076z>
- Elhmmali, M.M., Roberts, D.J., Evershed, R.P., 1997. Bile Acids as a New Class of Sewage Pollution Indicator. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3663–3668. <https://doi.org/10.1021/es9704040>
- Feito, R., Rubio, J.C.M., Fernández, J., 2010. Occurrence of pharmaceuticals in river and tap waters of Toledo (Castilla-La Mancha Community, Spain). *Toxicol. Lett.* 196, S61–S62. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.03.238>
- Fénichel, P., Brucker-Davis, F., Chevalier, N., 2015. The history of Distilbène® (Diethylstilbestrol) told to grandchildren – the transgenerational effect. *Ann. Endocrinol.* 76, 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2015.03.008>
- Feo, M.L., Eljarrat, E., Barceló, D., 2010. A rapid and sensitive analytical method for the determination of 14 pyrethroids in water samples. *J. Chromatogr. A* 1217, 2248–2253. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.018>
- Field, K.G., Samadpour, M., 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res.* 41, 3517–3538. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.056>
- Gao, J., Cui, Y., Tao, Y., Huang, L., Peng, D., Xie, S., Wang, X., Liu, Z., Chen, D., Yuan, Z., 2016. Multiclass method for the quantification of 92 veterinary antimicrobial drugs in livestock excreta, wastewater, and surface water by liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Liquid Chromatography. *J. Sep. Sci.* 39, 4086–4095. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600531>
- García-Galán, M.J., Garrido, T., Fraile, J., Ginebreda, A., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2010. Simultaneous occurrence of nitrates and sulfonamide antibiotics in two ground water bodies of Catalonia (Spain). *J. Hydrol.* 383, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.06.042>

- Goulas, A., Bourdat-Deschamps, M., Nélieu, S., Jimenez, J., Patureau, D., Haudin, C.-S., Benoit, P., 2017. Development of a soft extraction method for sulfamethoxazole and transformation products from agricultural soils: Effects of organic matter co-extraction on the environmental availability assessment. *Sci. Total Environ.* 607, 1037–1048. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.192>
- Gourmelon, M., Caprais, M.P., Mieszkin, S., Marti, R., Wéry, N., Jardé, E., Derrien, M., Jadas-Hécart, A., Communal, P.Y., Jaffrezic, A., Pourcher, A.M., 2010. Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water Res.* 44, 4812–4824. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.061>
- Goyat, Q., 2017. Développement d'une méthode de dosage de résidus de médicaments vétérinaires dans les eaux destinées à la consommation humaine par LC-MS/MS.
- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2012. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1248, 104–121. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.084>
- Groupe de Travail du Plan Régional Santé Environnement 2, 2015. Etude sur l'occurrence des résidus médicamenteux, notamment d'origine vétérinaire, dans les eaux destinées à la consommation humaine en Bretagne.
- Guillarme, D., Schappler, J., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., 2010. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.* 29, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.09.008>
- Guillemot, T., Zocatelli, R., Bichet, V., Jacob, J., Massa, C., Le Milbeau, C., Richard, H., Gauthier, E., 2015. Evolution of pastoralism in Southern Greenland during the last two millennia reconstructed from bile acids and coprophilous fungal spores in lacustrine sediments. *Org. Geochem.* 81, 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2015.01.012>
- Hamscher, G., 2000. Substances with pharmacological effects including hormonally active substances in the environment: Identification of tetracyclines in soil fertilized with animal slurry [Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hormonell aktiver Substanzen in der Umwelt: Nachweis von Tetracyclinen in Gülle gedüngten Böden]. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 107, 332–334.

- Harrault, L., Jardé, E., Jeanneau, L., Petitjean, P., 2014. Are fecal stanols suitable to record and identify a pulse of human fecal contamination in short-term exposed shellfish? A microcosm study. *Mar. Pollut. Bull.* 89, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.037>
- Haug, T., Hals, P.A., 2000. Pharmacokinetics of oxytetracycline in Arctic charr *Salvelinus alpinus* L. in freshwater at low temperature 17.
- Heaney, C.D., Myers, K., Wing, S., Hall, D., Baron, D., Stewart, J.R., 2015. Source tracking swine fecal waste in surface water proximal to swine concentrated animal feeding operations. *Sci. Total Environ.* 511, 676–683. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.062>
- Hektoen, H., Berge, J.A., Hormazabal, V., Yndestad, M., 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133, 175–184. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00310-K](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00310-K)
- Hu, F.-Y., He, L.-M., Yang, J.-W., Bian, K., Wang, Z.-N., Yang, H.-C., Liu, Y.-H., 2014. Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC–MS/MS. *J. Chromatogr. B* 949–950, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.008>
- Hu, X., Zhou, Q., Luo, Y., 2010. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environ. Pollut.* 158, 2992–2998. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.05.023>
- Hu, Y., Cheng, H., 2016. Health risk from veterinary antimicrobial use in China's food animal production and its reduction. *Environ. Pollut.* 219, 993–997. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.099>
- Iglesias, A., Nebot, C., Miranda, J.M., Vázquez, B.I., Cepeda, A., 2012. Detection and quantitative analysis of 21 veterinary drugs in river water using high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 3235–3249. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0830-3>
- Iglesias, A., Nebot, C., Vázquez, B.I., Miranda, J.M., Abuín, C.M.F., Cepeda, A., 2014. Detection of veterinary drug residues in surface waters collected nearby farming areas in Galicia, North of Spain. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 2367–2377. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2142-7>
- Institut national de la statistique et des études économiques, 2018. Estimation de population par région, sexe et grande classe d'âge - Années 1975 à 2018.

- Institut national de recherche et de sécurité, 2008. Le point des connaissances sur... Le formaldéhyde.
- Isobe, K.O., Tarao, M., Zakaria, M.P., Chiem, N.H., Minh, L.Y., Takada, H., 2002. Quantitative Application of Fecal Sterols Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry To Investigate Fecal Pollution in Tropical Waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4497–4507. <https://doi.org/10.1021/es020556h>
- Jadas-Hécart, A., Jeanneau, L., La Carbona, S., Ogorzaly, L., Rincé, A., 2012. Revue des principales méthodes d'identification des sources de pollutions fécales des eaux et coquillages. *Tech. Sci. Méthodes* 16–35. <https://doi.org/10.1051/tsm/201203016>
- Jaffrezic, A., Jardé, E., Pourcher, A.-M., Gourmelon, M., Caprais, M.-P., Heddadj, D., Cottinet, P., Bilal, M., Derrien, M., Marti, R., Mieszkin, S., 2011. Microbial and Chemical Markers: Runoff Transfer in Animal Manure–Amended Soils. *J. Environ. Qual.* 40, 959. <https://doi.org/10.2134/jeq2010.0355>
- Jaffrézic, A., Jardé, E., Soulier, A., Carrera, L., Marengue, E., Cailleau, A., Le Bot, B., 2017. Veterinary pharmaceutical contamination in mixed land use watersheds: from agricultural headwater to water monitoring watershed. *Sci. Total Environ.* 609, 992–1000. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.206>
- Jardé, E., Gruau, G., Mansuy-Huault, L., 2007. Detection of manure-derived organic compounds in rivers draining agricultural areas of intensive manure spreading. *Appl. Geochem.* 22, 1814–1824. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2007.03.037>
- Jardé, E., Jeanneau, L., Harrault, L., Quenot, E., Solecki, O., Petitjean, P., Lozach, S., Chev e, J., Gourmelon, M., 2018. Application of a microbial source tracking based on bacterial and chemical markers in headwater and coastal catchments. *Sci. Total Environ.* 610–611, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.235>
- Jeanneau, L., Jardé, E., Gruau, G., 2011. Influence of salinity and natural organic matter on the solid phase extraction of sterols and stanols: Application to the determination of the human sterol fingerprint in aqueous matrices. *J. Chromatogr. A* 1218, 2513–2520. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.066>
- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., Smalla, K., 2014. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol.* 22, 536–545. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>

- Jeon, D.S., Oh, T.-K., Park, M., Lee, D.S., Lim, Y.J., Shin, J.S., Song, S.G., Kim, S.C., Shinogi, Y., Chung, D.Y., 2014. Reactions and Behavior Relevant to Chemical and Physical Properties of Various Veterinary Antibiotics in Soil. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 59, 391–397.
- Jiang, M., Wang, L., Ji, R., 2010. Biotic and abiotic degradation of four cephalosporin antibiotics in a lake surface water and sediment. *Chemosphere* 80, 1399–1405. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.048>
- Jiménez-Lozano, E., Marqués, I., Barrón, D., Beltrán, J., Barbosa, J., 2002. Determination of pK<sub>a</sub> values of quinolones from mobility and spectroscopic data obtained by capillary electrophoresis and a diode array detector. *Anal. Chim. Acta* 464, 37–45. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00435-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00435-X)
- Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., Muniesa, M., 2014. Bacteriophages infecting *Bacteroides* as a marker for microbial source tracking. *Water Res.* 55, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.006>
- Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.* 8, 1–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>
- Khan, S.J., Roser, D.J., Davies, C.M., Peters, G.M., Stuetz, R.M., Tucker, R., Ashbolt, N.J., 2008. Chemical contaminants in feedlot wastes: Concentrations, effects and attenuation. *Environ. Int.* 34, 839–859. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.10.007>
- Kier, L., Hall, L., 1976. Molecular connectivity in chemistry and drug research.
- Kim, K.-R., Owens, G., Kwon, S.-I., So, K.-H., Lee, D.-B., Ok, Y.S., 2011. Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water. Air. Soil Pollut.* 214, 163–174. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0412-2>
- Kim, Y., Jung, J., Kim, M., Park, J., Boxall, A.B.A., Choi, K., 2008. Prioritizing veterinary pharmaceuticals for aquatic environment in Korea. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.03.006>
- Kim, Y., Lee, K.-B., Choi, K., 2016. Effect of runoff discharge on the environmental levels of 13 veterinary antibiotics: A case study of Han River and Kyungahn Stream, South Korea. *Mar. Pollut. Bull.* <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.011>
- Kinsella, B., O'Mahony, J., Malone, E., Moloney, M., Cantwell, H., Furey, A., Danaher, M., 2009. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *J. Chromatogr. A* 1216, 7977–8015. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.005>

- Kools, S.A., Boxall, A., Moltmann, J.F., Bryning, G., Koschorreck, J., Knacker, T., 2008. A ranking of European veterinary medicines based on environmental risks. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4, 399–408.
- Kristensen, D.M., Desdoits-Lethimonier, C., Mackey, A.L., Dalgaard, M.D., De Masi, F., Munkbøl, C.H., Styrihave, B., Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Platel, C., Hay-Schmidt, A., Jensen, T.K., Lesné, L., Mazaud-Guittot, S., Kristiansen, K., Brunak, S., Kjaer, M., Juul, A., Jégou, B., 2018. Ibuprofen alters human testicular physiology to produce a state of compensated hypogonadism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E715–E724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715035115>
- Krogh, K.A., Björklund, E., Loeffler, D., Fink, G., Halling-Sørensen, B., Ternes, T.A., 2008. Development of an analytical method to determine avermectins in water, sediments and soils using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1211, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.081>
- Kumar, K., Gupta, S.C., Baidoo, S.K., Chander, Y., Rosen, C.J., 2005. Antibiotic Uptake by Plants from Soil Fertilized with Animal Manure. *J. Environ. Qual.* 34, 2082. <https://doi.org/10.2134/jeq2005.0026>
- Kumar, R.R., Lee, J.T., Cho, J.Y., 2012. Fate, occurrence, and toxicity of veterinary antibiotics in environment. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 55, 701–709. <https://doi.org/10.1007/s13765-012-2220-4>
- Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75, 417–434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>
- Le Bizec, B., Pinel, G., Antignac, J.-P., 2009. Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 8016–8034. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.007>
- Lee, J.E., Lim, M.Y., Kim, S.Y., Lee, S., Lee, H., Oh, H.-M., Hur, H.-G., Ko, G., 2009. Molecular Characterization of Bacteriophages for Microbial Source Tracking in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7107–7114. <https://doi.org/10.1128/AEM.00464-09>
- Leeming, R., Ball, A., Ashbolt, N., Nichols, P., 1996. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Res.* 30, 2893–2900. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00011-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00011-5)
- Leeming, R., Latham, V., Rayner, M., Nichols, P., 1997. Detecting and Distinguishing Sources of Sewage Pollution in Australian Inland and Coastal Waters and Sediments, in: Eganhouse, R.P. (Ed.), *Molecular Markers in Environmental*

- Geochemistry. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 306–319.  
<https://doi.org/10.1021/bk-1997-0671.ch020>
- Leung, H.W., Jin, L., Wei, S., Tsui, M.M.P., Zhou, B., Jiao, L., Cheung, P.C., Chun, Y.K., Murphy, M.B., Lam, P.K.S., 2013. Pharmaceuticals in Tap Water: Human Health Risk Assessment and Proposed Monitoring Framework in China. *Environ. Health Perspect.* 121, 839–846. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206244>
- Levêque, J., 2011. Développement d'une méthode d'analyse des résidus pharmaceutiques vétérinaires dans les eaux naturelles destinées à l'alimentation par extraction SPE et analyse RRLC-MS/MS. (Rapport Master 2).
- Li, H., Helm, P.A., Metcalfe, C.D., 2010. Sampling in the Great Lakes for pharmaceuticals, personal care products, and endocrine-disrupting substances using the passive polar organic chemical integrative sampler. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 751–762. <https://doi.org/10.1002/etc.104>
- Li, X., Zheng, W., Machesky, M.L., Yates, S.R., Katterhenry, M., 2011. Degradation Kinetics and Mechanism of Antibiotic Ceftiofur in Recycled Water Derived from a Beef Farm. *J. Agric. Food Chem.* 59, 10176–10181. <https://doi.org/10.1021/jf202325c>
- Liebig, M., Fernandez, Á.A., Blübaum-Gronau, E., Boxall, A., Brinke, M., Carbonell, G., Egeler, P., Fenner, K., Fernandez, C., Fink, G., Garric, J., Halling-Sørensen, B., Knacker, T., Krogh, K.A., Küster, A., Löffler, D., Cots, M.Á.P., Pope, L., Prasse, C., Römbke, J., Rönnefahrt, I., Schneider, M.K., Schweitzer, N., Tarazona, J.V., Ternes, T.A., Traunspurger, W., Wehrhan, A., Duis, K., 2010. Environmental risk assessment of ivermectin: A case study. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 6, 567–587. <https://doi.org/10.1002/ieam.96>
- Litskas, V.D., Karamanlis, X.N., Batzias, G.C., Kamarianos, A.P., 2011. Sorption of the antiparasitic drug eprinomectin in three soils. *Chemosphere* 82, 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.024>
- Liu, J., Sun, Q., Zhang, C., Li, H., Song, W., Zhang, N., Jia, X., 2016. Removal of typical antibiotics in the advanced treatment process of productive drinking water. *Desalination Water Treat.* 57, 11386–11391. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1040848>
- Luo, Y., Xu, L., Rysz, M., Wang, Y., Zhang, H., Alvarez, P.J.J., 2011. Occurrence and Transport of Tetracycline, Sulfonamide, Quinolone, and Macrolide Antibiotics in the Haihe River Basin, China. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1827–1833. <https://doi.org/10.1021/es104009s>

- Madoux-Humery, A.-S., Dorner, S., Sauvé, S., Aboufadi, K., Galarneau, M., Servais, P., Prévost, M., 2013. Temporal variability of combined sewer overflow contaminants: Evaluation of wastewater micropollutants as tracers of fecal contamination. *Water Res.* 47, 4370–4382. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.030>
- Martínez-Villalba, A., Moyano, E., Galceran, M.T., 2009. Fast liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry of coccidiostats. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 1255–1263. <https://doi.org/10.1002/rcm.3997>
- Martinsen, B., Horsberg, T.E., 1995. Comparative Single-Dose Pharmacokinetics of Four Quinolones, Oxolinic Acid, Flumequine, Sarafloxacin, and Enrofloxacin, in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Held in Seawater at 10°C. *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER* 39, 6.
- Matsumoto, G., 1983. Changes in organic constituents in river water during incubation. *Water Res.* 17, 1803–1810. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(83\)90203-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90203-8)
- Miège, C., Budzinski, H., Jacquet, R., Soulier, C., Pelte, T., Coquery, M., 2012. Polar organic chemical integrative sampler (POCIS): application for monitoring organic micropollutants in wastewater effluent and surface water. *J Env. Monit* 14, 626–635. <https://doi.org/10.1039/C1EM10730E>
- Mitchell, S.M., Ullman, J.L., Teel, A.L., Watts, R.J., 2014. pH and temperature effects on the hydrolysis of three  $\beta$ -lactam antibiotics: Ampicillin, cefalotin and cefoxitin. *Sci. Total Environ.* 466–467, 547–555. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.027>
- Mompelat, S., 2011. Résidus pharmaceutiques dans les eaux destinées à la consommation humaine: occurrence et devenir pour une évaluation de l'exposition et du risque sanitaire.
- Mompelat, S., Jaffrezic, A., Jardé, E., Le Bot, B., 2013. Storage of natural water samples and preservation techniques for pharmaceutical quantification. *Talanta* 109, 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.042>
- Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O., 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ. Int.* 35, 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.10.008>
- Muniesa, M., Payan, A., Moce-Llivina, L., Blanch, A.R., Jofre, J., 2009. Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. *Water Res.* 43, 1559–1564. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.038>

- Nesser, G.A.A., Abdelbagi, A.O., Hammad, A.M.A., Tagelseed, M., Laing, M.D., 2016. Levels of pesticides residues in the White Nile water in the Sudan. *Environ. Monit. Assess.* 188. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5367-3>
- NF EN 1484, Afnor, 1997. Analyse de l'eau - Lignes directrices pour le dosage du carbone organique total (TOC) et carbone organique dissous (COD).
- NF ISO 5725-1, Afnor, 1994. Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 1 : principes généraux et définitions.
- NF ISO 5725-3, Afnor, 1994. Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 3 : mesures intermédiaires de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée.
- NF ISO 11352, Afnor, 2013. Qualité de l'eau - Estimation de l'incertitude de mesure basée sur des données de validation et de contrôle qualité.
- NF T90-210, Afnor, 2009. Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire.
- Norme XP T90-223; Afnor, 2013. Qualité de l'eau - Dosage de certains résidus médicamenteux dans la fraction dissoute des eaux - Méthode par extraction en phase solide et analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).
- Ohad, S., Vaizel-Ohayon, D., Rom, M., Guttman, J., Berger, D., Kravitz, V., Pilo, S., Huberman, Z., Kashi, Y., Rorman, E., 2015. Microbial Source Tracking in Adjacent Karst Springs. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5037–5047. <https://doi.org/10.1128/AEM.00855-15>
- Ok, Y.S., Kim, S.-C., Kim, K.-R., Lee, S.S., Moon, D.H., Lim, K.J., Sung, J.-K., Hur, S.-O., Yang, J.E., 2011. Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province, Korea. *Environ. Monit. Assess.* 174, 693–701.
- Paíga, P., Santos, L.H.M.L.M., Delerue-Matos, C., 2017. Development of a multi-residue method for the determination of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in aqueous environmental matrices by SPE-UHPLC–MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 135, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.013>
- Pesticide Safety Directorate, 2005. Pesticide Data Requirements Handbook.
- Prat, M., Benito, J., Compañó, R., Hernández-Arteseros, J., Granados, M., 2004. Determination of quinolones in water samples by solid-phase extraction and liquid

- chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A* 1041, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.042>
- Raich-Montiu, J., Folch, J., Compañó, R., Granados, M., Prat, M.D., 2007. Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. *J. Chromatogr. A* 1172, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.010>
- Raith, M.R., Kelty, C.A., Griffith, J.F., Schriewer, A., Wuertz, S., Mieszkin, S., Gourmelon, M., Reischer, G.H., Farnleitner, A.H., Ervin, J.S., Holden, P.A., Ebentier, D.L., Jay, J.A., Wang, D., Boehm, A.B., Aw, T.G., Rose, J.B., Balleste, E., Meijer, W.G., Sivaganesan, M., Shanks, O.C., 2013. Comparison of PCR and quantitative real-time PCR methods for the characterization of ruminant and cattle fecal pollution sources. *Water Res.* 47, 6921–6928. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.061>
- Sabljić, A., 2001. QSAR models for estimating properties of persistent organic pollutants required in evaluation of their environmental fate and risk. *Chemosphere* 43, 363–375. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00084-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00084-9)
- Salvia, M.-V., Experton, J., Geandel, C., Cren-Olivé, C., Vulliet, E., 2014. Fate of pharmaceutical compounds and steroid hormones in soil: study of transfer and degradation in soil columns. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 10525–10535. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3038-x>
- Samuelsen, O.B., Ervik, A., Pursell, L., Smith, P., 2000. Single-dose pharmacokinetic study of oxolinic acid and vetoquinol, an oxolinic acid ester, in Atlantic salmon *Salmo salar* held in seawater and in vitro antibacterial activity against 12.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725–759. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>
- Schauss, K., Focks, A., Heuer, H., Kotzerke, A., Schmitt, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B.-M., Matthies, M., Amelung, W., Klasmeier, J., Schloter, M., 2009. Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems. *TrAC Trends Anal. Chem.* 28, 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.02.009>
- Scott, T.M., Rose, J.B., Jenkins, T.M., Farrah, S.R., Lukasik, J., 2002. Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5796–5803. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5796-5803.2002>

- Secrétariat technique de bassin Loire-Bretagne, 2015. Etat 2013 publié en 2015 des masses d'eau du bassin Loire-Bretagne.
- Seurinck, S., Verstraete, W., Siciliano, S.D., 2005. Microbial Source Tracking for Identification of Fecal Pollution. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 4, 19–37. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-4997-7>
- Shah, V.G., Hugh Dunstan, R., Geary, P.M., Coombes, P., Roberts, T.K., Von Nagy-Felsobuki, E., 2007. Evaluating potential applications of faecal sterols in distinguishing sources of faecal contamination from mixed faecal samples. *Water Res.* 41, 3691–3700. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.006>
- Shi, H., Yang, Y., Liu, M., Yan, C., Yue, H., Zhou, J., 2014. Occurrence and distribution of antibiotics in the surface sediments of the Yangtze Estuary and nearby coastal areas. *Mar. Pollut. Bull.* 83, 317–323. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.034>
- Solecki, O., Jeanneau, L., Jardé, E., Gourmelon, M., Marin, C., Pourcher, A.M., 2011. Persistence of microbial and chemical pig manure markers as compared to faecal indicator bacteria survival in freshwater and seawater microcosms. *Water Res.* 45, 4623–4633. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.06.012>
- Soulier, A., Carrera, L., Jardé, E., Le Bot, B., de Lavenne, A., Jaffrézic, A., 2015. Occurrence des résidus médicamenteux d'origine vétérinaire et traceurs de contamination fécale dans les eaux de surface dans deux bassins versants bretons.
- Soulier, A., Jardé, E., Le Bot, B., Carrera, L., Jaffrézic, A., 2016. Résidus médicamenteux vétérinaires : quelles molécules rechercher dans les eaux superficielles en contexte d'élevage intensif? *Tech. Sci. Méthodes* 69–92. <https://doi.org/10.1051/tsm/201611069>
- Stackelberg, P.E., Gibs, J., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Lippincott, R.L., 2007. Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. *Sci. Total Environ.* 377, 255–272. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.095>
- Steene, J.C., Lambert, W.E., 2008. Comparison of matrix effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS analysis of nine basic pharmaceuticals in surface waters. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, 713–718. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.01.013>
- Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Profumo, A., Pretali, L., Fasani, E., Albini, A., 2012. Sunlight-induced degradation of soil-adsorbed veterinary antimicrobials

- Marbofloxacin and Enrofloxacin. *Chemosphere* 86, 130–137.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.09.053>
- Sun, L., Chen, L., Sun, X., Du, X., Yue, Y., He, D., Xu, H., Zeng, Q., Wang, H., Ding, L., 2009. Analysis of sulfonamides in environmental water samples based on magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction coupled with HPLC–UV detection. *Chemosphere* 77, 1306–1312.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.049>
- Tasho, R.P., Cho, J.Y., 2016. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. *Sci. Total Environ.* 563–564, 366–376.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.140>
- Thiele-Bruhn, S., 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 166, 145–167. <https://doi.org/10.1002/jpln.200390023>
- Thompson, T.S., Noot, D.K., Forrest, F., van den Heever, J.P., Kendall, J., Keenlside, J., 2009. Large volume injection for the direct analysis of ionophores and avermectins in surface water by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 633, 127–135.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.024>
- Togola, A., Budzinski, H., 2008. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 1177, 150–158.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.105>
- Tolls, J., 2001. Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3397–3406. <https://doi.org/10.1021/es0003021>
- Tong, L., Huang, S., Wang, Y., Liu, H., Li, M., 2014. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment of Jiangnan Plain, central China. *Sci. Total Environ.* 497–498, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.068>
- Tong, L., Li, P., Wang, Y., Zhu, K., 2009. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* 74, 1090–1097.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.051>
- Tran, N.H., Gin, K.Y.-H., Ngo, H.H., 2015. Fecal pollution source tracking toolbox for identification, evaluation and characterization of fecal contamination in receiving urban surface waters and groundwater. *Sci. Total Environ.* 538, 38–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.155>

- Tyagi, P., Edwards, D.R., Coyne, M.S., 2009. Distinguishing between human and animal sources of fecal pollution in waters: a review. *Int. J. Water* 5, 15. <https://doi.org/10.1504/IJW.2009.023080>
- Tyagi, P., Edwards, D.R., Coyne, M.S., 2007. Use of selected chemical markers in combination with a multiple regression model to assess the contribution of domesticated animal sources of fecal pollution in the environment. *Chemosphere* 69, 1617–1624. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.039>
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Van Epps, A., Blaney, L., 2016. Antibiotic Residues in Animal Waste: Occurrence and Degradation in Conventional Agricultural Waste Management Practices. *Curr. Pollut. Rep.* 2, 135–155. <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0037-1>
- Wade, C., Otero, E., Poon-Kwong, B., Rozier, R., Bachoon, D., 2015. Detection of human-derived fecal contamination in Puerto Rico using carbamazepine, HF183 Bacteroides, and fecal indicator bacteria. *Mar. Pollut. Bull.* 101, 872–877. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.016>
- Wegst-Uhrich, S.R., Navarro, D.A., Zimmerman, L., Aga, D.S., 2014. Assessing antibiotic sorption in soil: a literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides. *Chem. Cent. J.* 8, 5.
- Wei, R., Ge, F., Huang, S., Chen, M., Wang, R., 2011. Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere* 82, 1408–1414. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.067>
- Weiss, K., Schüssler, W., Porzelt, M., 2008. Sulfamethazine and flubendazole in seepage water after the sprinkling of manured areas. *Chemosphere* 72, 1292–1297. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.053>
- Wen, Y., Su, L.M., Qin, W.C., Fu, L., He, J., Zhao, Y.H., 2012. Linear and non-linear relationships between soil sorption and hydrophobicity: Model, validation and influencing factors. *Chemosphere* 86, 634–640. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.11.001>
- Xie, W.-Y., Shen, Q., Zhao, F.J., 2018. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review: Antibiotics and antibiotic resistance. *Eur. J. Soil Sci.* 69, 181–195. <https://doi.org/10.1111/ejss.12494>

- Xue, Q., Qi, Y., Liu, F., 2015. Ultra-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for the analysis of antibiotic residues in environmental waters. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 16857–16867. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4900-1>
- Yao, L., Wang, Y., Tong, L., Deng, Y., Li, Y., Gan, Y., Guo, W., Dong, C., Duan, Y., Zhao, K., 2017. Occurrence and risk assessment of antibiotics in surface water and groundwater from different depths of aquifers: A case study at Jiangnan Plain, central China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 135, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.006>
- Yao, L., Wang, Y., Tong, L., Li, Y., Deng, Y., Guo, W., Gan, Y., 2015. Seasonal variation of antibiotics concentration in the aquatic environment: a case study at Jiangnan Plain, central China. *Sci. Total Environ.* 527–528, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.091>
- Ye, Z., Weinberg, H.S., Meyer, M.T., 2007. Trace Analysis of Trimethoprim and Sulfonamide, Macrolide, Quinolone, and Tetracycline Antibiotics in Chlorinated Drinking Water Using Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 79, 1135–1144. <https://doi.org/10.1021/ac060972a>
- Zhang, X., Li, Y., Liu, B., Wang, J., Feng, C., Gao, M., Wang, L., 2014. Prevalence of Veterinary Antibiotics and Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in the Surface Water of a Livestock Production Region in Northern China. *PLoS ONE* 9, e111026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111026>
- Zhang, Y., Geißen, S.-U., Gal, C., 2008. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73, 1151–1161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>
- Zhou, L.-J., Wu, Q.L., Zhang, B.-B., Zhao, Y.-G., Zhao, B.-Y., 2016. Occurrence, spatiotemporal distribution, mass balance and ecological risks of antibiotics in subtropical shallow Lake Taihu, China. *Env. Sci Process. Impacts* 18, 500–513. <https://doi.org/10.1039/C6EM00062B>
- Zhou, L.-J., Ying, G.-G., Liu, S., Zhao, J.-L., Chen, F., Zhang, R.-Q., Peng, F.-Q., Zhang, Q.-Q., 2012. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1244, 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.076>
- Zocatelli, R., Lavrieux, M., Guillemot, T., Chassiot, L., Le Milbeau, C., Jacob, J., 2017. Fecal biomarker imprints as indicators of past human land uses: Source

distinction and preservation potential in archaeological and natural archives. *J. Archaeol. Sci.* 81, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2017.03.010>

Zrnčić, M., Gros, M., Babić, S., Kaštelan-Macan, M., Barcelo, D., Petrović, M., 2014. Analysis of anthelmintics in surface water by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 99, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.091>

# **ANNEXES**

ANNEXE 1 : Liste de RMV pré-sélectionnés par le GDT PRSE 2

ANNEXE 2 : Liste des molécules sélectionnées dans le cadre du projet REMEDES

ANNEXE 3 : Propriétés physico-chimiques des RMV d'intérêt

ANNEXE 4 : Résultats bruts des analyses des RMV et RMH dans les EB

ANNEXE 5 : Résultats des analyses des stanols dans les EB

ANNEXE 6 : Résultats des analyses microbiologiques dans les EB

ANNEXE 7 : Résultats des analyses de COD dans les EB

ANNEXE 8 : Débits des ressources au jour du prélèvement

ANNEXE 9 : Résultats bruts des analyses des RMV et RMH dans les ET

ANNEXE 10 : Résultats du test de conservation des échantillons à la congélation

## ANNEXE 1: Composés vétérinaire présélectionnés par le groupe de travail du Plan Régional Santé Environnement 2

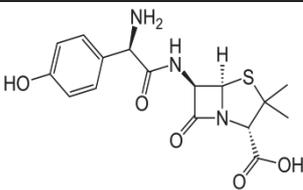
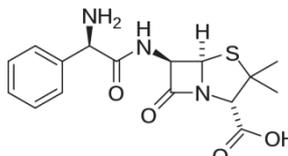
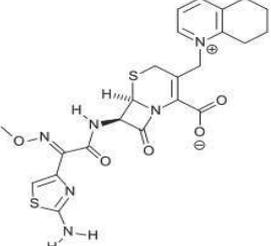
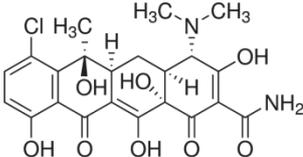
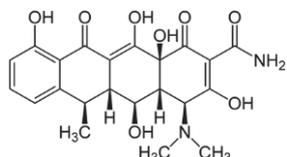
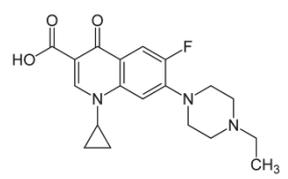
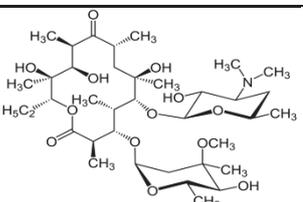
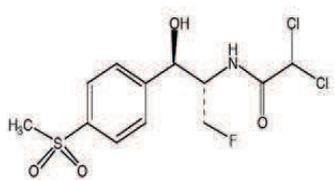
Classe thérapeutique	Molécule mère ou métabolite retenu	Classe thérapeutique	Molécule mère ou métabolite retenu
Antibiotiques	Acide oxolinique	Antibiotiques	Tilmicosine
	Ampicilline		Triméthoprim
	Amoxicilline		Tylosine
	Apramycine	Anti-inflammatoire	Phénylbutazone
	Benzylpénicilline	Antiparasitaires	Albendazole
	Céfalonium		Amitraz
	Chlortétracycline		Amprolium
	Colistine		Clorsulon
	Desfuoylceftiofur (métabolite)		Closantel
	Dihydrostreptomycine		Decoquinat
	Doxycycline		Deltaméthrine
	Erythromycine		Diclazuril
	Florfénicol		Dicyclanil
	Fluméquine		Diazinon
	Gentamycine		Fenvalérate
	Lincomycine		Flubendazole
	Néomycine		Lévamisole
	Néospiramycine (métabolite)		Mebendazole
	Oxytétracycline		Nitroxyuil
	Phenoxyméthylpénicilline		Oxibendazole
	Spectinomycine		Oxyclozanide
	Sulfadiazine		Phoxim
	Sulfadiméthoxine		Pipérazine
	Sulfadoxine		Toltrazuril
	Sulfaguanidine		Triclabendazole
	Sulfaméthazine		Toltrazuril
Sulfaméthoxyypyridazine	Triclabendazole		
Tiamuline	Désinfectant		Formaldéhyde

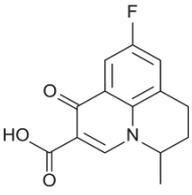
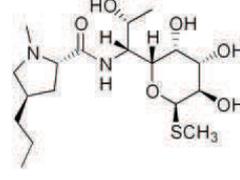
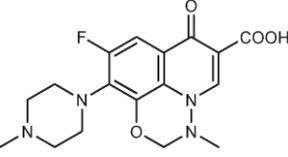
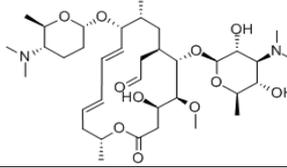
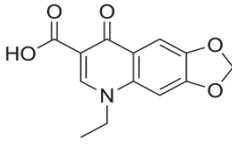
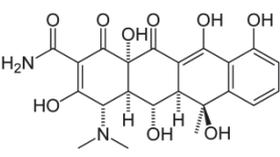
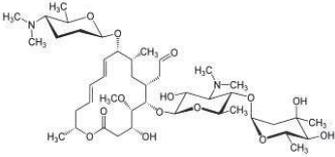
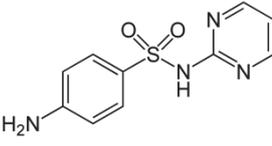
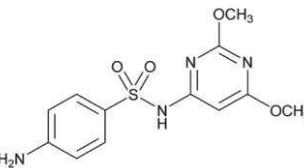
## ANNEXE 2 : Liste des molécules sélectionnées dans le cadre du projet REMEDES

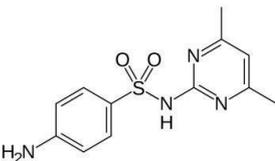
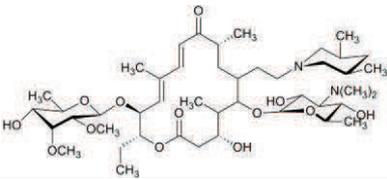
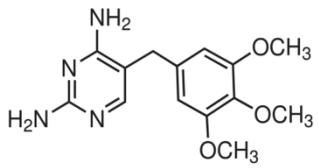
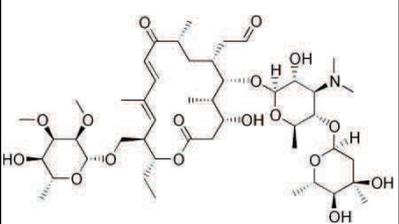
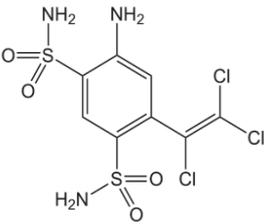
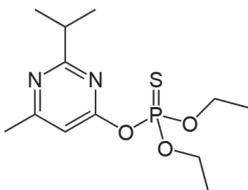
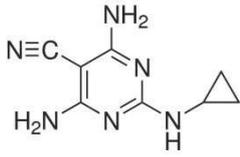
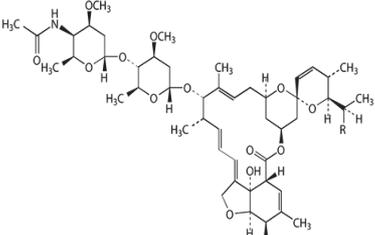
Classe thérapeutique	Molécules sélectionnées par REMEDES
Antibiotiques	Amoxicilline
	Ampicilline
	Benzylopénicilline
	Cefalexine
	Cefquinome
	Ceftiofur
	Chlortétracycline
	Cloxacilline
	Doxycycline
	Enrofloxacin
	Florfenicol
	Lincomycine
	Marbofloxacin
	Néomycine
	Oxytétracycline
	Spectinomycine
	Spiramycine
	Sulfadiazine
	Sulfadiméthoxine
	Sulfaméthazine
Triméthoprime	
Tylosine	

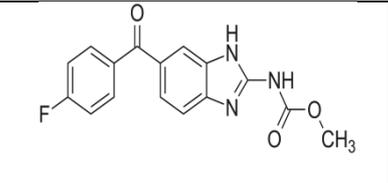
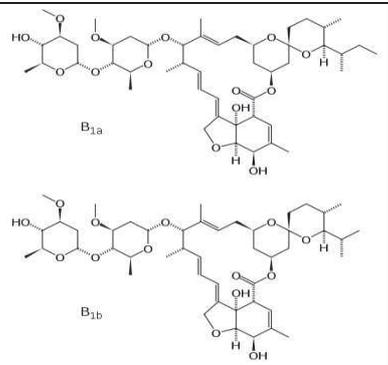
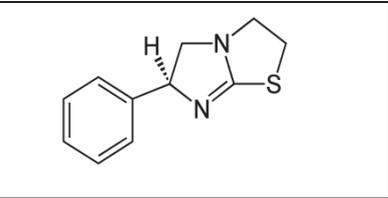
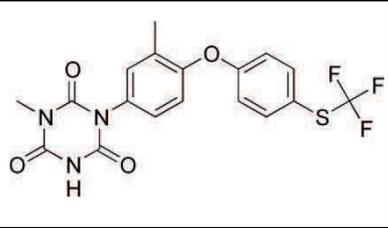
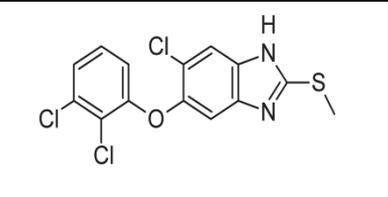
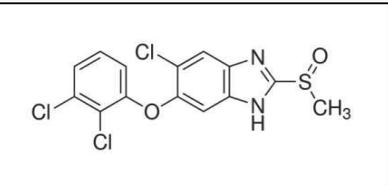
Classe thérapeutique	Molécules sélectionnées par REMEDES
Antiparasitaires	Amitraz
	Deltaméthrine
	Eprinomectine
	Fenbendazole
	Flubendazole
	Ivermectine
	Lévamisole
	Oxibendazole
Anticoccidiens	Décoquinate
	Diclazuril
	Toltrazuril
Anti-inflammatoires	Acide acétylsalicylique
	Dexaméthasone
	Flunixin
	Kétoprofène
	Meloxicam
Antalgique	Paracétamol
Hormone	Altrénogest
	Cloprosténol
	Dinoprost
	Oxytocine
	PMSG

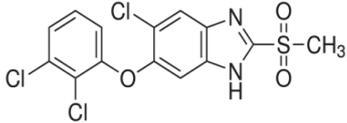
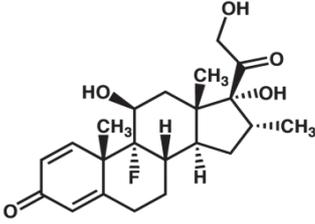
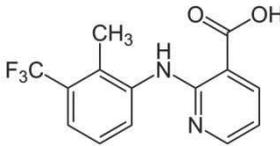
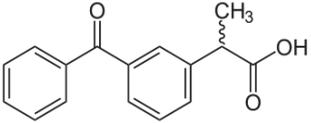
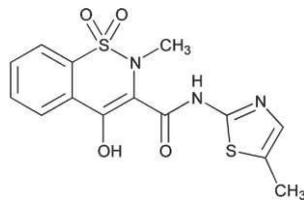
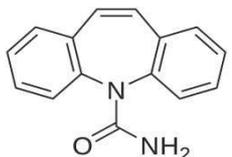
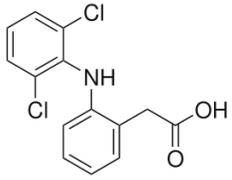
### ANNEXE 3 : Structures et propriétés des RMV analysés

Classe thérapeutique	Molécule	Structure	Propriété
Antibiotiques	Amoxicilline CAS : 26787-78-0 $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ Masse moléculaire (MM) : 365.4 g/mol		Log P = 0.87 <sup>a, b, c</sup> Pkas= 3.2 ; 11.7 <sup>a, c</sup> Koc = 108.4 L/kg <sup>b</sup>
	Ampicilline CAS : 69-53-4 $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ MM: 349.41g/mol		Log P = 1.35 <sup>a, b, c</sup> Pkas= 2.5 ; 7.3 <sup>a, c</sup> Koc = 84.4 L/kg <sup>b</sup>
	Cefquinome CAS : 84957-30-2 $C_{23}H_{24}N_6O_5S_2$ MM: 528.6 g/mol		Log P = -1.49 <sup>b</sup> Pkas= 2.6 ; 9.84 <sup>d</sup> Koc = 3.26x10 <sup>4</sup> L/kg <sup>b</sup>
	Chlortétracycline CAS : 57-62-5 $C_{22}H_{23}ClN_2O_8$ MM: 478.89 g/mol		Log P = -0.62 <sup>b</sup> Koc = 72.18 L/kg <sup>b</sup>
	Doxycycline CAS : 564-25-0 $C_{22}H_{24}N_2O_8$ MM: 444.44 g/mol		Log P = -0.02 <sup>a, b, c</sup> Koc = 49.36 L/kg <sup>b</sup>
	Enrofloxacin CAS : 93106-60-6 $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ MM: 359.4 g/mol		Log P = 0.70 <sup>b</sup> Koc = 14.93 L/kg <sup>b</sup>
	Erythromycine CAS : 114-07-8 $C_{37}H_{67}NO_{13}$ MM: 733.93 g/mol		Log P = 3.06 <sup>a, c</sup> Pka1= 8.9 <sup>c</sup> Koc = 566.9 L/kg <sup>b</sup>
	Florfenicol CAS : 73231-34-2 $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$ MM: 358.21 g/mol		Log P = -0.04 <sup>b</sup> Koc= 58.22 L/kg <sup>b</sup>

<p>Fluméquine CAS : 42835-25-6</p> <p><math>C_{14}H_{12}FNO_3</math> MM: 261.25 g/mol</p>		<p>Log P = 1.6<sup>a,c</sup></p> <p>Pka1 = 6.5<sup>a,c</sup></p> <p>Koc = 38.23 L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Lincomycine CAS : 154-21-2</p> <p><math>C_{18}H_{34}N_2O_6S</math> MM: 406.54 g/mol</p>		<p>Log P = 0.56<sup>a,b</sup></p> <p>Pka1 = 7.6<sup>c</sup></p> <p>Koc = 68.67 L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Marbofloxacine CAS : 115550-35-1</p> <p><math>C_{17}H_{19}FN_4O_4</math> MM: 362.36 g/mol</p>		<p>Log P = -2.92<sup>b</sup></p> <p>Pkas = 6.33; 8.84<sup>e</sup></p> <p>Koc = 10 L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Néospiramycine<sup>†</sup> CAS : 70253-62-2</p> <p><math>C_{36}H_{62}N_2O_{11}</math> MM: 698.88 g/mol</p>		<p>Koc = 32.26 L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Acide oxolinique CAS : 14698-29-4</p> <p><math>C_{13}H_{11}NO_5</math> MM: 261.23 g/mol</p>		<p>Log P = 0.94<sup>b</sup></p> <p>Koc = 10 L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Oxytétracycline CAS : 79-57-2</p> <p><math>C_{22}H_{24}N_2O_9</math> MM: 460.44 g/mol</p>		<p>Log P = -0.9<sup>a,b,c</sup></p> <p>Pka1 = 3.27<sup>a</sup></p> <p>Pka3 = 9.5<sup>a,c</sup></p> <p>Koc = 73.65 L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Spiramycine CAS : 8025-81-8</p> <p><math>C_{43}H_{74}N_2O_{14}</math> MM: 843.05 g/mol</p>		<p>Log P = 1.87<sup>a,c</sup></p> <p>Pkas = 7.88; 9.28<sup>a</sup></p> <p>Koc = 144.7 L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Sulfadiazine CAS : 68-35-9</p> <p><math>C_{10}H_{10}N_4O_2S</math> MM: 250.28 g/mol</p>		<p>Log P = -0.09<sup>a,b</sup></p> <p>Pka1 = 6.36<sup>a</sup></p> <p>Koc = 74.31 L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Sulfadiméthoxine CAS : 122-11-2</p> <p><math>C_{12}H_{14}N_4O_4S</math> MM: 310.33 g/mol</p>		<p>Log P = 1.63<sup>a,b,c</sup></p> <p>Pkas = 2; 6.7<sup>g</sup></p> <p>Koc = 30.51 L/kg<sup>b</sup></p>

	<p>Sulfaméthazine CAS : 57-68-1</p> <p><math>C_{12}H_{14}N_4O_2S</math> MM: 278.33 g/mol</p>		<p>Log P= 0.89<sup>a,b</sup></p> <p>Pkas= 2.65; 7.65<sup>a</sup></p> <p>Koc =191.3L/kg<sup>b</sup></p>
	<p>Tilmicosine CAS : 108050-54-0</p> <p><math>C_{46}H_{80}N_2O_{13}</math> MM: 869.13 g/mol</p>		<p>Log P= 3.80<sup>a,c</sup></p> <p>Pka1= 8.18<sup>a,c</sup></p> <p>Koc =1.1x10<sup>4</sup> L/kg<sup>b</sup></p>
	<p>Trimétoprime CAS : 738-70-5</p> <p><math>C_{14}H_{18}N_4O_3</math> MM: 290.32 g/mol</p>		<p>Log P= 0.91<sup>a,b,c</sup></p> <p>Pkas= 1.32; 7.45<sup>g</sup> 7.12<sup>a,c</sup></p> <p>Koc =718.8 L/kg<sup>b</sup></p>
	<p>Tylosine CAS : 1401-69-0</p> <p><math>C_{46}H_{77}NO_{17}</math> MM: 916.12 g/mol</p>		<p>Log P = 1.63<sup>a,c</sup></p> <p>Pka1= 7.73<sup>a,c</sup></p> <p>Koc = 746 L/kg<sup>b</sup></p>
<b>Antiparasitaires</b>	<p>Clorsulon CAS: 60200-06-8</p> <p><math>C_8H_8Cl_3N_3O_4S_2</math> MM: 380.66 g/mol</p>		<p>Log P= 1.09<sup>b</sup></p> <p>Koc = 124.8 L/kg<sup>b</sup></p>
	<p>Diazinon CAS: 333-41-5</p> <p><math>C_{12}H_{21}N_2O_3PS</math> MM: 304.35 g/mol</p>		<p>Log P= 3.81<sup>a,b,c</sup></p> <p>Pka=2.6<sup>a,c</sup></p> <p>Koc =3034 L/kg<sup>b</sup></p>
	<p>Dicyclanil CAS: 112636-83-6</p> <p><math>C_8H_{10}N_6</math> MM: 190.21 g/mol</p>		<p>Log P= -0.51<sup>b</sup></p> <p>Pka= 4.58<sup>g</sup></p> <p>Koc = 10 L/kg<sup>b</sup></p>
	<p>Eprinomectine CAS: 123997-26-2</p> <p><math>C_{50}H_{75}NO_{14}</math> MM: 913.52 g/mol</p>		<p>Log P= 5.4<sup>1</sup></p> <p>Koc =2.7x10<sup>5</sup> L/kg<sup>b</sup></p>

<p>Flubendazole CAS: 31430-15-6</p> <p><math>C_{16}H_{12}FN_3O_3</math> MM: 313.28 g/mol</p>		<p>Log P= 2.91<sup>b</sup></p> <p>Pkas= 3.6; 9.6<sup>h</sup></p> <p>Koc =4801 L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Ivermectine CAS: 70288-86-7</p> <p><math>C_{48}H_{74}O_{14}</math> MM: 875.09 g/mol</p>		<p>Log P= 3.2<sup>j</sup></p> <p>Koc =4.6x10<sup>5</sup> L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Lévamisole CAS: 14769-73-4</p> <p><math>C_{11}H_{12}N_2S</math> MM: 204.29 g/mol</p>		<p>Log P= 1.84<sup>a,b</sup></p> <p>Koc =3764 L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Toltrazuril CAS: 69004-03-1</p> <p><math>C_{18}H_{14}F_3N_3O_4S</math> MM: 425.38 g/mol</p>		<p>Log P= 6.50<sup>b</sup></p> <p>Koc = 1.7x10<sup>4</sup> L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Toltrazuril sulfoxide<sup>f</sup> CAS: 69004-15-5</p> <p><math>C_{18}H_{14}F_3N_3O_5S</math> MM: 441.38 g/mol</p>		<p>Log P= 5.27<sup>b</sup></p> <p>Koc =1924 L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Toltrazuril sulfone<sup>t</sup> CAS: 69004-04-2</p> <p><math>C_{18}H_{14}F_3N_3O_6S</math> MM : 457.38 g/mol</p>		<p>Log P=5.40<sup>b</sup></p> <p>Koc =2146 L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Triclabendazole CAS: 68786-66-3</p> <p><math>C_{14}H_9Cl_3N_2OS</math> MM: 359.66 g/mol</p>		<p>Log P= 5.53<sup>b</sup></p> <p>Koc =8.4x10<sup>4</sup> L/kg<sup>b</sup></p>
<p>Triclabendazole sulfoxide<sup>t</sup> CAS: 100648-13-3</p> <p><math>C_{14}H_9Cl_3N_2O_2S</math> MM: 375.66 g/mol</p>		<p>Log P= 4.77<sup>b</sup></p> <p>Koc =8566 L/kg<sup>b</sup></p>

	Triclabendazole sulfone <sup>f</sup> CAS: 106791-37-1  $C_{14}H_9Cl_3N_2O_3S$ MM: 391.66 g/mol		Log P= 2.95 <sup>b</sup>  Koc =8.4x10 <sup>4</sup> L/kg <sup>b</sup>
<b>Anti-inflammatoires</b>	Déxaméthasone CAS: 50-02-2  $C_{22}H_{29}FO_5$ MM: 392.46 g/mol		Log P=1.83 <sup>a,b,c</sup>  Koc = 290.8 L/kg <sup>b</sup>
	Flunixin CAS: 38677-85-9  $C_{14}H_{11}F_3N_2O_2$ MM: 296.25 g/mol		Log P=4.90 <sup>b</sup>  Koc = 540.1 L/kg <sup>b</sup>
	Kétoprofène CAS: 22071-15-4  $C_{16}H_{14}O_3$ MM: 254.28 g/mol		Log P=3.12 <sup>a,b,c</sup> Pka= 4.45 <sup>a</sup> Koc = 385.2 L/kg <sup>b</sup>
	Méloxicam CAS: 71125-38-7  $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$ MM: 351.0 g/mol		Log P= 3.43 <sup>a,b</sup> Pka=4.08 <sup>c</sup> Koc = 44.5 L/kg <sup>b</sup>
<b>Traceurs d'activité humaine</b>	Carbamazépine CAS: 298-46-4  $C_{15}H_{12}N_2O$ MM: 236.27 g/mol		Log P= 2.45 <sup>a,b,c</sup> Pka= 13.9 <sup>a,c</sup> Koc =1328 L/kg <sup>b</sup>
	Diclofénac CAS: 15307-86-5  $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ MM: 296.15 g/mol		Log P: 4.51 <sup>a,b,c</sup> Pka=4.15 <sup>a,c</sup> Koc =458 L/kg <sup>b</sup>

Log P : coefficient de partage octanol/eau

<sup>a</sup>Pubchem

<sup>b</sup>Epsuite

<sup>c</sup>HSDB-Toxnet

<sup>d</sup>Chemicalize.com

<sup>e</sup> Jiménez-Lozano et al., 2002

<sup>f</sup>Metabolite

<sup>g</sup>Salvia et al., 2014

<sup>h</sup>Weiss et al., 2008

<sup>i</sup>Litskas et al., 2011

<sup>j</sup>Liebig et al., 2010

## ANNEXE 4: Résultats bruts des analyses des RMV et RMH dans les EB

### CAMPAGNE 1

Site EB	Concentrations des RMV (ng/L)						
	FF	FLM	LIN	SMZ	LEV	CBZ	DFC
A	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
B	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
C	<b>21</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>6</b>
D	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
E	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>6</b>	<LQ
F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G	<b>22</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
H	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
I	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
K	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
L	<b>7</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
N	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>32</b>	<b>42</b>
O	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>11</b>	<LQ
Q	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>14</b>
R	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>8</b>	<b>5</b>	<LQ
S	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>22</b>	<b>16</b>
U	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
V	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
W	<LQ	<LQ	<LQ	<b>35</b>	<LQ	<b>14</b>	<b>9</b>
X	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Y	<LQ	<b>13</b>	<LQ	<b>31</b>	<LQ	<b>5</b>	<LQ
Z	<LQ	<LQ	<b>6</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

CAMPAGNE 2

Site	Concentrations des RMV (ng/L)												
	FF	SMZ	TIL	EPR	IVER	TRI	TRI sulfoxide	FLX	FLM	CBZ	DFC		
EB	<LQ	<LQ	<LQ	<b>20</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
A	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
B	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
C	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
D	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
E	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>9</b>	<LQ		
F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
G	<b>434</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>6</b>		
H	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
I	<LQ	<LQ	<LQ	<b>45</b>	<LQ	<LQ	<b>6</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		
J	<b>436</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>8</b>	<LQ	<LQ	<b>14</b>	<b>13</b>		
K	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>6</b>	<b>10</b>		
L	<LQ	<LQ	<LQ	<b>19</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<LQ	<LQ	<LQ			
M	<LQ	<LQ	<LQ	<b>10</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>6</b>		
P	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>9</b>	<LQ		
U	<LQ	<LQ	<b>9</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>5</b>	<LQ	<LQ	<LQ		
Y	<LQ	<b>13</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>13</b>	<b>11</b>	<LQ		
Z	<LQ	<LQ	<b>6</b>	<b>7</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ		

CAMPAGNE 3

Site	Concentrations des RMV (ng/L)												
	FF	FLIM	NEO	SDZ	SMZ	TIL	TMP	EPR	FLX	OTC	CBZ	DFC	
EB	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	9	<LQ	<LQ	36	<LQ	<LQ	
A	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	7	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
B	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	7	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	6	9	
C	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	5	<LQ	
D	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	11	<LQ	
E	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
G	<LQ	<LQ	24	508	<LQ	<LQ	121	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
H	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
I	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
J	930	<LQ	<LQ	2946	<LQ	<LQ	468	<LQ	<LQ	<LQ	8	10	
K	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	11	6	
L	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	18	<LQ	<LQ	325	7	<LQ	
M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	15	8	
N	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	14	<LQ	71	75	
O	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
P	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	32	<LQ	
Q	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	36	30	
R	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	13	<LQ	
S	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	76	30	
U	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
V	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
W	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	33	<LQ	
X	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	22	6	
Y	<LQ	10	<LQ	<LQ	66	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	25	<LQ	
Z	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	

CAMPAGNE 4

Site	Concentrations des RMV (ng/L)									
	SMZ	TIL	EPR	TRI sulfone	LIN	CBZ	DFC			
EB	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
A	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
B	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
C	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
E	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>5</b>	<LQ			
F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
G	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
H	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
I	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
K	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
L	<LQ	<LQ	<b>15</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
M	<LQ	<LQ	<b>16</b>	<b>9</b>	<LQ	<LQ	<LQ			
N	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>18</b>			
O	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
P	<LQ	<b>7</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<b>15</b>	<b>11</b>			
Q	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>9</b>			
R	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>5</b>	<LQ	<b>5</b>			
S	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>7</b>			
U	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
V	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
W	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>13</b>			
X	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
Y	<b>6</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ			
Z	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>5</b>			

CAMPAGNE 5

Site	Concentrations des RMV (ng/L)						
	EB	FF	FFA	IVER	KET	CBZ	DFC
C	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
E	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
K	<b>287</b>	<b>52</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
L	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
N	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>10</b>	<b>19</b>
O	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>61</b>	<LQ	<LQ
P	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Q	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>13</b>	<b>16</b>
R	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>5</b>	<LQ
S	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>11</b>
V	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
W	<LQ	<LQ	<b>13</b>	<LQ	<LQ	<b>14</b>	<LQ
X	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

CBZ : Carbamazépine

DFC : Diclofénac

EPR : Eprinomectine

FF : Florfénicol

FFA : Florfénicol amine

FLM : Fluméquine

FLX : Flunixin

IVER : Ivermectine

KET : Kétoprofène

LEV : Lévamisole

LIN : Lincomycine

NEO : Néospiramycine

OTC : Oxytétracycline

SDZ : Sulfadiazine

SMZ : Sulfaméthazine

TIL : Tilmicosine

TMP : Triméthoprim

TRI : Triclabendazole

TRI sulfone : Triclabendazole sulfone

TRI sulfoxide : Triclabendazole sulfoxide

## ANNEXE 5: Résultats des analyses des stanols dans les EB

### CAMPAGNE 1

Site	Concentrations des stanols (µg/l)										Somme des stanols	Source de la contamination	
	Co	Epico	Chol	Stigma	Epistigma	Ethylco	Ethylépico	Camp	Sito				
EB													
A	0,19	<LQ	0,20	0,14	0,11	<LQ	0,30	<LQ	0,24	1,18	-		
B	0,45	<LQ	0,16	nd	nd	<LQ	0,76	<LQ	0,28	1,64	-		
C	0,02	<LQ	0,07	0,02	0,02	0,05	0,03	0,02	0,09	0,33	Bovine		
D	0,11	0,04	0,05	nd	nd	0,17	0,04	0,04	0,10	0,55	Porcine		
E	0,37	<LQ	0,50	0,22	0,31	<LQ	0,47	<LQ	0,53	2,39	-		
F	0,35	<LQ	0,23	0,24	0,22	<LQ	0,53	<LQ	0,27	1,85	-		
G	0,04	0,01	0,09	0,02	0,03	0,09	0,03	0,05	0,13	0,50	Bovine / Porcine		
H	0,40	<LQ	0,33	0,37	0,37	<LQ	0,81	<LQ	0,08	2,37	-		
I	0,05	0,02	0,05	0,05	0,04	0,08	0,02	0,02	0,08	0,41	Bovine/Humaine/Porcine		
J	1,75	0,30	0,95	0,43	0,35	2,14	0,77	0,25	1,07	7,99	Humaine / Porcine		
K	0,68	0,27	0,89	0,30	nd	1,86	0,66	0,49	1,43	6,58	Porcine		
L	0,02	<LQ	0,07	0,01	0,02	0,06	0,02	0,03	0,09	0,32	Bovine		
M	0,09	0,03	0,10	0,07	0,07	0,18	0,04	0,05	0,15	0,78	Porcine / Humaine		
N	0,16	0,06	0,19	0,08	0,07	0,25	0,07	0,10	0,64	1,62	-		
O	ECHANTILLON PERDU												
P	0,03	0,01	0,10	0,01	0,02	0,11	0,03	0,03	0,12	0,47	Bovine/Porcine/Humaine		
Q	0,08	0,03	0,04	0,08	0,08	0,10	0,02	0,03	0,07	0,52	Porcine/Humaine/Bovine		
R	0,05	0,03	0,06	0,03	0,04	0,08	0,03	0,04	0,21	0,58	-		
S	0,23	0,07	0,28	0,11	0,08	0,43	0,12	0,14	0,67	2,13	Bovine		
U	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,00	-		
V	0,12	0,06	0,24	0,09	0,08	0,19	0,11	0,12	0,25	1,27	Bovine		
W	0,12	0,05	0,15	0,06	0,06	0,16	0,07	0,08	0,16	0,92	Porcine/Bovine/Humaine		
X	0,11	0,07	0,18	0,09	0,06	0,21	0,12	0,10	0,21	1,16	Porcine / Bovine		
Y	0,12	0,06	0,17	0,06	0,05	0,20	0,08	0,09	0,19	1,02	Porcine/Bovine/Humaine		
Z	0,05	0,02	0,07	0,03	0,06	0,10	0,03	0,04	0,11	0,51	Porcine/Bovine/Humaine		

CAMPAGNE 2

Site	Concentrations des stanols (µg/l)										Somme des stanols	Source de la contamination	
	Co	Epico	Chol	Stigma	Epistigma	Ethylco	Ethylépico	Camp	Sito				
EB													
A	0,08	<LQ	0,11	0,01	0,05	0,18	0,01	0,07	0,15	0,67	Porcine		
B	0,04	0,01	0,03	<LQ	0,02	0,02	<LQ	<LQ	0,04	0,16	-		
C	1,19	0,89	1,39	0,21	0,06	1,67	0,38	0,62	2,71	9,11	Bovine / Porcine		
D	0,15	0,10	0,15	0,04	0,02	0,53	0,07	0,09	0,23	1,38	Porcine		
E	0,07	0,03	0,09	0,02	0,03	0,23	0,05	0,09	0,15	0,76	Porcine		
F	0,02	0,02	0,06	<LQ	<LQ	0,06	0,01	0,02	0,12	0,30	Bovine		
G	0,16	0,04	0,17	0,06	<LQ	0,37	0,06	0,14	0,27	1,27	Porcine		
H	0,10	0,02	0,08	0,01	0,11	0,28	0,02	0,15	0,20	0,97	Porcine		
I	0,02	<LQ	0,04	<LQ	0,05	0,06	0,01	0,01	0,05	0,24	Bovine/Humaine/Porcine		
J	0,18	0,04	0,27	0,04	0,01	0,35	0,05	0,17	0,47	1,60	Bovine / Porcine		
K	0,13	0,07	0,15	0,18	0,06	0,31	0,15	0,10	0,88	2,04	-		
L	0,03	<LQ	0,05	<LQ	0,01	0,07	<LQ	0,03	0,06	0,25	-		
M	0,04	<LQ	0,03	<LQ	0,02	0,07	0,01	0,02	0,05	0,24	Humaine / Porcine		
P	0,32	0,05	0,36	0,05	0,04	0,71	0,07	0,19	0,39	2,17	Porcine		
U	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,00	-		
Y	0,01	<LQ	0,08	<LQ	0,02	0,05	0,02	nd	0,05	0,22	-		
Z	0,04	<LQ	0,07	0,01	0,01	0,10	0,03	0,02	0,09	0,37	Bovine/Porcine/Humaine		

CAMPAGNE 3

Site	Concentrations des stanols (µg/l)											Somme des stanols	Source de la contamination	
	Co	Epico	Chol	Stigma	Epistigma	Ethylco	Ethylépico	Camp	Sito					
EB														
A	0,04	0,02	0,08	0,02	0,03	0,09	0,02	0,04	0,18	0,51	Bovine			
B	0,02	0,03	0,07	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,08	0,32	Bovine			
C	0,03	0,02	0,09	0,02	0,03	0,13	0,04	0,04	0,12	0,51	Porcine / Bovine			
D	0,15	0,12	0,27	0,02	0,22	0,27	0,08	0,08	0,21	1,44	Porcine / Humaine			
E	0,02	0,02	0,05	0,01	0,06	0,02	0,01	0,02	0,06	0,27	Bovine			
F	0,03	0,03	0,07	0,02	0,02	0,05	0,02	0,02	0,11	0,38	Bovine			
G	0,05	0,02	0,09	0,02	0,04	0,08	0,02	0,06	0,17	0,56	Bovine			
H	0,02	0,03	0,06	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03	0,21	0,43	Bovine			
I	0,04	0,03	0,09	0,03	0,04	0,10	0,04	0,04	0,14	0,55	Bovine/ Humaine/ Porcine			
J	0,04	0,03	0,07	0,02	0,02	0,06	0,02	0,03	0,12	0,41	Bovine / Porcine			
K	0,04	0,02	0,08	0,02	0,04	0,10	0,02	0,03	0,09	0,43	Porcine / Humaine			
L	0,08	0,03	0,17	0,03	0,05	0,22	0,05	0,09	0,21	0,93	Porcine / Bovine			
M	0,04	0,02	0,08	0,03	0,03	0,13	0,05	0,04	0,12	0,52	Porcine / Humaine			
N	0,06	0,02	0,11	0,03	0,03	0,14	0,04	0,04	0,11	0,57	Bovine / Porcine			
O	0,02	0,01	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,05	0,20	Bovine			
P	0,04	0,02	0,07	0,02	0,04	0,09	0,02	0,03	0,08	0,42	Bovine/Porcine/Humaine			
Q	0,10	0,02	0,09	0,02	0,03	0,10	0,02	0,03	0,07	0,49	Humaine/Porcine/Bovine			
R	0,03	0,02	0,09	0,03	0,04	0,05	0,03	0,03	0,07	0,39	Bovine/Porcine/Humaine			
S	0,03	0,02	0,09	0,02	0,04	0,08	0,02	0,03	0,10	0,44	Bovine / Humaine			
U	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,05	0,20	Bovine			
V	0,03	0,03	0,06	0,02	0,02	0,04	0,02	0,04	0,85	1,10	-			
W	0,03	0,03	0,09	0,02	0,05	0,03	0,02	0,03	0,09	0,38	Bovine			
X	0,02	0,03	0,06	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,07	0,28	Bovine			
Y	0,04	0,04	0,10	0,02	0,03	0,04	0,03	0,03	0,11	0,44	Bovine			
Z	0,02	0,03	0,09	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,07	0,28	Bovine			

CAMPAGNE 4

Site	Concentrations des stanols (µg/l)										Somme des stanols	Source de la contamination	
	Co	Epico	Chol	Stigma	Epistigma	Ethylico	Ethylépico	Camp	Sito				
EB													
A	0,03	<LQ	0,08	<LQ	<LQ	0,12	0,07	0,02	0,21	0,52	Bovine		
B	0,06	0,02	0,11	0,04	<LQ	0,19	0,12	0,05	0,20	0,78	Bovine/Humaine		
C	0,12	0,02	0,12	0,07	<LQ	0,21	0,14	0,04	0,19	0,90	Bovine/Humaine		
E	0,04	<LQ	0,07	<LQ	<LQ	0,10	0,05	0,01	0,09	0,36	Bovine/Humaine		
F	0,01	<LQ	0,07	<LQ	<LQ	0,10	0,06	<LQ	0,13	0,37	-		
G	0,03	<LQ	0,07	<LQ	<LQ	0,10	0,05	0,02	0,13	0,40	Bovine		
H	0,03	<LQ	0,10	0,02	<LQ	0,16	0,11	0,02	0,12	0,56	Bovine		
I	0,02	<LQ	0,13	<LQ	<LQ	0,18	0,10	<LQ	0,14	0,57	-		
J	0,07	0,02	0,08	0,01	<LQ	0,13	0,06	0,04	0,45	0,86	Bovine		
K	0,06	0,01	0,09	0,04	<LQ	0,16	0,10	0,03	0,16	0,64	Bovine/Humaine		
L	0,02	<LQ	0,07	<LQ	<LQ	0,11	0,06	<LQ	0,08	0,34	-		
M	0,02	<LQ	0,06	<LQ	<LQ	0,09	0,05	<LQ	0,07	0,28	-		
N	0,12	0,02	0,17	0,05	<LQ	0,29	0,18	0,08	0,23	1,15	Bovine/Porcine		
O	<LQ	<LQ	0,09	<LQ	<LQ	0,15	0,09	<LQ	0,13	0,45	-		
P	0,09	0,01	0,11	0,02	<LQ	0,18	0,08	0,03	0,14	0,66	Bovine/Porcine/Humaine		
Q	0,23	0,05	0,21	0,12	0,04	0,42	0,28	0,16	0,67	2,18	Bovine		
R	0,08	0,03	0,12	<LQ	<LQ	0,21	0,13	<LQ	0,16	0,73	Bovine/Porcine/Humaine		
S	0,08	0,02	0,09	0,01	0,02	0,17	0,09	<LQ	0,13	0,60	Humaine/Bovine		
U	<LQ	<LQ	0,06	<LQ	<LQ	0,09	0,05	<LQ	0,08	0,28	-		
V	0,07	0,02	0,11	0,03	<LQ	0,19	0,11	0,02	0,15	0,69	Bovine/Humaine		
W	0,03	<LQ	0,09	<LQ	<LQ	0,16	0,09	<LQ	0,11	0,48	-		
X	0,04	<LQ	0,07	<LQ	<LQ	0,11	0,07	<LQ	0,08	0,36	-		
Y	0,13	0,02	0,14	0,06	<LQ	0,25	0,16	0,06	0,21	1,04	Bovine/Humaine		
Z	0,04	<LQ	0,10	0,01	<LQ	0,15	0,09	0,01	0,12	0,51	Humaine/Bovine		

CAMPAGNE 5

Site	Concentrations des stanols (µg/l)										Somme des stanols	Source de la contamination	
	Co	Epico	Chol	Stigma	Epistigma	Ethylico	Ethylépico	Camp	Sito				
EB													
C	0,02	<LQ	0,02	<LQ	<LQ	0,02	<LQ	0,01	0,05	0,12	0,12	-	
E	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	
G	0,05	<LQ	0,06	0,01	0,02	0,12	0,01	0,04	0,06	0,38	0,38	Porcine	
K	0,03	<LQ	0,03	0,01	0,01	0,07	0,02	0,02	0,03	0,23	0,23	Porcine	
L	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	
N	0,14	0,02	0,12	0,07	0,06	0,23	0,09	0,07	0,14	0,94	0,94	Bovine/Porcine	
O	0,02	<LQ	0,02	<LQ	<LQ	0,04	0,02	0,02	0,03	0,16	0,16	Bovine/Humaine	
P	0,01	<LQ	0,01	nd	nd	0,02	0,02	0,01	0,03	0,10	0,10	Bovine	
Q	0,01	<LQ	0,01	nd	nd	0,02	0,01	<LQ	0,03	0,08	0,08	Bovine	
R	<LQ	<LQ	0,01	nd	nd	0,01	0,01	<LQ	0,03	0,07	0,07	-	
S	0,16	0,05	0,12	0,06	0,04	0,35	0,11	0,07	0,15	1,11	1,11	Porcine	
V	<LQ	<LQ	0,01	nd	nd	<LQ	0,01	<LQ	0,01	0,04	0,04	-	
W	<LQ	<LQ	0,019	<LQ	<LQ	0,012	<LQ	<LQ	0,023	0,054	0,054	-	
X	0,01	<LQ	0,02	nd	nd	0,01	<LQ	<LQ	0,03	0,07	0,07	-	

Co : Coprostanol

Epico : Epicoprostanol

Chol : Cholestanol

Stigma : 5β-stigmasteranol

Epistigma : 5β-epistigmasteranol

Ethylico : 24-ethylcoprostanol

Ethylépico : 24-ethylepicoprostanol

Camp : Campestanol

Sito : Sitostanol

## ANNEXE 6: Résultats des analyses microbiologiques dans les EB

Site EB	Concentration C1 (/100ml)		Concentration C2 (/100ml)		Concentration C3 (/100ml)		Concentration C4 (/100ml)		Concentration C5 (/100ml)	
	E.coli	Enterocoques								
A	304	46	143	<15	260	<38	350	<38	-	-
B	195	<15	15	45	38	38	250	120	-	-
C	94	15	110	<15	560	310	570	120	120	78
D	215	46	4753	720	15	<15	-	-	-	-
E	15	<15	<15	15	<38	<38	<38	<38	160	38
F	127	15	292	45	160	260	640	120	-	-
G	272	<15	805	30	210	<38	120	<38	760	210
H	<15	30	<15	15	78	<38	120	<38	-	-
I	77	30	1033	213	630	38	120	<38	-	-
J	371	<15	465	<15	120	38	580	38	-	-
K	415	<15	5712	728	260	38	450	<38	720	310
L	94	<15	485	77	490	310	38	<38	750	160
M	94	61	1573	77	540	77	120	<38	-	-
N	309	15	-	-	720	160	2500	<38	2000	78
O*	<1	<1	-	-	35	16	5	4	20	4
P	457	15	1358	45	470	390	570	78	21000	2400
Q	266	45	-	-	120	38	1000	78	7000	6500
R	15	61	-	-	<38	<38	120	38	38	38
S	45	15	-	-	250	76	580	160	1100	38
U*	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	-	-
V	30	<15	-	-	160	38	720	120	510	120
W	<15	<15	-	-	<38	<38	300	<38	38	<38
X	15	<15	-	-	38	<38	400	160	310	38
Y	77	<15	292	15	78	<38	1500	78	-	-
Z	30	15	<15	<15	800	260	300	1000	-	-

Pour les sites marqués d'une étoile(\*), les résultats s'expriment en Unité Formant Colonie / 100mL car il s'agit d'eaux souterraines

## ANNEXE 7: Résultats des analyses de COD dans les EB

Site EB	Concentration C1 (mg/l)	Concentration C2 (mg/l)	Concentration C3 (mg/l)	Concentration C4 (mg/l)	Concentration C5 (mg/l)
A	7,1	5	6	5,1	-
B	9,1	10,7	7,6	9,5	-
C	4,2	3,5	4,4	5,3	6,6
D	7,1	7,9	4,9	-	-
E	5	5	6,3	5,8	5,8
F	8,9	4,3	3,8	7,2	-
G	3	8,5	3,6	3,7	2,8
H	6,3	5,4	5,4	5,5	-
I	6,9	4,3	5,8	9,3	-
J	3,9	3,5	2,6	2,9	-
K	3,4	9,2	6,6	3,7	6,1
L	2,4	3	5,2	3	9,9
M	3,2	6,5	3,4	3,8	-
N	3,7	-	5,1	7	5,8
O	0,6	-	0,6	1,1	0,8
P	3,1	3	4,3	6,4	7
Q	4,9	-	7,7	6,6	6,5
R	5,6	-	6,7	8,5	4,6
S	5,7	-	6,2	8	6,8
U	0,9	1	0,8	1	-
V	4,4	-	4,7	7,3	4,7
W	5,2	-	5,7	7,1	4,8
X	4,2	-	4,5	7,1	4,8
Y	3,6	3,5	4,6	6,9	-
Z	4,8	4,5	10	7,4	-

## ANNEXE 8: Débits au jour du prélèvement dans les ressources

Site EB	Débit C1 (m <sup>3</sup> /s)	Débit C2 (m <sup>3</sup> /s)	Débit C3 (m <sup>3</sup> /s)	Débit C4 (m <sup>3</sup> /s)	Débit C5 (m <sup>3</sup> /s)
A	2,750	0,729	0,401	7,150	-
B	2,190	0,314	0,110	6,250	-
C	3,270	1,280	2,100	16,9	2,91
D	1,940	0,692	0,129	-	-
E	3,280	1,560	0,117	6,280	3,080
F	1,020	0,238	0,147	2,340	-
G	0,249	0,209	0,946	2,420	0,304
H	0,402	0,066	0,077	0,562	-
I	nd	nd	nd	nd	-
J	7,780	1,500	1,430	15,80	-
K	3,850	2,940	0,418	14,30	1,4
L	1,230	0,463	0,341	4,950	1,52
M	3,010	1,310	1,780	10,30	-
N	2,100	-	0,708	8,750	5,96
O	nd	-	nd	nd	nd
P	0,415	0,384	0,316	2,670	2,36
Q	1,130	0,817	0,799	8,130	19,4
R	nd	-	0,206	2,110	0,744
S	1,300	-	0,283	3,010	2,13
U	nd	nd	nd	nd	nd
V	4,740		2,150	36,30	6,9
W	nd	nd	nd	nd	nd
X	nd	nd	nd	nd	nd
Y	6,780	6,180	1,180	42,90	-
Z	1,150	0,922	0,003	8,170	-

## ANNEXE 9: Résultats bruts des analyses des RMV et RMH dans les ET

### CAMPAGNE 1

Site EB	Concentrations des RMV (ng/L)		
	KET	CBZ	DFC
A	<LQ	<LQ	<LQ
B	<LQ	<LQ	<LQ
C	<LQ	<LQ	<b>8</b>
D	<LQ	<LQ	<LQ
E	<LQ	<LQ	<LQ
F	<LQ	<b>34</b>	<LQ
G	<LQ	<LQ	<LQ
H	<LQ	<LQ	<LQ
I	<LQ	<LQ	<LQ
J	<LQ	<LQ	<LQ
K	<LQ	<LQ	<LQ
L	<b>9</b>	<LQ	<b>6</b>
M	<LQ	<LQ	<LQ
NO	<LQ	<LQ	<LQ
P	<LQ	<LQ	<LQ
Q	<LQ	<LQ	<LQ
R	<LQ	<LQ	<LQ
S	<LQ	<LQ	<LQ
U	<LQ	<LQ	<LQ
V	<LQ	<LQ	<b>11</b>
W	<LQ	<LQ	<LQ
X	<LQ	<LQ	<LQ
YZ	<LQ	<LQ	<LQ

## CAMPAGNE 2

Site EB	Concentrations des RMV (ng/L)								
	FF	TIL	EPR	IVER	TOL	TOL sulfone	TRI	TRI sulfoxide	TRI sulfone
<b>A</b>	<LQ	<LQ	<b>20</b>	<b>18</b>	<LQ	<LQ	<b>10</b>	<b>7</b>	<LQ
<b>B</b>	<LQ	<LQ	<b>10</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<b>7</b>	<b>7</b>	<LQ
<b>C</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>D</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>13</b>
<b>E</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>6</b>
<b>F</b>	<LQ	<b>13</b>	<LQ	<LQ	<b>36</b>	<b>22</b>	<LQ	<b>6</b>	<b>10</b>
<b>G</b>	<b>159</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>H</b>	<LQ	<LQ	<b>6</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>5</b>	<LQ
<b>I</b>	<LQ	<LQ	<b>6</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>J</b>	<b>17</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>K</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>L</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>6</b>	<LQ
<b>M</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>13</b>
<b>P</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>U</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>YZ</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

CAMPAGNE 3

Site EB	Concentrations des RMV (ng/L)				
	FF	TYL	TRI sulfone	SDZ	CBZ
<b>A</b>	<LQ	<LQ	<b>5</b>	<LQ	<LQ
<b>B</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>C</b>	<LQ	<b>5</b>	<LQ	<LQ	<LQ
<b>D</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>E</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<b>11</b>
<b>F</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>G</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>H</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>J</b>	<b>211</b>	<LQ	<LQ	<b>7</b>	<LQ
<b>L</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>NO</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>P</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>Q</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>R</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>S</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>U</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>V</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>W</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>X</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
<b>YZ</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

CAMPAGNE 4

Site EB	Concentrations des RMV (ng/L)						
	TIL	EPR	IVER	TOL	TRI	TRI sulfoxyde	TRI sulfone
A	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
B	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
C	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
E	<LQ	<LQ	<b>5</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<b>5</b>
F	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
G	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
H	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
I	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
J	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
K	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
L	<LQ	<b>19</b>	<LQ	<b>13</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>19</b>
M	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
NO	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Q	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
R	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
S	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
U	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
V	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
W	<b>5</b>	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
X	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
YZ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

## CAMPAGNE 5

Site	Concentrations des RMV (ng/L)	
	FF	FFA
EB		
C	<LQ	<LQ
E	<LQ	<LQ
G	<LQ	<LQ
K	<b>33</b>	<b>71</b>
L	<LQ	<LQ
NO	<LQ	<LQ
P	<LQ	<LQ
Q	<LQ	<LQ
R	<LQ	<LQ
S	<LQ	<LQ
V	<LQ	<LQ
W	<LQ	<LQ
X	<LQ	<LQ

CBZ : Carbamazépine

DFC : Diclofénac

EPR : Eprinomectine

FF : Florfénicol

FFA : Florfénicol amine

IVER : Ivermectine

KET : Kétoprofène

SDZ: Sulfadiazine

TIL: Tilmicosine

TOL: Toltrazuril

TOL sulfone: Toltrazuril sulfone

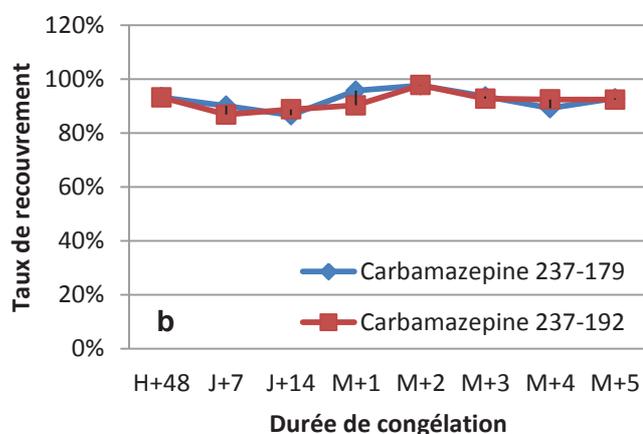
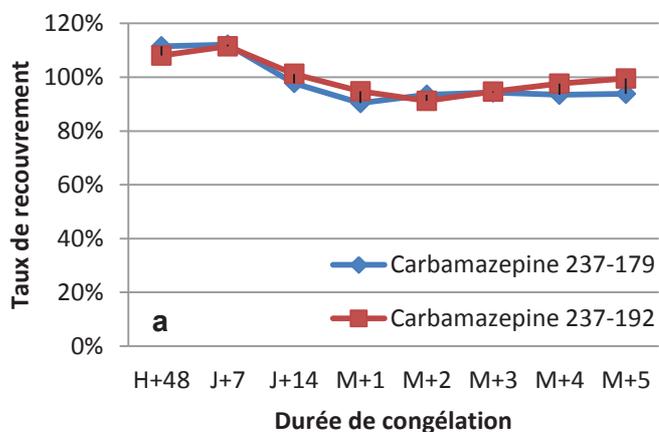
TRI : Triclabendazole

TRI sulfone : Triclabendazole sulfone

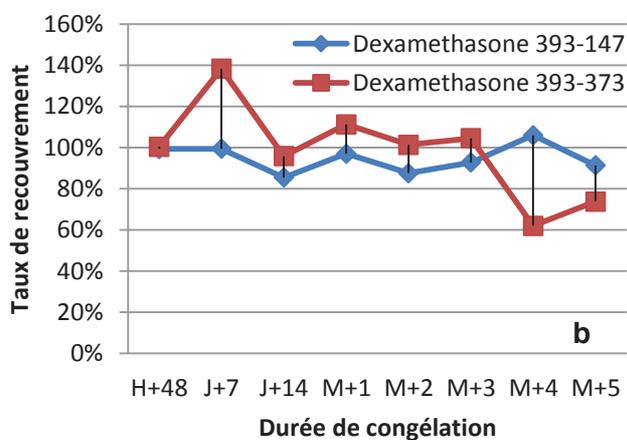
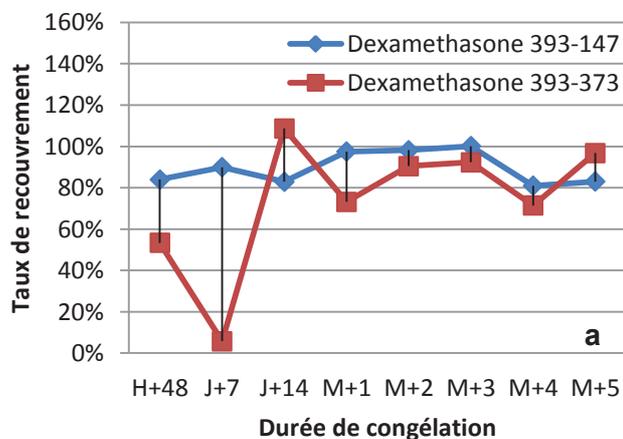
TRI sulfoxyde : Triclabendazole sulfoxyde

TYL : Tylosine

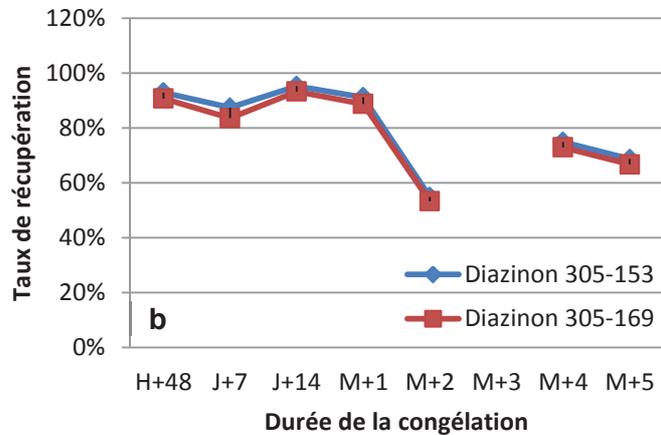
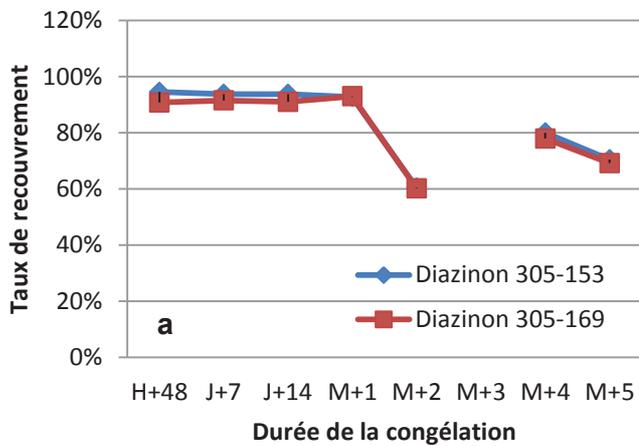
## ANNEXE 10: Cinétiques de dégradation des RMV de la méthode multi-résidus pendant la congélation



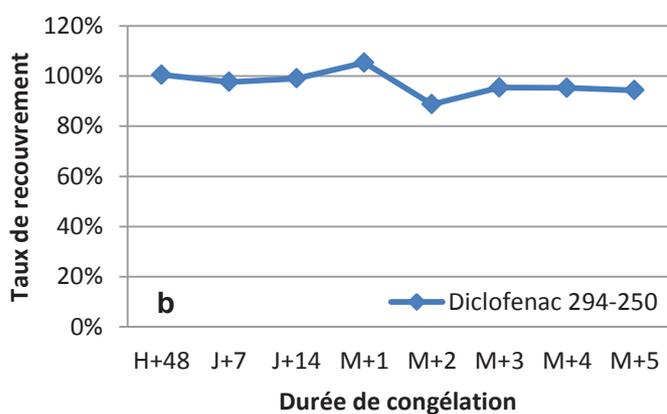
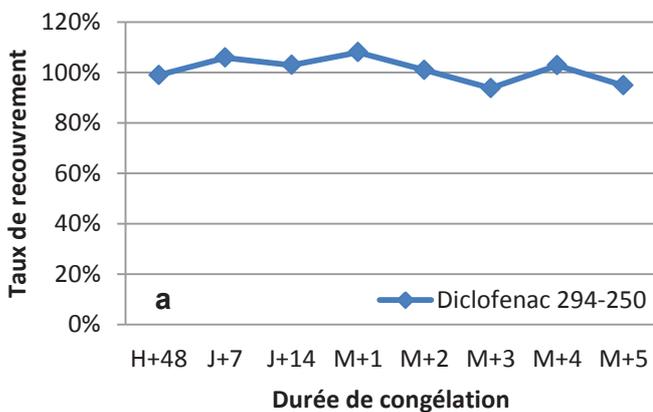
Taux de recouvrement de la carbamazépine en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



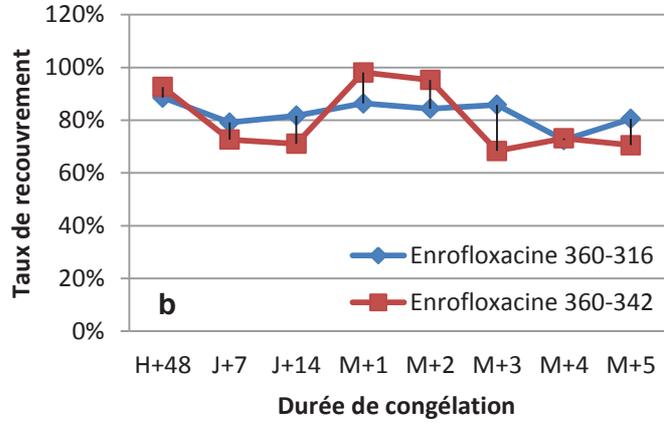
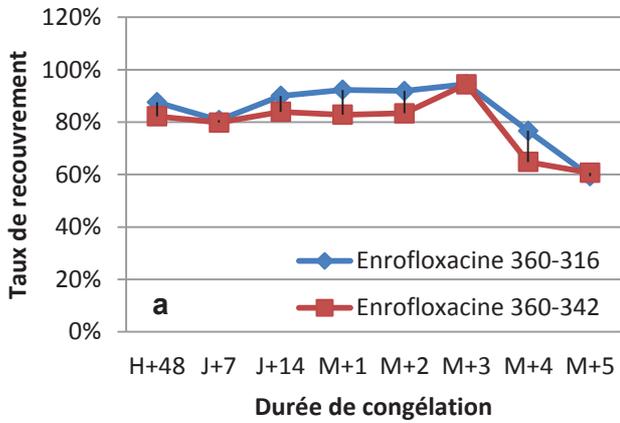
Taux de recouvrement de la dexaméthasone en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



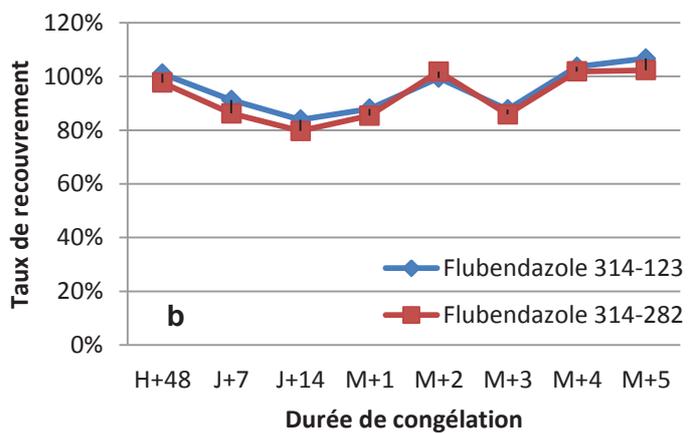
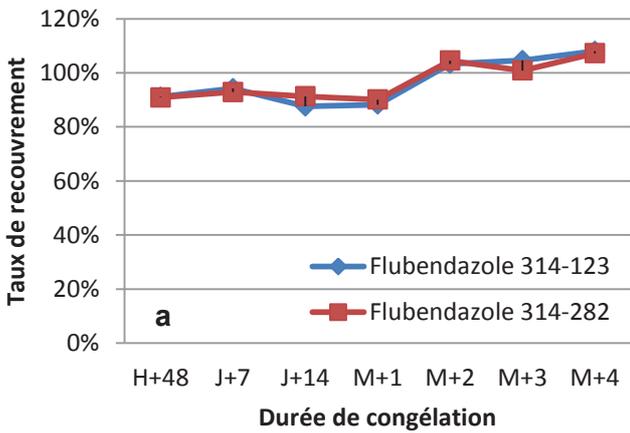
**Taux de recouvrement du diazinon en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)**



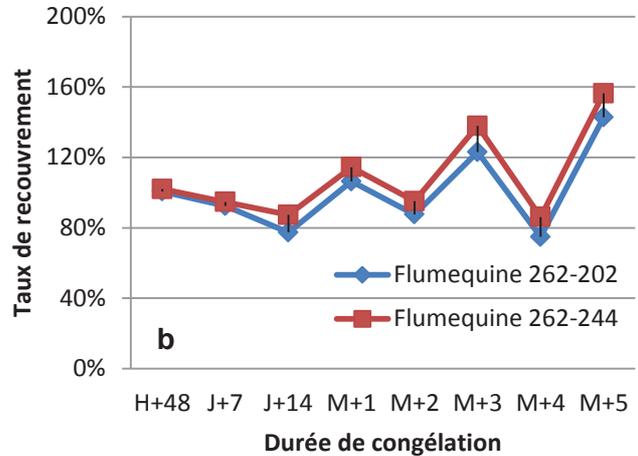
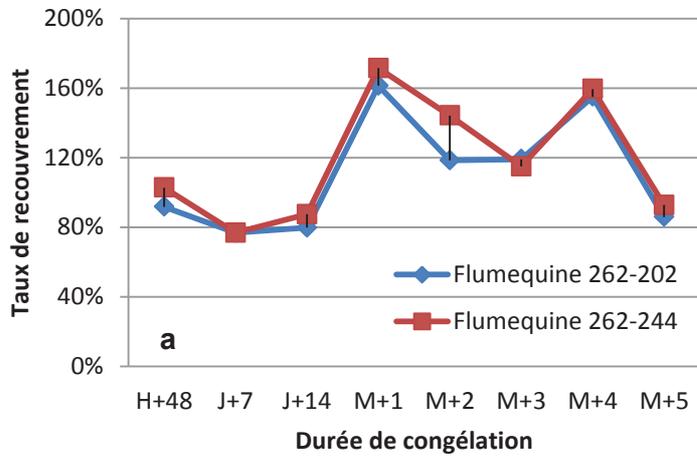
**Taux de recouvrement du diclofenac en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)**



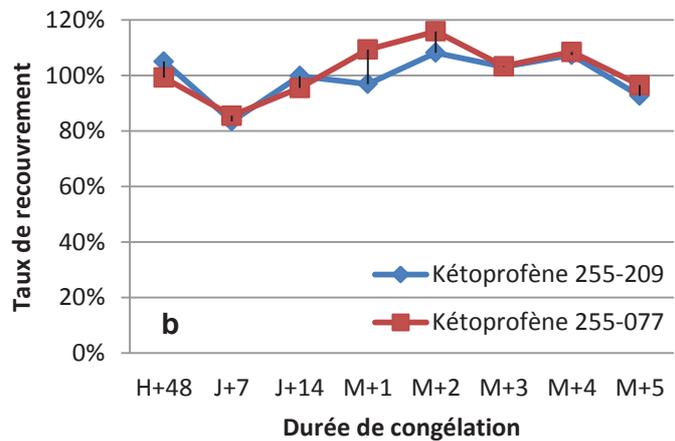
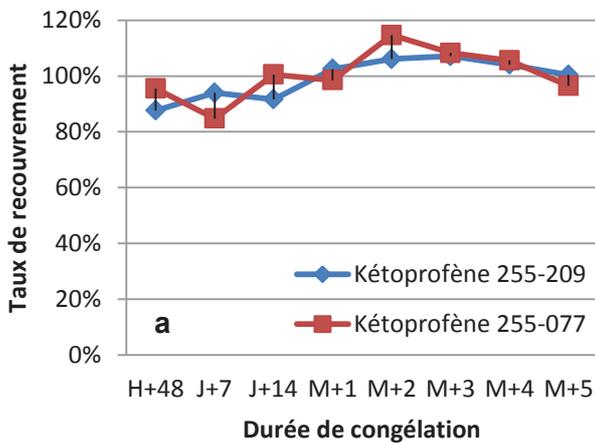
Taux de recouvrement de l'enrofloxacin en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



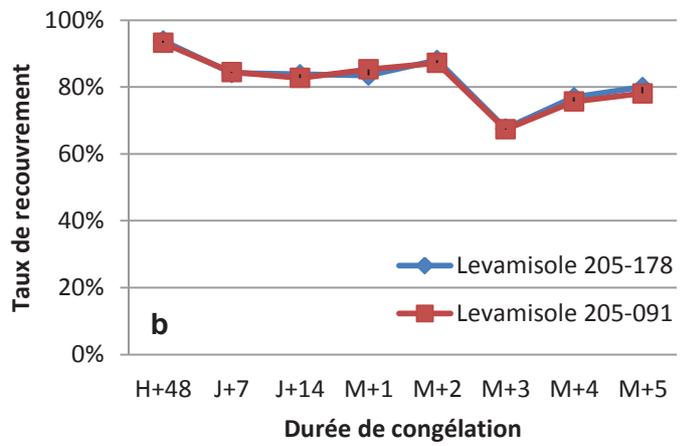
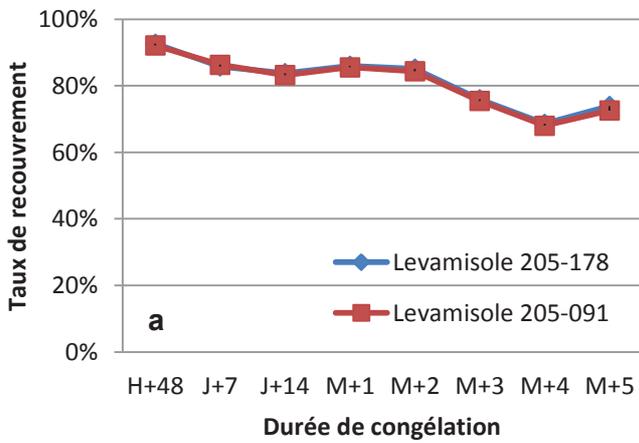
Taux de recouvrement du flubendazole en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



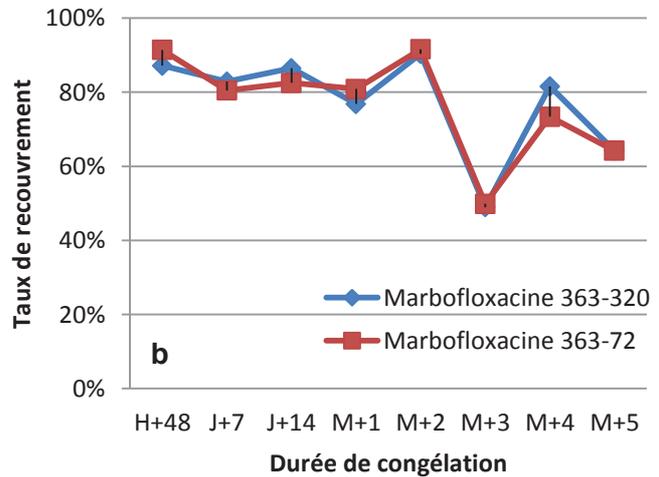
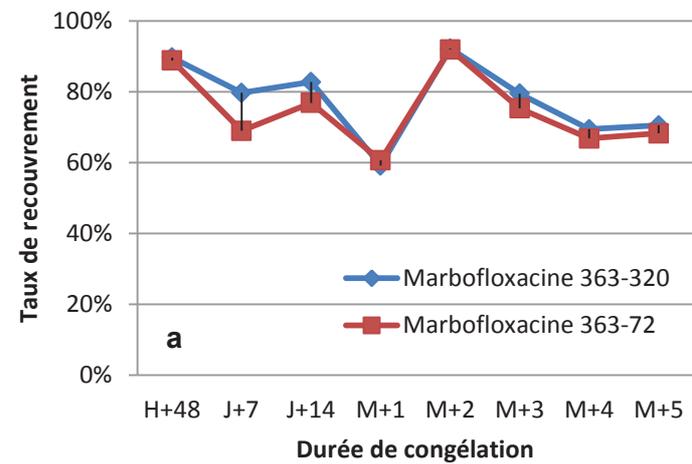
Taux de recouvrement de la fluméquine en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



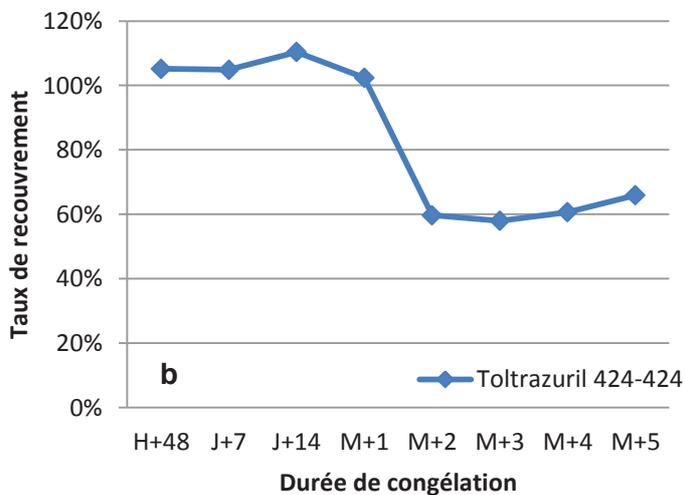
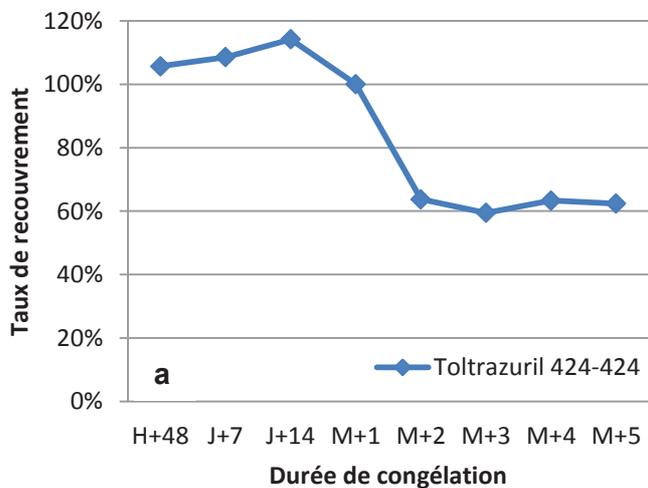
Taux de recouvrement du kétoprofène en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



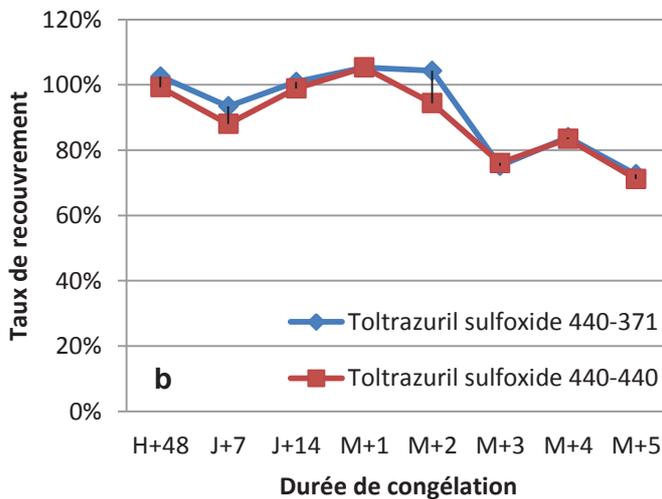
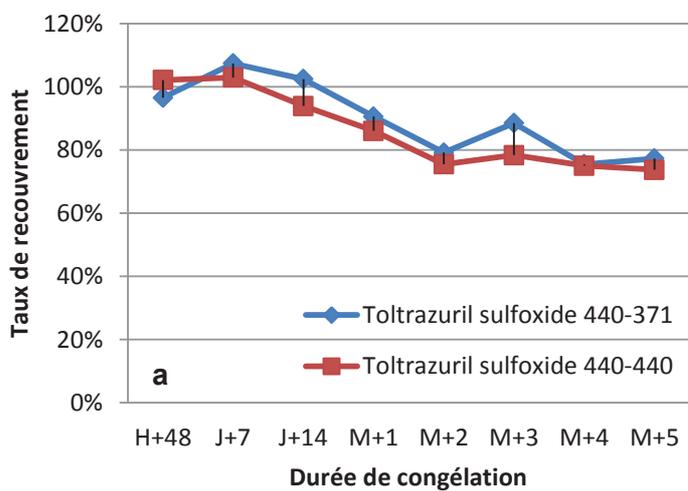
**Taux de recouvrement du lévamisole en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)**



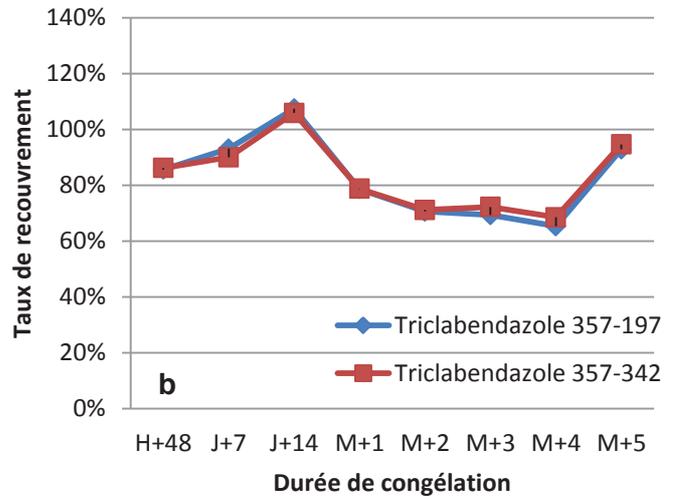
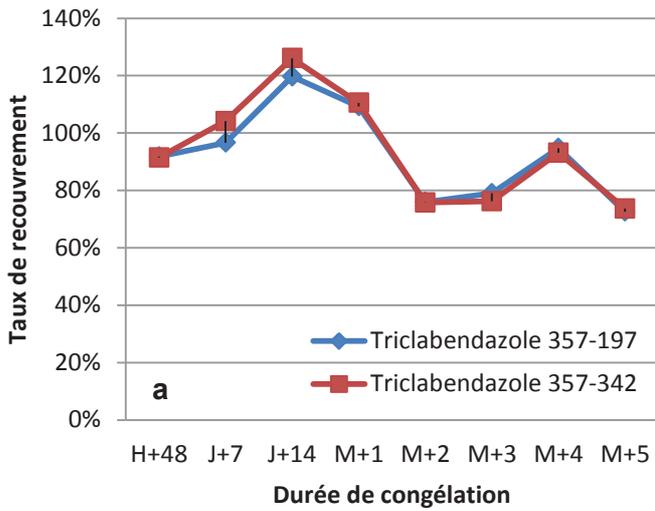
**Taux de recouvrement de la marbofloxacin en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)**



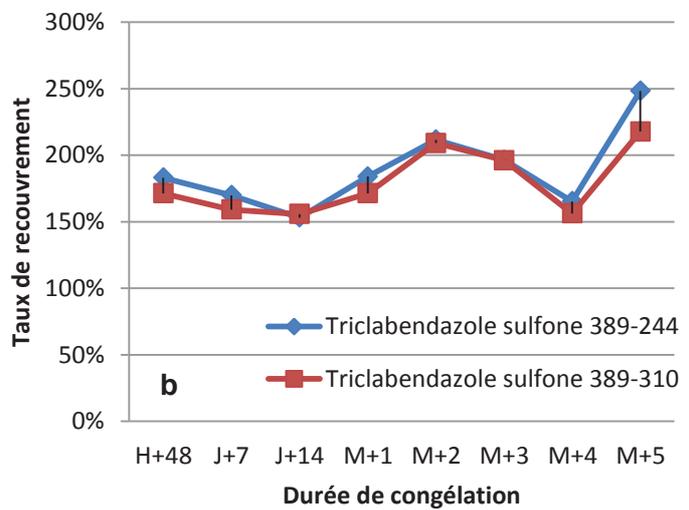
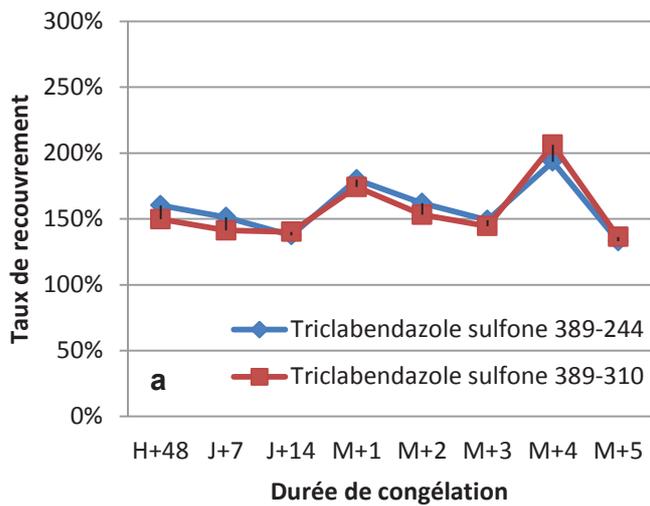
Taux de recouvrement du toltrazuril en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



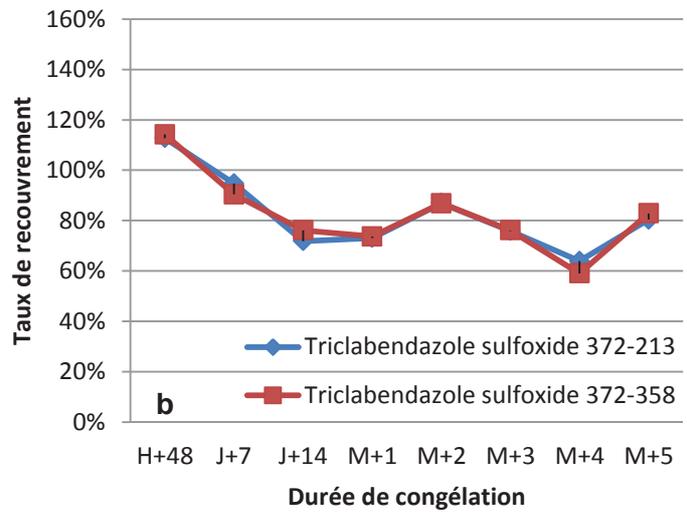
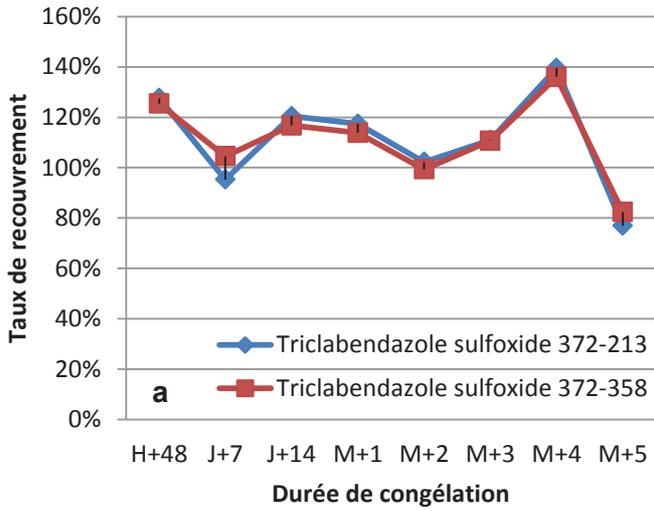
Taux de recouvrement du toltrazuril sulfoxide en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



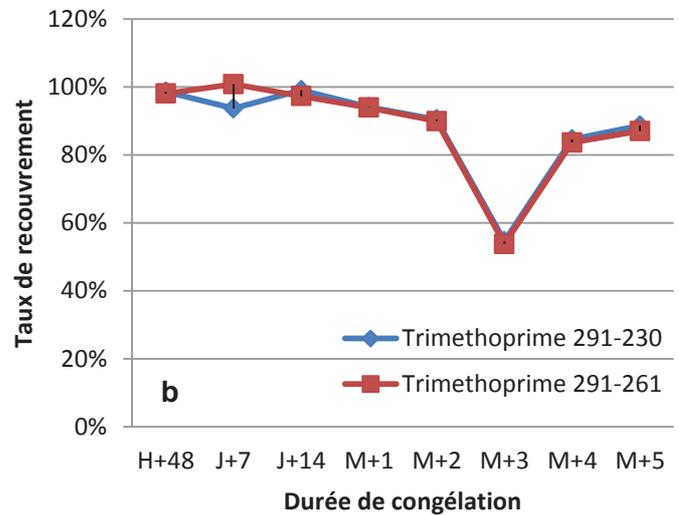
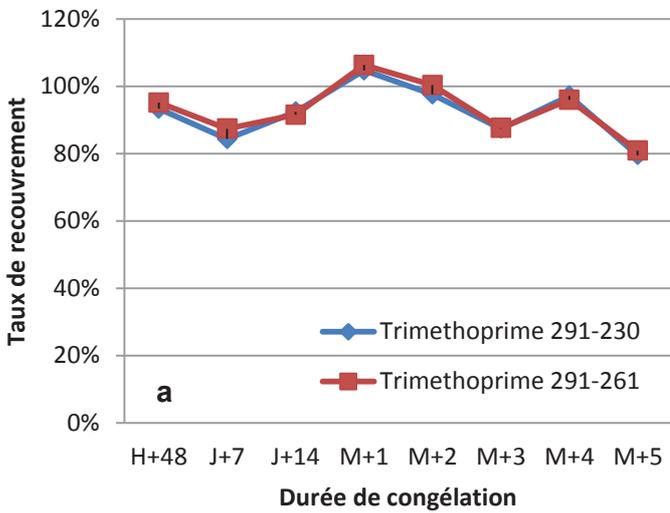
Taux de recouvrement du triclabendazole en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



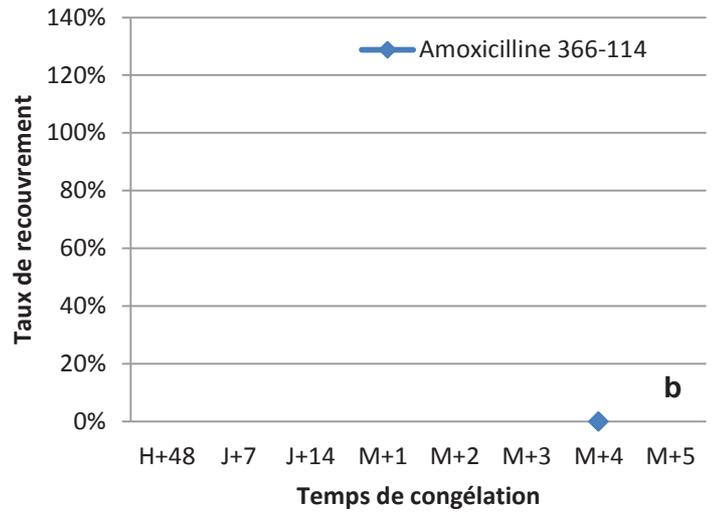
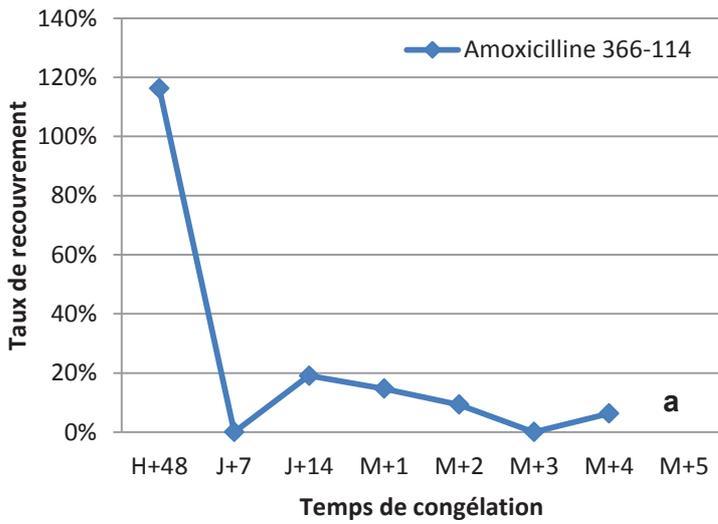
Taux de recouvrement du triclabendazole sulfone en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



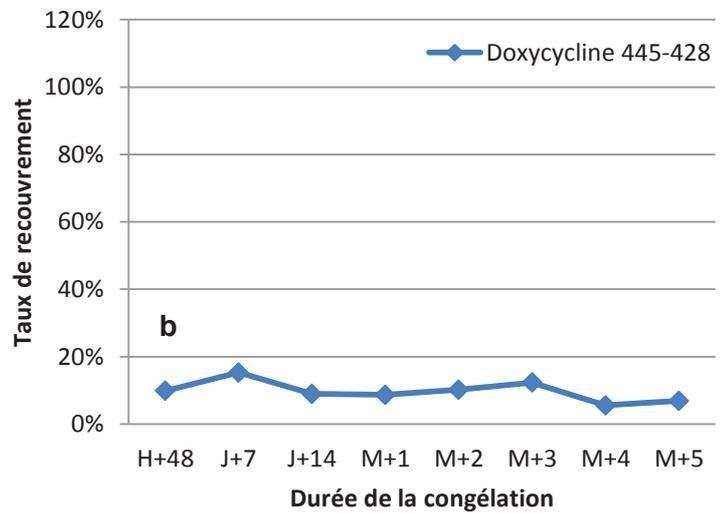
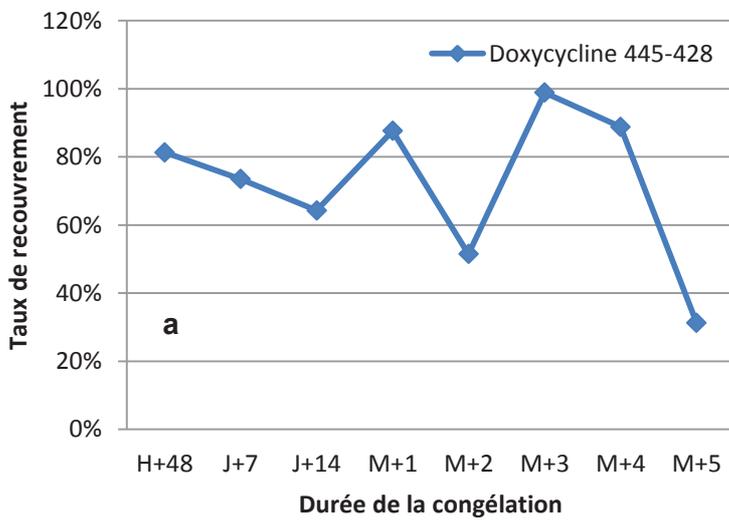
Taux de recouvrement du triclabendazole sulfoxide en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



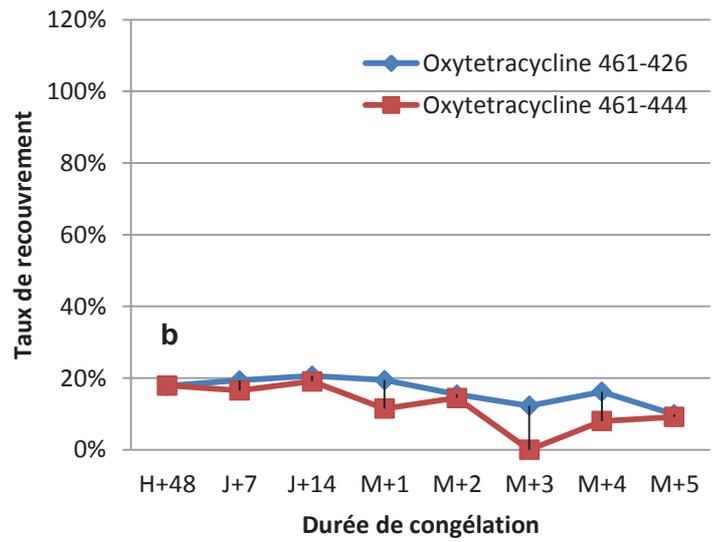
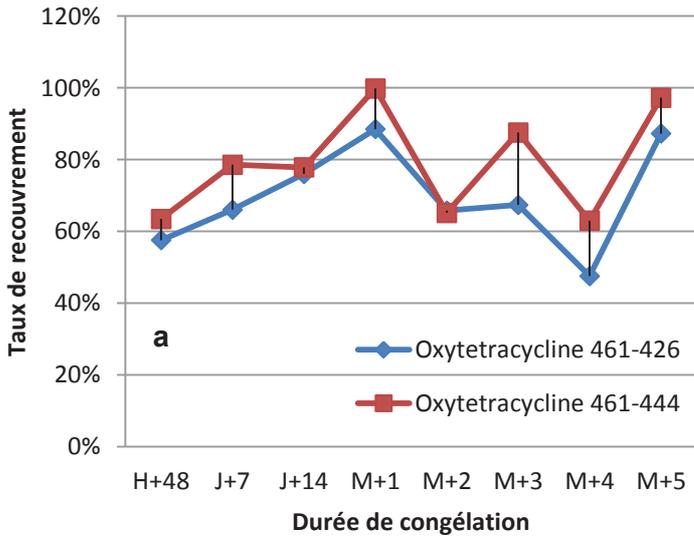
Taux de recouvrement du triméthoprime en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



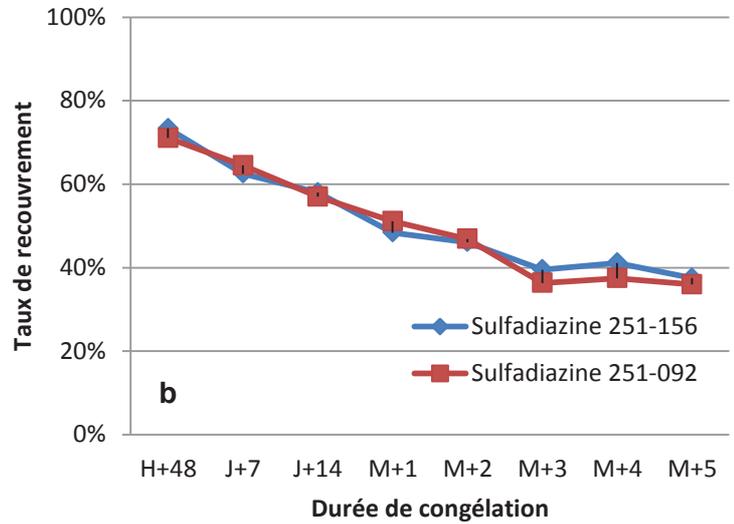
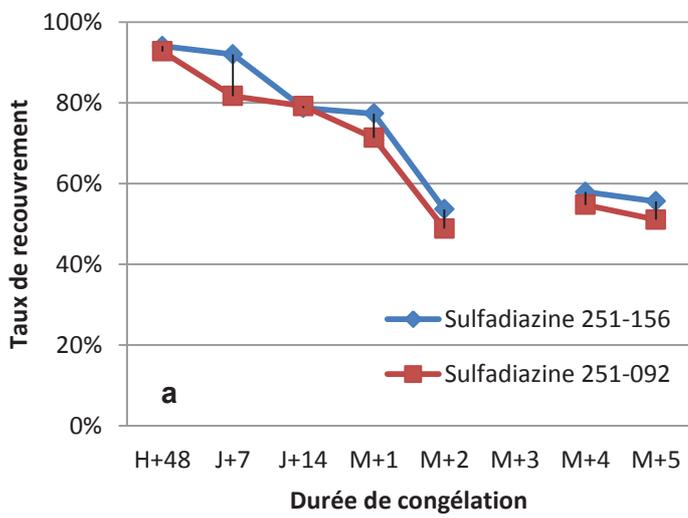
Taux de recouvrement de l'amoxicilline en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



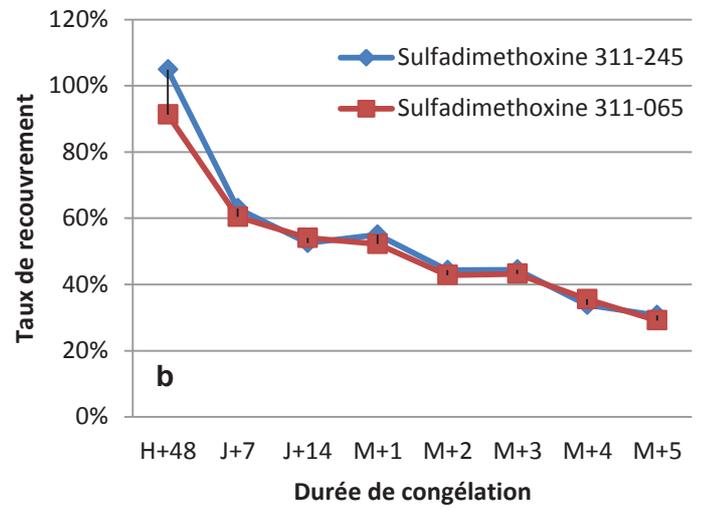
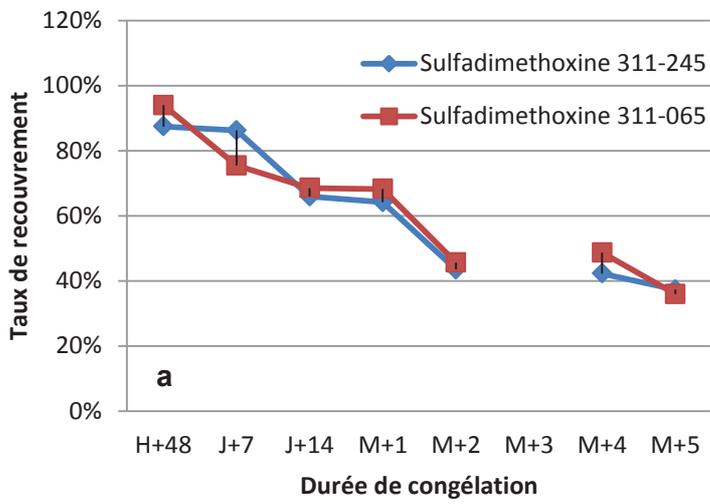
Taux de recouvrement de la doxycycline en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



Taux de recouvrement de l'oxytétracycline en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



Taux de recouvrement de la sulfadiazine en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)



**Taux de recouvrement de la sulfadiméthoxine en fonction de la durée de congélation dans l'eau brute (a) et l'eau traitée (b)**



**Titre:** Résidus de médicaments vétérinaires dans les eaux destinées à la consommation humaine en zone d'élevage intensif : cas de bassins versants bretons

**Mots clés:** eaux naturelles ; qualité de l'eau du robinet; polluants émergents ; résidus de médicaments vétérinaires

**Résumé :** La Directive Cadre sur l'Eau (2000) fait état de la dégradation du bon état chimique des eaux superficielles et des eaux souterraines. Parmi les polluants émergents mis en cause figurent les résidus de médicaments qui représentent une menace diffuse et potentiellement persistante dans les hydro-systèmes. A ce jour, peu d'études se sont intéressées spécifiquement aux résidus médicamenteux vétérinaires (RMV). En France, la Bretagne est une région d'élevage intensif. 75% des eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) sont issues d'eaux de surface particulièrement vulnérables. Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse sont de (i) sélectionner les sites à risque et les RMV d'intérêt, (ii) développer une méthode d'analyse pour la liste de composés retenus, (iii) acquérir les premières données d'occurrence des

RMV dans les ressources et eaux du robinet correspondantes et (iv) identifier les sources des RMV à l'aide de l'étude de la contamination fécale associée dans les eaux brutes. Cette thèse est constituée de trois chapitres : une synthèse bibliographique des connaissances relatives aux RMV dans les eaux brutes et les eaux traitées et des outils existant pour étudier la contamination fécale. La partie matériels et méthodes incluant la stratégie d'échantillonnage, le choix des RMV d'intérêt et les méthodes d'analyse développées sur cette base; enfin, les données d'occurrence et les facteurs d'impact. Ces travaux se concluent sur un contexte plus large avec des perspectives pour une meilleure appréhension des facteurs d'impact et pour évaluer l'exposition de la population.

**Title :** Veterinary pharmaceutical residues in water resources and tap water in an intensive husbandry area: case of Brittany in France

**Keywords :** water resources; tap water quality; emerging pollutants; veterinary pharmaceutical residues

**Abstract:** The Water Framework Directive (2000) refers to the deterioration of freshwater quality. The emergent pollutants of concern include pharmaceutical residues that represent a diffuse and potentially persistent threat in hydrosystems. To date, few studies have focused specifically on veterinary pharmaceutical residues (VPRs). Brittany is an intensive husbandry in France. 75% of tap water is produced from surface waters, which are particularly vulnerable. In this context, the objectives of this PhD thesis are to (i) select high-risk sites and RMVs of interest, (ii) develop analytical methods for the list of selected compounds, (iii) acquire data on the occurrence of VPRs in water resources and tap water in Brittany and (iv) identify the sources of VPRs

through the investigation of associated fecal contamination in water resources. This thesis consists of three chapters: a review of the literature on VPRs occurrence and fate in raw waters and tap waters, as well as a review of existing tools for addressing faecal contamination; the materials and methods including sampling strategy, selection of VPRs of interest and description of the methods of analysis developed according to this list; the results of VPRs occurrences in water resources and tap water in Brittany. This work concludes on a broader context by providing perspectives to gain a better understanding of the factors influencing VPRs occurrences and to assess population exposure.