

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université a. Mira de Bejaia



Faculté de Technologie
Département de Génie des procédés
Laboratoire des génies des procédés

Mémoire

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE Master

Domaine : Science et Technologie Filière : Génie des Procédés
Spécialité : Génie des procédés de l'environnement

Présenté par

AGUEMOUNE Nilda et ABDEMEZIEM Chafiaa

Thème

Dosage de l'amoxicilline dans les eaux de rejets

Soutenue le 28 / 06 / 2022

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
Rezgui Farouk	Prof	Université de Béjaia	Président
Azzoug Moufouk	MCA	Université de Béjaia	Examinateur
Fatmi Sofiane	MCA	Université de Béjaia	Encadrant
Bensadi Lydia	Doct	Université de Béjaia	Co- Encadrant

Année Universitaire : 2021/2022

Dédicaces

Je dédie ce projet à

Ma chère **maman** et mon cher **papa** pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur indéfectible soutien, leurs prières et surtout leur patience infinie tout au long de mes études,

A mes chères sœurs **Kamilia** et **Lamia** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A mes chers frères, **Halim** et **Lamine** pour leur appui et leur encouragement,

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infallible,

A mes chères amies **Yasmine** et **Sissa** pour leur aide et support dans les moments difficiles

Merci d'être toujours là pour moi.

Nilda

Dédicaces

Je dédie mon travail

A ma chère mère :

Tu m'as donné la vie, mais en plus, tu m'as appris le sens des responsabilités de l'effort et du travail bien fait. Tes immenses qualités de mère ont forcé l'admiration de tous tes enfants et au delà, de tous ceux qui t'ont approché.

Que Dieu tout puissant te grande long temps à mes côtés. Je t'aime maman.

A mon père :

L'aventure était certes longue, difficile mais passionnante. J'espère tout simplement ne t'avoir pas déçu.

Profonde gratitude.

A mes sœurs (kahina, Naima, Katia)

Qu'il me soit en ce grand jour, de vous dédier spécialement ce travail pour vous mes chères sœurs. Merci pour tout.

A mes frères (Mohaned, Mohamed, Hanafi, Salim, Karim, Nordin Amirouche) :

Pour leurs patiences, soutien et leurs sentiments d'amour aux moments les difficiles. Merci pour tout.

A mon Cher mari pour la patience et le soutien dont il a fait preuve pendant toute la durée de ce travail à qui je voudrais exprimer mes affections et mes gratitudes, et sa famille (djahnine).
Merci infiniment.

A mes grands-parents Rabi yarhmhoum (Ahmed, fatma)

A ma chère Khalti Cherifa et ses enfants (Chafiaa, Melissa, Idir) et son mari

A mes chères amies (Zohra, Zahra, Nawal) :

[L'amitié est comme une flamme qui éclaire et réchauffe la vie] sauvegardons –la.

Chafiaa

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos gratitude et remerciements pour toutes les personnes qui ont contribué à son élaboration.

Tout d'abord, ce projet n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mr Fatmi Sofiane, nous le remercions pour ses conseils et la qualité de son encadrement exceptionnel.

Nous souhaitons également remercier M^{lle} Bensadi Lydia pour son implication, son soutien, son aide pratique et surtout ses conseils tout au long de ce travail.

Nous tenons à remercier Mr Azzoug pour ses précieux conseils méthodologiques.

Nous adressons des remerciements particuliers à Mme Amrani pour sa serviabilité durant notre étude expérimentale afin de finir ce travail et Mr Bouhali pour son aide et sa disponibilité, ainsi qu'aux personnels des laboratoires de génie des procédés.

Nous sommes profondément reconnaissantes pour le soutien que nos proches nous ont apporté durant la réalisation de ce projet, nos remerciements ne pourront jamais égaler le support qu'ils nous ont toujours accordé.

Liste des tableaux

Tableau	Page
Tableau I.1 Les principales classes d'antibiotiques	4
Tableau I.2 Quelques propriétés physico-chimiques de l'amoxicilline	6
Tableau II.1 Concentrations recueillies dans la littérature d'une sélection de produits pharmaceutiques en entrée et en sortie de STEP	12
Tableau II.2 Occurrence des produits pharmaceutiques dans les milieux aquatiques	13
Tableau II.3 Toxicité de l'amoxicilline sur l'écosystème aquatique	17
Tableau IV.1 Produits chimiques utilisés	23
Tableau IV.2 Les conditions chromatographiques	30
Tableau V.1 Concentrations d'AMX trouvées dans les solutions étalons	36
Tableau V.2 Concentrations de l'AMX trouvées dans les échantillons analysés	38
Tableau V.3 Résultats obtenus des concentrations dans les échantillons analysés par HPLC	43

Liste des figures

Figure	Page
Figure II.1 Nombre de produits pharmaceutiques détectés dans les eaux de surface, les eaux souterraines, l'eau du robinet et/ou l'eau potable	8
Figure II.2. Différentes voies d'entrées des médicaments humains dans l'environnement	10
Figure III.1. Installation en HPLC	21
Figure III.2. : Principe de fonctionnement de la chromatographie liquide à haute performance	21
Figure III.3. HPLC	23
Figure IV.1. AMOXICILLINE [®] 1g (poudres pour solution injectable).	24
Figure IV.2. Schéma de la technique de la micro –extraction liquide –liquide dispersive	26
Figure IV.3. Site de prélèvement des échantillons d'eaux usées	27
Figure IV.4. Appareil HPLC utilisé	29
Figure IV.5. Solutions étalons filles préparées	31
Figure V.1. Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution fille (1) ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate de pH =4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C	33
Figure V.2. Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution fille (2) ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate de pH =4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C	33
Figure V.3. Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution fille (3) ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate de pH =4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C	34

Figure V.4 : Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution fille (4) ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate de pH =4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C	34
Figure V.5 : Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution fille (5) ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate de pH =4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C	35
Figure V.6 : Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution fille (6) ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate de pH =4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C	35
Figure V.7: La courbe d'étalonnage obtenue	36
Figure V.8 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon dopé (sédiment) ; ACN/tampon phosphate de pH =4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C	39
Figure V.9 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon 1 (surnageant)	39
Figure V.10 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon 2 (surnageant)	40
FigureV.11 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon 3 (surnageant)	40
Figure V.12 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon 1 (sédiment)	41
Figure V.13 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon 2 (sédiment)	41
Figure V.14 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon 3 (sédiment)	42

Liste des abréviations

ATZ : Atrazine

AMX : Amoxicilline

DLLME : Micro extraction liquide-liquide dispersive

EC : Critère d'évaluation

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

LLM : Extraction liquide-liquide

PCM : Paracétamol

STEP : Stations d'épuration des eaux usées

THS : Traitement hormonal substitutif

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre I généralité sur les produits pharmaceutiques	
I.1. Introduction	3
I.2. Définition des substances pharmaceutiques	3
I.2.1 Antibiotiques	3
I.2.1.1. Définition	3
I.2.1.1 Principales familles d'antibiotiques	3
I.2.3. Amoxicilline	4
I.2.3.1. Propriétés physico-chimiques de l'amoxicilline.....	5
Chapitre II Produits pharmaceutiques et environnement	
II.1. Introduction.....	7
II.2. Contaminants émergents présents dans l'environnement	8
II.2.1. Définition et exemples.....	8
II.3. Sources de produits pharmaceutiques dans l'environnement	9
II.3.1. Usage domestique et hospitalier	10
II.3.2. Usage industriel	11
II.3.3. Usage vétérinaire	11
II.3.4. Stations d'épuration des eaux usées STEP	11
II.4. Occurrence des produits pharmaceutiques	112
II.5.1. Voie d'élimination dans les STEP	14
II.5.2. Voie d'élimination dans l'environnement aquatique.....	14
II.5.2.1. La photo-dégradation	14
II.5.2.2. L'hydrolyse	14
II.5.2.3. La biodégradation	15
II.6. Danger et toxicité des produits pharmaceutiques.....	15
II.6.1. Antibiorésistance	15
II.6.2. Perturbation endocrinienne.....	16
II.7. Cas de l'écotoxicité de l'amoxicilline	16
II.7.1. Définition.....	16
II.7.2. Toxicité de l'amoxicilline dans l'environnement aquatique	16
Chapitre III : La chromatographie liquide à haute performance	
III.1 Définition	18
III.2 Caractéristiques.....	18

III.3 Appareillage et fonctionnement	19
III.4.. Principe	Erreur ! Signet non défini.

Chapitre I.V Matériel et méthodes

IV.1. Matériel utilisé	22
IV.2. Produits chimiques	23
IV.2.1. Amoxicilline	24
IV.3. Méthode d'extraction	24
IV.3.1 Micro extraction liquide-liquide dispersive (DLLME).....	24
IV.3.1.1. Principe	25
IV.4. Prélèvement et préparation des échantillons.....	26
IV.5. Protocoles expérimentaux.....	28
IV.5.1.DLLME	28
IV.5.2. Analyse HPLC.....	28
IV.5.2.1.Conditions chromatographiques	29
IV.6. Préparation des solutions	30
IV.6.1. Préparation de la phase mobile	30
IV.6.2. Préparation de la courbe d'étalonnage	30

Chapitre V. Résultats et discussions

V.Résultats et discussions	32
V.1.La courbe d'étalonnage.....	32
Conclusion Générale.....	44
Références bibliographiques	

Introduction générale

Introduction générale

Au cours des dernières décennies, un nombre important de produits pharmaceutiques à usage humain et vétérinaire a été détecté dans le milieu aquatique [1].

La présence des substances pharmaceutiques dans l'environnement a été signalée pour la première fois en 1976 à Kansas city, aux Etats-Unis, où de l'acide clofibrique a été détecté dans les eaux usées traitées [2], ce qui a incité la communauté scientifique à développer un vif intérêt pour la pollution du milieu aquatique causée par le rejet de produits chimiques industriels et agricoles [3], et de confirmer la présence de ces produits dans toutes les parties du milieu aquatique mondial.

En effet, les antibiotiques comme l'amoxicilline qui est couramment le plus utilisé [4] figurent parmi les produits pharmaceutiques les plus résistants aux traitements biologiques et donc ne sont pas entièrement éliminés par les stations d'épuration classiques. En outre, leur utilisation illimitée à quelque fin dans n'importe quel pays a le potentiel d'avoir un impact sur la santé humaine et animale à l'échelle mondiale [5,6,7].

Par ailleurs, la surveillance de ces substances pharmaceutiques dénommées « contaminants émergents » est nécessaire dans les différents compartiments environnementaux spécialement dans la matrice aquatique (par exemples : les eaux de surface et les eaux souterraines) à des concentrations pertinentes (de quelques ng/L à quelques µg/L) et cela en utilisant des méthodes avancées telle qu'une chromatographie liquide à haute performance. Avant cette analyse, plusieurs techniques de préparation des échantillons peuvent être appliquées, principalement basées sur l'extraction liquide-liquide [8] ou des extractions plus compliquées telles que la phase solide [9,10,11,12].

La présente étude propose une évaluation de dosage de l'amoxicilline dans les eaux usées. Ce manuscrit est scindé en quatre chapitres :

- Le chapitre I rassemble les informations essentielles concernant la molécule étudiée et ses propriétés physico-chimiques, les Antibiotiques et leurs principales familles, après une description des substances pharmaceutiques ainsi que leurs classes thérapeutiques.

Introduction générale

- Le chapitre II décrit les contaminants émergents en citant leurs sources, leurs occurrences et leurs devenir dans l'environnement ainsi que leurs impacts sur la faune et la flore en faisant un point sur la toxicité de l'amoxicilline dans le milieu aquatique
- Le chapitre III regroupe et décrit les méthodes d'extraction et d'analyse des produits pharmaceutiques telles que la micro-extraction liquide-liquide dispersive et l'analyse par chromatographie liquide à haute performance ainsi que leur principe de fonctionnement.
- Le chapitre IV est consacré à la description des dispositifs expérimentaux et les techniques analytiques utilisées dans le cadre de ce travail.
- Le chapitre IV est dédié aux résultats et discussions
- Le mémoire s'achève par une conclusion générale

Chapitre I : Généralités sur les produits pharmaceutiques

I.1. Introduction

Les substances pharmaceutiques sont des molécules possédant des propriétés curatives, préventives ou administrées dans le but d'établir un diagnostic [13]. Elles sont classées selon l'effet pour lequel elles sont conçues (antibiotiques, analgésiques...), selon leur structure chimique et selon leur mode d'action (anti-métabolites ou agents alkylants) [14]. Leurs propriétés physicochimiques leur confèrent des capacités de franchissement des membranes biologiques (parmi les antibiotiques : Amoxicilline) [15].

I.2. Définition des substances pharmaceutiques

Les substances pharmaceutiques sont des molécules biologiquement actives possédant un mode d'action particulier sur le corps humain et sur les animaux [13]. Elles sont utilisées pour la prévention, le diagnostic ou le traitement des maladies et pour restaurer, corriger ou modifier des fonctions organiques chez l'homme ou l'animal [13]. Les substances pharmaceutiques incluent plus de 4000 molécules avec de différentes propriétés physicochimiques et biologiques et surtout avec des modes d'action biochimique distincts [16]. Selon l'effet recherché, les substances pharmaceutiques peuvent être des antibiotiques, des antidépresseurs, des anti-inflammatoires, des bêtabloquants, des bronchodilatateurs, des hypolipémiants, des hormones ...etc [17].

I.2.1. Antibiotiques**I.2.1.1 Définition**

C'est toute substance chimique produite par un microorganisme susceptible d'être obtenue par la synthèse et qui à la propriété soit d'inhiber la croissance bactérienne en bloquant leur métabolisme par perturbation de la synthèse protéique (Bactériostatique), soit de les tuer par destruction de leur structure membranaire (Bactéricide) [25].

I.2.1.2. Principales familles d'antibiotiques

Parmi les principales familles d'antibiotiques on cite [26] :

- **Phénicols**

Le chloramphénicol est extrait à l'origine de streptomycines, il est maintenant obtenu par synthèse, il est bactériostatique pour de nombreuses espèces Gram positif et Gram négatif [27]. Le chloramphénicol est l'antibiotique des salmonelles et des infections graves [28].

- **Macrolides**

Les plus importants sont l'érythromycine et la spiramycine, ce sont des antibiotiques produits par streptomycines [29]. Ils sont faiblement toxiques, ils peuvent remplacer la pénicilline chez les personnes allergiques, sensibles [30] ou encore chez les femmes enceinte [31].

Ces antibiotiques sont actifs sur certaines bactéries Gram positif. Ils sont indiqués dans les infections du nez, de la gorge et des oreilles, ainsi que les infections des bronches et des poumons, de la peau, des organes génitaux et de la bouche [32].

- **Pénicillines ou Béta lactames**

La pénicilline est l'un des rares antibiotiques produits par des moisissures qui n'est pas toxique et qui possède des utilisations thérapeutiques [33].

Les β -lactamines incluant les pénicillines et les céphalosporines ont un noyau β -lactame instable chimiquement qui subit facilement une hydrolyse ; pour cela ils ne sont pas souvent détectés dans l'eau environnementale [34].

Les antibiotiques sont regroupés selon leur structure chimique ou bien par leur mécanisme d'action. Le tableau I. 1 suivant résume les plus importantes familles d'antibiotiques [35].

Tableau I.1 : Les principales classes d'antibiotiques [35].

Familles	Exemples
Les pénicillines ou Béta-lactames	Amoxicilline
Les phénicoles	Chloramphenicol
Les macrolides	Erythro-mycine A

I.2.3. Amoxicilline

L'amoxicilline est un médicament semi-synthétique, qui appartient à une classe d'antibiotiques appelée les pénicillines (antibiotiques β -lactames) [36]. Ce médicament s'est révélé efficace contre un large éventail d'infections causées par des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, il

est utilisé pour le traitement et la prévention des infections respiratoires, gastro-intestinales urinaires et cutanées en raison de ses propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques [37,38,36]. Outre son utilisation en médecine humaine, l'amoxicilline est également utilisée pour traiter et prévenir les maladies animales [39,40]. Utilisée comme stimulateur de croissance pour de nombreux animaux domestiques et de consommation, y compris les chiens, les chats, les pigeons, chevaux, poulets de chair, porcs, chèvres, moutons, veaux en pré-ruminants, bovins et poissons [39,40].

I.2.3.1. Propriétés physico-chimiques de l'amoxicilline

a. Ionisation

L'amoxicilline est une molécule amphotère : les valeurs de pKa de ces groupes donneurs de protons respectivement (-COOH et -OH) et celui de son groupe receveur de protons (-NH₂) sont respectivement de 2,4 et 7,4 et 9,6 [41, 42].

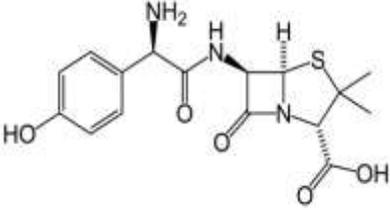
b. Hydrosolubilité et liposolubilité

La capacité de la molécule à se solubiliser dans l'eau et les lipides est la propriété physico-chimique qui favorise l'absorption. Il est établi que les molécules liposolubles traversent plus facilement la membrane cytoplasmique que les molécules polaires [43].

c. Stabilité en milieu acide

L'amoxicilline en solution est de moins en moins stable à mesure que sa concentration augmente. La structure de l'amoxicilline permet de conférer une stabilité au noyau β -lactame en milieu acide ce qui permet de favoriser son usage thérapeutique [44]. Cette substance possède une caractéristique qui favorise son utilisation par rapport à celle de l'ampicilline, dont la biodisponibilité orale est moins élevée [44].

Tableau I.2 : Quelques propriétés physico-chimiques de l'amoxicilline [45]

Amoxicilline	
Formule moléculaire	C ₁₆ H ₂₅ N ₃ O ₈ S
Masse moléculaire	365.4g/mol
Solubilité dans l'eau	0,958g/L
Surface polaire	161 Å ²

Chapitre II : Produits pharmaceutiques et environnement

II.1. Introduction

Ces dernières années, la détection de produits pharmaceutiques dans les cycles hydrologiques urbains à des concentrations pertinentes pour l'environnement a suscité une attention accrue de différentes organisations scientifiques [46]. En effet, la présence de ces résidus pharmaceutiques a été signalée dans 71 pays à travers le monde [17]. Les produits pharmaceutiques ont principalement été repérés dans les eaux de surface et les effluents d'eaux usées, mais ils ont aussi été décelés dans les eaux souterraines, le fumier et d'autres compartiments environnementaux [47]. Plus de 600 substances pharmaceutiques actives (ou leurs métabolites et leurs produits de transformation) ont été découvert dans l'environnement [48].

L'occurrence des antibiotiques et des médicaments antirétroviraux est particulièrement préoccupante pour l'environnement à cause de leur propagation potentielle de la résistance aux antimicrobiens et de leur toxicité pour les organismes aquatiques sensibles [49].

La figure II.1 suivante présente le nombre de produits pharmaceutiques détectés dans différents milieux aquatiques à l'échelle mondiale [17].

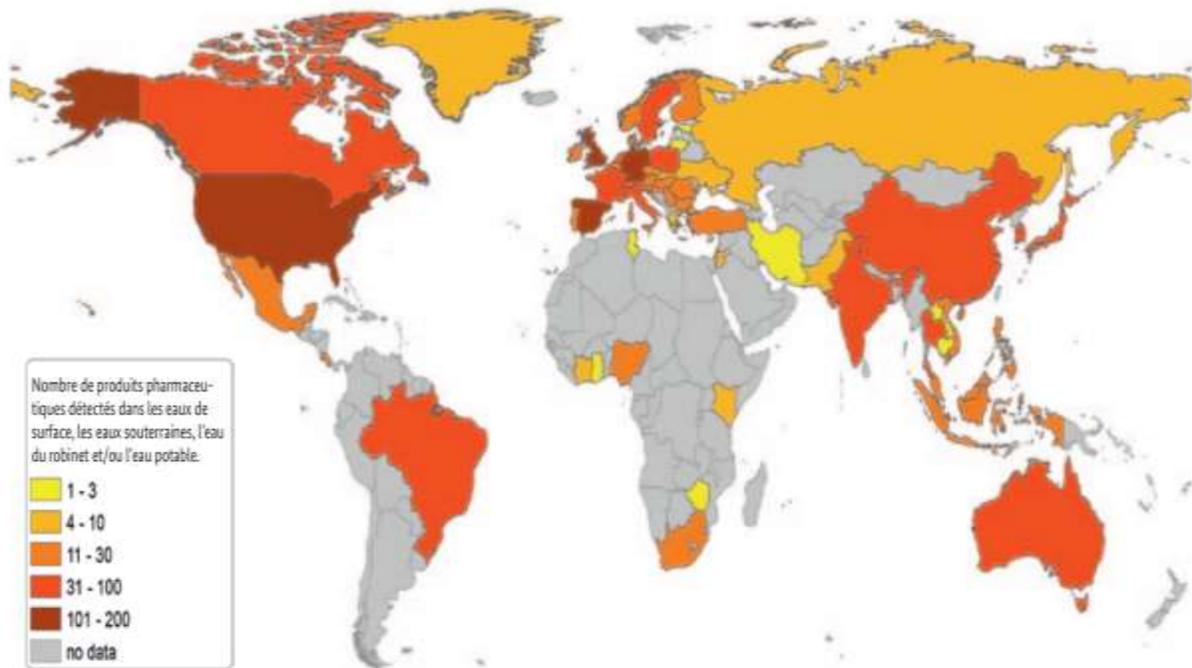


Figure II.1 : Nombre de produits pharmaceutiques détectés dans les eaux de surface, les eaux souterraines, l'eau du robinet et/ou l'eau potable [17].

II.2. Contaminants émergents présents dans l'environnement

II.2.1. Définition et exemples

Les contaminants émergents sont généralement des substances dont la source est nouvellement identifiée ou une voie alternative vers l'homme [50]. Parmi les différents polluants émergents dans l'environnement, l'atrazine (herbicide), l'amoxicilline (un antibiotique) et le paracétamol (un analgésique). Ces derniers ont été choisis comme des molécules modèles pour la discussion et l'examen critique en raison de leur présence répandue, de leur bioaccumulation et de leurs effets néfastes sur l'environnement aquatique et l'homme [50]. Parmi ces contaminants retrouvés dans l'environnement, on cite :

- **Atrazine (ATZ)**

L'atrazine est la substance active d'un produit phytopharmaceutique appartenant à la famille chimique des triazines qui a un effet herbicide. Il est largement utilisé en l'agriculture pour lutter contre les mauvaises herbes dans diverses cultures, telles que le maïs, le sorgho et la canne à sucre [51,52].

- **Amoxicilline (AMX)**

L'amoxicilline, un antibiotique bêta-lactame appartenant à la famille des pénicillines est utilisé pour traiter les infections microbiennes en empêchant la croissance des protozoaires, des bactéries et des champignons [53,54].

- **Paracétamol (PCM)**

Le paracétamol, également connu sous le nom d'acétaminophène, est un composé chimique utilisé comme analgésique (antidouleur) et antipyrétique. Il est l'un des médicaments les plus couramment utilisés et prescrits dans le monde [55].

II.3. Sources de produits pharmaceutiques dans l'environnement

Les stations d'épuration des eaux usées (STEP) sont la principale source de dispersion de composés pharmaceutiques à usage humain dans l'environnement à partir de la collecte réalisée par les réseaux d'assainissement [56]. En général, les concentrations mesurées dans les effluents des STEP sont de quelques ng/L à quelques µg/L [56].

Les produits pharmaceutiques peuvent pénétrer dans l'environnement à partir de diverses sources, telles que les rejets domestiques et hospitaliers (les fuites d'eaux usées domestiques), les effluents industriels, le ruissellement agricole, et les stations d'épuration municipales [50,57] comme l'illustre la figure II.2 qui suit :

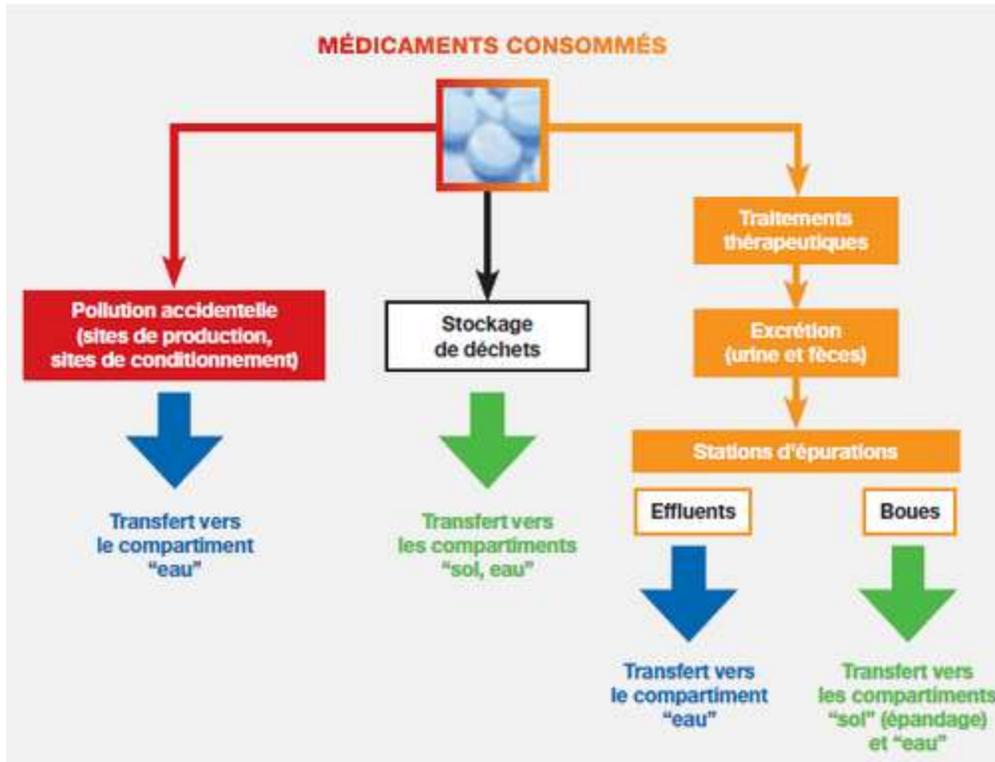


Figure II.2 : Différentes voies d'entrées des médicaments humains dans l'environnement [58]

II.3.1. Usage domestique et hospitalier

Après administration, les produits pharmaceutiques sont absorbés, métabolisés (par le corps), ensuite excrétés soit sous une forme active inchangée soit sous la forme d'une substance métabolisée [59]. Les eaux usées municipales collectent toutes sortes de produits pharmaceutiques humains administrés dans les ménages, les hôpitaux et dans les soins aux personnes âgées, ainsi que les médicaments non utilisés (éliminés de façon inadéquate) [60]. Les produits pharmaceutiques contenus dans les eaux de rejets ne sont pas entièrement éliminés dans les installations de traitement des eaux usées (procédés par boues activées) [60]. Les taux d'abattement (ou taux d'élimination) de certains produits pharmaceutiques varient entre moins de 20% comme par exemple pour le propranolol (béta-bloquant) et plus de 80% (notamment les œstrogènes) [60].

II.3.2. Usage industriel

Les rejets d'usines de fabrication ou de conditionnement de médicaments constituent la seconde source de rejets de produits pharmaceutiques dans l'environnement [61]. Les usines de production de médicaments dispersent dans leurs effluents des quantités importantes de substances pharmaceutiques (par exemple des antibiotiques) [37]. Des concentrations d'antibiotiques pouvant dépasser 1 mg/L ont été détectées dans des effluents de certaines usines de production. Ces concentrations ont un impact majeur sur la flore microbienne environnementale [37].

En cas de mauvais traitement des effluents, ces rejets peuvent engendrer des pics de pollution localisée surtout dans les pays en voie de développement [58].

II.3.3. Usage vétérinaire

Les produits pharmaceutiques vétérinaires utilisés dans l'élevage animal sont rejetés dans les sols dans lesquels le fumier est utilisé comme engrais [62]. Avec le temps, les résidus de ces médicaments s'accumulent dans le sol ou s'écoulent dans les eaux souterraines ou dans les eaux de surface ; ils peuvent également être assimilés par les plantes [62]. Les produits pharmaceutiques vétérinaires utilisés dans l'aquaculture fournissent une entrée directe dans les eaux de surface [63].

II.3.4. Stations d'épuration des eaux usées STEP

La présence de produits pharmaceutiques dans les eaux usées des STEP est due à la métabolisation incomplète de ces produits dans le corps humain et leur rejet via les urines et les fèces [64]. Les eaux usées urbaines sont ainsi un vecteur important de médicaments et de leurs métabolites vers les STEP [64]. De plus, plusieurs études se sont intéressées à la présence des produits pharmaceutiques dans les affluents et les effluents de STEP et ont constaté que l'élimination de ces produits est incomplète [65,66,46,67]. Le tableau (II.1) ci-dessous regroupe quelques exemples de concentrations recueillies dans la littérature :

Tableau II.1 : Concentrations recueillies dans la littérature d'une sélection de produits pharmaceutiques en entrée et en sortie de STEP [65,46,67,48]

Composés	Entrée de STEP (ng/L)	Sortie de STEP (ng/L)
Amoxicilline	0,19 – 0,28 ^a	0.007 ^a
Carbamazépine	1200 ^a ; 1200 ^c ; 15780 ^d	1040 ^a ; 1000 ^c ; < 5 – 4600 ^d
Diclofénac	1000 ^a ; 1004 ^b ; 750 ^c	800 ^a ; 627 ^b ; 200 ^c
Ibuprofène	37000 ^a ; 11179 ^b ; 12000 ^c	3600 ^a ; 251 ^b ; 800 ^c
Paracétamol	292093 ^b	64 ^b

^aVerlicchi et al., 2012 ; ^bPomies, 2013 ; ^cBudzinski et al., 2009 ; ^dLuo et al., 2014

II.4. Occurrence des produits pharmaceutiques

Le rejet des substances pharmaceutiques et de leurs métabolites conduit à leur accumulation dans le milieu aquatique [68,69]. Les études menées sur l'occurrence et les effets de ces polluants émergents dans l'environnement aquatique révèlent leur présence dans les eaux usées, les eaux de surface, les eaux souterraines [70] et l'eau potable [71] avec des quantités variables. La présence de certains produits pharmaceutiques dans les eaux de surface, les eaux usées et l'eau de mer de quelques pays a été mise en évidence comme le démontre le tableau II.2.

A titre d'exemple, KEMPER.N a procédé au dosage de l'amoxicilline dans les eaux de surface au Maroc, les concentrations retrouvées se situaient entre 158 et 4107ng/L [59].

Tableau II.2 : Occurrence des produits pharmaceutiques dans les milieux aquatiques [70]

Type d'eau	Pays	Polluants	Concentrations (ng/L)	Références
Eaux de surface	Rivière Sebou, Maroc	Amoxicilline	<158.3–4107	[59]
Eaux usées	STEP de Toscane, Italie	Paracétamol Amoxicilline	3914 2002	[74]
Eaux souterraines	Aquifères peu profonds du Nil, Égypte	Bisphénol A Amoxicilline paracétamol	71.1 44–6490 1–188	[56]
Eaux de mer	Méditerranée orientale Mer, Grèce	Amoxicilline	<5.0–127.8	[64]

II.5. Devenir des produits pharmaceutiques dans les STEP et dans l'environnement

II.5.1. Voie d'élimination dans les STEP

Le devenir des composés pharmaceutiques dans les STEP est contrôlé par des facteurs intrinsèques, liés aux molécules, et extrinsèques, spécifiques à la STEP [75,48]. Les facteurs internes comprennent les caractéristiques des composés : l'hydrophobicité, la biodégradabilité et la volatilité [75,48]. Par exemple, les composés polaires et non volatils sont plus susceptibles d'échapper aux procédés de traitement des eaux usées [75,48]. Les facteurs externes, quant à eux, sont liés aux conditions de mise en œuvre des procédés de traitement, au mélange de micropolluants qui peut avoir un effet de synergie comme un effet inhibiteur du traitement, ainsi qu'à la nature des eaux usées (pH, température, ...) [75,48].

II.5.2. Voie d'élimination dans l'environnement aquatique

Lors de leur passage à travers différentes matrices de l'environnement telles que les eaux de surface, les sols et les eaux souterraines, les composés pharmaceutiques, leurs métabolites et leurs produits de dégradation formés par les différents procédés de traitement des eaux sont transformés davantage par des processus biologiques et physico-chimiques en partie similaires à ceux observés dans les STEP [77].

II.5.2.1. La photo-dégradation

Dans les eaux naturellement ensoleillées (rivières, mers) la photo-dégradation est considérée comme la voie principale de dégradation des molécules photosensibles qui peut naturellement atténuer la concentration des produits pharmaceutiques [78].

De nombreux médicaments sont connus pour être dégradables par la lumière du soleil [73,64]. A titre d'exemple, le diclofénac est rapidement dégradé par photolyse directe tandis que certains composés pharmaceutiques sont connus pour être peu photolysables, comme les benzodiazépines [79,80,81].

II.5.2.2. L'hydrolyse

L'hydrolyse chimique est l'une des principales voies de transformation des contaminants organiques dans le milieu aquatique, car l'eau est un réactif omniprésent dans l'environnement qui peut déclencher des réactions successives [82]. Bien que l'hydrolyse se produit en fonction

du pH et de la température, d'autres substances présentes dans l'environnement comme la matière organique dissoute peuvent influencer l'hydrolyse des contaminants organiques dans les systèmes aquatiques [83]. Les structures moléculaires de nombreux produits pharmaceutiques contiennent des groupements fonctionnels hydrolysables comme les esters, les amides, les imides et les halogènes qui sont impliqués dans la dégradation hydrolytique [84].

II.5.2.3. La biodégradation

Les microorganismes présents dans les eaux de surface sont également impliqués dans les processus d'atténuation de la contamination des milieux aquatiques. En effet, ils peuvent dégrader les composés organiques par l'intermédiaire de deux voies : la biodégradation directe pendant laquelle les micropolluants sont utilisés comme source d'énergie pour la croissance bactérienne via des réactions d'oxydoréduction ou de fermentation ; et le co-métabolisme où les contaminants n'entrent pas dans le processus de croissance des microorganismes mais sont dégradés du fait de leur activité métabolique par une réaction enzymatique [85].

II.6. Danger et toxicité des produits pharmaceutiques

Les produits pharmaceutiques ont été spécialement conçus pour maximiser leur activité biologique à faibles doses et pour cibler certains mécanismes métaboliques, enzymatiques ou cellulaires [86]. Ces produits peuvent donc se révéler potentiellement actifs dans des organismes non-ciblés, involontairement exposés à des résidus de médicaments dans leur environnement naturel, augmentant ainsi le risque d'effets écotoxicologiques [86].

Les effets potentiels des produits pharmaceutiques sont l'antibiorésistance et la perturbation endocrinienne.

II.6.1. Antibiorésistance

L'antibiorésistance est la capacité d'une bactérie à résister vis à vis à l'action d'un antibiotique.

A titre d'exemple, la bactérie *Klebsiella pneumoniae* présente dans certaines infections urinaires est d'une résistance de 16% aux céphalosporines (antibiotique). Les résistances bactériennes engendrent des difficultés dans le traitement de différentes maladies bactériennes fréquentes comme dans la cystite de la femme adulte, mais aussi dans l'otite du nourrisson ou la pneumonie [87].

II.6.2. Perturbation endocrinienne

Certains produits pharmaceutiques ont une fonction endocrinienne, c'est à dire qu'ils affectent le système hormonal [88]. A titre d'exemple, les contraceptifs, certains traitements contre le cancer, les médicaments pour le traitement des maladies du système nerveux ...etc. Il a été découvert que certains produits pharmaceutiques perturbateurs du système endocrinien ont des effets nocifs sur la faune et la flore même à de très faibles concentrations, comme par exemple la féminisation de poissons mâles [88].

II.7. Cas de l'écotoxicité de l'amoxicilline**II.7.1. Définition**

Les antibiotiques tels que l'amoxicilline qui atteignent l'eau potable peuvent provoquer une allergie extrême aux espèces sensibles, dont les êtres humains [89, 90].

L'amoxicilline est une menace pour la vie terrestre et aquatique, mais les données disponibles sur sa toxicité pour les êtres vivants sont limitées [91]. Elle est largement utilisée sur les animaux, par conséquent, il est à noter que les résidus d'amoxicilline dans les animaux destinés à l'alimentation sont la cause d'une préoccupation mondiale [92].

II.7.2. Toxicité de l'amoxicilline dans l'environnement aquatique

Dans l'environnement aquatique, les antibiotiques et notamment l'amoxicilline, créent un déséquilibre écologique en produisant des effets toxiques sur les organismes aquatiques, altèrent la croissance des plantes, modifient les rapports sexuels chez les animaux supérieurs et provoquent des anomalies dans l'anatomie de nombreux organismes [93].

Les rapports d'enquête de la littérature sur l'effet de l'amoxicilline sur la flore et la faune aquatiques sont rares, ce qui est dû à la faible toxicité de l'amoxicilline car de nombreux cas sont associés à une valeur EC50 allant jusqu'à 1000 mg/L [94].

Dans les milieux aquatiques, peu d'études ont rapporté les effets de l'amoxicilline chez les poissons, probablement parce qu'elle n'est pas décrite comme une substance toxique importante dans la littérature scientifique rapportant qu'une exposition de 15minutes pour *Daphnia magna* était supérieure à 1000 mg/L [95]. Le tableau II.3 résume la toxicité de l'amoxicilline

sur l'écosystème aquatique.

Tableau II.3: Toxicité de l'amoxicilline sur l'écosystème aquatique

Les organismes aquatiques	Durée de l'exposition	Concentrations	Références
Daphnia magna (crustacé)	15 min	>1000 mg/L	[95,96]
Oryzias latipes ou Médaka (poisson)	15 min	>1000 mg/L	[95,96]
Vibrio fischeri (Bactérie)	15 min	3597 mg/L	[95,96]
Microcystis aeruginosa (cyanobactérie)	7 jours	0.0037 mg/L	[95,97]
Synechococcus leopoliensis (cyanobactéries)	96 h	1.56 µg/L	[98]
Danio rerio (poisson)	48 h	132.4 mg/L	[96]
Spirodeka polyhiza (Espèce d'herbe)	7 jours	0.089 µg/ L	[99]

Chapitre III : La chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

III.1. Définition

C'est une technique instrumentale très utilisée dans les laboratoires d'analyse. Elle permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, thermosensible, de polarités différentes afin de les identifier et les quantifier [13,14]. C'est une technique d'analyse à la fois qualitative et quantitative, [13,14] très utilisée en chimie analytique puisqu'elle permet une étude précise et complète d'une espèce chimique [13,14]. Elle met en œuvre, selon la nature des interactions entre la phase stationnaire, la phase mobile et l'échantillon analysé, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion [13,14]. La figure III.1 représente une installation d'un appareil HPLC.



Figure III.1 : Installation en HPLC [112]

III.2. Caractéristiques

Les techniques chromatographiques modernes sont caractérisées par leur critère de haute performance, haute résolution et grande vitesse d'analyse [109].

Dans un dispositif chromatographique, la grande résolution est le résultat de la combinaison de deux termes : grande efficacité et grande sélectivité [107] d'où la requise de la HPLC pour les séparations difficiles.

De plus, les particules des phases stationnaires sont très petites de 2 à 20 μm et le remplissage se fait à une très grande pression de 10-12 000 KPa [110, 111] d'où la nécessité d'une colonne en métal (acier inoxydable) [110]. Plus une particule est petite, plus le rapport surface/poids est grand. Le remplissage haute pression permet d'introduire une plus grande quantité de la phase stationnaire dans la colonne [111].

III.3. Appareillage et fonctionnement

Les composantes principales d'un système HPLC sont indiquées ci-dessous [111] :

- **Réservoir de solvant (éluant)**

C'est la phase mobile contenant plusieurs flacons de solvant en quantité suffisante qui sont disponibles pour pouvoir séparer deux substances à l'aide de la pompe doseuse.

- **Pompe**

Elle est équipée d'un système de gradient qui permet de programmer la nature du solvant. Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min.

- **Vanne d'injection**

Il s'agit d'un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes. Le volume de la boucle est choisi en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet un volume d'injection constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

- **Colonne**

Une colonne est un tube construit dans un matériel le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au-delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.

- **Phase stationnaire**

✓ La phase normale : Cette phase est constituée de gel de silice (matériau très polaire pour lequel il faut utiliser un éluant apolaire). Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.

✓ La phase inverse : L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire ou à polarité inversée se répercutent sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

-Si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ;

-Si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire, c'est la chromatographie en phase inverse. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés.

- **Détecteurs**

Deux types de détecteurs sont classiquement utilisés :

✓ Détecteur UV-visible : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne.

✓ Réfractomètre : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne.

III.4. Principe

Il s'agit d'une technique de migration différentielle des composants d'un mélange, entraînés à travers une phase mobile et en passant sur une phase stationnaire qui présente des affinités distinctes pour chaque composé à séparer [114].

Les composés chimiques du mélange, qui ont une affinité différente pour la silice, sont plus ou moins retenus : par un phénomène appelé rétention, les composés sont séparés et non pas à la même vitesse de passage du pilier. Un détecteur ainsi qu'un enregistreur détermine l'ordre et le temps de sortie de chaque espèce. Ainsi un chromatogramme est obtenu. Chaque pic correspond à la présence d'un composé, après réalisation de chromatogrammes standards dans les mêmes conditions, la nature chimique de chaque mélange initial peut être retrouvée par son pic caractéristique.

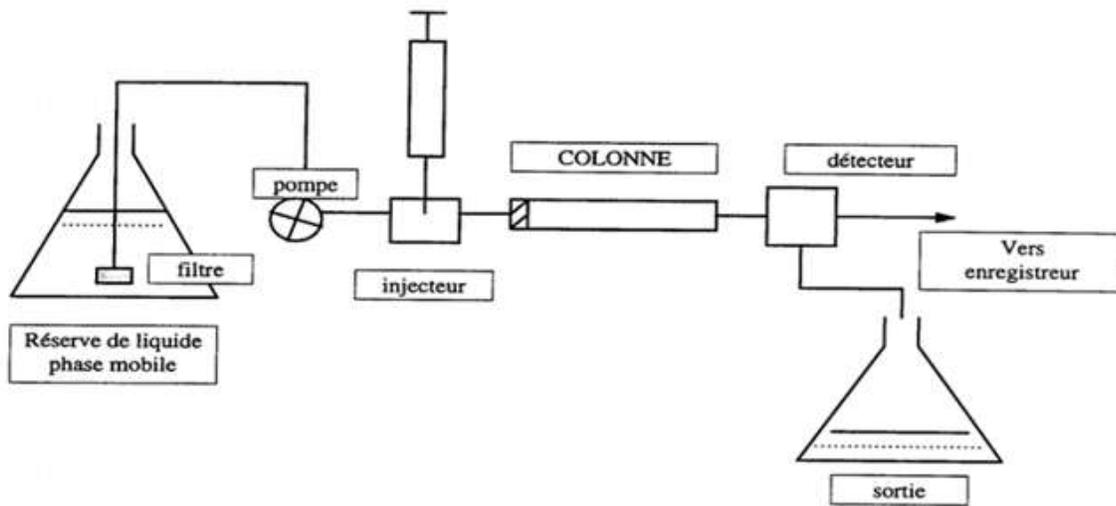


Figure III.2 : Principe de fonctionnement de la chromatographie liquide à haute performance [1].

Matériel et méthodes

• IV.1. Matériel

Ce travail entre dans le cadre d'une approche qui a pour objectif : le dosage d'AMOXICILLINE[®] dans les eaux de rejets par HPLC. L'étude a été réalisée au niveau des laboratoires situés au bloc 11 de génie des procédés à l'université de Béjaia, campus Targa Ouzemour.

Le matériel employé durant cette étude est le suivant :

Verrerie :

- Entonnoir
- Pipettes de 5ml et 10ml
- Fioles jaugées de 50ml, 100ml et 1L
- Béchers de 25ml, 50ml et 1L
- Eprouvette graduée de 50ml
- Erlenmeyer de 3L
- Seringues en verre
- Barreaux magnétiques

Appareillage et équipement :

- Balance
- PH mètre
- Conductimètre
- Agitateur magnétique
- Centrifugeuse
- Appareil HPLC

Autres :

- Tubes coniques de 15ml
- Filtres à seringue 0,45 um
- Papier filtre
- Micropipette 2-1000µL
- Pissette à eau
- Micro pissette
- Seringues
- Spatule

IV.2. Produits chimiques

Au cours de cette étude, divers produits chimiques ont été employés. Ces derniers sont illustrés dans le tableau (IV.2.) suivant :

Tableau IV.1 : Produits chimiques utilisés

Produits	Formules chimiques
Amoxicilline	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$
Acide phosphorique	H_3PO_4
Acide chlorhydrique	HCL
Hydroxyde de sodium	NaOH
Dichlorométhane	CH_2CL_2
Méthanol	CH_3OH
Phosphate monopotassique	KH_2PO_4
Acétonitrile	CH_3CN

A.N : Les solutions ont été préparées avec de l'eau distillée ultra pure (d'une conductivité inférieure à 2S/m).

IV.2.1. Amoxicilline

L'amoxicilline employé durant cette expérience est une poudre pour solution injectable comme le montre la figure II.1 ci-dessous. Sa formule est mentionnée sur son emballage comme suit :

- Flacon : amoxicilline sous forme de sel de sodium (1g)
- Ampoule de solvant I.M
- Alcool Benzylique (150 mg)
- Eau p.p.i (préparation pour injection) qsp (quantité suffisante pour) 5ml



Figure IV.1: AMOXICILLINE[®] 1g (poudre pour solution injectable).

IV.3. Méthode d'extraction

IV.3.1. Micro extraction liquide-liquide dispersive (DLLME)

C'est une technique de chimie analytique utilisée pour déterminer la présence des composés organiques dans un milieu liquide et les extraire [100]. C'est aussi une nouvelle technique de préparation d'échantillons offrant des facteurs d'enrichissement élevés à partir de faibles volumes d'échantillons d'eau. Cette méthode a été largement acceptée en raison de plusieurs avantages, notamment la simplicité, le faible coût et la facilité de développement, ce qui l'a rendu accessible à pratiquement tous les laboratoires d'analyse [101].

IV.3.1.1. Principe

Dans un protocole DLLME typique, un solvant d'extraction est mélangé avec un solvant dispersif et ce mélange de solvants est ensuite rapidement injecté dans l'échantillon aqueux. L'injection rapide du mélange solvant d'extraction-dispersion produit une solution trouble formée de microgouttelettes de solvant d'extraction dispersé dans l'échantillon aqueux comme illustré sur la figure (IV.2) [102].

La formation d'une solution/émulsion trouble permet la séparation instantanée des analytes de la solution aqueuse échantillon dans la phase d'extraction [103]. Ceci est réalisé par la grande surface relative à l'extraction liquide-liquide (LLE) créé par les nombreuses microgouttelettes. La solution nuageuse est ensuite centrifugée, ce qui brise l'émulsion en un système biphasé permettant une récupération facile de l'extraction [104].

Afin de réaliser une extraction DLLME, certaines conditions doivent être remplies. Le solvant d'extraction doit être non miscible avec l'eau, miscible avec le solvant de dispersion et doit montrer une grande affinité pour les analytes cibles [104].

Dans ce qui sera appelé ci-après « DLLME traditionnelle », le solvant d'extraction est typiquement plus dense que l'eau tel qu'il formera une "phase sédimentée" lors de la centrifugation pour une collecte facile avec une aiguille de seringue fine. A l'inverse, le solvant dispersif doit être miscible à la fois avec le solvant d'extraction et l'échantillon aqueux. Idéalement, le solvant d'extraction sera compatible avec la technique analytique utilisée ; sinon l'évaporation du solvant d'extraction et la reconstitution dans un solvant approprié est nécessaire [103].

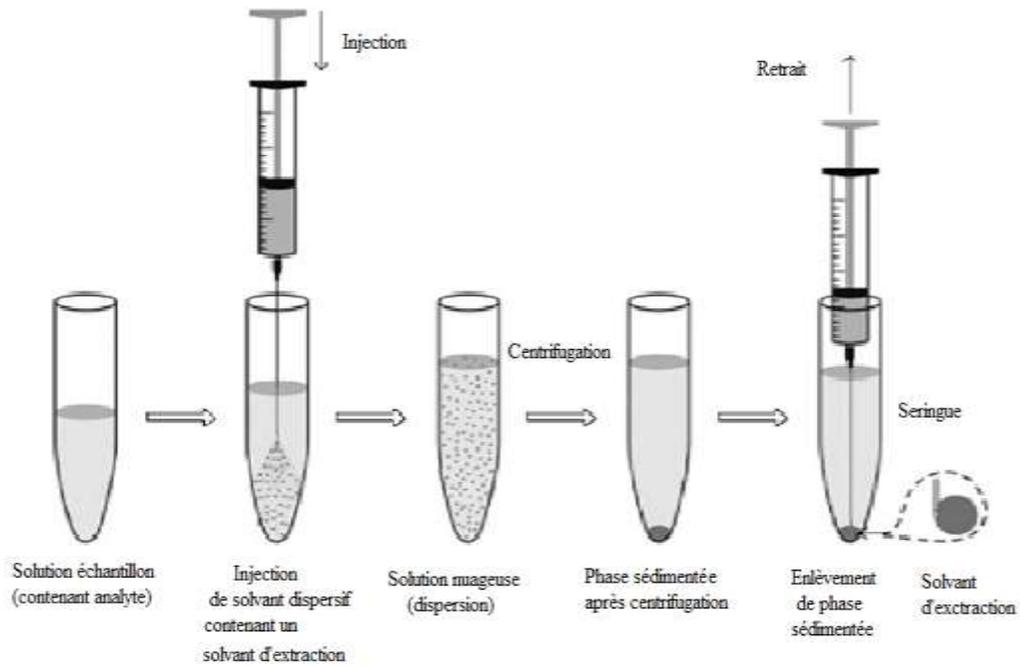


Figure.IV.2 : Schéma de la technique de la micro-extraction liquide-liquide dispersive
[104]

IV.4. Prélèvement et préparation des échantillons

- **Echantillon 1**

Les eaux usées du point 1 au niveau de l'Oued traversant le campus Targa Ouzemmour de l'université de Béjaia (voir la figure IV.3) et dont les coordonnées GPS sont 36,750434, 5,033727 sont prélevés à l'aide d'un bidon rattaché à une corde le 22 juin à 9h29.

- **Echantillon 3**

L'échantillon 3 est réalisé en dopant l'échantillon 1 d'eaux usées (pH=6) avec 1mg d'amoxicilline préalablement pesé. Pour ce faire, 100ml de l'échantillon 1 sont versés dans une fiole puis 1mg d'amoxicilline y est ajouté. Le mélange est ensuite mis sous agitation pendant 10min.

❖ **Remarque** : Ces échantillons ont été recouverts avec du papier aluminium pour se protéger de la lumière et conservés à 5C° jusqu'à leur utilisation.

- **Echantillon 4**

L'échantillon 4 est préparé à partir de 100ml d'eau distillée (pH=6) versés dans une fiole auxquels 1mg d'amoxicilline préalablement pesé est ajouté. La solution obtenue est ensuite mise sous agitation pendant 10min.

IV.5. Protocoles expérimentaux

IV.5.1. DLLME

Dans un bécher de 25ml, un mélange de solvants contenant 4ml de solvant d'extraction (dichlorométhane) et 4ml de solvant de dispersion (méthanol) est préparé. Dans un autre bécher, un aliquote de 5ml d'échantillon est prélevé à l'aide d'une micropipette.

A l'aide d'une seringue, le mélange de solvants est rapidement injecté dans le bécher contenant l'échantillon de 5ml ce qui a engendré des micro gouttelettes.

Par la suite, le mélange contenant l'échantillon et les solvants est mis sous agitation pendant 10 à 15min afin d'homogénéiser la solution et d'améliorer le rendement de l'extraction. Le mélange obtenu après agitation est versé dans un tube conique de 15ml puis est mis sous centrifugation à 6000 rpm pendant 15 min afin de le séparer en deux phases bien distinctes à savoir le surnageant et le sédiment.

IV.5.2. Analyses HPLC

Afin de procéder à l'analyse de l'échantillon par HPLC, les deux phases précédemment obtenues à savoir le surnageant et le sédiment sont séparées à l'aide d'une micropipette dans deux béchers

différents. En effet, le surnageant est tout d'abord prélevé et mis dans un bécher contenant préalablement 50ml d'acétonitrile puis le sédiment est également récupéré dans 50ml d'acétonitrile.

Les deux mélanges sont ensuite mis sous agitation puis filtrés à l'aide d'une seringue et d'un filtre 0,45 μ m. Enfin, les filtrats sont récupérés dans des vials préalablement rincés à l'acétonitrile puis injectés dans l'appareil HPLC.

IV.5.2.1. Conditions chromatographiques

Les analyses ont été réalisées sur un système chromatographique Dionex Ultimate 3000 équipé d'un détecteur de type UV-Visible 3000 et d'un injecteur de type Auto sampler 3000 (voir la figure IV.4). Les données d'analyses ont été traitées sur un ordinateur HP. La phase mobile impliquait un mélange de tampon phosphate, PH=4.8 et d'acétonitrile (95/5, v/v), pompé à un débit de 1.3ml/min à travers une colonne C18.



Figure IV.4 : Appareil HPLC utilisé

Les conditions chromatographiques sont résumées dans le tableau 3.3.1 ci-après :

Tableau IV.2: Les conditions chromatographiques

Chromatographe	Dionex Ultimate 3000
Colonne	C18
Phase mobile	Phosphate-Acétonitrile
Injecteur	Auto sampler 3000
Détecteur	UV-Visible 3000

IV.6. Préparation des solutions

IV.6.1. Préparation de la phase mobile

La phase mobile préparée est composée de phosphate monopotassique et d'acétonitrile (95/5, v/v).

Pour ce faire, 2,72g de phosphate monopotassique (KH_2PO_4) sont dissous dans une fiole contenant 1L d'eau distillée ultra pure. La solution obtenue est ensuite mise sous agitation pendant 30min et le pH est ajusté à 4,8 à l'aide de l'acide phosphorique (H_3PO_4).

Par la suite, 5ml de cette même solution sont prélevés et remplacés par 5ml d'acétonitrile afin d'obtenir 1L de solution contenant 95ml de tampon phosphate et 5ml d'acétonitrile.

L'opération est répétée une deuxième fois afin d'obtenir au total 2 litres de phase mobile.

IV.6.1.2. Préparation de la courbe d'étalonnage

Afin de préparer la courbe d'étalonnage, une première solution appelée solution mère « C0 » est préparée en ajoutant 10mg d'amoxicilline préalablement pesés dans 100ml de la phase mobile puis est mise sous agitation pendant 30min.

Par la suite, une série de dilutions est réalisée afin de préparer les solutions filles qui sont au nombre de 6 (voir la figure 3.4.2) et dont les concentrations vont de C1 jusqu'à C6. Pour chaque dilution, 1ml de la solution mère C0 est ajouté dans 6 tubes à essais contenant respectivement 4, 9, 14, 24, 34 et 49ml de la phase mobile. Les six solutions filles sont filtrées à l'aide d'une

seringue et d'un filtre 0,45 μ m. Enfin, les filtrats sont récupérés dans des vials de 20 μ l ensuite injectés dans le système chromatographique HPLC.



Figure IV.5 : Solutions étalons filles préparées.

Résultats et discussions

V. Résultats et discussions

La méthode de dosage utilisée au cours de notre étude est l'HPLC.

L'étude HPLC incluant les étapes d'extraction utilisées (DLLME) a permis de détecter la présence de l'amoxicilline dans les eaux de rejets analysées.

V.1. La courbe d'étalonnage

Pour tracer la courbe d'étalonnage de l'AMX $Y=f(X)$, on a calculé les concentrations dans chaque solution étalon.

Pour y parvenir, on a appliqué l'équation suivante :

$$C_0 \times V_0 = C_1 \times V_1 \quad \rightarrow \quad C_1 = (C_0 \times V_0) / V_1$$

Avec :

C_0 : représente la concentration de l'AMX dans la solution mère introduite

V_0 : représente le volume de la solution mère introduit

C_1 : représente la concentration de l'AMX dans la solution fille étalon (1)

V_1 : représente le volume total de la solution fille étalon (2)

Ainsi, on obtient les valeurs des concentrations correspondant à toutes les autres solutions étalons.

Les figures (V.1, V.2, V.3, V.4, V.5, V.6) ci-dessous représentent les chromatogrammes établis lors de la réalisation de la courbe d'étalonnage.

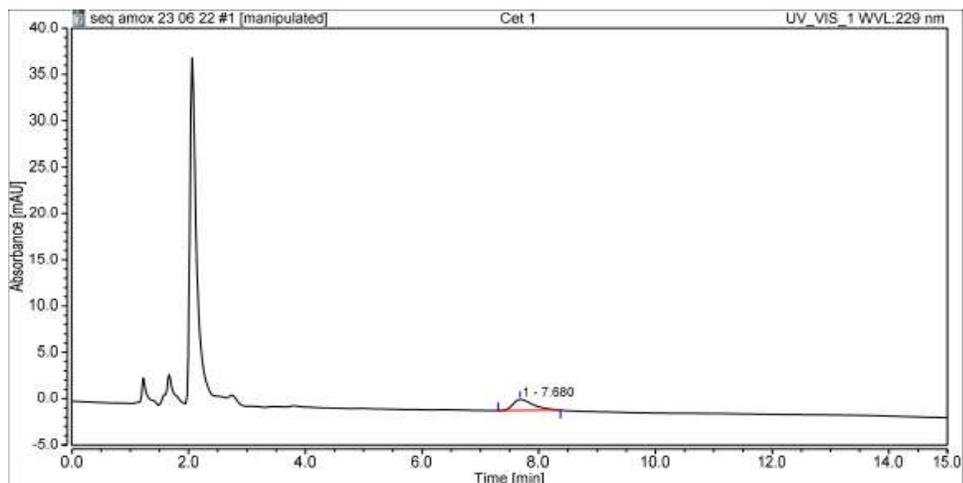


Figure V.1: Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution fille (1) ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate de pH =4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C

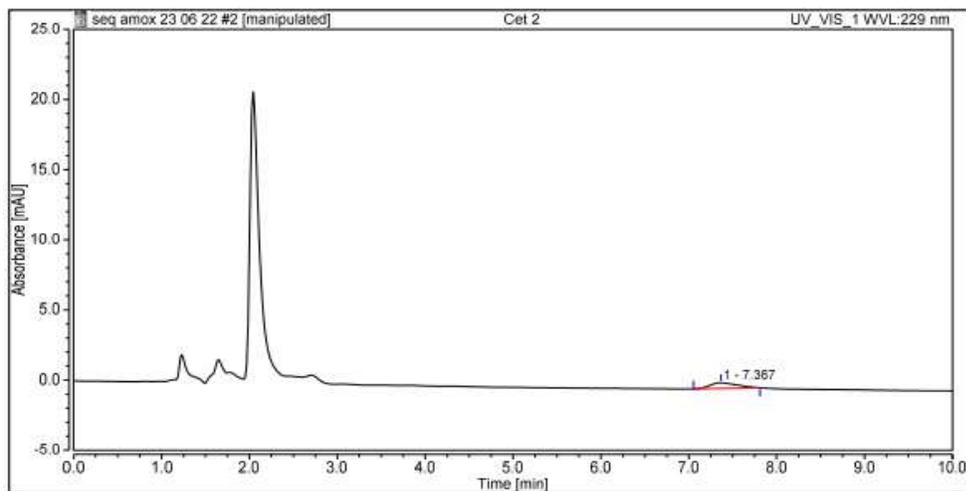


Figure V.2 : Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution fille (2) ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate de pH =4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C

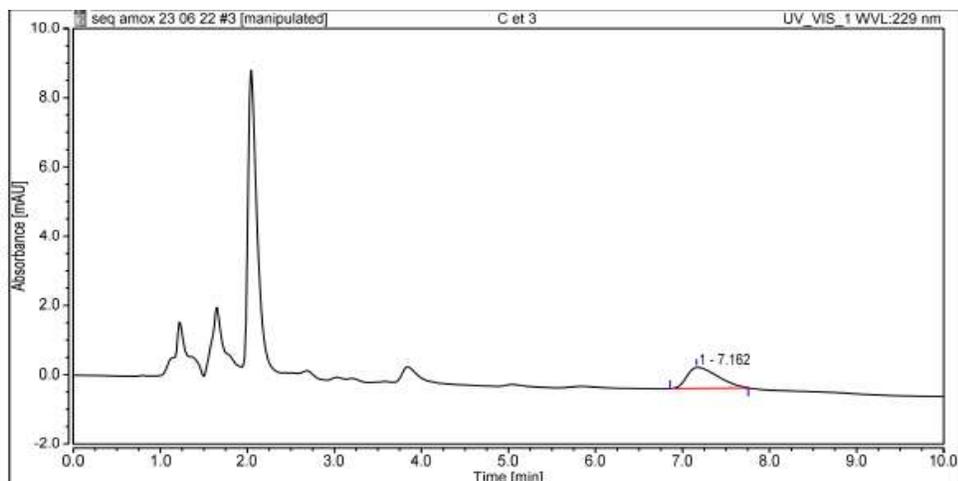


Figure V.3 : Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution fille (3) ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate de pH =4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C

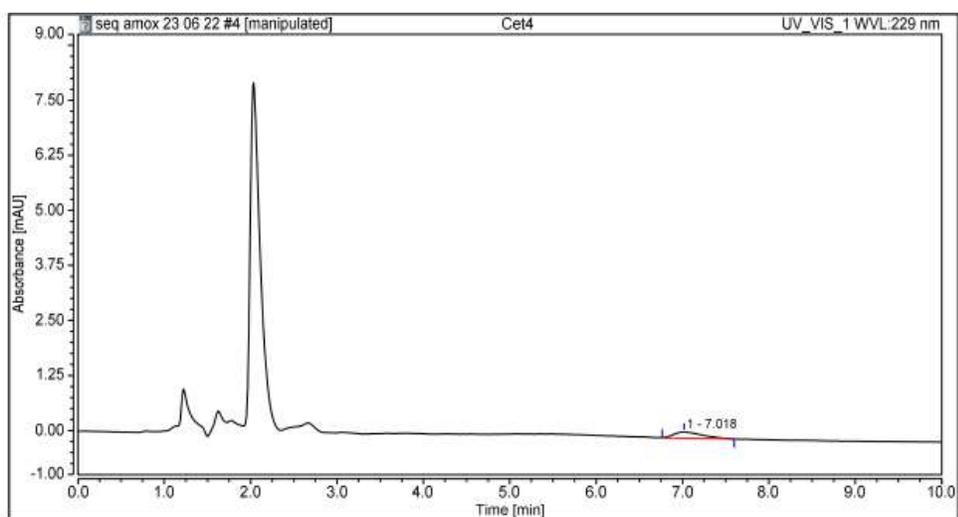


Figure V.4 : Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution fille (4) ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate de pH =4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C

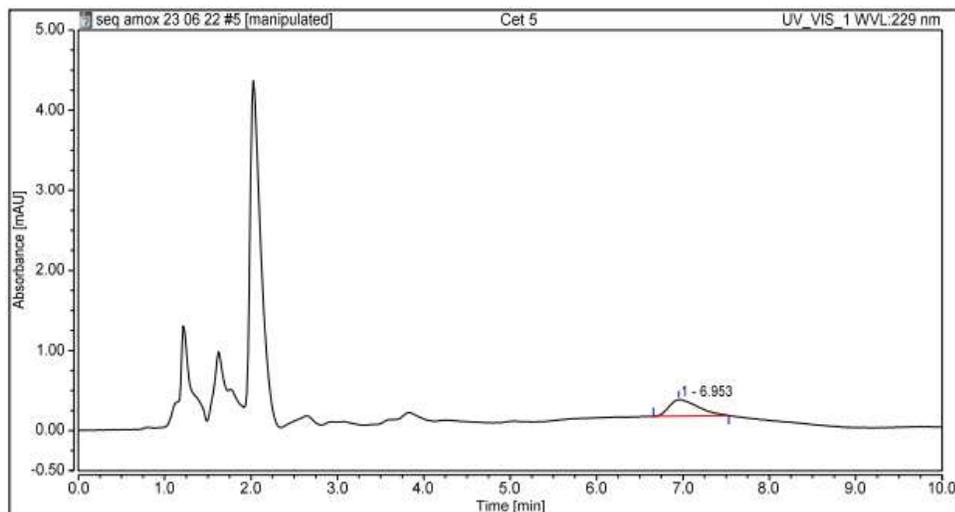


Figure V.5 : Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution fille (5) ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate de pH =4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C

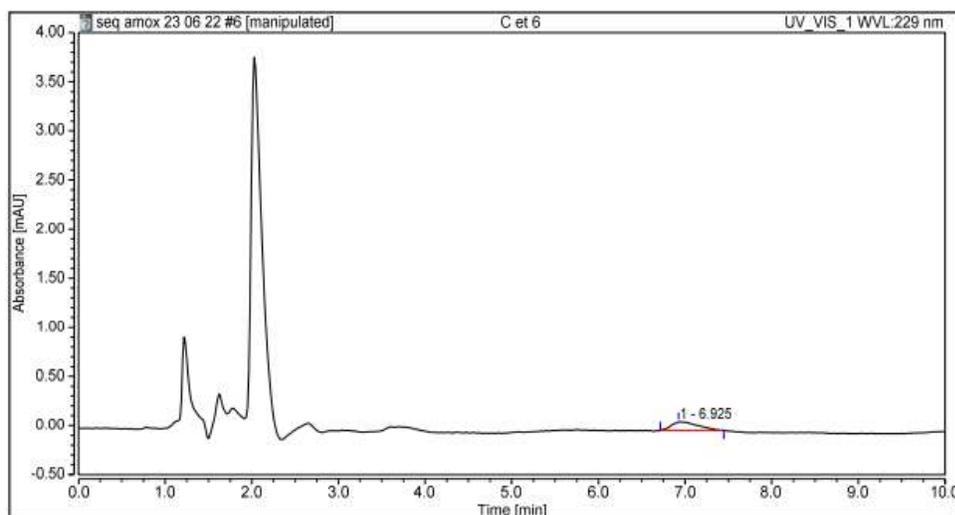


Figure V.6 : Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution fille (6) ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate de pH =4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C.

Les chromatogrammes des solutions étalons ont montré la détection des pics correspondant à la présence de l'amoxicilline.

Le tableau suivant résume les volumes, les concentrations de l'AMX trouvés dans les solutions filles et l'aire du pic qui correspond à chaque concentration.

Tableau V.1 : Concentrations d'AMX trouvées dans les solutions étalons.

Volumes des solutions étalons (ml)	Concentrations des solutions étalons (mg/ml)	Aire du pic
5	0,02	0,4799
10	0,01	0,2475
15	0,00667	0,1537
25	0,004	0,0798
35	0,00286	0,0538
50	0,002	0,0304

Les représentations graphiques des réponses instrumentales Y (Aire du pic) en fonction des concentrations introduites X selon la fonction $Y = f(X)$ nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage suivante :

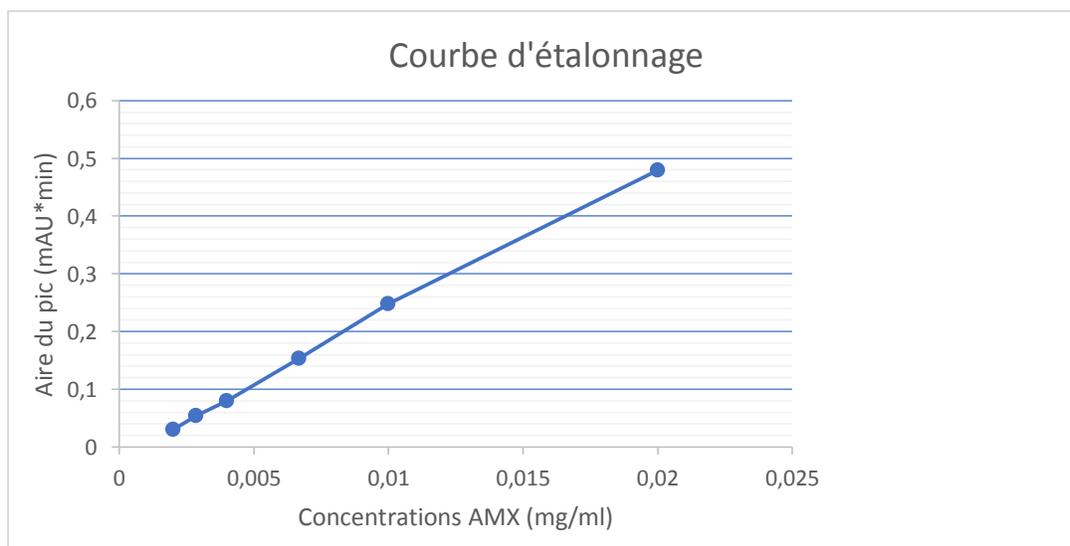


Figure V.7 : La courbe d'étalonnage obtenue

L'équation de la droite de régression est de la forme :

$$Y = a * X$$

Où :

Y : représente la réponse analytique (en aire du pic) ;

X : représente la concentration de l'AMX introduite (en mg/ml);

a : représente la pente

➤ **Calcul des concentrations :**

L'équation de la courbe d'étalonnage $Y=23,804X$ nous permet de calculer les concentrations de l'amoxicilline dans les échantillons analysés

On a : $Y=23.804X \dots (1) \rightarrow X= Y/23,804\dots (2)$

✓ **Calcul des concentrations dans les échantillons :**

Pour ce faire, on utilise l'équation (2)

A titre d'exemple : pour l'échantillon 1

$X= Y/23,804 \rightarrow X_1 = 0,0361/23,804 = 0,001516552$

Ainsi, cette règle est appliquée sur le reste des échantillons (voir le tableau).

Tableau V.2 : Concentrations de l'AMX trouvées dans les échantillons analysés.

Echantillons		Concentrations dans les échantillons (mg/ml)
Surnageants	1	0,001516552
	2	0,001898841
	1 dopé	0,002125693
Sédiments	1	0,045593178
	2	0,02439506
	1 dopé	0,032822215
	Eau distillée dopée	0,023315409

✓ **Concentrations avant dilution :**

Lors de la préparation de l'échantillon dopé, 1mg d'amoxicilline a été introduit dans 100ml d'eau distillée ce qui donne une concentration de 0.01 mg/ml en AMX. Pendant l'analyse HPLC et pour l'échantillon contenant le sédiment, une concentration de $C=0.01\text{mg/ml}$ devait théoriquement être détectée, sauf que l'appareil a détecté une concentration de 1,07095446 mg/ml (pour une aire de pic de 0.555maU*min) (voir la figure), ce qui n'est pas logique. Ceci est sans doute dû à l'absorbance causée par d'autres composés (que ce soit le dichlorométhane ou le méthanol). Pour cela, on va prétendre que la concentration en AMX détectée après l'analyse correspond à la concentration initiale avant l'analyse. Les résultats obtenus par l'HPLC sont présentés dans les figures (V.8, V.9, V.10, V.11, V.12, V.13, V.14) suivantes :

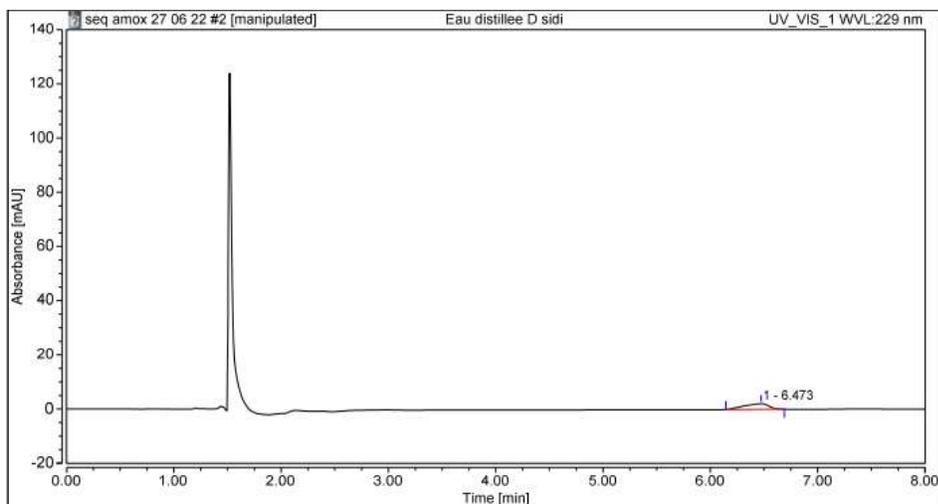


Figure V.8 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon dopé (sédiment) ; ACN/tampon phosphate de pH=4.8 ; (95 :5 ; v/v) ; débit = 1.3 ml/ min ; T = 25°C

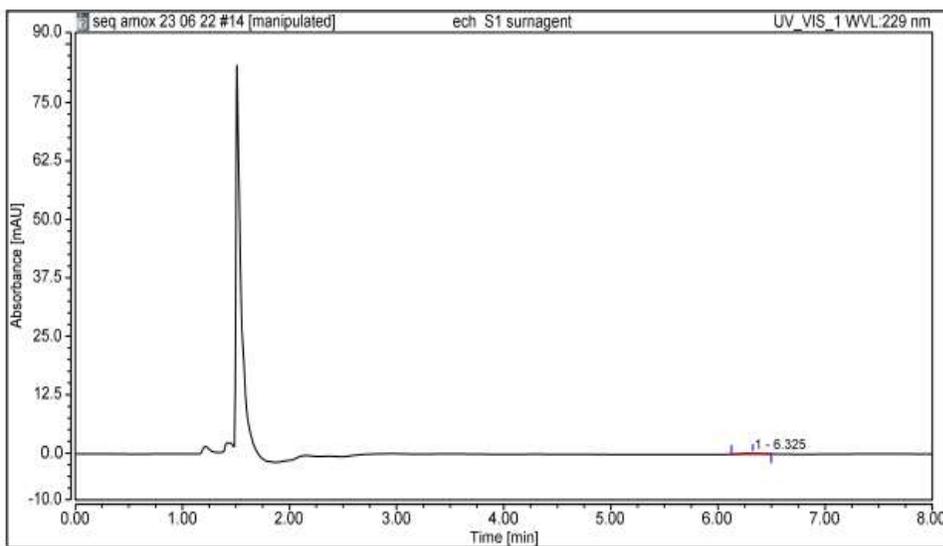


Figure V.9 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon 1 (surageant)

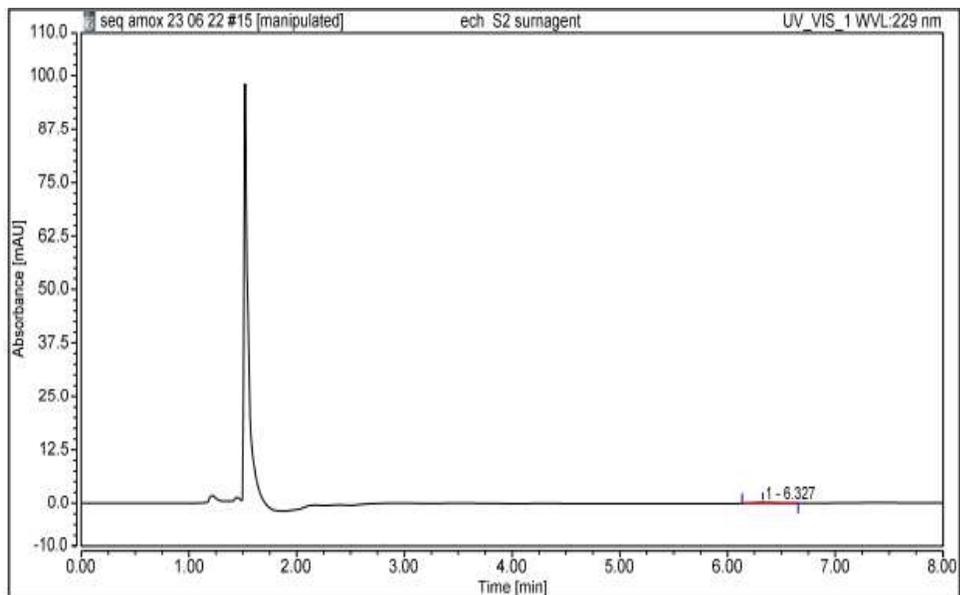


Figure V.10 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon 2 (suragent)

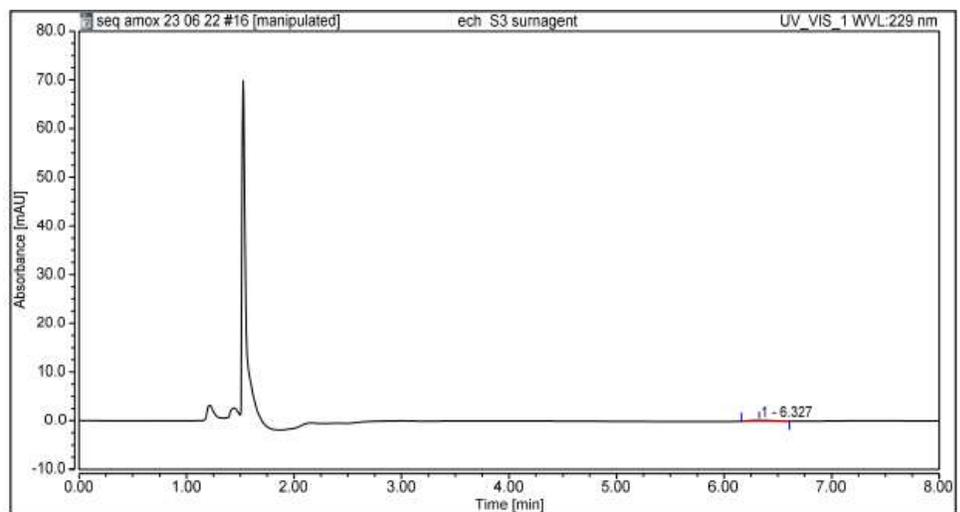


Figure V.11 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon 3 (suragent)

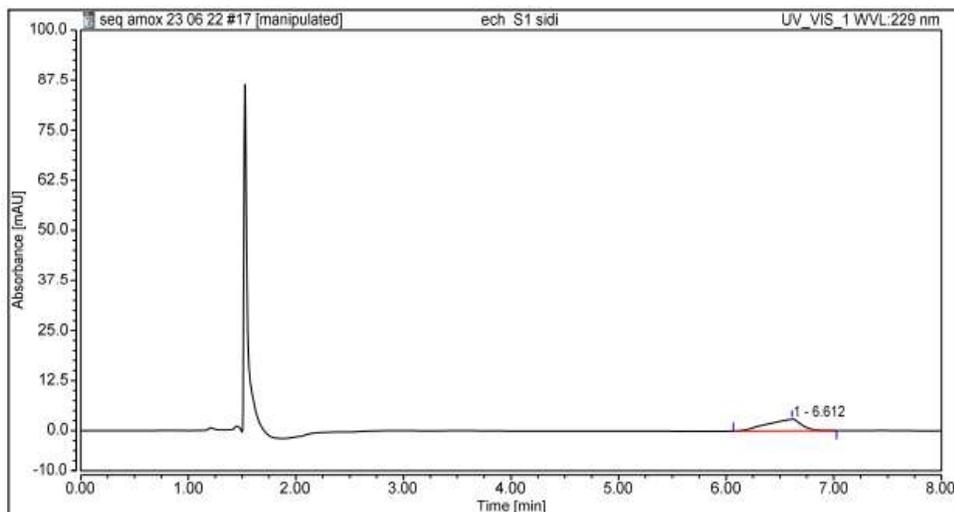


Figure V.12 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon 1 (sédiment)

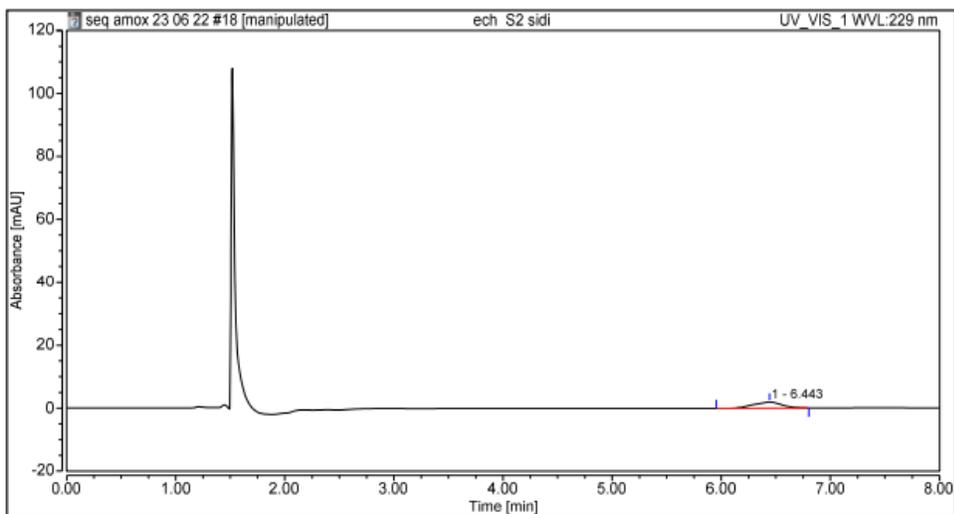


Figure V.13 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon 2 (sédiment)

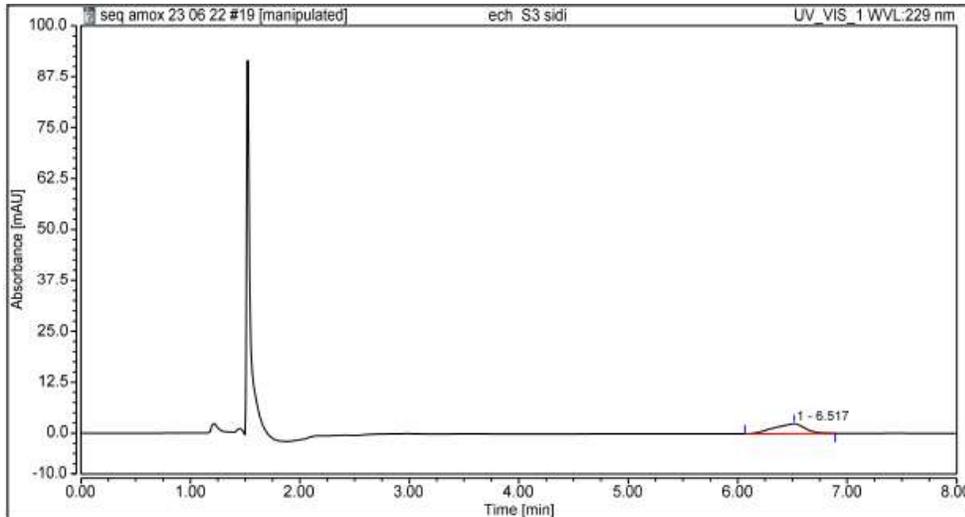


Figure V.14 : Chromatogramme obtenu par HPLC de l'échantillon 3 (sédiment)

Donc, pour calculer les nouvelles concentrations (théoriques) on applique la règle de '3' suivante :

A titre d'exemple : Pour l'échantillon dopé, on a :

1,07095446 mg/ml \rightarrow 0.01mg/ml

0,02365821 mg/ml \rightarrow Ct

❖ **A.N :** Ct (concentration théorique) = $(0,02365821 * 0,01) / 1,07095446 = 0,0002209$ mg/ml.

La même application numérique est réalisée pour le calcul des concentrations des autres échantillons.

Ainsi, les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau ci-après :

Tableau V.3 : Résultats obtenus des concentrations dans les échantillons analysés par HPLC

Echantillons		C : Concentrations avant dilution (réelles) (mg/ml)	Ct : Concentrations théoriques (mg/ml)
Surnageants	1	0,02365821	0,00022091
	2	0,02962191	0,00027659
	1 dopé	0,03316081	0,00030964
Sédiments	1	2,09424663	0,01955495
	2	1,12054641	0,01046306
	1 dopé	1,50763373	0,01407748
	Eau distillée dopée	1,07095446	0,01

Conclusion

Notre étude expérimentale était menée sur le dosage de l'amoxicilline dans les eaux usées en utilisant des méthodes d'extraction et de séparation telles que la micro-extraction liquide-liquide dispersive et la chromatographie liquide à haute performance.

Dans la première partie, nous avons indiqué les conditions optimales permettant de déterminer la présence de l'amoxicilline dans les eaux de rejets et l'extraire en utilisant la méthode DLLME avec le solvant d'extraction (dichlorométhane) et le solvant de dispersion (méthanol) (4/4, v/v).

Par ailleurs, la séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne de type C18, à $\lambda=229$ nm, une phase mobile constituée d'un mélange binaire acétonitrile-tampon phosphate KH_2PO_4 de $\text{pH}=4.8$ (95/5, v/v), à un débit de 1.3ml/min et une température ambiante 25°C .

Enfin, on peut conclure que les résultats obtenus n'ont pas répondu à toutes les exigences élaborées. La méthode de dosage de l'amoxicilline dans les eaux de rejets par HPLC développée dans cette étude s'est révélée invalide, car les résultats obtenus se sont avérés inadéquats, ce qui est dû à l'absorbance des autres composés présents dans les eaux usées analysées.

Conclusion générale

Conclusion Générale

L'étude menée dans ce mémoire a permis de dresser un état des lieux de la contamination de différents compartiments du milieu aquatique, en particulier dans les eaux de rejets par des résidus de produits pharmaceutiques tel que l'amoxicilline et d'évaluer le risque environnementale associé.

En premier lieu, l'amoxicilline est l'un des antibiotiques les plus consommés dans le monde, par conséquent, ce composé pharmaceutique pourrait être présent à des concentrations préoccupantes par infusion continue dans l'environnement et cela que ce soit par les déchets des usines qui les produisent ou par son excrétion sous forme inchangée dans les urines et les fèces.

L'occurrence des produits pharmaceutiques dans les STEP s'est avérée importante avec des concentrations allant de quelques dizaines de ng/L à la dizaine de µg/L. Ces concentrations trouvées affirment que les stations d'épuration sont incapables d'éliminer totalement ces molécules.

Par ailleurs, l'accumulation de ces substances pharmaceutiques ainsi que leurs résidus a été démontrée par plusieurs études dans divers écosystèmes aquatiques (Les eaux de surface, les eaux souterraines, les effluents d'eaux usées...etc.)

La présence de ces contaminants dans les masses d'eau environnementale a permis de révéler l'intérêt d'évaluer le risque que peuvent présenter ces polluants.

De plus, la chromatographie liquide à haute performance semble être un outil adapté pour la séparation des composés, La détection et l'identification de certaines substances.

D'après les résultats obtenus par cette méthode, on pourrait dire qu'afin d'assurer des résultats concrets, il est nécessaire d'établir un protocole de validation des procédures analytiques adapté au produit étudié.

Références bibliographiques

- [1] Sanderson, H., Brain, R.A., Johnson, D.J., Wilson, C.J. and Solomon, K.R. (2004). Toxicity Classification and Evaluation of Four Pharmaceuticals Classes: Antibiotics, Antineoplastics, Cardiovascular, and Sex Hormones. *Toxicology*, 203, 27-40.
- [2] Garrison, A. W., Pope, J. D., & Allen, F. R. (1976). Analysis of organic compounds in domestic wastewater. In *Analysis of Organic Pollutants in Water*, Keith, C. H., p. 517-566. Michigan, USA : Ann Arbor Science.
- [3] Samia, Mokh. (2013). Optimisation de techniques analytiques pour caractériser les antibiotiques dans les systèmes aquatiques. Autre. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, Français.
- [4] Luis Renato Pires, de Abreu., Rodrigo Agustin, Mas Ortiz., Silvana Calafatti, de Castro., José Pedrazzoli, Jr. (2003). Détermination HPLC de la biodisponibilité comparative de l'amoxicilline chez des volontaires sains après administration d'une dose unique. Unité intégrée de pharmacologie et de gastroentérologie – École de médecine de l'Université de São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo, Brésil.
- [5] Cabello, FC. (2006). Utilisation intensive d'antibiotiques prophylactiques en aquaculture : un problème croissant pour la santé humaine et animale et pour l'environnement. *Microbiologie environnementale*, 8, 1137–1144.
- [6] Cabello, FC. (2003). Antibiotiques et aquaculture : Une analyse de leur impact potentiel sur l'environnement, la santé humaine et animale au Chili. Fondation Terram. *Analisis de Politicas Publicas*, 17, pp. 1–16.
- [7] Cabello, FC. (2004). Antibiotiques et aquaculture au Chili : implications pour la santé humaine et animale. *Revista Medica Chilena* 132: 1001–1006.
- [8] Wibawa, JI., Fowkes, D., Shaw, Pennsylvanie., Barrett, DA. 2002. Dosage de l'amoxicilline dans les échantillons plasmatiques et gastriques par chromatographie liquide à haute performance avec détection fluorimétrique. *J Chromatogr B Analyt Tech nol Biomed Life Sci*, 774,141-8.
- [9] Yuan, Z., Russie, QG., Canafax, DM. 1995. Ttest sensible pour mesurer l'amoxicilline dans le plasma humain et le milieu liquide auriculaire utilisant l'extraction en phase solide et la phase inverse Chromatographie en phase liquide à haute performance. *J Chromatogr B*, 674 :93-9.
- [10] Krauwinkel, WJ., Volkens-Kamermans., NJ., van., Zijtveld, J. 1993. Détermination de l'amoxicilline chez l'homme, plasma par chromatographie liquide à haute performance et extraction en phase solide. *J Chromatogr*, 617 :334-8.
- [11] Maurer, HH. 1998. Chromatographie liquide-spectrométrie de masse en toxicologie médico-légale et clinique. *J Chromatographie B*, 713, pp, 3-25.
- [12] Oliveira, CH., Abib, E., Vannuchi, YB., Sucupira, M., Ilha, J., De Nucci, G. 2001. Biodisponibilité comparative de 4 formulations d'amoxicilline chez des volontaires humains sains après administration d'une dose unique. *Int J Clin Pharm Et Là*, v.39, p: 167-172.

- [13] **Tiwari, B., Sellamuthu, B., Ouarda, Y., Drogui, P., Tyagi, R. D., Buelna, G. (2017).** Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach *Bioresource Technology*, 224., pp, 1-12.
- [14] **Roig B., (2008).** KNAPPE: presentation and synthesis. Bruxelles, Commission Européenne, p,45.
- [15] **Académie nationale de pharmacie, (2008).** Médicaments et Environnement. Paris, Académie nationale de pharmacie, p,103.
- [16] **Monteiro, S., C. et Boxall, B. A. (2010).** Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, pp, 53-154
- [17] **Frank-Andreas Weber., Tim aus der Beek., Axel Bergmann., Silke Hickmann., Ina Ebert., Arne Hein., Anette Küster., Johanna Rose., Juliane Koch-Jugl., Hans-Christian Stolzenberg. (2014).** Les produits pharmaceutiques dans l'environnement – perspective à l'échelle mondiale.
- [18] **Togola, A. (2006).** Présence et devenir des substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux 1. France.
- [19] **Lardy-Fontan, S. (2008).** Les substances émergentes dans les écosystèmes aquatiques français : une application aux alkylphénol-polyéthoxylés et aux substances pharmaceutiques. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux 1, France.
- [20] **Lechat, P. (2006).** Pharmacologie. Université Pierre et Marie Curie.
- [21] **Capdeville, M.J. (2011).** Etudes des cycles biogéochimiques des contaminants organiques dits « émergents » dans les systèmes aquatiques. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux 1, France.
- [22] **Garric, J., Ferrari, B. (2005).** Les substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques. Niveaux d'exposition et effet biologique : que savons-nous ? *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science* 18. Pp, 307-330.
- [23] **Dinh, Q.T., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Eurin, J., Chevreuil, M., Labadie, P. (2011).** Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. *Talanta* 85. Pp, 1238-1245.
- [24] **Juma, S., Karaman, R. 2015.** Antibiotiques. Éditeurs Nova Science.
- [25] **Jean Paul, Larpent., Jean Jaques, Sanglier. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques, 2^{ème} Edition Masson.
- [26] **Y. Belaïssa. (2018).** Optimisation des paramètres physico-chimiques de dégradation d'un polluant pharmaceutique sous une illumination sur un oxyde semi-conducteur. Thèse doctorat, Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, Algérie.

[27] **Sahli, A. (1990).** Mécanismes moléculaires de la bactéricidie : chloramphenicol. In: Courvalin P, Drugeon H, Flandrois JP, Goldstein F, editors. Bactéricidie. Aspects théoriques et pratique. Paris : Maloine. P. 73-6.

[28] **Gasem MH., Keuter M., Dolmans WM., Van Der Ven-Jongekrijg J, Djokomoeljanto R, Van Der Meer JW. (2003).** Persistence of Salmonellae in blood and bone marrow. randomized controlled trial comparing ciprofloxacin and chloramphenicol treatments against enteric fever. *Antimicrob Agents Chemother*, 47. Pp.1727-31.

[29] **Adriaenssens, N., Bruyndonckx, R., Versporten, A., Hens, N., Monnet, DL., Molenberghs G. (2021).** Consumption of macrolides, lincosamides and streptogramins in the community, European Union/European Economic Area, 1997-2017. *J Antimicrob Chemother.*, 76 (12 Suppl 2). Pp. 30-36.

[30] **Yves, Le Normand., Henri Drugeon., Sarah, Abbas., Brigitte, Palestro. (2004).** Une modélisation informatique pour une meilleure compréhension de la relation PK/PD. Application à l'azithromycine dans le traitement de l'angine aiguë streptococcique et des exacerbations aiguës de la bronchite chronique », *Thérapies*, vol. 59, no 1., p. 155–162

[31] **Hansen MP., Scott AM., McCullough, A., Thorning, S., Aronson, JK., Beller, EM. 2019.** Adverse events in people taking macrolide antibiotics versus placebo for any indication. *Cochrane Database Syst Rev*.1: CD011825.

[32] **Cohen R., Angoulvant F., Biscardi S., Madhi F., Dubos F., Gillet Y. ((2017).** Antibiotic treatment of lower respiratory tract infections. *Arch Pediatr*. 24. Pp. 17-21

[33] **Ernest, Duchesne. (1897).** Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les micro-organismes : antagonisme entre les moisissures et les microbes.

[34] **Seifrtov, M. (2009).** An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters, *Analytica Chimica Acta* 649.Pp. 158–179

[35] **Mansour, D. (2015).** Minéralisation des antibiotiques par procédé électro-Fenton et par procédé combiné : Électro Fenton/Traitement biologique, application à la dépollution des effluents industriels. Thèse de doctorat, Université de Renne 1, France,

[36] **Bush, K., Greenwood, D., Norby, S.R., Whitley, R.J., Finch, R.G. (2003).** β -lactam antibiotics: Penicillin, and other β -lactam antibiotics. In: *Antibiotic and Chemotherapy, anti-infective agents and their use in therapy*. 8th ed. Philadelphia (USA): Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Science Limited. Pp. 224–278

[37] **Rao, R., Kaur, P.S., Nanda, S. (2011).** Amoxicillin: a broad-spectrum antibiotic. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 30–37

- [38] **Soussa, J.C. (2005).** Manual de antibióticos antibacterianos. Fernando Pessoa University, Oporto, Portugal. See, 219–221
- [39] **Pfizer. (2004).** Clavamox® for cats and dogs
- [40] **Schering-Plough. (2007).** Amoxi-Mast, lacting cow formula. Intramammary infusion. Union, NJ07083, USA.
- [41] **Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K.-I., MacNeil, J.D. (1995).** Chemical Analysis of Antibiotics Used in Agriculture. AOAC International. Pp. 452.
- [42] **Nelson, D.L., Cox, M.M. (2004).** Amino acids, peptides, and proteins Lehninger Principles of biochemistry 4th edition. Ch.3: pp. 75-115. New York, NY, États-Unis. W.H. Freeman and Company.
- [43] **Shargel, L., Wu-Pong, S., Yu, A.B.C. (2004).** Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics 5th edition. États-Unis, McGraw-Hill Medical
- [44] **Miller, E. L. (2002).** The penicillins: a review and update. Midwifery and Women's Health. 47: 426-434.
- [45] **Panizza, M., Dirany, A., Sirés,I., Haidar, M., Oturan, N., Oturan, M. A.(2014).** Complete mineralization of the antibiotic amoxicillin by electro Fenton with a BDD anode. Journal of Applied Electrochemistry, 44. Pp. 1327-1335
- [46] **Pomies, M. 2013.** Etude et modélisation dynamique de l'élimination de micropolluants prioritaires et émergents au sein du procédé à boues activées. Université de Montpellier 1.
- [47] **IWW. (2014)** Pharmaceuticals in the environment: Occurrence, effects, and options for action. Research project funded by the German Federal Environment Agency (UBA) within the Environmental Research Plan.
- [48] **Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., Wang, X. C. 2014.** A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. Science of The Total Environment. Pp. 473–474, 619-641.
- [49] **BARAN, W., ADAMEK, E., ZIEMIAŃSKA, J, SOBCZAK, A. 2011.** Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. J. Hazardous Mater. Pp. 196 1–15.
- [50] **O. C. Olatunde., A. T. Kuvarega., D. C. 2020.** Onwudiwe. Photo enhanced degradation of contaminants of emerging concern in waste water, Emerging Contaminants, vol. 6. Pp. 283–302.
- [51] **N, Zhou., Y, Liu., S, Cao., R, Guo., Y, Ma., J. 2020.** Chen. Biodegradation of bisphenol compounds in the surface water of Taihu lake and the effect of humic acids, Science of the Total Environment, vol. 723, Article ID 138164.

- [52] **N, Akhtar., M, Fiaz Khan., S, Tabassum., E, Zahran. (2021).** Adverse effects of atrazine on blood parameters, biochemical profile and genotoxicity of snow trout (*Schizothorax plagiostomus*), Saudi Journal of Biological Sciences, vol. 28, no. 3. Pp. 1999–2003.
- [53] **F. P, de Albuquerque., J. L, de Oliveira., V, Moschini-Carlos., L. F, Fraceto. (2020).** An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: perspectives for tailored solutions based on nanotechnology. *Science of the Total Environment*, vol. 700, Article ID 134868.
- [54] **P, Vanraes., G, Willems., A, Nikiforov. (2015).** Removal of atrazine in water by combination of activated carbon and dielectric barrier discharge, *Journal of Hazardous Materials*, vol. 299, pp. 647–655.
- [55] **A, Spaltro., M. N, Pila., D. D, Colasurdo. (2021).** Removal of paracetamol from aqueous solution by activated carbon and silica. Experimental and computational study. *Journal of Contaminant Hydrology*, vol. 236, Article ID 103739.
- [56] **Kummerer, K. (2001).** Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*, 45, 957-969.
- [57] **X, Gao., S, Kang., R, Xiong., M, Chen. (2020).** Environment friendly removal methods for endocrine disrupting chemicals, sustainability (Switzerland), vol. 12, p. 7615.
- [58] **Besse, J.P. (2010).** Impact environnemental des médicaments à usage humain sur le milieu récepteur : évaluation de l'exposition et des effets biologiques pour les écosystèmes d'eau douce. Thèse Université de Metz-Cemagref.
- [59] **Kemper, N. (2008).** Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indicators*. 8, 1-13.
- [60] **Gabet-Giraud, V. (2009).** Distribution d'estrogènes et de bêtabloquants dans les stations d'épuration des eaux résiduaires et dans l'eau de surface. Thèse Université Claude Bernard Lyon
- [61] **Larsson, D.G.J., (2014).** Pollution from drug manufacturing: review and perspectives. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369, 20130571. doi:10.1098/rstb.2013.0571
- [62] **Carter, L.J., Harris, E., Williams, M., Ryan, J.J., Kookana, R.S., Boxall ABA. (2014).** Fate and uptake of pharmaceuticals in soil plant systems. *J. Agr. Food Chem.* 62, 816-825
- [63] **Bártíková, H.; Podlipná, R., Skálová, L. (2016).** Veterinary Drugs in the Environment and Their Toxicity to Plants. *Chemosphere*. 144: 2290–2301.
- [64] **Poiger, T., Buser, H.-R., & Müller, M. D. (2001).** Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: Pathway, field measurements, and mathematical modeling. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(2), 256–263.

- [65] **Budzinski, H., Soulier, C., Esperanza, M., Miège, C., Coquery, M., Choubert, J.-M., Bruchet, A. (2009).** Concentrations et flux de micropolluants dans les eaux usées et les boues de stations d'épuration. Concentrations en entrée et sortie de station d'épuration.
- [66] **Escher, B. I., & Fenner, K. (2011).** Recent Advances in Environmental Risk Assessment of Transformation Products. *Environmental Science & Technology*, 45(9), 3835-3847.
- [67] **Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Zambello, E. (2012).** Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater, Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Science of The Total Environment*, 429, 123-155.
- [68] **Li, D et Shi, W. (2016).** Recent developments in visible-light photocatalytic degradation of antibiotics. *Chinese Journal of Catalysis*. 37(6). Pp.792-799.
- [69] **Kümmerer, K. (2009).** The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use—present knowledge and future challenges. *Journal of environmental management*. 90(8) : 2354-2366.
- [70] **Clara, M., Strenn, B et Kreuzinger. N. (2004).** Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: Investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration, *Water Research* 38, 947-954.
- [71] **Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., Fanelli, R. (2000).** Presence of therapeutic drugs in the environment, *Lancet* 355, 1789-1790.
- [72] **Larsson, D.G.J., C. de Pedro et N. Paxeus. (2007).** Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J. Hazardous Mater.*, 148, 751-755.
- [73] **Ternes, T.A., M.-L, Janex-habib., T, Knacker., N, Kreuzinger et H. Siegrist. (2004).** Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse. Rapport final POSEIDON (EVK1-CT-2000-00047).
- [74] **Mons, M.N., J.F.M. Versteegh., S.M, Schrap., P.G, Stoks et T.H.M., Noij. (2004).** Pharmaceuticals in drinking water and human health, Proc. SETAC Europe 14th Annual Meeting, Prague, République Tchèque, 294.
- [75] **Andreozzi, R., Raffaele, M., & Nicklas, P. (2003).** Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50(10), 1319-1330.
- [76] **Escher, B. I., Fenner, K. (2011).** Recent Advances in Environmental Risk Assessment of Transformation Products. *Environmental Science & Technology*, 45(9), 3835-3847.
- [77] **Li, D., Shi, W. (2016).** Recent developments in visible-light photocatalytic degradation of antibiotics. *Chinese Journal of Catalysis*. 37(6): 792-799.

[78] **Poirier-Larabie, S., Segura, P. A. (2016).** Degradation of the pharmaceutical diclofenac and sulfamethoxazole and their transformation products under controlled environmental conditions. *Science of The Total Environment*, 557-558, 257-267.

[79] **Calisto, V., Domingues, M. R. M., Esteves, V. I. (2011).** Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments – Kinetics and photodegradation products. *Water Research*, 45(18), 6097-6106.

[80] **Lam, M. W., Mabury, S. A. (2005).** Photodegradation of the pharmaceutical atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquatic Sciences*, 67(2), 177-188.

[81] **Hirte, K., Seiwert, B., Schüürmann, G., Reemtsma, T. (2016).** New hydrolysis products of the beta-lactam antibiotic amoxicillin, their pH-dependent formation and search in municipal wastewater. *Water Research*, 88. Pp. 880-888.

[82] **Noblet, J. A., Smith, L. A., Suffet, I. H. (1996).** Influence of Natural Dissolved Organic Matter, Temperature, and Mixing on the Abiotic Hydrolysis of Triazine and Organophosphate Pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), 3685-3693.

[83] **Zhang, H., Xie, H., Chen, J., Zhang, S. (2015).** Prediction of Hydrolysis Pathways and Kinetics for Antibiotics under Environmental pH Conditions: A Quantum Chemical Study on Cephadrine. *Environmental Science & Technology*, 49(3), 1552-1558.

[84] **Denys, S. (2004).** Biodégradation des solvants chlorés en conditions naturelles : Mécanismes et caractérisation. Synthèse bibliographique. Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. Ineris.

[85] **Fabbri, E., & Franzellitti, S. (2016).** Human pharmaceuticals in the marine environment. Focus on exposure and biological effects in animal species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4). Pp. 799-812.

[88] OMS. (2015). Antibiotic Resistance. Multi—Country Public Awareness Survey

[86] **Cabello, FC. (2006).** Utilisation intensive d'antibiotiques prophylactiques en aquaculture : un problème croissant pour la santé humaine et animale et pour l'environnement. *Microbiologie environnementale*, 8, 1137–1144.

[87] Santé publique France. Antibiorésistance. Site internet : Santé publique France. Saint Maurice (France) ; 2021 [consulté le 15 novembre 2021]

[88] **Andreozzi, R., Caprio, V., Ciniglia, C., De Champdoré, M., Lo Giudice, R., Marotta, R., Zucatto, E. (2004).** Antibiotiques dans l'environnement : Occurrence dans les STP italiennes, devenir et évaluation préliminaire de la toxicité algale de l'amoxicilline *Environmental Science and Technology*. 38. Pp. 6832– 6838.

- [89] **Fatta-Kassinou, D., Meric, S., Nikolau, A. (2011).** Résidus pharmaceutiques dans les déchets environnementaux et les eaux usées : état actuel des connaissances et recherches futures. *Chimie analytique et bioanalytique*, 399, 251–275.
- [90] **Gozlan, I., Rotstein, A., Avisa, D. (2010).** Enquête sur un produit de dégradation oxydative de l'amoxicilline formé dans des conditions environnementales contrôlées. *Chimie de l'environnement*. 7, 435–442.
- [91] **C, Roose-Amsaleg, AM, Laverman. (2016).** Les antibiotiques ont-ils un côté environnemental ? Impact des antibiotiques de synthèse sur les processus biogéochimiques, *Environ. Sci. Pollution. Rés. - Int.* 23 (5). Pp. 4000–4012.
- [92] **R, Oliveira., S, McDonough., JC, Ladewig., AM, Soares., AJ, Nogueira., I, Domingues. (2013).** Effets de l'oxytétracycline et de l'amoxicilline sur le développement et les activités biomarqueurs du poisson zèbre (*Danio rerio*), *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36 (3). 903–912.
- [93] **S, Park., K, Choi. (2008).** Évaluation des risques des antibiotiques agricoles couramment utilisés sur les écosystèmes aquatiques, *Ecotoxicologie*, 17 (6). Pp. 526–538.
- [94] **Y, Kim., K, Choi., J, Jung., S, Park., PG, Kim., J, Park. (2007).** Toxicité aquatique de l'acétaminophène, de la carbamazépine, de la cimétidine, du diltiazem et de six sulfamides majeurs, et leurs risques écologiques potentiels en Corée, *Environ. Int.* 33 (3). 370–375.
- [95] **Y, Wu., L, Wan., W, Zhang., H, Ding., W, Yang. (2020).** Résistance des cyanobactéries *Microcystis aeruginosa* à l'érythromycine avec exposition multiple, *Chemosphere* 249, 126147.
- [96] **RV, Busto., J, Roberts., C, Hunter., A, Escudero., K, Helwig., LHG, Coelho. (2020).** Études mécanistes et écotoxicologiques de l'élimination de l'amoxicilline par des systèmes de dégradation anaérobie, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 192, 110207.
- [97] **V, Singh., B, Pandey., S, Suthar. (2018).** Phytotoxicité de l'amoxicilline pour la lentille d'eau *Spirodela polyrrhiza*: croissance, stress oxydatif, traits biochimiques et dégradation des antibiotiques, *Chemosphere* 201. Pp. 492–502.
- [98] **Zorita, S., Boyd, B., JONSSON, S., Yilmaz, E., Svensson, C., Mathiasson, L., Bergstrom, S. (2008).** Selective determination of acidic pharmaceuticals in wastewater using molecularly imprinted solid-phase extraction. *Analytica chimica acta* 626147-154.
- [99] [103] **Elena, Martínez., Marinella, Farré., Damià Barceló.** Techniques de Détermination de composés organiques dans l'Environnement, Éditions techniques de l'ingénieur, 2–3 p.
- [100] **Agnieszka, Zgoła-Grześkowiak. (2011).** *Trends in Analytical Chemistry*, Dispersive liquid-liquid microextraction, volume 30, issue 9, P 1382-1399
- [101] **Miller, James M. (1988).** *Chromatography: concepts and contrasts*, Wiley Interscience Publication.

- [102] **Andrew Quigley, Wayne Cummins, and Damian Connolly. (2016).** Pharmaceutical and Molecular Biotechnology” Dispersive Liquid-Liquid Microextraction in the Analysis of Milk and Dairy Products, vol. 12, Article ID 4040165, p. 2.
- [103] **M. Roosta, M. Ghaedi, and A. Daneshfar. (2014).** Optimisation of ultrasound-assisted reverse micelles dispersive liquid-liquid micro-extraction by Box-Behnken design for determination of acetoin in butter followed by high performance liquid chromatography,” Food Chemistry, vol. 161, pp. 120–126.
- [104] **A, Zgola-Grze’skowiak., T, Grze’skowiak. (2011).** Dispersive liquid-liquid microextraction. Trends in Analytical Chemistry, vol. 30, no. 9, pp. 1382–1399.
- [105] **L. Humbert. (2010).** Chemistry-Annales de toxicologie analytique, Extraction en phase solide (SPE) : Théorie et application. 22(2): 61-68.
- [106] **F. Chapuis., V, Pichon., M.-C. (2005).** Hennion.Analyses de traces dans l’industrie pétrolière. Paris. Vol. 60. No. 6, pp. 899-912.
- [107] **Burgot, G., et JL. Burgot. (2011).** Méthodes instrumentales d’analyse chimique et applications : méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. Édition Tec. 3e édition vols. Paris.
- [108] **Rouessac, F., A. Rouessac., D, Cruché. (2004).** Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes : cours et exercices. 6e édition vols. Paris. Dunod.
- [109] **De Grave, Jean., Berthou, Francois., PROST, Michel. (1986).** Méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse, Masson,
- [110] **Ordre des chimistes du Quebec, (1988).** Notes de cours pour chromatographie liquide à haute performance (HPLC), édition 3.
- [111] **Synder, L. R., Kirkland, J.J. (1979).** Introduction to modern liquid chromatography, 2d, A.
- [112] **Aymen, Labidi. (2020).** Chromatographie Liquide à Haute Performance HPLC. V.18, p.1.
- [113] **Yanis, François. (2017).** Chromatographie en Phase Gazeuse CPG., Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Interactions et des Systèmes., Université de Strasbourg.
- [114] **Jean-Louis. CUQ.COURS : La chromatographie liquide. 2019.** https://www.academia.edu/33835757/CHROMATOGRAPHIE_LIQUIDE (accès le mai 24, 2019).

Résumé

Alors que des progrès ont été réalisés en termes de surveillance et de régulation de nombreux contaminants organiques dans le milieu aquatique, la présence et les risques associés à leurs produits de dégradation suscitent désormais beaucoup d'interrogations. Notamment, peu d'intérêt a été porté aux résidus de médicaments, bien que leur présence et leurs effets néfastes sur les organismes non-ciblés soient avérés. Ce travail apporte des éléments de réponse quant à la contamination du milieu aquatique par des produits de dégradation de médicaments (comme l'amoxicilline), ainsi qu'une première évaluation des risques environnementaux associés.

Ce travail a aussi démontré que des produits de dégradation de médicaments sont présents dans tous les compartiments du milieu aquatique étudié avec des concentrations et des distributions variables qui dépendent de la nature du compartiment, du cours d'eau où l'échantillonnage a été effectué ainsi que de la localisation du site d'échantillonnage par rapport à des zones de rejets.

Par ailleurs, on s'est intéressé au dosage de l'amoxicilline dans les eaux de rejets, en utilisant des méthodes d'extraction et de séparation telle que la DLLME et L'HPLC.

D'après les résultats obtenus par les méthodes utilisées, on pourrait dire qu'afin d'assurer des résultats concrets, il est nécessaire d'établir un protocole de validation des procédures analytiques adapté au produit étudié.

Abstract

With progress being made in terms of monitoring and regulation of many organic contaminants in the aquatic environment, the presence and risks associated with their degradation products are now raising many questions. Particularly, little interest has been paid to pharmaceutical residues, although their presence and harmful effects on non-target organisms have been proven. This work provides answers on the contamination of aquatic environment by pharmaceutical degradation products (amoxicillin), as well as a first assessment of the associated environmental risks.

This work has also shown that pharmaceutical degradation products are present in all the studied compartments of the aquatic environment, with variable concentrations and distributions which depend on the nature of the compartment, the watercourse where the sampling was carried out as well as the location of the sampling site in relation to discharge areas.

We were interested in the determination of amoxicillin in wastewater using extraction and separation methods such as dispersive liquid-liquid micro-extraction and high-performance liquid chromatography.

We concluded at the end that the method for the determination of amoxicillin in waste water by HPLC developed in this study proved to be invalid, because the results obtained proved to be inadequate, this is due to the absorbance of other compounds present in the wastewater analyzed.