



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du titre de
Docteur de l'université de Lorraine
Mention : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

Par Tiphanie Deblonde

Évaluation des risques sanitaires de la consommation d'eaux potentiellement chargées en résidus de médicaments anticancéreux

Soutenue publiquement le 10 décembre 2013 devant un jury composé de :

Président et rapporteur: M. Yves LEVI, Professeur, Université Paris Sud

Rapporteur : M. Philippe VANHEMS, Professeur, Université de Lyon

Directeur de thèse : Mme Carole COSSU-LEGUILLE, Maître de conférence, HDR,
Université de Lorraine

Co-directeur de thèse : M. Philippe HARTEMANN, Professeur, Université de Lorraine

« Rien est poison, tout est poison : seule la dose fait le poison »
Paracelse

« Attendre d'en savoir assez pour agir en toute lumière, c'est se condamner à l'inaction »
Jean Rostand Extrait de : Inquiétudes d'un biologiste

« En toute chose, il faut considérer la fin »
Jean de La Fontaine

Remerciements

Durant ces trois années de thèses, j'ai rencontré de nombreuses personnes qui m'ont aidé à mener à bien ce travail de recherche. Je tiens à remercier toutes celles qui y ont participé d'une manière ou d'une autre.

Je remercie,

Monsieur le Professeur Philippe Hartemann qui m'a accueilli au sein du Service d'Etudes et de Recherches en Environnement et Santé. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour ses conseils, sa disponibilité, son aide et son infinie patience, ainsi que pour la confiance qu'il m'a toujours accordée.

Madame Cossu-Leguille, Maître de conférence d'avoir suivi avec beaucoup d'intérêt mon travail, de son aide, ses conseils, ses encouragements et sa disponibilités aux moments les plus difficiles durant ces trois années de thèse.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Yves Levi de l'université Paris Sud et Monsieur le Professeur Philippe Vanhems, de l'université de Lyon, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble du personnel du laboratoire, Magali, Danièle, Philippe et Lisiane.

A ceux qui m'ont suivi tout au long de ce travail Arnaud, Marion, Nicolas, Lucile pour leur bonne humeur, leur soutien et leur humour, je vous en remercie.

Un remerciement pour Djihane avec qui j'ai partagé, dans cette aventure, le quotidien de thésards avec son lot d'émotions.

Un remerciement particulier pour Nathalie, sans ton amitié, ta bonne humeur et ton soutien ce travail n'aurait sans doute jamais abouti.

Merci à ma famille, Maman, Papa, Lorène, pour votre soutien sans faille et votre amour. Sans vous ce projet ne serait pas. Merci pour votre patience ; cette fois-ci promis, c'est fini !

Un grand merci à Michaël pour son amour, son soutien, sa patience et son optimisme.

Et à ceux qui ne sont plus là ...

Sommaire

<i>Sommaire</i>	4
Introduction	14
1. État des lieux de la présence des résidus de médicaments dans l'environnement aquatique et risque inhérent pour la santé	16
1.1. Définitions.....	16
1.2. Les sources de contamination.....	17
1.3. La pollution de l'environnement par les composés pharmaceutiques	19
1.3.1. Substances retrouvées dans les compartiments aquatiques et concentrations	21
1.3.2. Focus sur les concentrations dans les eaux usées et l'efficacité des stations d'épuration.....	23
1.3.3. Spécificités des effluents liquides hospitaliers.....	38
1.3.4. La contamination de la ressource.....	47
1.4. Les dangers et le risque pour la santé humaine	57
1.5. L'ampleur du problème en France et les réponses des pouvoirs publics	60
1.6. Synthèse de notre revue de la littérature	61
2. Méthode de hiérarchisation	64
2.1. Principes généraux	64
2.2. Évaluation de risque et méthodes de hiérarchisation déjà utilisées	64
2.3. Elaboration d'une méthode de hiérarchisation.....	76
2.3.1. Liste de molécules candidates.....	77
2.3.2. Matériels et méthodes pour la hiérarchisation.....	77
2.3.3 Résultats	87
2.3.4 Le cas particulier des anticancéreux.....	111
2.4. Synthèse concernant la hiérarchisation des molécules.....	114
3. Évaluation des risques pour les molécules anti-cancéreuses	116
3.1. Rappels sur l'évaluation quantitative des risques.....	116
3.1.1. Rappels méthodologiques	116
3.1.2. Problématique spécifique des anticancéreux	121
3.2. Identification du potentiel dangereux	122
3.3. Relation dose - réponse	123
3.3.1. Matériel et méthode de notre évaluation de la dose-réponse	123
3.3.2. Analyses statistiques	128
3.3.3. Résultats	129
3.3.4. Synthèse de notre recherche de relation dose-réponse.....	137
3.4. Évaluation de l'exposition aux anti-cancéreux.....	139
3.4.1. Sources d'exposition professionnelle pour l'Homme	139
3.4.2. Exposition environnementale	147
3.5. Calcul du risque	148
3.6. Synthèse de l'évaluation des risques	151
4. Discussion générale	153

4.1. État des lieux de la présence des résidus de médicaments dans l'environnement aquatique et risque inhérent pour la santé	153
4.2. Méthode de hiérarchisation	155
4.2.1. Etat des connaissances	155
4.2.2 Construction de notre méthodologie de hiérarchisation	156
4.2.3. Les résultats obtenus.....	160
4.3. Évaluation quantitative des risques.....	163
4.3.1. Test de viabilité cellulaire : test bleu de Trypan	164
4.3.2. Test de génotoxicité.....	164
4.3.3. Tests micronoyaux.....	165
4.3.4. L'exposition	165
4.3.5. Le calcul du risque	166
5. Conclusion et perspectives	168
Références bibliographiques.....	170
ANNEXES.....	178

Index des Tables

Tableau I-1. Résidus de médicaments (substances actives) présents dans les eaux de surface, les eaux souterraines et le milieu marin en France, toutes régions confondues.....	21
Tableau I-2 Extrapolation des doses cumulées vie entière en résidus de médicaments retrouvés après traitement en station d'épuration (d'après la campagne d'analyse de l'ANSES).....	59
Tableau II-1. Facteurs d'incertitude pour le calcul de la PNEC	79
Tableau II-2. Score de persistance basé sur le temps de persistance.....	80
Tableau II-3. Score de persistance basé sur la demi-vie.....	81
Tableau II-4. Score de bioaccumulation basé sur le log Kow.....	81
Tableau II-5. Score de bioaccumulation basé sur la solubilité.....	81
Tableau II-6. Score de bioaccumulation basé sur le BCF.....	82
Tableau II-7. Score de toxicité basé sur la DL50	82
Tableau II-8. Score de toxicité basé sur le QD.....	83
Tableau II-9. Pondération de chaque variable.....	83
Tableau II-10. Combinaison des scores.....	84
Tableau II-11. Répartition par classe thérapeutique des molécules candidates à la hiérarchisation.....	87
Tableau II-12. Résultats de la hiérarchisation.....	91
Tableau II - 13. Liste de molécules prioritaires.....	92
Tableau II-14. Résultats du classement par ordre de priorité de la hiérarchisation pour le centre hospitalier	93
Tableau II-15 Score de quantité calculé pour les molécules anticancéreuses délivrées par le CAV (2011)	112
Tableau II-16 Représentation de la répartition du nombre de molécule par indice de quantité ..	112
Tableau II-17 Score final hiérarchisant les 10 molécules ayant le plus haut score.....	113
Tableau III-1 résultats des tests micronoyaux (exposition 24h).....	132
Tableau III-2 : résultats des tests statistiques par toxique et temps d'exposition, présentation des valeurs de p (seuil de significativité fixé à 5%).....	136
Tableau III-3 Résultats des tests de corrélation sur les molécules et temps d'exposition considérés.....	137
Tableau III-4 Tableau présentant les effets néfastes observés chez les manipulateurs de cytotoxiques (source : CClin Sud Ouest juillet 2002)	141

Tableau III-5 Equipements de protections individuelles utilisés en unité centralisée (Cclin Sud Ouest juillet 2002).....	143
Tableau III-6 Equipements de protections individuelles nécessaires lors d'une reconstitution non centralisée, en unité de soins (Cclin Sud Ouest juillet 2002).....	144
Tableau III-7 Descriptifs des locaux en fonction du type d'équipements pour la reconstitution des cytotoxiques (source : Cclin Sud Ouest juillet 2002).....	145
Tableau III-8 Listes des points à prélever en fonction de la norme ISO 14644-1(Cclin Sud Ouest juillet 2002).....	146

Index des Figures

Figure 1-1 : Origines et voies de dissémination dans l'environnement des résidus de médicaments et des produits d'hygiène (Daughton, 2006 US EPA web site http://www.epa.gov/pibs/pdfs/CECRSM.pdf) dernière consultation 22/01/2013.....	18
Figure 1-2 : Répartition des données des produits pharmaceutiques dans les différents milieux aquatiques (source Coestier, 2009).....	20
Figure 1-3 : Principes de fonctionnement d'une station d'épuration (source : www.ademe.fr)..	24
Figure 1-4 Histogramme présentant les classes thérapeutiques analysées dans l'article avant et après STEPs (AAI : analgésiques et anti-inflammatoires ; Anticancéreux : antinéoplasique et cytostatique).....	35
Figure 1-5 Concentration en analgésiques et anti-inflammatoires dans les eaux usées avant et après STEPs	36
Figure 1-6 Concentration en antibiotiques dans les eaux usées avant et après STEPs	36
Figure 1-7 Concentration en métabolites dans les eaux usées avant et après STEPs	37
Figure 1-8 : Fonctionnement d'une station de potabilisation (source : Agence de l'eau Seine Normandie)	47
Figure 2-1. Schéma récapitulatif de la procédure EMEA 2006	66
Figure 2-2. Schéma récapitulatif de notre méthode de hiérarchisation	83
Figure 2-3. Molécules les plus consommées (en kg) par le CH entre janvier et octobre 2011 (les substances, excipients y compris sont présentées en abscisse)	85
Figure 2-4 Répartition des scores de persistance en fonction de la variable testée (temps de persistance ou demi-vie dans l'eau)	88
Figure 2-5 Répartition des scores de bioaccumulation en fonction de la variable testée (log KoW, solubilité dans l'eau, BCF).....	89
Figure 2-6 Répartition du score de toxicité pour les deux variables testées (quotient de danger QD et dose létale 50 DL50)	90
Figure 2-7 : données de consommation de molécules anticancéreuses au CAV de Vandoeuvre les Nancy (année 2011).....	111
Figure 3-1 : Différences entre les effets déterministes et les effets stochastiques. D'après http://www.uvp5.univ-paris5.fr/RADIO/Info/ciprfig1.asp	119
Figure 3-2 Cellules HepG2 (source Hepg2.com).....	123
Figure 3-3 Cellules HepG2 coloré au bleu de Trypan.....	126
Figure 3-4 Comète lue avec le logiciel Komet5.....	127
Figure 3-5 Histogramme présentant la mortalité cellulaire (+/- écart-type) pour différentes concentrations d'ifosphamide pour 2 temps d'exposition	129
Figure 3-6 Histogramme présentant la mortalité cellulaire (+/- écart-type) pour différentes concentrations de cyclophosphamide pour 2 temps d'exposition	130
Figure 3-7 Histogramme présentant la mortalité cellulaire (+/- écart-type) pour différentes concentrations de 5 Fluoro-uracile pour 2 temps d'exposition.....	130
Figure 3-8 Histogramme présentant la mortalité cellulaire (+/- écart-type) pour différentes concentrations d'un mélange de 3 anticancéreux pour 2 temps d'exposition	131

Figure 3-9 Histogramme présentant le pourcentage d'ADN dans la queue pour les tests comètes effectués sur des cellules HepG2 pour différentes concentrations de cyclophosphamide et deux temps d'exposition (24 et 72h).....	133
Figure 3-10 Histogramme présentant le pourcentage d'ADN dans la queue pour les tests comètes effectués sur des cellules HepG2 pour différentes concentrations d'ifosfamide et deux temps d'exposition (24 et 72h)	133
Figure 3-11 Histogramme présentant le pourcentage d'ADN dans la queue pour les tests comètes effectués sur des cellules HepG2 pour différentes concentrations de 5 fluorouracile et deux temps d'exposition (24 et 72h)	134
Figure 3-12 Histogramme présentant le pourcentage d'ADN dans la queue pour les tests comètes effectués sur des cellules HepG2 pour différentes concentrations d'un mélange des trois anticancéreux et deux temps d'exposition (24 et 72h)	135
Figure 3- 13 Schéma d'aide à la décision sur l'hypothèse de construction de VTR cancérogène (source : AFSSET, 2010)	149
Figure 3-14 Représentation graphique du pourcentage d'ADN dans la queue lors du test comète pour les cellules HepG2 exposées à 24h d'Ifosfamide.....	150

Liste des abréviations

AAI	Analgésiques et Anti-Inflammatoires
ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF	Assessment Factor, facteur d'extrapolation
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AFSSET	Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
AINS	Anti-inflammatoire Non Stéroïdien
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARN	Acide Ribonucléique
ATC	Anatomique, Thérapeuthique et Chimique
B[a]P	Benzo[a]pyrène
BCF	BioConcentration Factor, facteur de bioconcentration
BMD	BenchMark Dose
CAS	Chemical Abstracts Service
CAV	Centre Alexis Vautrin
CCLin	Centre de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales
CEE	Communauté Économique Européenne
CH	Centre Hospitalier
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CO ₂	Dioxyde de carbone
CIRC	Centre International de Recherche contre le Cancer
CNAM	Caisse Nationale d'Assurance Maladie
CSA	Conseil, Sondage et Analyse
DASRI	Déchets d'Activité de Soins à Risque Infectieux
DBO ₅	Demande Biologique en Oxygène en 5 jours
DCE	Directive Cadre sur l'Eau

DCO	Demande Chimique en Oxygène
DL50	Dose Létale médiane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EC50	Half maximal Effective Concentration, concentration efficace médiane
EDCH	Eau Destinée à la Consommation Humaine
EDTA	Acide éthylène diamine tetra acétique
EH	Equivalent Habitant
EMA	European Medicine Agency, agence européenne des médicaments
EPI	Equipe ment de Protection Individuelle
EQRS	Evaluation Quantitative des Risques Sanitaire
ERU	Excès de risqué unitaire
FDA	Food and drugs agency
FU	Fluoro-Uracile
Fexcrétée	Fraction excrétée sous forme inchangée dans les urines
HPLC-MS	Chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à une spectrométrie de masse
HPLC-MS-MS	Chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à deux spectrométries de masse en tandem
ICC	Indice de Contact Cytotoxique
ICL	Institut de Cancérologie Lorrain
INC	Institut National de la Consommation
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité
ISO	Organisation Internationale de Normalisation
K	Facteur de pondération pour le calcul de la concentration prédite
KNAPPE	Knowledge and Need Assessment on Pharmaceutical Products in Environmental Waters
L	Litre
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect level
Log Kow	Logarithme de base 10 de la constante de partage octanol/eau
MCO	Médecine, Chirurgie, Obstétrique
MEM	Milieu Essentiel Minimum
MNU	Médicaments Non Utilisés
MS	Marge de Sécurité
MTT	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazolium

NKT	Azote total réduit
NOEC	No Observed Effect Concentration, concentration sans effet observé
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
OCDE	Organisation de coopération et de développement économique
OMEDIT	Observatoire des médicaments, des dispositifs médicaux et des innovations thérapeutiques
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORL	Otho-Rhino-Laryngologie
PBS	Phosphate buffered saline
PBT	Persistence, Bioaccumulation, Toxicité
PEC	Predicted Environmental Concentration, concentration prédite dans l'environnement d'un composé dans l'eau
PNEC	Predictive Non Effect Concentration, concentration prédite sans effet d'un composé sur un organisme
PNRM	Plan National sur les Résidus Médicamenteux dans l'eau
PNSE	Plan National Santé Environnement
PPCPs	Pharmaceuticals and Personal Care Products
PSC	Poste de Sécurité Cytotoxique
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
Pt	Phosphore total
Q	Quantité consommée
QD	Quotient de Danger
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship, relation quantitative structure à activité
R	Rendement d'élimination moyen en station d'épuration
RCP	Résumé des caractéristiques des produits
REACH	Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals
SA	Substance Active
SGH	Système Général Harmonisé
STEP	Station d'épuration
TGD	Technical Guidance Document on Risk Assessment, document d'orientation technique pour l'évaluation de risques
TP	Temps de Persistence
UE	Union Européenne

URC	Unité de reconstitution Centralisée
US EPA	United States Environmental Protection Agency
UV	UltraViolet
VG	Valeur Guide
VTR	Valeur Toxicologique de Référence

Introduction

La France est le 4^{ème} consommateur mondial de médicaments (avec une moyenne de 48 boîtes par an et par habitant) après les Etats Unis, l'Allemagne et le Japon. Une fois administrées, ces molécules sont éliminées par voie naturelle, se retrouvent dans les eaux usées et peuvent alors être transportées jusqu'aux eaux destinées à la consommation humaine pour ensuite servir d'eau de boisson ou pour l'arrosage de denrées alimentaires.

La détection de résidus de médicaments dans les eaux est réalisée depuis les années 1980 et a d'abord été effectuée dans les pays anglo-saxons. La mise en lumière d'effets des résidus de médicaments sur la faune aquatique, tels que la féminisation des poissons par exemple, a encouragé les recherches et nous savons aujourd'hui qu'aucun milieu aquatique (eaux usées avant et après traitement, eaux souterraines, eaux de surface, voire eau destinée à la consommation humaine) ne peut être considéré comme indemne de contamination par ces molécules. Le niveau de contamination des eaux usées reste plus élevé que celui des eaux souterraines (respectivement 10 µg/L et 10 ng/L).

L'excrétion par le patient, mais aussi l'industrie pharmaceutique, les rejets par les établissements de soins et la mise à l'évier des médicaments non consommés sont les sources de cette pollution. L'ensemble de ces contaminants arrive généralement dans des stations d'épuration qui ne sont pas conçues pour éliminer ce type de polluants d'origine organique.

En France, le Plan National Santé et Environnement deuxième version (2004-2008) a contribué à l'intérêt pour cette problématique jusqu'alors limitée à quelques laboratoires pionniers et a initié la « *recherche de contamination des rejets urbains et des eaux superficielles par les médicaments* ».

Notre travail de thèse a pour objet de contribuer au progrès des connaissances sur l'impact éventuel des résidus de médicaments présents dans les milieux aquatiques sur la santé humaine et en particulier ceux présents dans les eaux destinées à la consommation humaine. Ceci implique une hiérarchisation de ces molécules en termes de danger et une priorisation de celles dont la toxicité ou l'écotoxicité serait la plus importante afin de pouvoir répondre aux questions du public et des gestionnaires de risque (par exemple en cas de réutilisation des eaux usées). Nous avons donc choisi de mener une démarche d'évaluation quantitative des risques sanitaires (EQRS). Les expositions analysées sont l'ingestion d'eau quotidienne et le contact cutané lors de la baignade.

Les différentes phases d'une EQRS relative à la gestion d'un risque chimique sont les suivantes :

1. identification des principes actifs auxquels la population est exposée,
2. évaluation du danger (risques pour la santé),
3. quantification et qualification de l'exposition,
4. hiérarchisation des risques,

Le plan de notre mémoire suivra donc ces étapes : dans un premier temps, nous allons présenter dans notre partie bibliographique un état des connaissances concernant les composés

pharmaceutiques retrouvés dans les compartiments aquatiques environnementaux et leurs concentrations dans les eaux usées et les eaux destinées à la consommation humaine. Puis nous nous intéresserons aux risques qu'ils présentent pour la santé humaine. Ainsi, cette partie posera les préalables à notre démarche d'EQRS. En second lieu, nous développerons la méthode construite et utilisée afin de hiérarchiser les résidus pharmaceutiques en termes de danger. Dans une troisième partie, nous exposerons les résultats de tests de génotoxicité réalisés en laboratoire sur les molécules anticancéreuses sélectionnées, tests qui nous ont permis d'améliorer notre hiérarchisation des risques en complétant notre état des connaissances quant aux risques pour la santé humaine. Enfin, nous discuterons l'ensemble de ce travail avant de conclure et de proposer des perspectives à donner à ce projet.

1. État des lieux de la présence des résidus de médicaments dans l'environnement aquatique et risque inhérent pour la santé

Les résidus de médicaments sont des polluants émergents dont les effets sur la santé humaine mais aussi la faune aquatique sont mal connus. Il est admis que tous les compartiments aquatiques sont contaminés par ce type de pollution, mais il semble nécessaire de savoir quelle en est l'importance.

1.1. Définitions

Micropolluants

Les micropolluants sont définis comme des substances (minérale, biologique, organique, radioactive,...) polluantes qui à des concentrations infimes (de l'ordre du micro voir du nanogramme par litre) dans un milieu donné, peuvent avoir une action toxique ou écotoxique avec des effets directs ou indirects sur la santé humaine et les écosystèmes. Ces substances sont retrouvées dans les différents compartiments de l'environnement (eau, air, sol), par émission directe ou indirecte (ruissellement, drainage, retombées atmosphériques).

Médicaments

Le Code de Santé Publique définit dans son article L5111-1 la notion de médicament comme *« toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'Homme ou chez l'animal, ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique »*.

Un médicament est composé de deux sortes de substances : une ou plusieurs substances actives (ou « principes actifs ») et un ou plusieurs excipients.

La substance active d'un médicament est le composant de ce médicament qui possède un effet thérapeutique. Cette substance est souvent en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients.

Les excipients sont des substances auxiliaires inertes, servant à la formulation galénique ou destinées à modifier l'absorption du principe actif par le corps.

Un médicament peut avoir une origine naturelle lorsque la substance active est extraite de végétaux, de minéraux ou d'organismes vivants, ou une origine synthétique lorsqu'elle est issue de l'industrie chimique ou pharmaceutique. Aujourd'hui les substances naturelles ne comptent plus que pour 5 % de la pharmacopée (d'après l'industrie du médicament).

Les médicaments sont des molécules fabriquées pour être biologiquement actives.

Lors de leur administration à l'Homme ou à l'animal, une partie n'est pas totalement utilisée par l'organisme. Ces sont ces « résidus de médicaments » qui seront excrétés sous forme inchangée ou métabolisée dans les selles et les urines, rejoignant ainsi les réseaux des eaux usées et l'environnement.

Résidus de médicaments

Les résidus de médicaments représentent les rejets de médicaments dans l'environnement. Le terme « résidus de médicaments » désigne la molécule mère ainsi que ses métabolites, qu'ils soient issus d'une dégradation biologique après passage dans les reins, le foie ou un autre organe, ou issus d'une transformation dans l'environnement par hydrolyse, photolyse, etc.

1.2. Les sources de contamination

Les résidus de médicaments retrouvés dans l'environnement proviennent de deux grands types de sources :

- ^ les sources diffuses, représentées par les excréta humains après collecte dans les réseaux d'assainissement et à la sortie des stations de traitement ; la quantité retrouvée dans les eaux dépend donc, pour cette voie d'entrée, de la consommation faite par la population. Celle-ci vieillissant et augmentant, les quantités consommées et ainsi rejetées ne font que croître.
- ^ les sources plus ponctuelles, résultant des pertes lors des procédés industriels de fabrication ou des rejets issus d'activités d'élevage, soit directement dans le milieu (activités piscicoles par exemple), soit par ruissellement, notamment après épandage sur les sols agricoles.

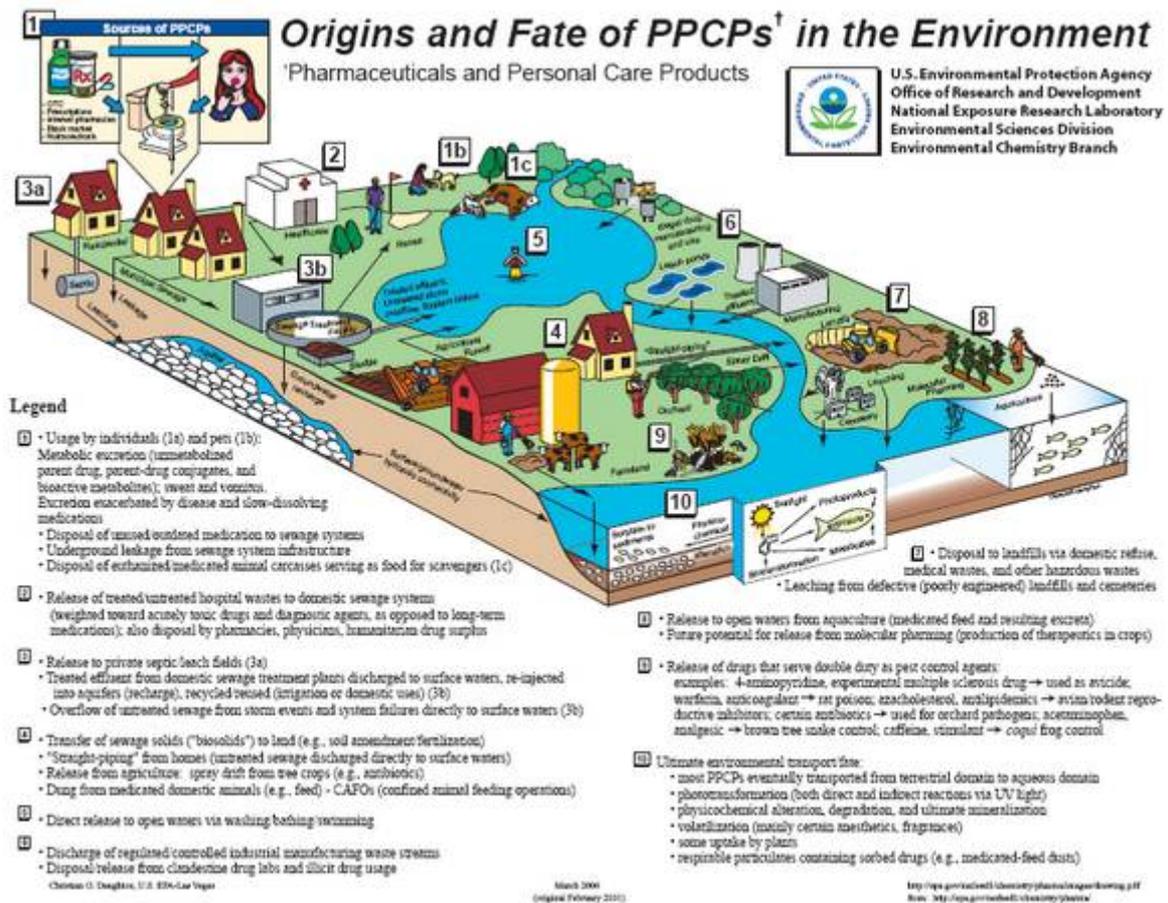


Figure 1-1 : Origines et voies de dissémination dans l'environnement des résidus de médicaments et des produits d'hygiène (Daughton, 2006 US EPA web site <http://www.epa.gov/pibs/pdfs/CECRSM.pdf>) dernière consultation 22/01/2013.

S'ajoutent à ces deux types de sources, les médicaments non utilisés (MNU) éliminés dans les ordures ménagères avec les déchets classiques ou directement dans les égouts par méconnaissance des filières de recyclage et dont la part est difficile à quantifier. D'après l'enquête de Bound et Voulvoulis réalisée en 2005 auprès de 400 foyers du sud-est de l'Angleterre, 12 % des ménages jetteraient leurs restes de traitements après utilisation et l'élimination se ferait pour 63 % dans les ordures ménagères, pour 22 % par retour en pharmacie et pour 11,5 % dans les égouts. En France, l'institut de sondage Conseil, Sondage et Analyse (CSA) estime à 23 300 tonnes la masse de MNU pour 2012 (Cyclamed, 2011).

Les rejets des établissements de soins constituent une source particulière de contamination car les eaux usées d'établissements de soins ont un profil spécifique ; elles contiennent principalement des anti-infectieux, des détergents-désinfectants, des produits de contraste iodés et des anticancéreux. Les effluents n'étant pas traités sur place dans la plupart des cas (sauf pour quelques établissements possédant leur propre système de traitement de leurs effluents), ces rejets se retrouvent dans les stations de traitement des eaux usées et le milieu aquatique.

De ce fait, les établissements de soins sont considérés comme des « points noirs » pour ce type de pollution diffuse en raison des quantités importantes de substances administrées et rejetées quotidiennement. Dans son rapport sur la vente de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France, l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS), actuellement Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), estime à 27,539 milliards d'euros le marché pharmaceutique en 2010 (AFSSAPS, 2011). Bien que la part des ventes aux hôpitaux corresponde seulement à 21,4 % des ventes de médicaments au niveau français, les substances utilisées sont souvent hautement actives (chimiothérapie, antibiothérapie, anesthésiques, etc.), prescrites en quantité plus importante et rejetées de façon plus concentrée que dans le réseau de la ville. En effet, les niveaux de concentrations de substances médicamenteuses dans les effluents hospitaliers sont de l'ordre de plusieurs centaines de microgrammes par litre, tandis qu'ils sont de l'ordre d'une dizaine de microgrammes par litre dans les effluents urbains (Mullot, 2009). Cette pollution spécifique s'ajoute donc à la pollution urbaine et doit être traitée par les STEP urbaines. Celles-ci n'étant pas conçues à l'origine pour gérer ces molécules, elles se retrouvent dans le milieu récepteur et potentiellement dans les eaux destinées à la consommation humaine.

1.3. La pollution de l'environnement par les composés pharmaceutiques

La première mise en évidence de résidus de médicaments dans l'environnement remonte à la fin des années 1970. Hignite et Azarnoff ont en effet mis en évidence pour la première fois en 1976 des traces d'acide salicylique (précurseur de l'aspirine) et d'acide clofibrique (métabolite actif du clofibrate, un hypolipémiant) dans les eaux d'une station d'épuration à Kansas City dans le Missouri, avec des concentrations respectives de 28,79 et 7,09 µg/L.

Par la suite, l'amélioration des méthodes d'analyse, et en particulier le développement de la chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse (HPLC-MS ou HPLC-MS-MS), a permis de détecter et de quantifier les résidus de médicaments à des niveaux de concentrations de plus en plus faibles, de l'ordre du nanogramme. Par ailleurs, cela a aussi permis de mieux caractériser les médicaments et leurs métabolites présents dans les eaux. Plusieurs auteurs ont ainsi pu faire le constat d'une contamination de l'environnement par l'ensemble des classes thérapeutiques. Coetsier en 2009 a réalisé une revue bibliographique qui avait pour objectif d'identifier les principales classes de médicaments présentes dans les environnements aquatiques de France. Il a confirmé que toutes les classes thérapeutiques sont retrouvées dans les eaux usées. Les quantités des molécules contaminantes sont différentes en fonction des quantités ingérées, du niveau de métabolisation de la molécule et du taux de dilution dans les eaux usées urbaines.

Une seconde analyse des revues scientifiques réalisée par Mullot (2009) a permis quant à elle de faire le constat d'une contamination de la majorité des compartiments aquatiques en rapport avec le cycle de l'eau. Plusieurs études viennent corroborer ces données et mettent en évidence la présence de résidus de médicaments dans :

- ▲ les eaux usées urbaines (Lindberg, 2005 ; Agüera, 2006) ;
- ▲ les affluents et effluents de STEPs (Miao, 2002 ; Andreozzi, 2003) ;
- ▲ les eaux de surface (Boyd, 2001 ; Ollers, 2001 ; Metcalfe, 2003 ; Wiegel, 2004) ;
- ▲ les eaux souterraines (Sacher, 2001 ; Daughton, 2004 ; Kreuzinger, 2004) ;
- ▲ les ressources alimentant les usines de potabilisation (Stackelberg, 2004) ;
- ▲ les eaux de boisson (Jux, 2002 ; Petrovic, 2003 ; Boyd, 2004) ;
- ▲ les bassins d'orage (Zuccato, 2000) ;
- ▲ les sédiments (Diaz-Cruz, 2003 ; Beausse, 2004 ; Burkhardt, 2005 ; Loffler, 2005) ;
- ▲ les lixiviats de décharge (Heberer, 2002) ;
- ▲ les estuaires (Thomas, 2004 ; Roberts, 2006) ;
- ▲ les fjords et eaux marines côtières (Weigel, 2004 ; Thomas, 2007).

Selon le programme KNAPPE (projet européen qui se proposait d'identifier les produits pharmaceutiques les plus pertinents en terme de concentrations dans les milieux aquatiques et d'identifier les actions prioritaires à mener), il a été recensé près de 58600 données jusqu'en septembre 2007 lors d'une revue de la littérature sur la présence de composés pharmaceutiques dans les milieux aquatiques. Ces données provenaient en grande partie de l'Allemagne (50%), du Canada (12%) et de la France (6%). Elles montraient que la majorité des mesures sont à rapporter aux effluents de STEPs et aux eaux superficielles (Sadezky, 2008 ; Schlüsener, 2008).

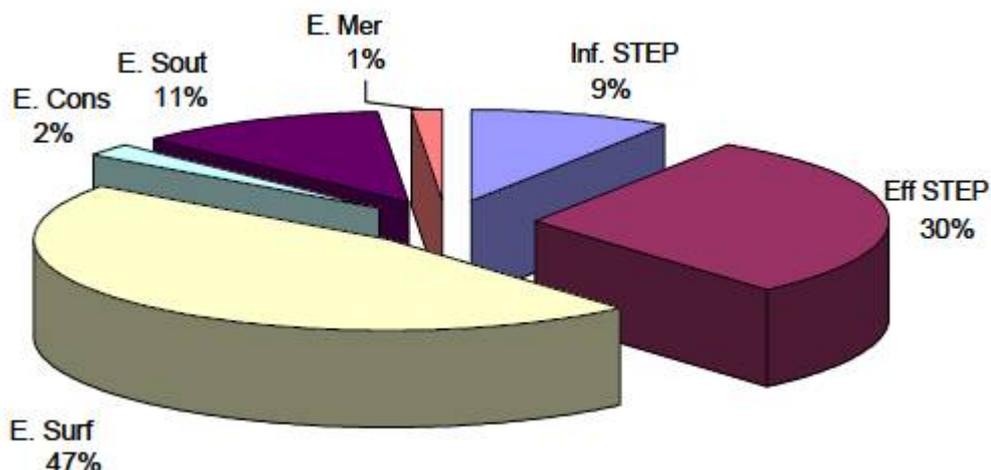


Figure 1-2 : Répartition des données des produits pharmaceutiques dans les différents milieux aquatiques (source Coestier, 2009)

A. Surf = eaux de surface ; E. cons = eaux destinées à la consommation humaine ; E. Sout = eaux souterraines ; E. Mer = eaux de mer ; Inf. STEP = affluents de STEPs ; Eff STEP = effluents de STEPs

1.3.1. Substances retrouvées dans les compartiments aquatiques et concentrations

Les concentrations retrouvées dans ces différents compartiments (des influents de STEPs aux EDCH) dépendent de nombreux paramètres tels que les propriétés physico-chimiques des substances, les quantités consommées, les quantités rejetées, le rendement des STEPs, la nature du milieu récepteur, etc. Elles varient du milligramme (urine de patients traités) au nanogramme (EDCH), les affluents de stations d'épuration contiennent une concentration d'environ 10 µg/L et ressortent avec une concentration dix fois inférieure. Les eaux de surface sont également dix fois plus chargées que les eaux souterraines dont les concentrations approcheraient les 10 ng/L. La concentration en résidus de médicaments en sortie d'établissement de soins serait d'environ 100µg/L.

De nombreux auteurs ont travaillé sur la contamination par des résidus de médicaments de l'environnement aquatique, et la liste des substances retrouvées ne cesse de s'enrichir au fur et à mesure des avancées thérapeutiques et analytiques. Pour construire un premier tableau des molécules retrouvées dans l'eau, nous nous sommes appuyés sur la revue de la littérature réalisée en 2009 par Coetsier.

Tableau I-1. Résidus de médicaments (substances actives) présents dans les eaux de surface, les eaux souterraines et le milieu marin en France, toutes régions confondues

<i>Anti-inflammatoires (AINS) et analgésiques</i>		
Anti-inflammatoires non stéroïdiens	Diclofénac Ibuprofène	Kétoprofène Naproxène
Analgésiques	Paracétamol	Acide acétylsalicylique
<i>Diurétiques</i>		
	Furosémide	
<i>β-bloquants</i>		
	Aténolol Céliprolol Métoprolol	Propranolol Sotalol
<i>Psychotropes</i>		
Antiépileptiques	Carbamazépine	
Tranquillisants	Alprazolam Bromazépan Diazépan	Lorazépan Oxazépan
Hypnotiques	Zolpidem	
Antidépresseurs	Amitryptiline	
Psychostimulants	Caféine	
<i>Antiasthmatiques et bronchodilatateurs</i>		
	Clembutérol	

Régulateurs lipidiques		
Fibrates	Acide clofibrrique Acide fénofibrrique Bézafibrate	Fénofibrate Gemfibrozil
Antibiotiques		
Tétracyclines	Oxytétracycline	
Pénicillines	Amoxicilline	Dicloxacilline
Sulfonamides et triméthoprime	Sulfaméthoxazole Triméthoprime	Sulfadimidine Sulfaméthazine
Macrolides	Azithromycine Clarithromycine Clindamycine Erythromycine	Roxithromycine Spiramycine Tylosine
Fluoroquinolones et autres quinolones	Ciprofloxacine Fluméquine	Norfloxacine Ofloxacine
Agents de contraste		
	Acide amidotrizoïque Acide ioxaglique Acide ioxithalamique Diatrizoate	Iohexol Iopamidol Iomeprol Iopromide

Les principales classes pharmacologiques détectées dans l'environnement sont les antibiotiques, les hypolipémiants, les analgésiques, les anti-inflammatoires, les antidépresseurs, les hormones et les anticancéreux. Leur présence dans l'environnement est principalement due à l'excrétion physiologique de ces substances par les patients traités (soit en ville soit en milieu hospitalier). En effet, l'excrétion sans aucun changement d'un médicament administré à l'Homme est estimée entre 50 et 90%, le reste étant éliminé par l'organisme sous forme de métabolites (Montague, 1998).

Ainsi, les eaux usées représentent sans doute possible le compartiment aquatique le plus contaminé de l'environnement, puisqu'il est le réceptacle de ces différentes molécules. Cet état est d'ailleurs confirmé par l'étude des concentrations retrouvées dans les différents compartiments. Ces concentrations dépendent de l'origine de l'eau (urbaine seule, urbaine et industrielle, ou hospitalière), des habitudes de consommation des patients et de prescriptions des praticiens, des saisons, etc. L'ibuprofène, anti-inflammatoire non stéroïdien largement utilisé est retrouvé à une concentration moyenne de 13,482µg/L dans les affluents des STEPs, et à 3,48µg/L en moyenne après traitement en STEP. Avant station de potabilisation, des concentrations moyennes de 19ng/L et des traces de cette molécule ont été retrouvées respectivement après station de potabilisation et dans le réseau de distribution.

Si les eaux usées recèlent les concentrations les plus élevées en résidus de médicaments (nous leur avons consacré un paragraphe spécifique dans notre travail : 1.3.2.), il apparaît que les eaux destinées à la consommation humaine peuvent ne pas être exemptes de contamination par ces résidus. D'ailleurs, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) dans un rapport de 2011 « Campagne nationale d'occurrence des résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine », montre après campagne de mesure, la présence de plusieurs résidus de médicaments dans les eaux brutes destinées à la consommation humaine, à des concentrations très faibles. Un paragraphe (1.3.4.) sera donc consacré aux concentrations des résidus de médicaments dans ces eaux.

1.3.2. Focus sur les concentrations dans les eaux usées et l'efficacité des stations d'épuration

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la contamination des eaux usées.

En effet, après avoir été traitées dans les stations d'épuration, ces eaux sont rejetées dans les eaux de surface. Les produits pharmaceutiques non dégradés ou non adsorbés sont alors déversés directement dans le milieu naturel. De plus, les boues d'épuration chargées en molécules non dégradées peuvent être valorisées dans l'agriculture comme fertilisant après homologation, avec la possibilité de retrouver ensuite les résidus de médicaments dans les eaux superficielles après infiltration dans les sols et lessivage. Ainsi, les résidus de médicaments peuvent contaminer les points de captage superficiels et souterrains des eaux destinées à la consommation humaine. Une bonne connaissance des rejets médicamenteux constitue à ce titre une étape essentielle de la maîtrise des risques pour la santé humaine liés à l'eau.

Après rejet dans les réseaux d'assainissement, les résidus de médicaments sont acheminés jusqu'aux stations de traitement et d'épuration des eaux usées (STEP) avec des effluents de toutes origines et de toute nature. Ces composés peuvent alors être dégradés ou adsorbés dans les boues.

Les différentes étapes de traitement des eaux usées dans les stations d'épuration sont décrites dans le schéma 1-3 ci-après.

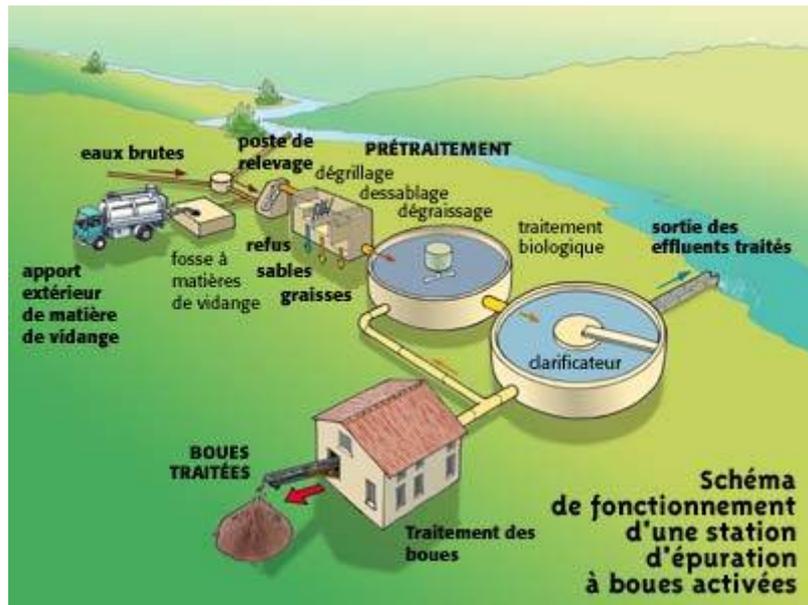


Figure 1-3 : Principes de fonctionnement d'une station d'épuration (source : www.ademe.fr)

Fonctionnement des stations de traitement des eaux usées

Les stations d'épuration (STEPs) sont installées entre le réseau de collecte et le milieu naturel ou milieu récepteur. Ces stations comportent différentes étapes successives qui vont permettre de traiter les eaux usées.

Les pré-traitements sont assurés dans toutes les STEPs, leur but est d'éliminer les éléments de grosses tailles (ex. : branches, feuilles, gros déchets, sables...) à travers différentes phases : dégrillage, dessablage, deshuilage/dégraissage.

Le dégrillage a pour objectif d'éliminer les gros déchets en faisant passer les eaux usées à travers des barreaux plus ou moins rapprochés. Cette étape peut être complétée par un tamisage.

Le dessablage et le deshuilage-dégraissage consistent ensuite à faire passer l'eau dans des bassins où la réduction de vitesse d'écoulement fait se déposer les sables et flotter les graisses. L'injection de microbulles d'air permet d'accélérer la flottation des graisses. Les sables sont récupérés par pompage alors que les graisses sont raclées en surface.

Les éléments grossiers et les sables de dimension supérieure à 200 microns sont enlevés de l'eau ainsi que 80 à 90 % des graisses et matières flottantes (soit 30 à 40 % des graisses totales).

Après pré-traitement, des traitements dits primaires sont mis en place (selon les auteurs, les étapes de pré-traitement peuvent faire partie des traitements primaires). Ils se déroulent dans des bassins de grande taille et sont nécessaires afin d'éliminer les matières en suspension et les polluants encore présents dans les eaux après les étapes de pré-traitement.

Ils consistent en traitements physico-chimiques permettant d'agglomérer les particules résiduelles par adjonction d'agents coagulants et floculants (sels de fer ou d'alumine, chaux...). Les amas de particules ainsi formés, ou "flocs", peuvent être séparés de l'eau par

décantation ou par flottation.

Les éléments éliminés sont appelés « boues primaires » et sont composés essentiellement de matières minérales en suspension. Ces boues sont ensuite éliminées dans le traitement des boues.

Puis des traitements secondaires ou traitements biologiques sont réalisés en bassin d'aération ou « réacteurs biologiques ». Ils sont nécessaires afin d'éliminer les matières organiques des eaux usées, et se font grâce à l'action de micro-organismes. A la fin de cette étape, les eaux sont transférées dans un bassin de décantation secondaire. Les boues formées dans ces bassins sont éliminées et partent elles aussi dans le circuit de traitement des boues.

Enfin, selon la qualité des eaux souhaitées, un traitement tertiaire nécessaire pour éliminer l'azote et le phosphore est pratiqué. Lorsque les eaux sont destinées à l'utilisation pour la baignade, un traitement quaternaire s'opère grâce à une désinfection par chloration ou ultraviolets.

Dans un dernier temps, les eaux épurées rejoignent le milieu récepteur.

Les boues issues des premières et deuxièmes décantations peuvent être envoyées en décharge publique ou incinérées. Elles sont parfois utilisées dans l'agriculture comme engrais, après une étape d'évaluation de l'absence d'effets écotoxiques majeurs et caractérisation physicochimique dans le cadre d'une procédure d'homologation.

Au cours de ces étapes de traitement, la dégradation des produits chimiques (médicaments par exemple) dépend de nombreux facteurs (structure chimique, pH, formation de ligands, présence de bactéries, photodégradation, etc.) et conduit soit à une minéralisation totale, soit à la formation de produits organiques de dégradation.

L'adsorption sur particules, et plus particulièrement sur les boues de STEP, est le mécanisme classique d'épuration des substances chimiques, mais il concerne essentiellement les molécules lipophiles comme les dérivés du platine (anticancéreux) et les fluoroquinolones (antibiotiques). Ces phénomènes d'adsorption conduisent à une baisse de la concentration dans la phase liquide. Le second mécanisme est la biodégradation des molécules, liée soit à la stabilité des molécules dans le temps (dégradation naturelle), soit à la présence de bactéries dans certains bassins des STEPs.

Cependant, les STEPs ne sont pas conçues pour traiter une pollution d'origine médicamenteuse. Ceci explique leur efficacité relative pour épurer les eaux usées de ces molécules organiques.

Dans certains cas, le traitement en STEP peut même augmenter les concentrations de principes actifs présents dans l'eau. Par exemple, Vieno *et al.* (2006) ont observé des concentrations supérieures dans les effluents par rapport aux affluents des stations d'épuration pour la carbamazépine (anti-épileptique). Cela peut s'expliquer par la présence de certaines bactéries dans la biomasse, capables de déconjugaison, et pouvant ainsi régénérer une molécule initialement éliminée sous forme conjuguée.

Malgré les progrès technologiques réalisés dans les procédés utilisés pour l'épuration de l'eau, les STEPs n'ont jamais été conçues pour traiter les contaminants organiques à l'état de traces. Ainsi, le devenir des médicaments peut être très variable : l'ibuprofène (anti-inflammatoire non stéroïdien) est éliminé à des taux de 60 à 96 % (Benz, 2005 ; Carballa, 2004) alors que le rendement pour l'acide clofibrique (hypolipémiant) ne serait que de 6 à 50 % (Stumpf, 1999).

Devant le constat de présence de résidus de médicaments dans les eaux usées, nous avons mené une étude qui avait pour objectif de faire un état des lieux de l'occurrence des polluants émergents avant et après STEP, et ainsi de déterminer les capacités d'épuration des stations. Elle a constitué la première phase de notre démarche d'EQRS.

Notre étude s'est concentrée sur certaines classes de polluants émergents qu'étaient les résidus de médicaments, les phtalates, le bisphénol A et certaines molécules utilisées en cosmétique afin de rechercher les différentes concentrations et les taux de rendement pour différents micropolluants.

Afin de mener à bien ce projet, une revue de la littérature a été entreprise ; une base de données a été construite à partir de 45 publications retenues (articles publiés entre 1997 et 2010 et concernant les molécules choisies). Cinquante sept molécules ont été étudiées.

La description de la base de données, ainsi que les résultats observés concernant l'occurrence des résidus de polluants émergents et leur élimination par les STEPs, se retrouve dans l'article présenté ci-après (Tiphany Deblonde, Carole Cossu-Leguille, Philippe Hartemann. Emerging pollutants in wastewater : a review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2011; 214 : 442-8).



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Hygiene and Environmental Health

journal homepage: www.elsevier.de/ijheh

Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature

Tiphanie Deblonde^{a,*}, Carole Cossu-Leguille^b, Philippe Hartemann^a

^a DESP – SERES (Département Environnement et Santé Publique – Service d'Etudes et de Recherche en Environnement et Santé), Inserm U954, Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandœuvre les Nancy, France

^b LIEBE (Laboratoires des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes), UMR 7146, rue du général Delestraint, Campus Bridoux, 57070 Metz, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2010

Received in revised form 13 July 2011

Accepted 9 August 2011

Keywords:

Emerging pollutants

Wastewater

Pharmaceutical compounds

Phthalates

Bisphenol A

ABSTRACT

For 20 years, many articles report the presence of new compounds, called "emerging compounds", in wastewater and aquatic environments. The US EPA (United States – Environmental Protection Agency) defines emerging pollutants as new chemicals without regulatory status and which impact on environment and human health are poorly understood.

The objective of this work was to identify data on emerging pollutants concentrations in wastewater, in influent and effluent from wastewater treatment plants (WWTPs) and to determine the performance of sewage disposal. We collected 44 publications in our database. We sought especially for data on phthalates, Bisphenol A and pharmaceuticals (including drugs for human health and disinfectants). We gathered concentration data and chose 50 pharmaceutical molecules, six phthalates and Bisphenol A. The concentrations measured in the influent ranged from 0.007 to 56.63 µg per liter and the removal rates ranges from 0% (contrast media) to 97% (psychostimulant). Caffeine is the molecule whose concentration in influent was highest among the molecules investigated (in means 56.63 µg per liter) with a removal rate around 97%, leading to a concentration in the effluent that did not exceed 1.77 µg per liter. The concentrations of ofloxacin were the lowest and varied between 0.007 and 2.275 µg per liter in the influent treatment plant and 0.007 and 0.816 µg per liter in the effluent. Among phthalates, DEHP is the most widely used, and quantified by the authors in wastewater, and the rate of removal of phthalates is greater than 90% for most of the studied compounds. The removal rate for antibiotics is about 50% and 71% for Bisphenol A. Analgesics, anti inflammatories and beta-blockers are the most resistant to treatment (30–40% of removal rate). Some pharmaceutical molecules for which we have not collected many data and which concentrations seem high as Tetracycline, Codeine and contrast products deserve further research.

© 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Every day, industries, agriculture and the general population are using water and releasing many compounds in wastewaters. Indeed, agriculture practices, industrial discharges and the human being play an important role on the issue of pollutants in wastewater. All these practices have generated various pollutants and altered the water cycle causing a global concern linked to their eventual impact on wild life and human health.

For 20 years, many articles have reported the presence of new compounds, called "emerging pollutants", in wastewater and aquatic environments (Pham and Proulx, 1997; Rosal et al., 2010; Vogelsang et al., 2006). Emerging pollutants are new products or chemicals without regulatory status and whose effects on environment and human health are unknown.

The EU water framework directive 2000/06/CE announced in Annex X a list of 33 priority substances or groups of substances which include metals, pesticides, phthalates, polycyclic aromatic hydrocarbons, and endocrine disruptors. These substances must be removed within an objective of quality and preservation of good ecological status of water by 2015. Authorities should pay particular attention to their industrial discharge into the water but they also have to ensure safety for the population. In addition, the REACH regulation, which aims to identify dangerous chemicals and less dangerous replacements, was established in 2007 in Europe. The application of this regulation requires the removal of three phthalates (DEHP, DBP and BBP) classified as carcinogenic, toxic for reproduction or persistent in the environment.

The presence of metals, bacteria, hydrocarbons or other ions like nitrates (NO₃⁻), ammonia (NH₄⁺) in water are described for several decades and their impact on human health and the environment are known; these contaminants are subject to regulation and control. But the occurrence and effects of phthalates, pharmaceuticals compounds, PAHs, PCBs, Bisphenol A is often not available.

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 34 80; fax: +33 3 83 68 34 89.
E-mail address: tiphanie.deblonde@medecine.uhp-nancy.fr (T. Deblonde).

They are originated from industry (phthalates, PCBs) or from the discharge in wastewaters (e.g. pharmaceuticals). The pharmaceutical molecules identified in the environment belong to several classes of human drugs as analgesics, antibiotics, beta-blockers, anticonvulsants, lipid-regulators, contrast agents, anti-cancer agents, hormones; disinfectants are also included (Halling-Sorensen et al., 1998; Garric and Ferrari, 2005). Wastewater treatments are necessary to eliminate potential toxic compounds but their efficiency are not yet clearly known, and wastewater treatment plants were not originally designed for elimination of xenobiotics.

The problem of emerging pollutants is the lack of knowledge of their impact in the middle or long-term effect on human health, the environment and aquatic environments.

As very few synthetic studies exist on the wastewaters composition of emerging pollutants and their removal during treatment in wastewater treatment plant (WWTP), the objective of this work was to identify and synthesize data on emerging pollutant concentrations in wastewater influent and effluent of WWTP and to determine the performance of sewage disposal for each molecule or groups of molecules. Are treatment plants more effective for certain molecules? Is there any removal rate for each group of substances? Are the emerging pollutants equally removed in the process of sewage treatment?

The data used for this study were published in the scientific literature. We sought especially data on phthalates, PCBs, PAHs, Bisphenol A and pharmaceuticals used for human health and also disinfectants and hormones.

Phthalates have been used for 50 years and 3 million tons are produced per year around the world. They are present in many consumer products, and commonly used as plasticizers in plastics (e.g. PVC) to make them flexible and improve the impact- and cold resistance. Cosmetics are the second field of application of phthalates, they are incorporated as fixative agents to increase the penetrating power of a product on the skin or to prevent cracking of nails. The most used is DEHP (di-2-ethylhexyl phthalate) especially for fragrances, food containers, blood bags, catheters or bibbers (Barnabé et al., 2008; Clara et al., 2010; Dargnat et al., 2009; Oehlmann et al., 2008).

Polychlorobiphenyls (PCBs) are a family of 209 chlorinated aromatic compounds. They are, according to their chlorine content, more or less viscous or resinous, insoluble in water, colorless or yellowish, with strong smelling aroma. They are part of bioaccumulative contaminants found in some fatty tissue in humans, including human milk (ICPS-WHO, 2003). They are produced all around the world and often discharged in the environment and stored in sediments because of their low solubility in water (Pham and Proulx, 1997; Sanchez-Avila et al., 2009).

For many years, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have been widely studied as they are found in all environmental media and have high toxicity (Blanchard et al., 2004). They were included in the list of priority pollutants of the United States Environmental Protection Agency (US EPA) in 1976. Pyrolytic PAHs come from the combustion of automotive fuel, residential combustion (coal, wood), industrial production (steel), energy production (power plants fueled by oil or coal) and incinerators.

Three million tons of Bisphenol A (BPA) are produced worldwide each year, and used as an antioxidant in plasticizers and PVCs, and as a polymerization inhibitor in PVC. This compound is often found in CDs, sunglasses, bottles, cans, and containers for food and water. Human contamination occurs mainly by ingestion and accumulation in the fatty tissues is well described (Oehlmann et al., 2008; Sanchez-Avila et al., 2009). BPA emissions to waters represent about 92% of total emissions (European Commission, 2003). In 2010, monitoring of BPA was not governed by French nor European regulation.

The pharmaceutical compounds are grouped into different classes: hormones, anti-inflammatory, anti-epileptic, statins, antidepressants, beta-blockers, antibiotics, products of contrasts, etc. (Miège et al., 2009). The uses for these molecules are domestic, veterinary and hospital. After administration, human drugs are excreted in large part as original or metabolized. Numerous studies have demonstrated the presence of human drugs in urban wastewater, sewage from hospitals and surface waters (Kim et al., 2007; Roberts and Thomas, 2006). They have also been detected in groundwater and even in some drinking water (Bendz et al., 2005; Ternes, 1998). They can also reach the soil due to the use of wastewater for irrigation (Ternes et al., 2007; Zuccato et al., 2000).

Description of the database

45 publications are listed in the database used for this study. These are derived from French and international journals. These articles were published between 1997 and 2010. 55 molecules were studied, and for these molecules 222 results describe concentrations found in the influent (raw wastewater) and 269 concentrations in the effluent (wastewater after treatment). Articles containing the data of both concentrations in influent and effluent of WWTP have been preferred to articles studying only one or the other. The method of analysis of samples was not included as selection criteria, because analytical techniques are more or less described, and protocols are rarely completely exposed. Studies with pilot projects have been rejected for this work.

The following informations were collected when they were available: characteristics of the WWTP (capacity, average throughput, and population equivalents number), physicochemical wastewater indicators of quality (chemical oxygen demand and concentration of suspended matter), nature of the influent (municipal, hospital, and industrial), sampling period (month, season, and year), values for detection limit and quantification. Only data obtained from average sampling on 24 h were included in the study. This is the type of sample where raw sewage and treated wastewater are the most representative. All studied WWTPs included primary, secondary (with activated sludge system) and sometimes a tertiary treatment.

The median and standard deviation were calculated for molecules with three or more concentrations found.

For calculating the removal efficacy of WWTP for a molecule, we used the data collected for concentrations in the influent and effluent for activated sludge processes. The treatments in the WWTP may include a primary sedimentation, treatment with nitrogen and/or phosphorus and in some cases tertiary treatment. To obtain quantitative results for the data mining only the concentrations and removal efficiencies on the WWTPs in the dissolved phase were included. There are only few data of pollutants concentrations sought in this study in the solid phase (particulate) water, so only the dissolved phase was retained.

Results

The raw data are presented in Table 1. This Table 1 does not contain results for PCBs and PAHs because these compounds are very often picked up by the activated sludge treatment, thus the studies dealing with these compounds focused only on their quantification in sludge. Thus, there are only few articles on these molecules in the effluent treatment plant and even less in the influent. The removal rate for each class of compounds is presented in Fig. 1. Removal rates are presented in ascending order. The lowest removal rate is reported for the class of antiepileptics and the highest for antidepressants (with over 90%). Standard deviations are indicated for each group of substances.

Table 1
Concentrations of emerging pollutants ($\mu\text{g/L}$) in influent and effluent of WWTP.

Pharmaceuticals compounds	Molecules	Influent				Effluent				Removal rate (%)			
		Means	RSD	Median	n	Means	RSD	Median	n	Max	Min	n	
Antibiotics	Clarithromycin	0.344	1.48	0.157	2	0.15	0.649	0.021	2	2.378	0.007	2	56.4
	Ciprofloxacin	0.62	0.94	0.098	13	0.234	0.426	0.227	13	1.09	0.038	13	62.3
	Doxycycline	0.65	0.242	0.067	10	0.420	0.237	0.2305	9	0.62	0.109	9	35.4
	Erythromycin	0.58	0.2025	0.346	3	0.297	0.055	0.0195	4	0.62	0.007	4	48.8
	Erythromycin-H ₂ O	2.025	0.06	0.0905	2	0.59	0.0985	0.0195	2	0.62	0.007	2	70.9
	Methonidazole	0.09	0.056	0.066	1	0.055	0.0885	0.0195	1	0.33	0.007	1	38.9
	Norfloxacin	0.115	0.884	0.156	12	0.0526	0.317	0.0485	10	0.33	0.007	10	54.3
	Ofloxacin	0.482	0.737	0.007	6	0.171	0.435	0.007	6	0.816	0.007	6	64.5
	Roxithromycin	0.78	0.248	0.0272	3	0.472	0.150	0.54	3	0.87	0.008	3	39.5
	Sulfamethoxazole	0.32	0.401	0.2905	10	0.264	0.789	0.243	11	0.62	0.07	11	17.5
Antiepileptics	Sulfapyridin	0.492	0.869	0.02	1	0.081	0.363	0.32	1	1.34	0.04	1	83.5
	Tetracyclin	48	0.401	0.0535	1	2.375	0.774	0.37	2	2.1	0.042	2	95.1
	Trimethoprim	0.43	0.869	0.25	15	0.424	0.027	0.32	17	1.34	0.04	17	1.4
	Carbamazepine	0.732	0.286	0.0819	6	0.774	0.789	0.37	13	2.1	0.042	13	-5.7
	4-aminocapryline	1.517	0.04	0.027	1	0.676	0.027	0.027	1	32.5	0.027	1	55.4
	Antipyrin	0.04	2.8605	0.027	2	1.93	0.027	0.027	2	32.5	0.027	2	32.5
	Codein	2.8605	1.283	0.232	6	0.679	0.701	0.55	11	2.448	0.04	11	34.6
	Diclofenac	1.039	25.639	3.495	10	3.480	1.489	0.56	17	12.6	0.03	17	74.2
	Ibuprofen	13.482	0.136	0.0143	2	0.166	0.118	0.19	3	0.27	0.037	3	-2.1
	Indomethacine	0.136	0.483	0.441	5	0.333	0.148	0.34	9	0.63	0.125	9	31.1
Analgesics and anti-inflammatories	Ketoprofen	0.407	8.251	0.206	7	0.934	0.873	0.452	1	2.62	0.017	1	44.0
	Naproxen	5.077	0.215	0.12	3	0.131	0.136	0.12	5	0.36	0.012	5	81.6
	Clofibrac acid	0.215	0.251	0.026	3	0.196	0.161	0.13	3	0.38	0.078	3	39.1
	Fenofibrac acid	0.079	2.320	1.4205	4	0.763	0.963	0.13	5	2.2	0.035	5	-148.1
	Bezafibrate	1.948	1.704	0.71	3	0.757	1.068	0.323	6	2.86	0.0112	6	60.8
	Gemfibrozil	1.562	0.946	0.996	1	0.140	0.381	0.345	1	1.025	0.16	1	51.5
	Acetabulol	0.335	0.44	0.02	4	0.468	0.28	0.16	4	1.025	0.16	4	58.2
	Atenolol	1.080	2.290	0.61	4	0.679	0.657	0.73	5	1.7	0.019	5	56.7
	Cellprolol	0.44	0.269	0.005	3	0.102	0.0712	0.093	5	0.18	0.03	5	36.4
	Metoprolol	1.535	0.198	0.086	2	0.79	0.0712	0.093	2	0.18	0.03	2	55.8
Diuretics	Propanolol	1.667	0.546	0.005	2	0.79	0.0712	0.093	5	0.18	0.03	5	48.5
	Sotalol	1.667	0.44	0.005	2	0.79	0.0712	0.093	2	0.18	0.03	2	52.6
	Furosemide	0.413	2.290	0.61	4	0.679	0.657	0.73	1	1.7	0.019	1	59.8
	Hydrochlorothiazide	2.514	0.198	0.086	3	0.102	0.0712	0.093	1	0.18	0.03	1	53.2
	Amidotricic acid	2.5	1.667	0.005	2	0.79	0.0712	0.093	1	0.18	0.03	1	0.2
	Diazotrate	3.3	0.44	0.005	2	0.79	0.0712	0.093	1	0.18	0.03	1	0.0
	Iotalamic acid	1.8	0.44	0.005	2	0.79	0.0712	0.093	1	0.18	0.03	1	0.0
	Iopromide	9.205	0.44	0.005	2	0.79	0.0712	0.093	1	0.18	0.03	1	-1.1
	Iomeprol	6.05	0.44	0.005	2	0.79	0.0712	0.093	3	3	0.411	3	78.1
	Iohexol	6.7	0.44	0.005	2	0.79	0.0712	0.093	2	7.35	0.03	2	73.5
Cosmetics	Iopam idol	2.3	5.01	2.031	3	1.019	0.243	1.08	2	1.225	0.751	2	59.6
	Galaxolide	4.281	0.878	0.079	2	0.21	0.243	1.08	3	1.225	0.751	3	17.4
	Tonalide	0.878	0.878	0.079	2	0.21	0.243	1.08	2	1.225	0.751	2	76.2

Table 1 (Continued)

Pharmaceuticals compounds	Molecules	Influent					Effluent					Removal rate (%)		
		Means	RSD	Median	Min	Max	n	Means	RSD	Median	Min	Max	n	
Psycho-stimulants	Caffeine	56.634	52.769	52.424	3.69	118	4	1.771	3.620	0.64	0.174	12	10	96.9
	Paraxanthin	26.722					1	0.836					1	96.9
	Triclozan	0.852	0.659	0.317	0.3	1.93	8	0.198	0.161	0.18	0.012	0.219	6	76.8
Antidepressants	Fluoxetin	5.85					1	0.112					2	98.1
	Molecules													
Plasticizers	DEP	19.64	19.64	14.8	0.19	50.7	5	0.68	1.11	0.02	0.0002	2.58	5	96.5
	D8P	12.44	17.59	5.27	0.15	46.8	6	0.52	1.04	0.34	0.00054	2.38	5	95.8
	BBP	9.17	16.1	3	0.01	37.87	5	0.7	1.36	0.076	0.00036	3.13	5	92.4
	DEHP	39.68	44.81	23.6	0.13	122	7	3.87	4.91	2.75	0.0016	14.2	8	90.2
	DMP	1.51	1.39	1.24	0.26	3.32	4	0.038	0.066	0.00019	0.000062	0.115	3	97.5
	DIBP	5.98	9.75	1.7	0.04	20.48	4	5.24	1.09	0.05	0.006	4.09	2	12.4
Phthalates	Bisphenol A	2.07	3.1	0.563	0.088	11.8	14	0.6	1.09	0.05	0.006	4.09	15	71.0

DEP = diethyl phthalate, DBP = dibutyl phthalate, BBP = benzyl butyl phthalate, DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate, DMP = dimethyl phthalate, DIBP = diisobutyl phthalate.

R: removal rate; n: number of concentrations recorded for influent or effluent.

RSD: relative standard deviation.

Ashton et al. (2004), Barmabé et al. (2008), Bendz et al. (2005), Blanchard et al. (2004), Boyd et al. (2003), Clara et al. (2005), Clara et al. (2005), Dagnat et al. (2009), Drewes et al. (2005), Fauser et al. (2003), Fernandez et al. (2007), Garcia-Ac et al. (2009), Gomez et al. (1999), Hua et al. (2003), Hirsch et al. (2007), Hirsch et al. (2007), Kang and Price (2009), Karthikeyan and Meyer (2006), Khan and Orgerth (2002), Kim et al. (2007), Lagana et al. (2004), Lin et al. (2005), Lindberg et al. (2005), Lishman et al. (2006), Liu et al. (2009), Loraine and Pettigrove (2006), Miao et al. (2004), Nakada et al. (2007), Nikolau et al. (2007), Oliver et al. (2005), Pham and Proulx (1997), Pohitou and Voutsas (2008), Roberts and Thomas (2006), Rosal et al. (2010), Roslev et al. (2007), Sanchez-Avila et al. (2009), Santos et al. (2007), Tan et al. (2007), Ternes et al. (2007), Ternes et al. (2007), Ternes (1998), Vethaak et al. (2005), Vieno et al. (2005), Vieno et al. (2007), Vogelsang et al. (2006), and Ying et al. (2009).

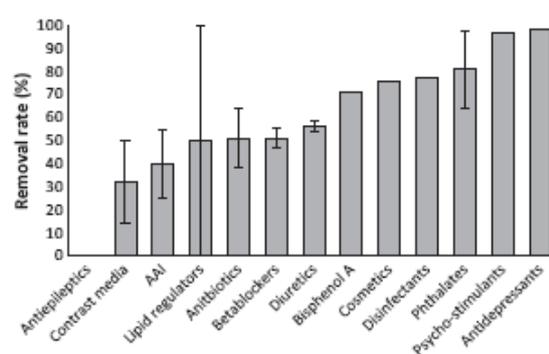


Fig. 1. Removal rate in percentage for each class of compounds calculated from the database, with relative standard deviation (AAI, analgesics and anti-inflammatories).

Phthalates

Among phthalates only six molecules are regularly analyzed. DEHP is the most widely used and its concentration in influent and effluent treatment plant is the highest. The rate of removal of phthalates is greater than 90% for most compounds studied. The DiBP has a much lower rate of removal but this is related with the data of occurrence of this compound which are scarce, four for the influent and two for effluents of WWTP.

Bisphenol A

The concentrations of Bisphenol A ranged from 0.088 to 11.8 μg per liter in WWTP influent and 0.006 to 4.09 μg per liter in the effluent. The removal efficiency is about 71%. Much data have been collected and the differences in concentration are important. According to this study, the largest differences for concentrations are in WWTP influents. When STEP receives effluent from a manufacturing industry recycled paper, epoxy resins, plastics chemical, BPA concentrations are much higher than for sewage treatment plants only receiving domestic sewage.

Pharmaceuticals compounds

Most articles found relevant concentrations of pharmaceutical compounds in wastewater. Data on concentrations in the treatment plant effluent are greater in number than those in the influent. Among all therapeutic classes, antibiotics, analgesics and anti-inflammatory drugs are the most studied.

Trimethoprim is the most studied molecule from the list of molecules included in the database, 15 times quantified in WWTP influent and 17 times in the effluent. This antibiotic is not very well removed by activated sludge in WWTP. If we consider the results expressed as mean, median, standard deviation, the removal rate is around 40–50%.

In general, beta-blockers are not widely studied or quantified. Depending on the particular molecule, concentrations varied between 0.02 and 4.9 μg per liter (Metoprolol) in the influent and 0.019 and 1.7 μg per liter in the effluent. The removal rate in WWTP is about 60%. Caffeine is the molecule which concentration in influent was highest (56.63 μg per liter) but the removal rate is about 97%; the concentration in the effluent does not exceed 1.77 μg per liter. Some compounds such as Carbamazepine and its metabolites or Iopromide are described in many studies and are sometimes used as indicators of the presence of their therapeutic class (the anti-epileptic drugs for Carbamazepine and contrast agents for Iopromide).

Discussion

The main objective of this study is to define the potential removal of wastewater treatment for certain group of emerging pollutants. For this work, a review of the scientific literature was made and a database was constructed.

Database construction

We have taken into consideration the most frequently studied and quantified molecules in wastewaters among the scientific literature. An exhaustive survey is impossible, due to the large number of molecules potentially present in wastewater. Some molecules are often found in studies (such as Carbamazepine, Ibuprofen, Diclofenac, and DEHP) and others are very rarely mentioned (like diuretics, contrast media, DIBP, etc.). In addition, metabolites and derivatives of molecules are not reliably identified. The search for molecules is also dependant on the available analytical methods, cost of analysis, and the region of the analyzed WWTP effluent (domestic, industrial or mixed).

One limitation of this study is data availability. Inclusion in the database was limited to articles available in the literature. Industrial groups operating the WWTP conduct regular analyses but these data are not often available; thus, such important and informative data could not be included in this database. However, this source of information could increase the knowledge about the chemical quality of sewage. In each country, agencies are responsible for monitoring and testing of the water quality. Priority pollutants as part of the UE Framework Directive are tested and other pollutants such as BPA are often analyzed for inclusion in the list in the future. Thus, there are currently no available systematic surveys of emerging pollutants concentrations around the world.

The operation of the database shows the inability to quantify certain molecules in water. Two assumptions can be made; the first is that analyses were not conducted on derivatives or metabolites of the molecules. The second assumption is that the desired molecules are present in too small quantities below the level that the available analytical techniques can determine a quantifiable concentration. In this case, the molecule or compound is detected but not quantified.

External parameters

In the literature review, several parameters studied by different authors appeared essential for understanding the variations of concentrations of emerging pollutants in wastewater before and after treatment plant, regardless of treatment performed in the WWTPs.

First of all, the concept of dilution is important to consider. Depending on the volume of wastewater entering in the sewage plant, the molecules are more or less diluted and their concentrations can vary. It is necessary to take into account the capacity of the sewage treatment plant in terms of volume and to quantify the water flow and the number of inhabitants connected to the sewerage network leading to the station (Karthikeyan and Meyer, 2006).

Some authors have also highlighted variation in concentrations due to seasonal changes. This is particularly the case for pharmaceutical compounds (Vieno et al., 2005). It appears that changes in temperature, precipitation rate and solar radiation influence the amount of molecules found in wastewater. Even if the mechanisms of elimination of pharmaceutical compounds are not exactly known, it is accepted that the steps of biodegradation and sorption are the major part of the elimination's process. These two steps depend on temperature. Photodegradation is an elimination process that will be less effective during wintertime when solar radiation is minimum. For many compounds, sorption increases

with decreasing temperatures while biodegradation is less effective when the temperature decreases (Loraine and Pettigrove, 2006; Vieno et al., 2005). However, the difference in elimination rate for Ibuprofen between the seasonal sampling periods was not drastically different.

The origin of the wastewater is a crucial parameter to consider when looking for pollutants in wastewater. Indeed, when this information was found in articles, we observed possible links between sources of wastewater and the concentrations of chemical pollutants. For example, when wastewaters from a hospital are collected in a sewer, this leads to an increase of concentration of certain drug residues such as contrast media or disinfectants (e.g. triclosan) in the influent of WWTP (Boyd et al., 2003; Lishman et al., 2006; Nakada et al., 2007). This is not the case for a treatment plant receiving wastewater from industrial or domestic origin. As a wastewater treatment plant is rarely intended for a single type of pollutant, it is important to know parts from domestic, hospital and industrial wastewaters. The wastewater composition is very dependent on the use of water upstream, concentration differences can be observed in two nearby sewage plants.

Classification by concentrations

The studied components can be classified differently depending on their frequency of citation in the literature by the concentrations recorded in wastewater, or the rate of their elimination in sewage treatment. The academic interest in recent decades for the presence of pharmaceutical residues in wastewater results in a large number of publications on this subject (Miège et al., 2009). On the other hand, articles concerning concentrations of PCBs are the rarest. The molecules studied are the most commonly prescribed antibiotics (Ciprofloxacin, Doxycyclin, Norfloxacin, Trimethoprim and Sulfamethoxazole) and analgesics and anti-inflammatory drugs (Diclofenac, Ibuprofen, and Naproxen) (Miège et al., 2009), the number of studies decreasing for the phthalates with DEHP and BBP and finally Bisphenol A. Molecules least cited in the literature are contrast agents, beta-blockers, lipid regulators and finally diuretics (Miège et al., 2009).

Tetracycline, Ibuprofen, contrast products, Caffeine, Codeine and DEHP were found in effluents from sewage treatment plants with concentrations of about 2 µg per liter (Dargnat et al., 2009). The Metronidazole, Norfloxacin and DMP (Clara et al., 2010) are found at concentrations below 0.05 µg per liter in the effluent.

Classification by removal efficiency in the WWTP

In Fig. 1, the removal efficiencies were calculated from the average concentration between the effluent and influent. However, for some molecules, negative results were obtained when calculating a removal efficiency. The few data for molecules with low concentrations like Fenofibric acid, Indomethacin and lotalamic acid (contrast product) may explain the negative results. All studied WWTPs included primary, secondary (with activated sludge system) and sometimes a tertiary treatment.

The components which are the most effectively eliminated in a WWTP including an activated sludge systems are phthalates with a removal efficiency above 90% (Bendz et al., 2005) and psychostimulants with about 97% removal (Ternes et al., 2007; Ying et al., 2009). Bisphenol A is eliminated at about 70% (Gomez et al., 2007).

The molecules of the therapeutic classes like analgesic, anti-inflammatory and beta-blockers are the least effectively removed (30–40%) (Miège et al., 2009). This result is in accordance with the last data obtained during a national survey performed in France in 2009–2010 (Médiflux) but still not yet published. These data are related only to the dissolved phase of wastewater treatment plant. The solid effluent of WWTP should not be neglected for hydropho-

bic substances such as beta-blockers, for example (Clara et al., 2005; Garcí-Ac et al., 2009; Lin et al., 2005). Pharmaceutical compounds present in wastewater can be biologically degraded in the WWTP and end up in surface water or be picked up by the sludge. Sludge could be used as fertilizers in agriculture, these substances can move into the soil and reach groundwater. Molecules which low removal rates are likely to be found in the different environmental media and may affect ecosystems (Ashton et al., 2004; Hirsch et al., 1999; Nikolaou et al., 2007).

Several proposals can be made to avoid adverse effects on ecosystems; the first one is to increase the efficiency of sewage treatment with other treatments specific to the chemical and emerging micro pollutants. The second one would be to install specific treatments upstream WWTP targeted for specific elimination of the pollutants discharged by an industrial plant or a hospital.

Conclusion

The aim of this work was to identify data on emerging pollutant concentrations in wastewater influent and effluent at WWTP and to determine the performance of sewage disposal. We sought data on phthalates, PCBs, PAHs, Bisphenol A and pharmaceuticals used for human health as well as disinfectants and hormones. A database has been built allowing to determine the most frequently searched and quantified emerging pollutants in the wastewater. We gathered concentration data and elimination performance (or process) of some 50 pharmaceutical molecules, six phthalates and Bisphenol A. DEHP is the most widely used, and quantified by the authors in the wastewater, and the rate of removal of phthalates is greater than 90% for most of the studied compounds. The removal rate for antibiotics is about 50% and 71% for Bisphenol A. Analgesics, anti-inflammatories and beta-blockers are the most resistant to treatment (30–40% of removal rate). Some pharmaceutical molecules for which we have not collected much data and which concentrations seem high such as Tetracycline, Codeine and contrast products deserve further research.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the financial support from the French Direction Générale de la Compétitivité, de l'Industrie et des Services (project n° 092906646). The authors wish to warmly thank Pr. Paul Hunter for the English language correction.

References

Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K.V., 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* 333, 167–184.

Barnabé, S., Beauchesne, I., Cooper, D.G., Nicell, J.A., 2008. Plasticizers and their degradation products in the process streams of a large urban physicochemical sewage treatment plant. *Water Res.* 42, 153–162.

Bendz, D., Paxeus, N.A., Ginn, T.R., Loge, F.J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.* 122, 195–204.

Blanchard, M., Teil, M.J., Ollivon, D., Legenti, L., Chevreuil, M., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in wastewaters and sewage sludges from the Paris area (France). *Environ. Res.* 95, 184–197.

Boyd, G.R., Reemtsma, H., Grimm, D.A., Mitra, S., 2003. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.* 311, 135–149.

Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O., Kroiss, H., 2005. The solids retention time – a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Res.* 39, 97–106.

Clara, M., Windhofer, G., Hartl, W., Braun, K., Simon, M., Gans, O., Scheffknecht, C., Chovanec, A., 2010. Occurrence of phthalates in surface runoff, untreated and treated wastewater and fate during wastewater treatment. *Chemosphere* 78, 1078–1084.

Commission Européenne, 2003. European Risk Assessment Report, Bisphenol A, EUR20843EN.

Dargnat, C., Teil, M.J., Chevreuil, M., Blanchard, M., 2009. Phthalate removal throughout wastewater treatment plant Case study of Mame aval station (France). *Sci. Total Environ.* 407, 1235–1244.

Drewes, J.E., Hemming, J., Ladenburger, S.J., Schaauer, J., Sonzogni, W., 2005. An assessment of endocrine disrupting activity changes during wastewater treatment through the use of bioassays and chemical measurements. *Water Environ. Res.* 77, 12–23.

Fausser, P., Vikelsøe, J., Sorensen, P.B., Carlsen, L., 2003. Phthalates, nonylphenols and LAS in an alternately operated wastewater treatment plant. Fate modeling based on measured concentrations in wastewater and sludge. *Water Res.* 37, 1288–1295.

Fernandez, M.P., Ikonou, M.G., Buchanan, I., 2007. An assessment of estrogenic organic contaminant in Canadian wastewaters. *Sci. Total Environ.* 373, 250–269.

Garcí-Ac, A., Segura, P.A., Gagnon, C., Sauvè, S., 2009. Determination of bezafibrate, methotrexate, cyclophosphamide, orlistat and enalapril in waste and surface waters using on-line solid-phase extraction liquid chromatography coupled to polarity-switching electrospray tandem mass spectrometry. *J. Environ. Monit.* 11, 830–838.

Garric, J., Ferrari, B., 2005. Les substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques. Niveaux d'exposition et effets biologique: que savons-nous? *Revue des Sciences de l'eau* 18, 307–330.

Gomez, M.J., Martinez Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernandez-Alba, A.R., Agüera, A., 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 993–1002.

Halling-Sorensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Lutzhoft, H.C.H., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* 36, 357–394.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 225, 109–118.

Hua, J., An, P., Winter, J., Gallert, C., 2003. Elimination of COD, microorganisms and pharmaceuticals from sewage by trickling through sandy soil below leaking sewers. *Water Res.* 37, 4395–4404.

ICPS-WHO, 2003. Polychlorinated biphenyl: Human health aspects. Concise international chemical assessment. Document 55.

Kang, J., Price, W.E., 2009. Occurrence of phytoestrogens on municipal wastewater and surface waters. *J. Environ. Monit.* 11, 1477–1483.

Karthikeyan, K.G., Meyer, M.T., 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Sci. Total Environ.* 361, 196–207.

Khan, S.J., Ongert, J.E., 2002. Estimation of pharmaceutical residues in primary and secondary sewage sludge based on quantities of use and fugacity modeling. *Water Sci. Technol.* 46, 105–113.

Kim, S.D., Cho, J., Kim, I.S., Vanderford, B.J., Snyder, S.A., 2007. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking and waste waters. *Water Res.* 41, 1013–1021.

Lagana, A., Bacaloni, A., Leva, I.D., Faberi, A., Fago, G., Marino, A., 2004. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal. Chim. Acta* 501, 79–88.

Lin, W.C., Chen, H.C., Ding, W.H., 2005. Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1065 (2), 279–285.

Lindberg, R.H., Wennberg, P., Johansson, M.J., Tysklind, M., Andersson, B.A.V., 2005. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environ. Sci. Technol.* 39 (10), 3421–3429.

Lishman, L., Smyth, S.A., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Servos, M., Beland, M., Seto, P., 2006. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.* 367, 544–558.

Liu, Z.-H., Kanjo, Y., Mizutani, S., 2009. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment – physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. *Sci. Total Environ.* 407, 731–748.

Loraine, G.A., Pettigrove, M.E., 2006. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in Southern California. *Environ. Sci. Technol.* 40, 687–695.

Miao, X.S., Bishay, F., Chen, M., Metcalfe, C.D., 2004. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3533–3541.

Miège, C., Choubert, J.-M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., Coquery, M., 2009. Le devenir des résidus pharmaceutiques dans les stations d'épuration d'eaux usées. Une synthèse de la littérature. *Technique Science et Méthode* 11, 75–94.

Nakada, N., Shinohara, H., Murata, A., Kiri, K., Managaki, S., Sato, N., Takada, H., 2007. Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Res.* 41, 4373–4382.

Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D., 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1225–1234.

Oehlmann, J., Oetken, M., Schulte-Oehlmann, U., 2008. A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption. *Environ. Res.* 108, 140–149.

Oliver, R., May, E., Williams, J., 2005. The occurrence and removal of phthalates in a trickle filter STW. *Water Res.* 39, 4436–4444.

Pham, T.T., Proulx, S., 1997. PCBs and PAHs in the montreal urban community (Quebec, Canada) wastewater treatment plant and in the effluent plume in the St Lawrence river. *Water Res.* 31 (8), 1887–1896.

- Pothitou, P., Voutsas, D., 2008. Endocrine disrupting compounds in municipal and industrial wastewater treatment plants in Northern Greece. *Chemosphere* 73, 1716–1723.
- Roberts, P.H., Thomas, K.V., 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci. Total. Environ.* 356, 143–153.
- Rosal, R., Rodriguez, A., Perdigon-Melon, J.A., Petre, A., Garcia-Calvo, E., Gomez, M.J., Aguera, A., Fernandez-Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* 44, 578–588.
- Roslev, P., Vorkamp, K., Aarup, J., Frederiksen, K., Nielsen, P.H., 2007. Degradation of phthalate esters in an activated sludge wastewater treatment plant. *Water Res.* 41, 969–976.
- Sanchez-Avila, J., Bonet, J., Velasco, G., Lacorte, S., 2009. Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PAHs in an industrial sewage grid discharging to a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Sci. Total. Environ.* 407, 4157–4167.
- Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2007. Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environ. Int.* 33, 596–601.
- Tan, B.L.L., Hawker, D.W., Müller, J.F., Leusch, F.D.L., Tremblay, L.A., Capman, H.F., 2007. Modelling of the fate of selected endocrine disruptors in a municipal wastewater treatment plant in South East Queensland, Australia. *Chemosphere* 69, 644–654.
- Ternes, T., Bonerz, M., Herrmann, N., Teiser, B., Andersen, H.R., 2007. Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: an option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemosphere* 66, 894–904.
- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32 (11), 3245–3260.
- Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B., Gerritsen, A., 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of the Netherlands. *Chemosphere* 59, 511–524.
- Vieno, N.M., Tuhkanen, T., Kronberg, L., 2005. Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from sewage treatment plant and in the recipient water. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8220–8226.
- Vieno, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L., 2007. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Res.* 41, 1001–1012.
- Vogelsang, C., Grung, M., Jantsch, T.G., Tollefsen, K.E., Liltved, H., 2006. Occurrence and removal of selected organic micropollutants at mechanical, chemical and advanced wastewater treatment plants in Norway. *Water Res.* 40, 3559–3570.
- Ying, G.G., Kookana, R.S., Koplun, D.W., 2009. Occurrence and removal of pharmaceutically active compounds in sewage treatment plants with different technologies. *J. Environ. Monit.* 11, 1498–1505.
- Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., Fanelli, R., 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 355, 1789–1790.

Les résidus de médicaments sont rejetés en continu dans les eaux usées par l'utilisation domestique, les rejets de l'industrie pharmaceutique, l'agriculture et les établissements de santé.

Dans un premier temps, l'article traite de l'occurrence des différentes concentrations en polluants émergents. Certaines molécules sont plus étudiées par la communauté scientifique ; le nombre de publications les concernant est donc plus important, comme pour :

- les antibiotiques,
- les anti-épileptiques,
- les analgésiques et les anti-inflammatoires.

Paradoxalement, les molécules les plus étudiées ne sont pas toujours celles dont les concentrations sont les plus importantes dans les effluents. Elles semblent surtout correspondre aux médicaments prescrits le plus fréquemment en médecine humaine.

Néanmoins, notre revue nous a permis de montrer que dans les eaux usées les concentrations les plus importantes en principes actifs dans les eaux usées sont identifiées pour les tétracyclines, l'ibuprofène et les psychostimulants. Au regard des quantités entrantes, il n'est pas étonnant de retrouver ces trois médicaments parmi les molécules dont les concentrations sont les plus importantes en sortie de STEP. Toutefois, nous avons pu montrer que l'hydrochlorothiazide (un diurétique) et les produits de contraste font également partie des molécules retrouvées en forte concentration, et ce malgré les quantités entrantes relativement faibles.

Dans un premier temps, les molécules anticancéreuses ont volontairement été écartées de nos recherches car, même si leur utilisation tend à se développer de plus en plus, la littérature concernant ces molécules est pour l'instant très faible. La prise de conscience du potentiel risque lié à ces molécules est encore récente. Cette classe médicamenteuse fera l'objet d'une analyse plus détaillée dans la partie relative aux effluents hospitaliers.

Un focus sur les résidus de médicaments présents dans les eaux usées a été réalisé, les concentrations de ces molécules avant et après STEPs ont été recherchées et étudiées. Les rendements d'épuration sont présentés dans la figure suivante.

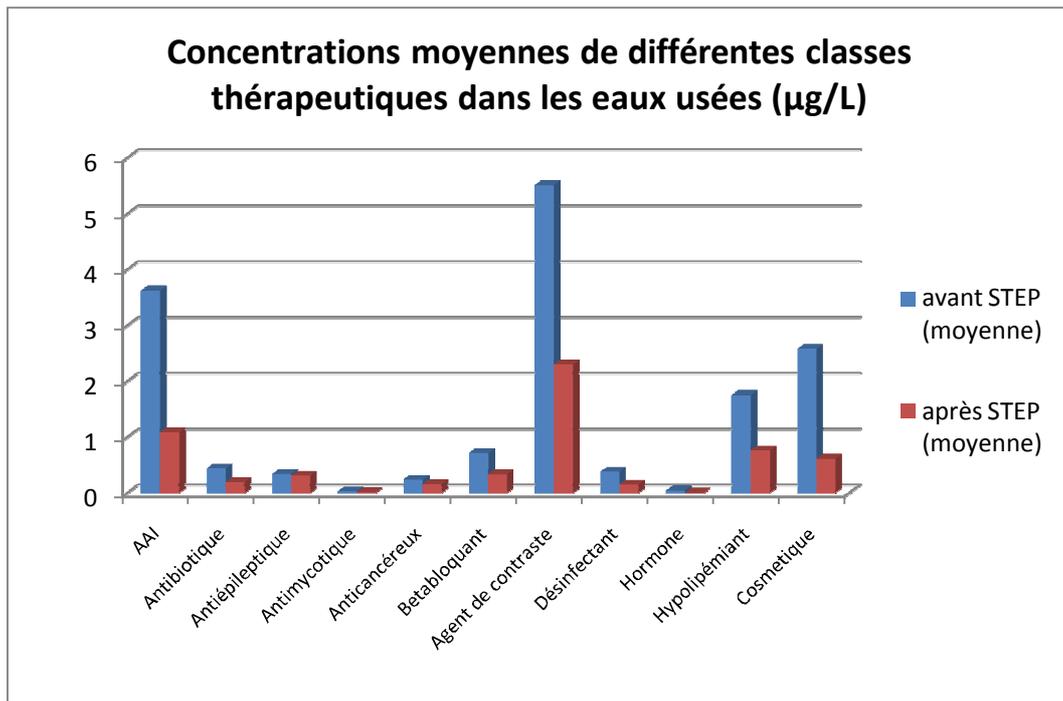


Figure 1-4 Histogramme présentant les classes thérapeutiques analysées dans l'article avant et après STEPs (AAI : analgésiques et anti-inflammatoires ; Anticancéreux : antinéoplasique et cytostatique)

Les capacités d'épuration des STEPs ont donc été étudiées. Les résultats mettent en évidence que les analgésiques et les anti-inflammatoires sont les classes thérapeutiques les plus facilement éliminées, que les antibiotiques ont un taux d'élimination de l'ordre de 50%. Les produits de contraste semblent également avoir un fort taux de rendement, cela est principalement dû à l'Iopromide dont les concentrations, 9,20 µg/L et 2,01 µg/L respectivement avant et après épuration, surexprime ma moyenne. Pour les autres molécules de contraste (Iohexol, Iomeprol, Iopamidol) le taux d'épuration est plutôt de l'ordre de 30%. Les anti-épileptiques, quant à eux, sont très peu épurés, voire pas du tout.

En faisant un point particulier sur la classe des analgésiques et anti-inflammatoires (données non publiées), nous remarquons également que toutes les molécules ne sont pas représentées de la même façon dans les eaux usées. La figure ci-dessous explore tout particulièrement la classe des antalgiques et des anti-inflammatoires.

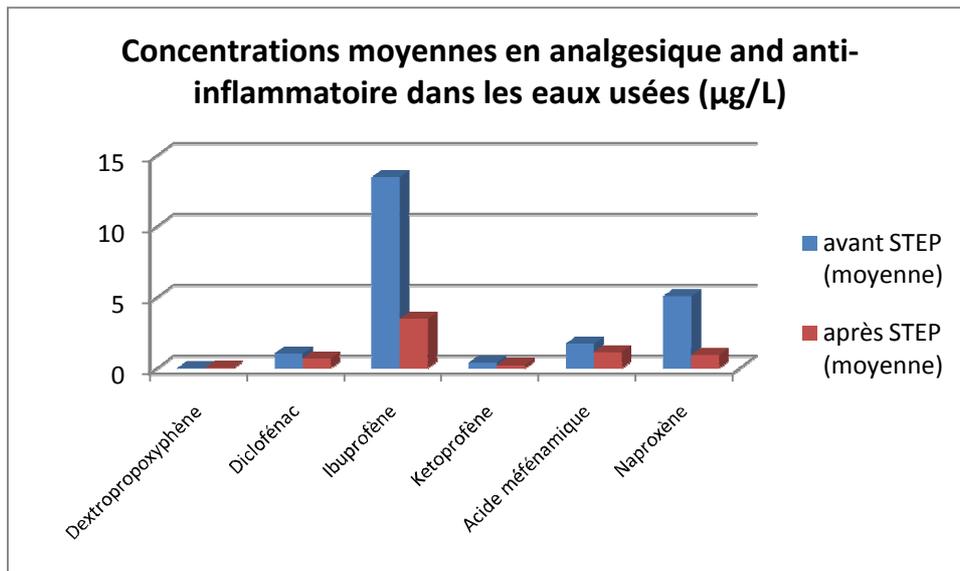


Figure 1-5 Concentration en analgésiques et anti-inflammatoires dans les eaux usées avant et après STEPs

La présence de paracétamol est relevée à des concentrations allant jusqu'à 80 µg/L (non indiqué sur la figure car cela rend le graphique moins lisible) alors que les concentrations d'ibuprofène ne dépassent pas les 13 µg/L. Dans cette classe, les STEPs sont efficaces puisque les molécules antalgiques et anti-inflammatoires sont retrouvées en très faible concentration après les STEPs (taux d'élimination proche de 90%).

Ces capacités élevées d'épuration ne se retrouvent pas dans la classe des antibiotiques, comme le montre la figure suivante.

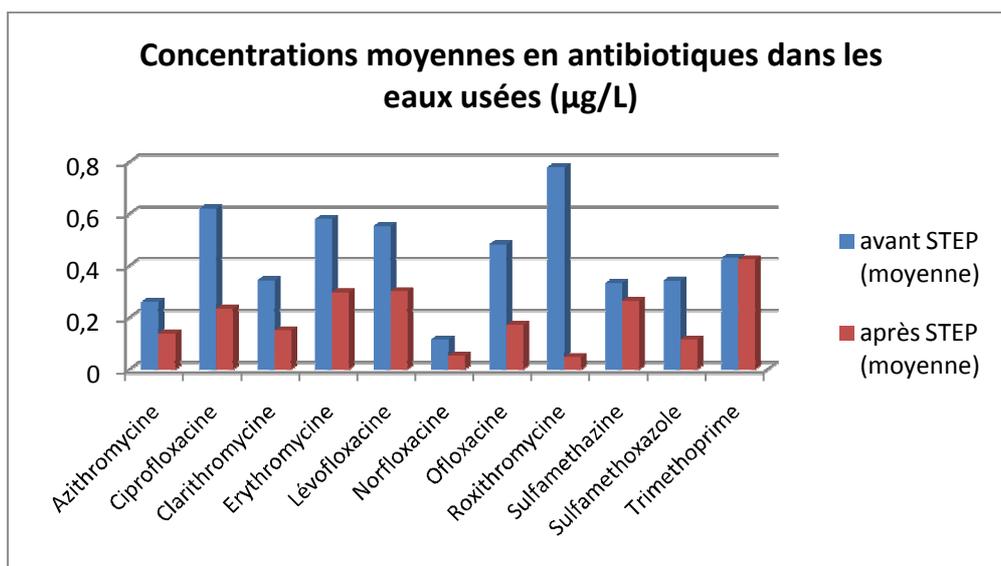


Figure 1-6 Concentration en antibiotiques dans les eaux usées avant et après STEPs

La roxithromycine et la ciprofloxacine sont les antibiotiques plus représentés dans les eaux usées, avec respectivement 0,77 et 0,6 µg/L. Elles ont un taux d'épuration d'environ 50%,

alors que la norfloxacine (0,4 µg/L dans les influents de STEPs) bénéficie d'un abattement de plus de 75%.

Les métabolites actifs de différentes substances (carbamazépine, clofibrate et érythromycine) ont été recherchés. La figure suivante décrit la concentration en métabolites dans les eaux usées avant et après STEP.

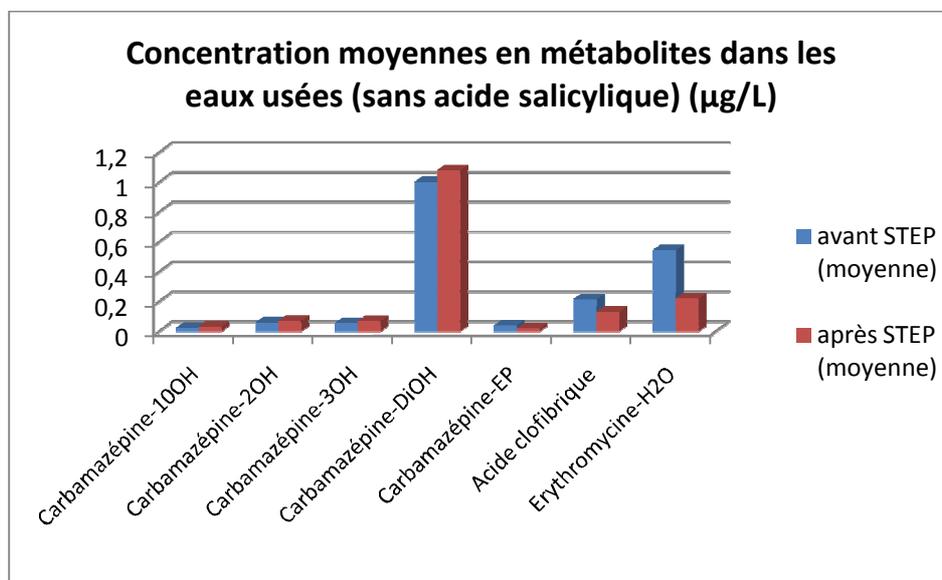


Figure 1-7 Concentration en métabolites dans les eaux usées avant et après STEPs

Notre étude de la présence des métabolites de principes actifs a montré la présence de métabolites de la carbamazépine (carbamazépine 10OH, 2OH, 3OH, DiOH), de clofibrate et d'érythromycine (érythromycine H₂O). Le taux de carbamazépine DiOH (métabolite inactif) est plus élevé en sortie de STEPs qu'à l'entrée, cela peut s'expliquer par la présence de certaines bactéries capable de déconjugaison et donc de régénération des molécules. L'acide salicylique a volontairement été retiré du graphique afin de ne pas « écraser » les données et ainsi de pouvoir remarquer taux des différents métabolites dans les eaux usées avant et après station d'épuration. L'acide salicylique est présent dans les eaux usées avant station d'épuration à un taux moyen de 212 µg/L et après épuration à un taux moyen de 2,5µg/L.

Cette étude aura permis de mettre en évidence la disparité des molécules en termes de concentration dans les eaux usées et en termes de rendement d'épuration par les STEPs. Elle aura également mis en lumière le panel important de molécules potentiellement présentes dans les eaux usées, puis dans le milieu récepteur.

L'hypothèse selon laquelle les STEPs ne sont pas initialement conçues pour traiter ce type de pollution se vérifie, car la plupart des classes pharmaceutiques ainsi que les plastifiants et le bisphénol A ne sont pas éliminés à 100%.

Devant le constat d'une telle pollution aux résidus pharmaceutiques, la question de la part de chaque acteur du système de santé est posée. Il semble dès lors nécessaire de caractériser et quantifier la pollution d'origine hospitalière.

1.3.3. Spécificités des effluents liquides hospitaliers

Les effluents liquides hospitaliers ont des particularités qui les différencient des eaux usées communautaires (consommation d'eau plus importante, rejet de produits de nettoyage, rejet en continu...).

La consommation d'eau quotidienne par habitant en France est estimée à 150 litres. En la comparant à la consommation journalière pour un lit en établissement de santé, nous remarquons que cette dernière est nettement supérieure. En effet, l'eau consommée par un centre hospitalier est comprise entre 500 et 700 litres par jour et par lit (Cêtre, 1999).

De plus, les établissements de soins rejettent des résidus de médicaments en grande quantité dans les réseaux d'évacuation des eaux usées, et ce sans traitement préalable. Le développement des traitements ambulatoires et des traitements en hospitalisation à domicile conduit lui aussi à un rejet plus diffus d'effluents contaminés dans les réseaux de collecte. L'augmentation de la population et de l'espérance de vie ne faisant qu'accroître l'utilisation de médicaments, les rejets sont voués à augmenter.

Les molécules spécifiques sont donc rejetées de façon localisée et en quantité par les établissements de soins ; de cette manière, nous pouvons admettre leur présence quasi constante (au même titre que les molécules issues des traitements en ville) dans l'environnement.

Enfin, la nature des effluents hospitaliers présente des spécificités par rapport aux effluents de ville. Les rejets hospitaliers peuvent être classifiés en deux catégories :

- les effluents dits « domestiques » qui correspondent aux rejets des activités de cuisine, de blanchisserie et de l'hygiène corporelle des patients, des visiteurs et du personnel ;
- les rejets spécifiques issus des activités de soins.

La pollution microbiologique, physique et chimique issue de ces établissements peut être particulière du fait des germes spécifiques présents chez les patients infectés ou colonisés, des quantités importantes de rejet de détergents et désinfectants, et de l'élimination par un grand nombre de patients des médicaments administrés.

Or, selon les conventions passées avec les STEP's locales, les effluents liquides hospitaliers rejoignent les effluents domestiques et sont traités de façon non différenciée par les stations de d'épuration.

A partir des données déjà recensées, nous avons souhaité caractériser plus précisément les effluents liquides hospitaliers d'un point de vue chimique et microbiologique. Nous avons analysé les données de la littérature, et les avons confrontées aux données de terrain issues d'une campagne de prélèvements des effluents du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nancy réalisée en 1993.

L'ensemble des recherches menées est présenté dans l'article ci-après : N. Lopez, T. Deblonde Ph. Hartemann. Les effluents liquides hospitaliers. Hygiènes 2010, 18 (6) : 381-6.

Les effluents liquides hospitaliers

N. Lopez, T. Deblonde, Ph. Hartemann

Service d'hygiène hospitalière, CHU, Nancy

Pr Philippe Hartemann - Service d'hygiène hospitalière - Hôpitaux de Brabois - CHU - 54511 Vandœuvre-lès-Nancy cedex
E-mail : philippe.hartemann@medecine.uhp-nancy.fr

La problématique des eaux résiduaires a toujours suscité, au cours des siècles, une certaine crainte vis-à-vis de la pollution qui lui est associée. Dès l'antiquité, le développement des premières cités romaines provoqua la contamination des nappes phréatiques et des eaux de surface par des bactéries pathogènes. Ce problème a été et demeurera une cause importante de mortalité au cours des siècles. Notamment au moyen âge où les cours d'eau et rivières servaient d'exutoires à de nombreux rejets, dont les rejets hospitaliers, provoquant ainsi de nombreuses épidémies (typhoïde, choléra...). Dans un article précédent nous décrivions la problématique associée aux eaux usées hospitalières [1]. Depuis, le sujet a fait l'objet de nombreux travaux et l'objectif de cet article est de faire le point sur ces nouvelles études

ayant trait aux effluents hospitaliers en y intégrant également des données concernant le centre hospitalier universitaire (CHU) de Nancy.

Les rejets liquides hospitaliers ont des particularités : la consommation d'eau quotidienne d'un habitant est estimée à 150 litres et permet de déterminer ce que l'on appelle l'équivalent habitant (EH). Si on la compare à la consommation d'eau journalière pour un lit, on remarque que cette dernière est nettement supérieure. En effet, l'eau consommée par un centre hospitalier (CH) est comprise entre 500 et 700 litres/lit/jour avec des maxima de 1 m³/lit/jour [2].

D'un point de vue qualitatif, les effluents hospitaliers peuvent être divisés en deux parties, la première comprend les effluents dits « domestiques » correspondant

RÉSUMÉ

Les établissements de santé utilisent une grande variété de produits à usage médical (antibiotiques, solvants, métaux lourds, radioéléments, médicaments) mais aussi des produits d'entretien et de désinfection, susceptibles de se retrouver dans les eaux usées. Cette pollution chimique s'accompagne d'une pollution biologique issue des excréta des patients (champignons, bactéries parfois résistantes aux antibiotiques, virus). Tous ces produits rejoignent la station d'épuration communale dont l'efficacité des procédés sur la dégradation ou la rétention de ces produits est variable. Certaines techniques sont incapables de les éliminer totalement, les laissant ainsi s'échapper dans le milieu naturel. Le devenir des produits présents dans les rejets liquides des centres de soins doit être pris en considération afin de pouvoir évaluer leur impact sur l'environnement et l'autorité publique ne tardera pas à taxer ce type de pollution. Ainsi les établissements doivent dès maintenant s'intéresser à une meilleure gestion de ce flux polluant.

MOTS-CLÉS

Effluents hospitaliers – Station d'Épuration – Polluants – Médicaments.

ABSTRACT

Hospital wastewater

Healthcare facilities use a wide variety of medical products such as antibiotics, solvents, heavy metals, radioisotopes and medications as well as the cleaning products and disinfectants that are typically found in wastewater. In addition to this type of chemical pollution, wastewater also contains biological pollution from the excreta of patients (fungi, bacteria, which may be resistant to antibiotics, and viruses). All these products enter the local wastewater treatment plants. The efficiency of the treatment processes to degrade or retain these products varies. Some techniques are unable to eliminate them completely, and discharge them into the natural environments. The fate of pollutants that are present in hospital effluent must be taken into consideration to evaluate their impact on the environment and the authorities will soon be imposing taxes on this type of pollution. Healthcare establishments must now start to consider improving the management of their effluents.

KEYWORDS

Hospital Wastewater – Wastewater Treatment Plant – Pollutants – Medicaments.

aux rejets des activités de cuisine, de blanchisserie, de l'hygiène corporelle des patients et du personnel. La deuxième catégorie est plus spécifique du milieu hospitalier et provient des rejets des activités de soins. L'ensemble de ces polluants va atteindre le réseau d'assainissement de la commune et cet apport de polluant est non négligeable. En effet, certaines études ont montré que les rejets d'un hôpital de 1 000 lits étaient aussi polluants que ceux d'une ville de 10 000 habitants [3].

Ces effluents hospitaliers contiennent des contaminants biologiques qui sont depuis toujours ceux auxquels on pense en premier, même s'il apparaît, de plus en plus, que la contamination chimique est probablement la plus préoccupante. Nous envisagerons successivement ces deux aspects avant de présenter les solutions techniques qui ont été proposées et/ou testées durant les dernières années. Parmi les données présentées dans cet article, nous avons incorporé les résultats obtenus lors d'une campagne d'échantillonnage réalisée sur les eaux usées de l'hôpital de Brabois du CHU de Nancy. Ce site hospitalier comporte 1 800 lits de toutes spécialités et nous avons procédé en 1993 à un échantillonnage automatique des eaux usées asservi au débit sur 24 heures. Les analyses ont été réalisées selon les méthodes normalisées dont l'emploi est obligatoire pour chacun des paramètres testés, tandis que des profils chromatographiques en phase gazeuse ont été systématiquement effectués.

La contamination biologique des rejets liquides hospitaliers

Les germes potentiellement présents à l'hôpital sont apportés via la flore des malades, du personnel ou des visiteurs. Ils sont retrouvés dans l'environnement à la surface des sols et des matériels, dans les appareils de ventilation, dans l'eau (*Legionella pneumophila*) ou bien dans l'air (*Aspergillus* sp.). Ces germes peuvent être regroupés en trois catégories : les agents commensaux, les agents saprophytes et les agents infectieux. La variabilité des germes retrouvée est très grande :

Tableau I - Caractérisation bactérienne des effluents hospitaliers (indicateurs de contamination fécale).

Paramètre	Source	Coliformes totaux (UFC/ml)	Coliformes thermo-tolérants (UFC/ml)
Effluents hospitaliers	[2]	1.10 ⁴ à 3.10 ⁶	1.10 ² à 8.10 ⁴
	[4]	3.10 ⁶	1,5.10 ⁵
	Hôpitaux de Brabois (CHU Nancy, 1993)	3,24.10 ⁵	1,07.10 ⁵
Effluents urbains	[3]	1.10 ³ à 1.10 ¹⁰	1.10 ² à 5.10 ⁹

Les bactéries

Les études menées sur la caractérisation des bactéries s'accordent à montrer que leur concentration est inférieure à celles retrouvées dans les effluents urbains si l'on raisonne en termes de bactéries classiquement considérées comme indicatrices (Tableau I). En effet, nous observons, 10² à 10⁴ fois moins de bactéries mesurées selon les classiques méthodologies de microbiologie des eaux dans les effluents liquides hospitaliers que dans les eaux résiduaires urbaines. Les concentrations retrouvées dans les effluents de l'hôpital de Brabois sont comparables à celles retrouvées dans les effluents d'autres hôpitaux [1,4]. Le risque est plutôt lié à la dissémination éventuelle de caractères de résistance aux antibiotiques mais il n'y a pas encore, à notre connaissance, d'étude probante sur ce sujet.

Les virus et parasites

Les parasites les plus susceptibles de se retrouver dans les effluents hospitaliers sont les amibes. Celles-ci sont parmi les plus excrétées lors de parasitoses [5] mais elles sont surtout très présentes dans les réseaux et peuvent constituer des réservoirs de pathogènes. Cependant, on peut déplorer qu'aucune étude n'ayant trait aux rejets hospitaliers n'ait traité de cet aspect ; aucune valeur chiffrée de leur présence dans ces effluents n'a été trouvée dans la littérature.

La présence de virus dans les effluents est discutée ; les conditions drastiques présentes dans les réseaux d'assainissement ne sont pas favorables à leur survie. Cependant certaines études ont révélé la présence du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans certaines eaux résiduaires [6].

La contamination physicochimique des rejets liquides hospitaliers Les paramètres physicochimiques généraux

Les données collectées au sein du CHU de Nancy et celles issues de la littérature montrent quelques différences entre les effluents hospitaliers et les effluents domestiques. L'étude publiée par BOLLLOT *et al.* [3] présente la synthèse des résultats de 17 établissements hospitaliers français, résultats résumés dans le **tableau II** pour les principaux paramètres physico-chimiques. Dans ce même tableau sont présentés à titre de comparaison ceux trouvés pour les effluents de l'hôpital de Brabois. L'analyse des effluents de l'hôpital de Brabois menée en 1993, montre que ces paramètres sont nettement supérieurs à ceux observés au niveau de la station d'épuration urbaine de Nancy-Maxéville (Figure 1), ce qui met en évidence une importante pollution organique apportée par ces effluents. Cette pollution se caractérise surtout par une toxicité particulière [3] qui est liée à des molécules dont l'usage est assez spécifique au fonctionnement hospitalier.

Les rejets radioactifs

À l'hôpital, ces rejets sont issus des services de médecine nucléaire, des laboratoires de préparation et de manipulation (dosage des hormones thyroïdiennes), des sanitaires des chambres des patients sous thérapie anticancéreuse. Cette filière est bien encadrée, les vaisseaux contenant des substances radioactives sont lavés dans des éviers spécifiques (dits chauds) dont les rejets sont captés et seront gérés par une filière spécifique selon les prescriptions de l'Agence nationale de gestion des déchets radioactifs (ANDRA).

Les effluents contenant des radioéléments à vie longue (période supérieure à 100 jours) seront pris en charge par l'ANDRA ; ceux à période courte (inférieure à 100 jours) seront stockés puis rejetés dans le réseau d'assainissement après décroissance. La radioactivité des effluents doit être contrôlée avant leur évacuation vers le réseau de collecte des eaux usées urbaines.

Les substances pharmaceutiques

Les médicaments administrés à l'homme (antibiotiques, hormones, antalgiques et tranquillisants) ont été détectés dans les eaux de surface, dans les eaux souterraines et dans l'eau potable à des concentrations comprises entre quelques nanogrammes par litre jusqu'à plusieurs microgrammes par litre [7]. Ce constat nous amène à réfléchir sur le mode de propagation de ces substances dans l'environnement, mais également sur notre système de gestion des eaux résiduaires.

Les principales classes pharmacologiques détectées dans l'environnement sont les antibiotiques, les hypolipémiants, les analgésiques, les anti-inflammatoires, les antidépresseurs, les hormones (naturelles et synthétiques) et les anticancéreux. Leur présence dans l'environnement est due d'une part à la mise à l'évier de substances pharmaceutiques et d'autre part aux excréctions physiologiques. En effet, on estime que 50 % à 90 % d'un médicament administré à l'homme sont excrétés sans aucun changement. Le reste étant éliminé, par l'organisme, sous forme de métabolites plus ou moins toxiques [7]. Ces valeurs dépendent de divers paramètres dont la posologie, la typologie des molécules administrées mais également de la physiologie des individus.

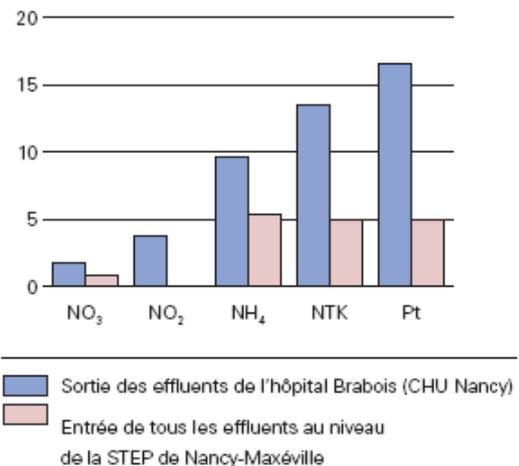
Les effluents hospitaliers contribuent de manière conséquente à l'apport de substances pharmaceutiques retrouvées au niveau des stations d'épuration [8]. Cependant, leur parcours dans le réseau d'assainissement est difficile à suivre car les médicaments peuvent être éliminés par les organismes sous formes de conjugués pas toujours suivis analytiquement.

Certaines études [9] ont quantifié l'apport des rejets hospitaliers en substances médicamenteuses et elles ont montré que ces substances constituent un faible apport comparé à la teneur totale retrouvée au niveau de la station d'épuration. Ainsi, un hôpital de 4,4 lits pour 1 000 habitants contribue à moins de 15 % du total de

Tableau II - Paramètres physico-chimiques globaux dans les effluents hospitaliers.

Étude Concentration (mg/l) Spécificité	17 hôpitaux [3]	Hôpitaux de Brabois 1993
NO ₃	< 1 - 1	1,8
NO ₂	NR	3,7
NH ₄	475 - 3 095	9,6
NTK	3 - 68,3	13,5
Pt	2 - 24,5	16,5
DCO	106-2 664	505,3
DBO ₅	20-1559	283,0

Figure 1 - Comparaison des paramètres physico-chimiques globaux des effluents à la sortie de l'hôpital de Brabois à l'entrée dans la STEP de Nancy.



substances pharmaceutiques retrouvées au niveau de la station d'épuration (STEP). Cet apport dépasse les 15 % dans le cas de deux antibiotiques : la roxithromycine (56 %) et le triméthoprime (18,3 %). Le **tableau III** présente la contribution de deux hôpitaux de la région d'Oslo au flux entrant de médicaments dans la station d'épuration connectée [8].

Deux catégories de médicaments posent des problèmes spécifiques : les anticancéreux et les antibiotiques.

Cas particulier des médicaments anticancéreux

Le plan Cancer 2004-2008 dénombrait, en France, 278 000 personnes atteintes annuellement d'une pathologie cancéreuse, le nombre total de patients soignés ne cesse d'augmenter avec, en parallèle, l'emploi de substances anticancéreuses. Ces substances peuvent avoir une activité cancérogène, mutagène ou tératogène. En conséquence, il paraît nécessaire d'identifier la présence

Tableau III - Contribution de deux hôpitaux de la région d'Oslo au flux entrant de médicaments dans la station d'épuration connectée (réf. 8).

Classe de médicaments	Molécule	Contribution moyenne des deux hôpitaux (%)
β-bloquants	Métoprolol	0,75
	Atenolol	1,25
	Propranolol	5,7
Antidépresseur	Paroxétine	0,25
	Sertraline	0,05
Hypolipémiant	Simvastatine	0,485
	Atorvastatine	1,135
Analgésique	Paracétamol	5,85
	Phénazone	0,355
Anticancéreux	Tamoxifène	0,005
Anti-épileptique	Carbamazépine	0,85
Anti-inflammatoire non stéroïdien	Diclofénac	0,8
	Ibuprofène	0,35
Antifongiques	Clotrimazole	0,05

de ces composés dans les effluents hospitaliers et de suivre leur devenir dans l'environnement.

La présence des substances anticancéreuses dans les rejets liquides hospitaliers peut être due à des déversements lors de la préparation de ces médicaments mais aussi aux excréments des malades. La manipulation des médicaments anticancéreux étant très réglementée, les rejets physiologiques de patients traités pourraient représenter la seule voie de décharge. Cette hypothèse est corroborée par certaines études menées sur la composition biologique et chimique de l'urine de patients sous thérapie anticancéreuse [10].

Une étude menée à Pékin [11] sur les effluents de 21 hôpitaux chinois a montré que certaines substances anticancéreuses (méthotrexate, étoposide) sont retrouvées dans leurs effluents. La présence des anticancéreux dans les rejets liquides hospitaliers étant ainsi bien démontrée, on peut s'interroger sur leur devenir dans le réseau d'assainissement.

Des essais effectués [12] sur la biodégradation des agents antitumoraux dans les effluents hospitaliers mais aussi urbains ont montré que certains anticancéreux, tel que l'ifosfamide, sont non biodégradables et non adsorbés par les boues mettant en avant la problématique du devenir de telles substances dans l'environnement. De plus, d'autres études [13-15] ont prouvé que certaines substances anticancéreuses (cyclophosphamide, ifosfamide et méthotrexate) peuvent subsister après traitement des eaux usées dans les STEP, pouvant ainsi, à de très faibles concentrations, intégrer le cycle de l'eau.

Cas particulier des antibiotiques

Ces médicaments importants pour la médecine font partie des plus prescrits tant en médecine humaine que

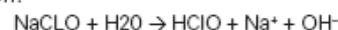
vétérinaire. Pour pouvoir évaluer leur présence dans les rejets liquides hospitaliers, il est nécessaire d'évaluer la quantité réellement excrétée. Des études ont déterminé la concentration d'antibiotique présente dans les selles humaines d'individus sous traitement [16] et ont montré des concentrations de l'ordre de 3 mg/kg à 40 mg/kg de selles pour le triméthoprime et la doxycycline, et des concentrations de 200 mg/kg à 300 mg/kg de selles pour l'érythromycine. En estimant le taux d'élimination durant la période de traitement à 95 %, l'étude [17] montre une concentration maximale de 13 µg/l pour les tétracyclines pouvant être présents dans les effluents d'une STEP.

Les résidus des antibiotiques dans l'environnement sont soupçonnés d'être l'agent causal du développement de formes de résistance chez les bactéries. Dans le cas d'effluents hospitaliers, la présence d'antibiotiques est reconnue comme étant le facteur de risque le plus important dans l'acquisition de résistances aux antibiotiques (fluoroquinolones et aux β-lactamines) [18,19]. La présence de désinfectants, utilisés en grande quantité à l'hôpital, exerce probablement une pression de sélection qui favorise l'apparition de ces résistances.

Les détergents/désinfectants

Les surfaces hospitalières constituent un réservoir de micro-organismes susceptible de contaminer le personnel soignant ou les patients. Ce risque est non négligeable même si, à l'heure actuelle, il est difficile d'évaluer avec précision la part des surfaces et de l'environnement hospitalier dans l'origine des infections nosocomiales. Les détergents et les désinfectants représentent un tonnage très important comparé aux substances pharmaceutiques, mais ne sont pas les plus dangereux pour l'environnement. En 2009, au CHU de Nancy, 135 m³ de produits désinfectants ont été utilisés ainsi que 93,3 m³ de produits détergents. Les principaux produits désinfectants utilisés pour la désinfection des sols et des surfaces ou encore pour la désinfection des instruments et des matériels sont, soit des produits chlorés, le plus courant étant l'hypochlorite de sodium, ou plus rarement des produits contenant des aldéhydes.

L'hypochlorite de sodium, NaClO (ou eau de javel), est encore très employé. Ainsi près de 7000 berlingots sont utilisés annuellement aux cuisines du CHU Nancy. Lorsque NaClO est présent dans l'eau (eaux potables, eaux résiduaires), il va réagir avec divers composés organiques, dont les protéines, pour produire une variété de composés chlorés [20], dont la plupart sont lipophiles, persistants et toxiques dans les milieux aquatiques [21]. La formation de ces composés chlorés peut s'expliquer ainsi: le chlore gazeux, dissous dans l'eau, va rapidement s'hydrolyser pour former l'acide hypochloreux selon l'équation:



Ensuite, l'acide hypochloreux (HClO) va pouvoir réagir avec des composés organiques, des composés ammo-

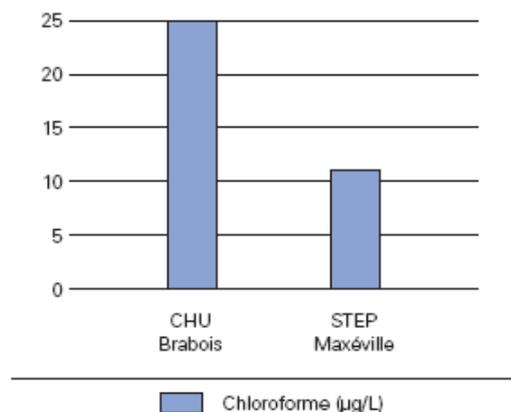
niacaux pour former notamment du chloroforme, du bromodichlorométhane, des chloramines et de nombreux métabolites toxiques [22,23].

L'étude de 1993, menée sur les effluents de l'hôpital de Brabois, montre que l'hôpital contribue de manière conséquente en l'apport de chloroforme au niveau de la station d'épuration si l'on compare les concentrations en chloroforme à la sortie du CHU et à l'entrée de la STEP (Figure 2). La concentration en AOX correspondant à la quantité de chlore contenu dans les substances organiques adsorbables sur du charbon actif indirectement imputable aux désinfectants chlorés variés pour les effluents de l'hôpital de Brabois entre 200 µg/l et 900 µg/l, ce qui montre une contribution conséquente au niveau de la STEP (valeur moyenne d'entrée de 120 µg/l).

Discussion

La caractérisation biologique a montré que la concentration des bactéries indicatrices dans les rejets hospitaliers est inférieure à celle des effluents domestiques, ce qui est dû notamment à la présence importante de produits désinfectants et au facteur de dilution. Néanmoins, le risque biologique n'est pas inexistant. En effet, on retrouve dans ces rejets des bactéries résistantes aux antibiotiques, susceptibles de se répandre dans l'environnement [24], mais cet impact est difficile à évaluer car peu étudié. Certains auteurs le considèrent comme limité [25]. Diminuer l'impact de la pollution biologique des effluents hospitaliers passe, soit par une désinfection plus poussée et systématique des excréta des patients (ce qui accentuerait le problème de la pollution chimique), soit par une récupération des excréta potentiellement contaminés. La mise en place d'une gestion spécifique des déjections et excréta d'un malade (désinfection, incinération) est complexe ; il faut définir les critères de risque liés aux malades excréteurs afin de pouvoir établir différents protocoles de traitement de ces effluents.

Figure 2 - Concentration en chloroforme dans les effluents de l'hôpital de Brabois et dans les influents de la STEP de Nancy.



En ce qui concerne la pollution chimique, il a été montré que les substances déversées en grande quantité dans les rejets liquides hospitaliers, sont les désinfectants et détergents et les substances médicamenteuses. Ceci devient un sujet de préoccupation majeur. Une attention particulière est accordée à leur teneur dans le milieu aquatique, en raison de leurs effets potentiels qui peuvent conduire, à long terme, à des effets néfastes sur les organismes aquatiques et terrestres [26]. Aujourd'hui, les stations d'épuration sont incapables d'éliminer totalement les molécules médicamenteuses qui se retrouvent donc dans les eaux de surface, mais aussi dans les eaux souterraines et potentiellement dans les stations de potabilisation et finalement dans l'eau potable.

Les critères de potabilisation n'intègrent que certains paramètres basés sur les toxicités des composés individuels et non sur leur combinaison. Il paraît essentiel, voire indispensable, de rechercher la typologie de ces substances, ainsi que leurs interactions afin de pouvoir évaluer au mieux leurs effets potentiels sur la santé humaine ainsi que sur l'environnement.

La maîtrise de la pollution chimique est complexe, et passe tout d'abord par une utilisation raisonnée des substances chimiques (détergents et désinfectants) et par l'emploi de substances plus respectueuses de l'environnement (détergents biodégradables). En ce qui concerne les molécules médicamenteuses, seule une sensibilisation du personnel hospitalier pourrait empêcher les déversements « accidentels » de substances pharmaceutiques dans le réseau d'assainissement. Une gestion spécifique des excréta des malades permettrait de diminuer l'apport de substances médicamenteuses mais engendrerait des coûts trop importants.

Plusieurs méthodes de traitement sont envisageables afin de réduire les pollutions biologiques et chimiques issues des rejets hospitaliers dans le traitement à la source. En effet, les établissements de soins sont de grands consommateurs d'eau et une diminution de cette consommation conduira à concentrer cette pollution. Cette perspective commence à être abordée par les pouvoirs politiques. Récemment, une convention d'engagements, issue du Grenelle de l'environnement, cosignée le 27 octobre 2009, entre le gouvernement et les instances hospitalières, fixe des objectifs portant sur un management des structures hospitalières visant à rationaliser les consommations d'eau. L'objectif fixé pour 2011 est que l'ensemble des établissements mette en place des indicateurs de suivi de leur consommation d'eau. Une deuxième solution pour réduire l'impact des effluents hospitaliers serait une collecte spécifique qui permettrait de diminuer le nombre de substances retrouvées dans les effluents. Par exemple, on pourrait envisager une collecte des urines, suivi d'un traitement par filtration sur membrane, ce qui permettrait de concentrer les polluants (qui seront ensuite incinérés) ; la partie liquide épurée pouvait être rejetée dans le réseau d'assainissement. Des

projets techniques sont à l'étude au niveau européen, tel que le projet Poséidon (2001-2004) qui a rassemblé sept pays européens dans le but d'évaluer des technologies de traitement pour éliminer des composés pharmaceutiques et des produits d'hygiène dans les eaux potables et usées. Cette étude a permis de réaliser un état des lieux et d'enrichir les connaissances sur la présence de ces composés et l'efficacité des traitements, à la fois en station d'épuration et en filière de potabilisation [27]. À terme, il est évident que l'autorité publique taxera lourdement la pollution liée aux effluents hospitaliers.

Conclusion

En France, la problématique des rejets liquides hospitaliers est encore peu abordée. Seule une réglementation plus stricte incitera les instances hospitalières à mieux maîtriser ce type de rejets, comme c'est le cas en Allemagne. La connaissance de la composition des eaux résiduaires hospitalières permettrait de mettre en place des actions de prétraitement spécifiques aux produits retrouvés avant l'arrivée dans le réseau d'assainissement communal. Pour ce faire, toute forme de pollution doit être recherchée afin de connaître la constitution potentielle et réelle des eaux hospitalières ainsi que la part de pollution entrant à la station d'épuration qui est attribuable aux établissements hospitaliers. □

Références bibliographiques

- 1- HARTEMANN P, HAUTEMANIERE A, JOYEUX M. La problématique des effluents hospitaliers. *Hygiènes* 2005; 13: 369-374.
- 2- CÈTRE C, LABADE JC. Bilan et recommandations sur les conditions de rejets des effluents liquides des établissements de santé. *Techniques hospitalières* 1999; 634: 58-61.
- 3- BOILLLOT C, BAZIN C, TISSOT-GUERRAZ F, DROGUET J, FERRAUD M, CÈTRE JC, TREPO D, FERRODIN Y. Daily physico-chemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. *Sci Tot Environ* 2008; 403: 113-129.
- 4- LECLERC H. *Microbiologie : le tube digestif, l'eau et les aliments*. Editions Doin, Paris, 1998.
- 5- FAECHEM RG, BRADLEY DJ, GARELICK H, MARA DD. Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management. John Wiley and sons, New-York, 1983.
- 6- LUE-HING C, ZMUDA JT, SEDITA SJ, TATA P. Indigenous levels of HIV in wastewater: an empirical estimate and discussion. *In: HIV in wastewater, presence, survivability, and risk to wastewater treatment plant workers*. Water Environment Federation, USA, 1999.
- 7- MONTAGUE P. Drug in the water. *Rachel's. Environment & Health Weekly* # 614. Environmental Research Foundation. Disponible à : <http://www.monitor.net/rachel/r614.html>, 05/04/2001, 1998.
- 8- ORT C, LAWRENCE MG, REUNGOAT J, EAGLESHAM G, CARTER S, KELLER J. Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital. *Wat Res* 2010; 44: 605-615.
- 9- LANGFORD KH, THOMAS KV. Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environment International* 2009; 35: 766-770.
- 10- GIUMIANI F, KOLLER T, WURGLER FE, MARIA R. Detection of genotoxic activity in native hospital waste water by the umuC test. *Mutation Research* 1996; 368: 49-57.
- 11- YIN J, SHAO B, ZHANG J, LI K. A preliminary study on the occurrence of cytostatic drugs in hospital effluents in Beijing, China. *Bull of Environ Contam and Tox* 2010; 84: 39-45.
- 12- KÜMMERER K, MEYER M, STEGER-HARTMANN T. Biodegradability of the anti-tumour agent Ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Wat Res* 1997; 31: 11-27.
- 13- STEGER-HARTMANN T, KÜMMERER K, SCHECKER J. Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two step solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromato* 1996; 726(1-2): 179-184.
- 14- AHERNE GW, HARCASTLE A, NIELD AH. Cytotoxic drugs and the aquatic environment: estimation of bleomycin in river and water samples. *J Pharm Pharmacol* 1990; 42: 741-742.
- 15- CASTATINI C, MULLOT JU, BOUKARI S, MAZELLER P, LEVI Y, CERVANTES P, ORMSBY JN. Assessment of antineoplastic drugs in effluents of two hospitals. *Eur J Water Qual* 2008; 39(2): 171-180.
- 16- HOEVERSTAT T, CARLSTEDT-DUKEV B, LINGASS E. Influence of oral intake of seven different antibiotics on faecal short-chain fatty acid excretion in healthy subjects. *Scand J Gastroenterol* 1986; 21: 997-1000.
- 17- VAN DER HEIDE EF, HUECK E. Geneesmiddelen en milieu. *Pharmaceutisch Weekblad* 1984; 119: 936-1047.
- 18- CARMELI Y, TROILLET N, ELIPOULOS GM, SAMORE MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1379-1382.
- 19- HARRIS A, TORRES-VIERA C, VENKATARAMAN L, DEGIROLAMI P, SAMORE, CARMELI Y. Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1128-1133.
- 20- US EPA, 1989 Preliminary data summary for the hospitals point source category. Washington: United States Environmental Protection Agency, Office of water regulation and standards office of water. 76p.
- 21- SALINOUJA-SALONAN MS, JOKELA JK. Measurement of organic halogen compounds in urine as an indicator of exposure. *Scand J Workplac Environ Health* 1991; 17: 75-78.
- 22- MARHABA TF, WASHINGTON MB. Drinking water disinfection and by-products: history and current practice. *Adv Environ Res*; 1998; 2: 103-115.
- 23- LOPEZ A, MASCOLOE GC, TIRAVANTI G. Formation of volatile halogenated byproducts during chlorination of isoproturon aqueous solutions. *Chemosphere* 2001; 45: 269-274.
- 24- PECU S, BLECH MF, HARTEMANN P. Study of the frequency of antibiotic resistant microbial indicators in hospital and urban sewage. *Environ Technol Letters* 1981; 2: 347-356.
- 25- TUMELO E, GBAGUIDI-HAORE H, PATRY, BERTRAND X, THOUVEREZ M, TALON D. Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients recovered in the hospital effluents. *Int J Environ Health* 2008; 211: 200-204.
- 26- HERNANDEZ MD, MEZCUA M, FERNANDEZ-ALBA AR, BARCELO D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 2006; 69: 334-340.
- 27- www.cirsee.fr/fr/poseidon/poseidon

Les établissements de soins sont souvent considérés par le grand public comme la principale source de rejet de résidus de médicaments, de détergent-désinfectant et de bactéries dans les eaux usées.

Bien qu'anciens, les résultats ont permis d'appréhender la contamination biologique des rejets hospitaliers. La forte dilution des excréta des patients liée au grand volume d'eau consommée ne fait pas apparaître de risque biologique particulier dans les effluents. Néanmoins, la résistance des germes retrouvés n'a pas été explorée.

En ce qui concerne le risque chimique, les résultats obtenus sur les effluents du CHU de Nancy évoquent une pollution organique importante (nitrates NO_3^- , dioxyde d'azote NO_2 , ammoniums NH_4^+ , azote total réduit NKT, phosphore total Pt, demande chimique en oxygène DCO, demande biochimique en oxygène sur 5 jours DBO5). Ce rejet important de matières organiques semble être le fait de nombreux établissements hospitaliers puisque les résultats issus du CHU de Nancy sont corroborés par l'étude de Boillot en 2008, qui a étudié les paramètres physico-chimiques des effluents hospitaliers de 17 établissements et les a comparés avec les paramètres d'effluents domestiques. Dans tous les cas, la contribution hospitalière à la pollution globale (effluents domestiques et hospitaliers) est non négligeable. L'origine des matières organiques n'est pas clairement définie, mais nous pouvons émettre la supposition qu'elle est reliée, au moins en partie, à l'emploi de détergents-désinfectants. En effet, les établissements français sont nombreux à utiliser des détergents-désinfectants de type ammoniums quaternaires pour l'entretien des surfaces et des dispositifs médicaux. Malgré le développement actuel de techniques alternatives (vapeur, détergents-désinfectants enzymatiques ou à base de peroxyde d'hydrogène), ces composés restent largement utilisés. Aucune donnée concernant les produits de dégradation environnementale de ces détergents-désinfectants n'est disponible car elles sont considérées comme confidentielles par les laboratoires qui les commercialisent.

Les données relatives aux concentrations élevées en chloroforme relevées dans les effluents du CHU de Nancy peuvent conforter cette hypothèse dans la mesure où l'eau de Javel était historiquement employée dans les cuisines collectives pour la désinfection des aliments, ainsi que pour la désinfection des sanitaires (ce qui n'est plus le cas actuellement : remplacement de l'eau de Javel par d'autres produits en 2008 dans cet établissement).

Enfin, pour la partie concernant les résidus de médicaments dans les effluents hospitaliers, nous ne disposons pas de données issues du CHU de Nancy. Nous avons donc étayé notre réflexion au moyen des données issues d'une étude sur la contribution de deux hôpitaux de la région d'Oslo en flux entrant de médicaments à la STEP connectée (Ort, 2012). Les résultats montrent l'infime part des hôpitaux dans la pollution aux résidus de médicaments (< 5%). Selon Langford (2009), la part de contribution à cette pollution des hôpitaux vis-à-vis des effluents domestiques ne représenteraient que 15% en France.

Ces constatations sont reproductibles pour les antibiotiques.

Le cas particulier des médicaments anticancéreux a été traité spécifiquement. En effet le nombre de patients atteints de cancer et soignés par chimiothérapie augmente chaque année.

Or ces substances peuvent avoir un effet cancérigène, mutagène ou tératogène ; il semblait donc nécessaire de s'attarder sur ces molécules, de les quantifier dans les effluents hospitaliers et de les suivre dans l'environnement.

En premier lieu, nous avons référencé une étude menée à Pékin (Yin, 2010), qui montrait la présence d'anticancéreux (méthotrexate, ifosfamide, cyclophosphamide, étoposide, aziatropine) dans les effluents de 21 centres hospitaliers. Ainsi, la présence de ces molécules très actives dans les eaux usées est prouvée (150 ng/L d'ifosfamide et 100 ng/L de cyclophosphamide dans les effluents des centres de soins). Leur éventuelle persistance jusqu'aux eaux de consommation doit être étudiée.

Il est à noter qu'en France, les pratiques de préparation des cytostatiques sont très encadrées, de même que l'élimination des déchets souillés par ces produits (arrêté du 20 décembre 2004 fixant les conditions d'utilisation des anticancéreux injectables, circulaire du 3 mars 1987 relative à la manipulation des médicaments anticancéreux en milieu hospitalier, circulaire du 13 février 2006 relative à l'élimination des déchets générés par les traitements anticancéreux). L'élimination par les patients est donc la seule voie de décharge possible.

Une fois la présence de cytotoxiques identifiée dans les effluents hospitaliers, la question de leur devenir dans l'environnement se pose. Concernant la biodégradation d'anticancéreux, certains auteurs ont montré que l'ifosfamide était non biodégradable et non adsorbable par les boues activées. D'autres études ont également confirmé que l'ifosfamide, mais aussi le cyclophosphamide et le méthotrexate, n'étaient pas totalement dégradés par le traitement en STEP et pouvaient donc se retrouver dans le milieu récepteur et intégrer le cycle de l'eau.

Ainsi, concernant les effluents hospitaliers, nous avons observé que les établissements de santé étaient source de pollution particulière du fait de leurs activités de soins.

Dans cet article, il a été exposé l'état de la pollution hospitalière d'un point de vue biologique et chimique, dans un contexte local (CHU de Nancy). Il a été démontré que les établissements de soins sont responsables d'une part importante de la pollution des eaux pour certaines molécules (ex. : détergents-désinfectants, pollution organique). Cependant, concernant les résidus pharmaceutiques, même si les hôpitaux contribuent à ce type de pollution spécifique, le rejet dû aux activités domestiques (prise de médicaments à domicile et, dans une moindre mesure, mise à l'évier de médicaments non utilisés) est également à prendre en compte.

Néanmoins, ces molécules peu dégradables dans les stations d'épuration sont susceptibles d'atteindre le milieu récepteur et donc d'intégrer le cycle de l'eau. La mise en place de stations incluant des traitements spécifiquement adaptés à la pollution d'origine médicamenteuse à la sortie des établissements de soins, pourrait permettre une meilleure prise en charge de ces résidus.

1.3.4. La contamination de la ressource

L'eau usée, une fois traitée dans les STEP, rejoint le milieu récepteur où elle va être diluée. Les résidus de médicaments qu'elle contient peuvent ainsi se retrouver dans l'eau captée pour être transformée, via des stations de potabilisation, en eau destinée à la consommation humaine (EDCH).

En effet, l'EDCH peut provenir de deux types de sources : le captage des nappes phréatiques (et donc captage souterrain) et le captage d'eau de surface. Après captage, elle est dirigée vers une station de potabilisation pour traitement avant acheminement dans les réseaux d'eau potable. Toutefois, à l'inverse des stations d'épuration, les stations de potabilisation sont conçues pour épurer la pollution organique, dont fait partie la pollution médicamenteuse.

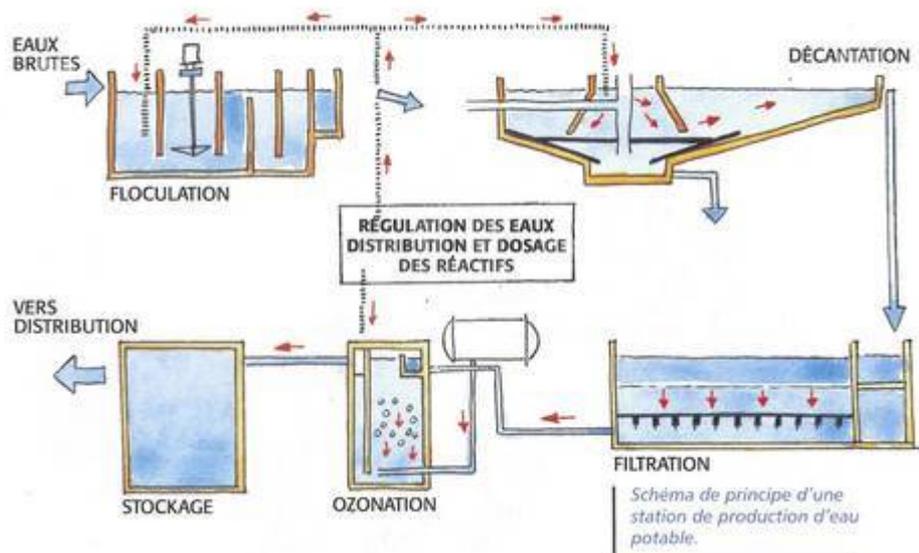


Figure 1-8 : Fonctionnement d'une station de potabilisation (source : Agence de l'eau Seine Normandie)

Le processus de potabilisation, décrit par la figure 1-8, commence par une étape de pompage de l'eau dans le milieu naturel, soit en souterrain (2/3 des cas), soit en surface (1/3 des cas).

Comme pour les traitements d'assainissement, l'eau puisée passe par diverses étapes de dégrillage. Une fois ce pré-traitement réalisé, l'eau est stockée dans de grands bassins et subit une étape de prédésinfection au chlore ou à l'ozone pour éliminer les bactéries qui auraient pu polluer l'eau pendant l'étape de stockage.

Ensuite, afin d'éliminer les matières organiques et la turbidité de l'eau, une technique de coagulation-floculation est employée. Les « floccs » sédimentent dans des bassins de décantation.

Après l'étape de décantation, l'eau passe par une phase de filtration. Ensuite vient la phase de désinfection qui a pour but d'éliminer les bactéries et virus pathogènes. Le chlore, l'ozone ou encore les ultraviolets peuvent être utilisés lors de cette étape. Une quantité de chlore reste dans l'eau afin d'empêcher toute prolifération de germes dans le réseau d'eau.

Le traitement de l'eau dans le processus de potabilisation dépend de sa qualité d'origine et peut varier dans le temps.

En 2011, le laboratoire d'hydrologie de l'ANSES situé à Nancy a mené une campagne nationale d'analyses, afin de déterminer la contamination des EDCH par des résidus de médicaments selon son origine (souterraine ou superficielle). Il a également réalisé une comparaison de cette contamination avant et après station de potabilisation.

Une étude regroupant les données déjà disponibles (données sur la contamination des eaux usées issues de notre article présenté précédemment, et données concernant les eaux brutes et eaux traitées, obtenues lors d'une campagne de prélèvements de l'agence de l'eau Seine-Normandie en 2009), ainsi que les résultats de cette campagne d'analyses de l'ANSES, a donné lieu à la rédaction d'un article publié dans HEGEL présenté ci-après (Tiphany Deblonde, Marion Dreyer, Philippe Hartemann. Résidus de médicaments et eau destinée à la consommation humaine. HEGEL. 2012 ; 2 (3) : 12-20).

DOI : 10.4267/2042/48244

SANTÉ PUBLIQUE**Résidus médicamenteux et eau destinée à la consommation humaine**
*Pharmaceuticals residues and drinking water**Tiphanie Deblonde, Marion Dreyer, Philippe Hartemann*

Université de Lorraine, Département Environnement et Santé Publique, Faculté de médecine, F-54500 Vandoeuvre-les-Nancy

tiphanie.deblonde@univ-lorraine.fr

Résumé

La France est un grand consommateur de produits pharmaceutiques à usage humain, avec en moyenne 48 boîtes par an et par habitant pour 2011. La mise en évidence dans les années 1980 de molécules à visée thérapeutique dans les eaux usées a mis en exergue cette pollution. Depuis, de nombreuses publications sur le sujet ont montré que la plupart des milieux aqueux contiennent des résidus médicamenteux. L'industrie pharmaceutique, l'excrétion par le patient, les rejets par les établissements de soins et la mise à l'évier des médicaments non consommés sont les sources de cette pollution. Ces différents effluents arrivent généralement dans des stations d'épuration non conçues pour éliminer les polluants d'origine organique. Pour certaines classes thérapeutiques, les stations d'épuration ont un rendement d'élimination plus élevé que d'autres ; par exemple, pour les antidépresseurs, le rendement est de l'ordre de 90-100 %, les antibiotiques d'environ 50 %, alors que les antiépileptiques ne sont pas éliminés. Le rejet quotidien de ces molécules leur confère une pseudo-persistance dans l'environnement. En effet, certaines molécules comme le Clofibrate ou la Codéine ont une demi-vie supérieure à 365 jours alors que pour d'autres, comme le Paracétamol, cette demi-vie est inférieure à un jour.

D'après un rapport du laboratoire National de Recherche et d'Hydrologie, environ 14 molécules pharmaceutiques sont retrouvées dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) et la provenance de l'eau (souterraine ou superficielle) n'a pas d'influence sur la nature des molécules retrouvées mais seulement sur les quantités. Les concentrations maximales retrouvées dans l'EDCH sont nettement inférieures aux doses thérapeutiques ; cependant, des études sur les effets chroniques de ces molécules à faibles doses semblent nécessaires ainsi qu'une politique préférentielle de molécule ayant le plus faible impact écotoxicologique à efficacité thérapeutique identique.

Mots-clés

Eau destinée à la consommation humaine ; Résidus médicamenteux

Abstract

France is a major consumer of human pharmaceuticals products, with a means of 48 boxes per year and per person in 2011. The demonstration in the 1980's of the occurrence of therapeutic molecules in wastewater highlighted this "new" pollution. Many publications on the subject have shown that most aqueous media contain drug residues. Both the pharmaceutical industry, the excretion by the patient, the release by health care facilities and making up to the sink of not consumed pharmaceuticals are sources of this pollution. These different effluents come usually in wastewater treatment plants which are not designed to remove pollutants of organic origin. For some therapeutic classes, sewage treatment plants have higher removal efficiency than others, such as antidepressants about 90-100%, antibiotics about 50%, while antiepileptics are not eliminated. The daily discharge of these molecules gives them a pseudo-persistence in the environment. Indeed, some molecules such as clofibrate or codeine have a half-life greater than 365 days while for others such as paracetamol half-life is less than one day. According to a report by the French National Research Laboratory for Hydrology, about 14 pharmaceutical molecules are found in water intended for human consumption drinking water (DW). The source of water (groundwater or surface) has no influence on the type of molecules found, but the differences are clear for the quantities. The maximum concentrations found in the DW are well below the therapeutic doses; however, studies on chronic effects of these molecules at low doses appear to be necessary as a preferential policy of prescription of molecule with the lowest ecotoxicological impact for an identical therapeutic efficacy.

Keywords

Drinking water; Pharmaceutical residues

Introduction

Si la France est le 4^{ème} consommateur mondial de médicaments après les Etats Unis, l'Allemagne et le Japon [1], la détection de molécules pharmaceutiques dans les eaux, depuis les années 1980, a d'abord été effectuée dans les pays anglo-saxons [2]. Les mises en lumière de quelques effets sur la faune aquatique (ex. : féminisation des poissons [3,4]) ont encouragé les recherches et on sait aujourd'hui qu'aucun milieu aquatique (eaux usées avant et après traitement, eaux souterraines, eaux de surface, voire eau destinée à la consommation humaine) ne peut être considéré comme indemne de contamination [5]. Le niveau de celle-ci est logiquement décroissant entre les eaux usées et les eaux souterraines [6]. En France, le Plan National Santé et Environnement deuxième version (2004-2008) a contribué à l'intérêt pour cette problématique jusqu'alors limitée à quelques laboratoires pionniers et demandé la « recherche de contamination des rejets urbains et des eaux superficielles par les médicaments ». Ceci a été entrepris et l'état des lieux que nous présentons ici s'intéresse aux molécules pharmaceutiques à usage humain ; il a été établi à partir des principales données récemment publiées.

Nous envisagerons successivement dans cet article, l'origine des molécules pharmaceutiques dans les eaux, les résidus médicamenteux dans les stations de traitement des eaux usées et dans les eaux superficielles puis, enfin, les résidus médicamenteux dans l'eau destinée à la consommation humaine.

L'origine des molécules pharmaceutiques

La présence de composés pharmaceutiques dans les eaux peut s'expliquer par 4 voies d'entrée :

- La première voie, majoritaire, est celle de l'excrétion (domestique) des médicaments et de leurs métabolites après utilisation par les patients. La molécule est administrée au patient, absorbée et métabolisée par son organisme pour être excrétée puis rejetée dans les eaux usées qui seront traitées en station d'épuration (STEP). La quantité retrouvée dans les eaux dépend donc, pour cette voie d'apport, de la consommation faite par la population. Celle-ci vieillissant et augmentant, les quantités consommées, et rejetées, ne font que croître. De plus, selon Montague, [7] 50 à 90 % d'un médicament absorbé est excrété sous forme inchangée.
- La seconde voie d'apport est constituée par les rejets des établissements de soins. C'est une source particulière de contamination car les eaux usées de ces établissements ont un profil spécifique et contiennent en quantité plus importantes des antibiotiques, des anti-infectieux, des produits de contraste iodés et des anticancéreux. Elle a été estimée à travers plusieurs études à environ 20 % (Afssaps) de l'ensemble des apports. Les effluents n'étant pas traités sur place, ces rejets se retrouvent dans les STEPs.
- La troisième voie d'apport est constituée par les rejets des médicaments non utilisés à l'évier ou dans les toilettes (environ 10 % selon Bound et Voulvoulis, 2005 [8]).
- La dernière voie d'apport concerne les effluents des industries qui produisent les différentes molécules pharmaceutiques. Ce type de production fait l'objet d'un contrôle sévère de ses effluents après traitement dans les pays développés ; ce n'est pas encore le cas dans les pays émergents où sont fabriqués beaucoup de génériques.

Toutes les différentes classes thérapeutiques sont retrouvées dans les eaux usées mais les quantités sont différentes en fonction de la consommation, du niveau de métabolisation de la molécule et du taux de dilution dans les eaux usées urbaines comme ceci va être présenté dans le chapitre suivant.

Résidus médicamenteux et stations de traitement des eaux usées et eaux superficielles

Les effluents arrivant en STEP sont donc d'origines variées, mais les antibiotiques, les anti-inflammatoires et les analgésiques sont les classes thérapeutiques les plus étudiées et les plus retrouvées à ce niveau dans la littérature.

Le tableau 1, présente une synthèse établie à partir des publications récentes sur les différentes molécules retrouvées selon les classes thérapeutiques, leur concentration moyenne calculée à partir de ces études en entrée et sortie de STEP ainsi que le rendement d'élimination ainsi estimé.

Tableau 1 : Concentrations en résidus pharmaceutiques (en µg/L) dans les influents et effluents de STEP s et rendements d'élimination (d'après Deblonde *et al.*, [9])

Composés pharmaceutiques	Molécules	Influent		Effluent		Rendement d'élimination (%)
		moyenne	n	moyenne	n	
Antibiotiques	Clarithromycine	0.344	2	0.15	2	56,4
	Ciprofloxacin e	0.62	13	0.234	13	62,3
	Doxycycline	0.65	10	0.420	9	35,4
	Erythromycine	0.58	3	0.297	4	48,8
	Erythromycine-H ₂ O	2.025	2	0.59	2	70,9
	Methronidazole	0.09	1	0.055	1	38,9
	Norfloxacin e	0.115	12	0.0526	10	54,3
	Ofloxacin e	0.482	6	0.171	6	64,5
	Roxithromycine	0.78	3	0.472	3	39,5
	Sulfamethoxazole	0.32	10	0.264	11	17,5
	Sulfapyridine	0.492	1	0.081	1	83,5
	Tetracycline	48	1	2.375	2	95,1
	Trimethopri me	0.43	15	0.424	17	1,4
Antiépiléptiques	Carbamazepine	0.732	6	0.774	13	-5,7
Analgésiques et anti inflammatoires	4-aminoantipyrine	1.517	1	0.676	1	55,4
	Antipyrine	0.04	1	0.027	1	32,5
	Codeine	2.8605	2	1.93	2	32,5
	Diclofenac	1.039	6	0.679	11	34,6
	Ibuprofene	13.482	10	3.480	17	74,2
	Indomethacine	0.136	2	0.166	3	-22,1
	Ketoprofen	0.483	5	0.333	9	31,1
	Ketorolac	0.407	1	0.228	1	44,0
Naproxen	5.077	7	0.934	13	81,6	
Régulateurs lipidiques	acide clofibrique	0.215	3	0.131	5	39,1
	acide fenofibrique	0.079	1	0.196	3	-148,1
	Bezafibrate	1.948	4	0.763	5	60,8
	Gemfibrozil	1.562	3	0.757	6	51,5
Bé ta-bloquants	Acebutolol	0.335	1	0.140	1	58,2
	Atenolol	1.080	4	0.468	4	56,7
	Celiprolol	0.44	1	0.28	1	36,4
	Metoprolol	1.535	4	0.679	5	55,8
	Propanolol	0.198	3	0.102	5	48,5
	Sotalol	1.667	2	0.79	2	52,6
Diurétiques	Furosemide	0.413	1	0.166	1	59,8
	Hydrochlorothiazide	2.514	1	1.176	1	53,2

Produits de contraste	Amidotrizoic acid	2.5	1	2.494	1	0,2
	Diatrizoate	3.3	1	3.3	1	0,0
	Iotalamic acid	1.8	1	1.820	1	-1,1
	Iopromide	9.205	2	2.014	3	78,1
	Iomeprol	6.05	2	1.606	2	73,5
	Iohexol	6.7	2	2.706	2	59,6
	Iopamidol	2.3	1	1.9	1	17,4
Desinfectants	Triclosan	0.852	8	0.198	6	76,8
Psycho-stimulants	Caféine	56.634	4	1.771	10	96,9
	Paraxanthine	26.722	1	0.836	1	96,9
Antidépresseurs	Fluoxetine	5.85	1	0.112	2	98,1

Il apparaît que les rendements d'élimination par les stations d'épuration présentés par classes thérapeutiques de façon synthétique dans la figure 1 sont très différents d'une classe pharmaceutique à une autre allant de 0 % pour les antiépileptiques (ex. : carbamazépine) à 50 % environ pour les antibiotiques et à presque 100 % pour les antidépresseurs et psychostimulants. Ainsi, le récent titre provocateur d'un journal à grand tirage « du Prozac au robinet » ne repose guère sur des bases scientifiques !!!

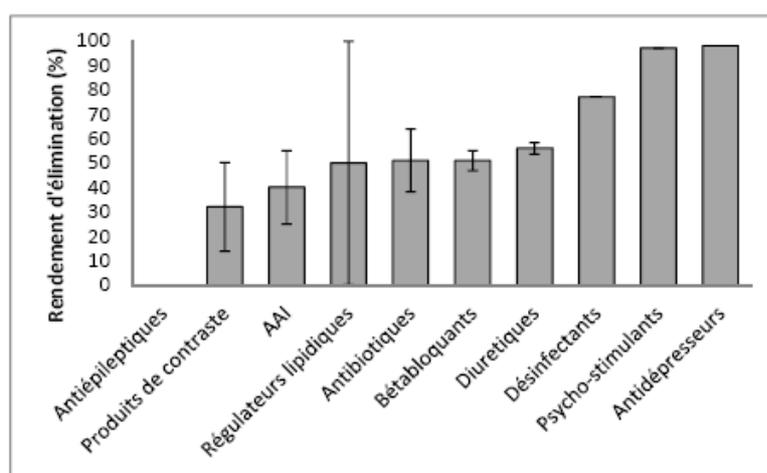


Figure 1

Représentation des rendements d'élimination en STEP par classe thérapeutiques

Les résidus de médicaments non éliminés par les STEP sont rejetés dans les eaux de surface avec les effluents. Par effet de dilution et de photodégradation, les concentrations diminuent ensuite dans les milieux récepteurs.

Dans l'étude de l'agence de l'eau Seine Normandie [10], des traces de résidus médicamenteux ont été retrouvées sur tous les sites qui ont fait l'objet des campagnes. Les substances les plus souvent détectées sont : la carbamazépine [6-40 ng/l], l'acide fénofibrique [2-50 ng/l], l'oxazépam [5-20 ng/l], le paracétamol [30-100 ng/l], le bézafibrate [4-20 ng/l], le métoprolol

Tableau 3. Fréquence de détection et de quantification eaux brutes / eaux traitées

Molécules	Eaux brutes			Eaux traitées		
	Fréquence des résultats quantifiables (>LQ) en %	Fréquence de détection (>LD) en %	Teneur maximale (ng/L)	Fréquence des résultats quantifiables (>LQ) en %	Fréquence de détection (>LD) en %	Teneur maximale (ng/L)
Caféine	28.9	49.6	856	10.9	28.1	115
Oxazepam	18.7	27.1	161	4.0	7.2	91
Paracetamol	13.5	23.6	443	1.1	4.1	71
Carbamazépine	12.6	29.8	48	4.0	9.0	33
Epoxy-carbamazépine	11.3	20.8	8	7.6	14.8	6
Losartan	4.3	10.0	11	0	0.7	traces
Gadolinium anthropique	2.8	2.8	19	1.4	1.4	12
Hydrochlorothiazide	2.6	8.1	48	0	0.7	traces
Ketoprofen	1.8	3.9	258	0.4	0.4	36
Acide salicylique	1.6	2.1	57	1.0	1.0	102
Trimetazidine	1.5	7.4	31	0	0	
Hydroxibuprofène	1.3	5.0	83	2.3	5.8	85
Diclofenac	1.1	2.6	16	0	0	
Ibuprofène	1.1	2.5	19	0	1.4	traces
Naftidrofuryl	1.1	1.8	2	1.8	5.5	3
Sulfadiazine	0.7	1.4	54	0	0.0	
Amlodipine besylate	0	0.4	traces	0	0	
Amoxicilline	0	0.9	traces	0	0	
Atenolol	0	4.8	traces	0	0	
Danofloxacine	0	3.8	traces	0.8	3.5	57
Doxycycline	0	0.5	traces	0	0	
Erythromycine	0	1.7	traces	0	0	
Florfenicol	0	0.8	traces	0	0.4	traces
Fluvoxamine	0	0.4	traces	0	0	
Lincocomycine	0	1.4	traces	0	0	
Ofloxacine	0	2.0	traces	0.8	1.5	35
Parconazole	0	0.4	traces	0	0	
Ramipril	0	0.7	traces	0	0	
Ramiprilate	0	0.7	traces	0	0.4	traces
Tylosine	0	0.4	traces	0.4	2.2	20
17B- Estradiol ;	0	0		0.5	0.5	77
Altenogest ; Ampicilline ; Clorsulon ; Cyclophosphamide ; Dicyclanil ; Estrone ; Furosemide ; Ifosfamide ; Levamisole ; Levonorgestrel ;	0	0		0	0	

Metrifonate ; Pravastatine ; Progesterone ; Ranitidine						
---	--	--	--	--	--	--

Sur les 45 molécules recherchées, 30 ont été détectées au moins une fois et 16 ont été retrouvées à des teneurs supérieures à la limite de quantification dans les eaux brutes. Pour ce qui concerne les eaux traitées destinées à la consommation humaine, 19 molécules ont été détectées au moins une fois et 14 à des teneurs supérieures à la limite de quantification.

La caféine doit être exclue car cette molécule est plus un marqueur de l'activité humaine des ménages qu'un résidu pharmaceutique. Elle est présente dans une eau brute sur deux et dans une eau traitée sur quatre.

En dehors de la caféine, la carbamazépine, l'oxazepam, le paracétamol et l'époxycarbamazépine sont les molécules les plus retrouvées dans les eaux brutes. Dans les eaux traitées, ce sont l'époxycarbamazépine, la carbamazépine, l'oxazepam et l'hydroxibuprofène.

La molécule avec la concentration maximale dans l'eau brute est le paracétamol (400 ng/L) tandis que l'acide salicylique présente la plus haute concentration retrouvée dans l'EDCH.

L'EDCH provient, selon les réseaux de distribution, d'eaux brutes superficielles ou d'eaux brutes souterraines. Selon le rapport du Laboratoire d'Hydrologie de Nancy, les molécules médicamenteuses retrouvées dans les deux types d'eaux sont généralement les mêmes. La différence se fait surtout au niveau de la fréquence de quantification. Celle-ci est plus importante dans les eaux brutes superficielles que dans les eaux brutes souterraines. Ainsi par exemple, plus de 40 % d'échantillons sont positifs à l'Oxazepam dans les eaux brutes superficielles et moins de 10 % dans les eaux brutes souterraines.

La caféine est également plus fréquemment quantifiée dans les eaux d'origine superficielles avec plus de 50 % d'échantillons positifs.

Il est nécessaire de remarquer que 35 % des eaux brutes superficielles et 70 % des eaux brutes souterraines ne renferment aucune molécule quantifiable.

Conclusion

La pollution des eaux par des molécules pharmaceutiques est faible en termes de concentration mais constante, ce qui lui confère une pseudo-persistance dans le milieu aquatique. Les effets peuvent être de deux ordres : démontrés sur des espèces animales et végétales de ce milieu, tout à fait hypothétiques sur l'homme. Dans ce cadre, les concentrations maximales retrouvées dans l'EDCH sont très largement inférieures aux doses thérapeutiques ; il faut, selon la molécule, consommer plusieurs milliers ou millions de litres d'EDCH pour ingérer l'équivalent d'une dose. Par ailleurs, la toxicologie de ces molécules est bien connue, ce qui n'est pas le cas de nombreuses autres molécules polluantes présentes dans ces mêmes eaux (ex. biocides). Cependant, on ne peut pas négliger d'éventuels effets à faible dose chronique de type effet cocktail avec des synergies entre molécules.

Dans ce contexte, il est largement souhaitable de s'intéresser à cette question comme l'ont fait nos collègues suédois.

Ainsi, des substitutions sont possibles, comme le montre l'exemple de la prescription médicamenteuse en Suède [15]. Dans ce pays, les molécules à usage pharmaceutique ont été classées en fonction de leur impact sur l'environnement avec un indice simple qui prend en compte leur toxicité, leur persistance et leur possible bioaccumulation par les flores et faunes hydriques. Dans ce pays, le médecin prend donc en compte ce troisième critère, en plus de l'efficacité thérapeutique et du coût, lors de sa prescription. En quelques années, les résultats sont là. Lorsqu'il y a substitution possible, la molécule la moins toxique pour l'environnement a supplanté les autres. L'industrie pharmaceutique travaille donc maintenant sur ce critère avant toute mise sur le marché.

Références

1. Académie Nationale de Pharmacie, "Médicaments et environnement". Rapport, 2008.
2. Hignite C, Azarnoff D. Drugs and drugs metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent, *Life Sci* 1977;20:337-41.
3. Gameson A, Wheeler A. Restoration and recovery of the Thames estuary. In Gameson, Caims, Dickson & Herricks eds. University Press of Virginia, USA 1977:531 pp
4. Allen Y, Matthiesen P, Scott AP, Haworth S, Feith S, Thain JE. The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments - further surveys of flounder. *Sci Total Environ* 1999;233:5-20.
5. Schwartzenbach RP, Escher BI, Fenner K, Hofstetter TB, Johnson CA, von Gunten U, Wehrli B. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 2006;313:1072-81.
6. Mullett JU. Modélisation des flux de médicaments dans les effluents hospitaliers. Thèse 2010.
7. Montague P. Drug in the water. Rachel's. Environment and Health Weekly #614. Environmental Research Foundation, 1998 available on: <http://www.monitor.net/rachel/r614.html>, 05/04/2001
8. Bound JP, Voulvoulis N. Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom, *Environ Health Perspect* 2005;113:1705-11.
9. Deblonde T, Cossu-Leguille C, and Hartemann P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int J Hyg Envir Heal* 2011;214:442-8.
10. Duchemin J, Tracol R. Evaluation de l'occurrence des résidus de médicaments dans un échantillon de nappes souterraines vulnérables du bassin Seine-Normandie utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine. AESN/DRASS 14. Rapport de synthèse, 2009.
11. Anderozzi R, Raffaele M, Nicklas P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, *Chemosphere* 2003;50:1319-30.
12. Zuccato E, Calamari D, Natangelo M, Fanelli R. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 2000;355:1789-90.
13. ANSES. Campagne nationale d'occurrence des résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine. Rapport, 2011.
14. AFSSA. Hiérarchisation des résidus médicamenteux d'intérêt pour l'analyse des ressources et des eaux traitées. Rapport, 2008.
15. Swedish Medical Product Agency (MPA). Environmental effect of pharmaceuticals and cosmetic and hygiene products (Miljöpåverkan från läkemedel samt kosmetiska och hygieniska produkter). Report, 2004.

D'après les données exposées précédemment concernant l'état de la pollution des différentes masses d'eau par des résidus pharmaceutiques, la capacité d'épuration des STEPs et l'origine de cette pollution, il semblait nécessaire d'effectuer un suivi de cette pollution jusqu'au consommateur et donc d'évaluer la contamination de l'EDCH.

Le but de cette analyse était d'identifier les molécules présentes à chaque étape de la production d'EDCH. Ainsi, cet article traite successivement de l'origine des substances actives et leurs métabolites dans les eaux, puis de l'occurrence des résidus de médicaments dans les STEPs et dans les eaux superficielles, pour finir par un état des lieux de la présence de ces résidus dans l'EDCH.

Les molécules les plus fréquemment retrouvées avant et après traitement de potabilisation sont : la caféine (psycho-stimulant) pour laquelle il est difficile de différencier la part médicamenteuse de la part issue de l'activité des ménages (consommation de café), l'oxazepam (psychotrope de la famille des benzodiazépines), le paracétamol (antalgique), la carbamazépine (anti-épileptique) et l'époxy-carbamazépine (métabolite de la carbamazépine), le gadolinium (produit de contraste iodé), l'acide salicylique (antalgique, anticoagulant), l'hydroxy-ibuprofène (métabolite de l'ibuprofène, anti-inflammatoire) et le naftidrofuryl (vasodilatateur).

Quelques molécules sont présentes dans les prélèvements avant potabilisation mais ne sont retrouvées qu'en quantités négligeables après traitement. Il s'agit du losartan (diurétique), de l'hydrochlorothiazide (diurétique) et du kétoprofène (anti-inflammatoire).

Enfin, l'acide salicylique, s'il n'est retrouvé que dans 1,0% des prélèvements d'eaux traitées, présente les concentrations les plus élevées lorsqu'il est présent (102 ng/L).

1.4. Les dangers et le risque pour la santé humaine

L'exposition humaine aux résidus de médicaments présents dans l'environnement est quasi-inévitable. Aucun milieu aquatique (eaux souterraines, eaux de surface, eaux traitées, eau destinée à la consommation humaine) n'est totalement exempt de contamination par des principes actifs. Nous avons également identifié les molécules présentes dans les différents compartiments hydriques de l'environnement et leurs concentrations, en particulier dans les eaux usées et les eaux destinées à la consommation humaine. Ainsi, si certains médicaments se retrouvent seulement à l'état de traces (ex. : amoxicilline, atenolol, erythromycine), d'autres sont capables de rester présents à des taux non négligeables même après traitement de l'eau en station d'épuration et en station de potabilisation (acide salicylique 102 ng/L, oxazepam 91 ng/L, paracétamol 71 ng/L).

La mise en lumière de quelques effets des résidus de médicaments sur la faune aquatique (ex. : perturbation endocrinienne avec effets oestrogènes like chez les poissons d'eau douce liée au rejet d'hormones telles que les oestrogènes dans les rivières (Allen, 1999) a encouragé les

recherches concernant l'effet sanitaire des substances actives et de leurs métabolites environnementaux sur la santé humaine. Toutefois, cette prise de conscience est relativement récente, ce qui explique la pauvreté de la littérature scientifique à ce sujet.

Les risques sanitaires liés aux résidus de médicaments retrouvés dans les eaux destinées à la consommation humaine ont été étudiés. Selon le rapport de l'ANSES (2013), les risques liés à l'ingestion de médicaments *via* l'EDCH sont considérés comme négligeable. La question des risques liés au mélange à faibles doses des résidus reste posée.

Nous avons retrouvé une publication permettant d'évaluer ce risque de façon argumentée : en 2003, Webb *et al.* estimaient le danger comme nul pour la majorité des résidus de médicaments identifiés dans l'eau de boisson allemande suite à la recherche de résidus de médicaments. Les analyses ont été réalisées à l'aide de chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse. Les résidus recherchés étaient des analgésiques, des antihypertenseurs, des anticancéreux, des hormones ou encore des anti-épileptiques. Une comparaison avec les doses thérapeutiques a été effectuée afin de déterminer sur une période de 70 ans le nombre de doses ingérées par un habitant pour chaque molécule. Dans cette étude, la consommation d'eau du robinet a été extrapolée de la manière suivante : 2L / jour pour un adulte.

Ces auteurs ont néanmoins mis en exergue cinq molécules pour lesquelles les doses absorbées pendant 70 ans pouvaient dépasser la dose thérapeutique : le clenbutérol (anabolisant interdit en France : 25,5 doses thérapeutiques), le cyclophosphamide (anticancéreux), le salbutamol (broncho-dilatateur, mais aussi myorelaxant utérin), le 17 α -éthynylestradiol (hormone contraceptive : 2,5 doses thérapeutiques) et la terbutaline (anti-asthmatique : 2,1 doses thérapeutiques) (Webb, 2003).

Cependant, ces auteurs n'ont pas fait le parallèle dans leur étude entre ces affirmations et d'éventuels effets cliniques observés sur la population générale.

A ce jour, il n'existe aucune limite réglementaire pour les résidus de médicaments dans les eaux, qu'il s'agisse d'eau potable, des milieux aquatiques ou des rejets de STEP. Il est donc difficile de déterminer pour chaque molécule des valeurs toxiques aiguës ou chroniques. Nous proposons donc de nous appuyer sur les valeurs thérapeutiques usuelles, telles qu'elles sont décrites dans les Résumés des Caractéristiques des Produits (RCP) figurant dans les dossiers d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) des médicaments.

Notre état des lieux des dangers en santé humaine liés aux résidus de médicaments s'intéresse prioritairement aux résidus de médicaments et leurs métabolites à usage humain retrouvés dans l'EDCH.

Nos calculs, présentés dans le tableau I-2, sont basés sur le scénario d'une ingestion quotidienne de 2L d'eau du robinet pour calculer la dose quotidienne administrée. Pour les doses cumulées vie entière, nous nous sommes basés sur l'espérance de vie moyenne de 70 ans.

Tableau I-2 Extrapolation des doses cumulées vie entière en résidus de médicaments retrouvés après traitement en station d'épuration (d'après la campagne d'analyse de l'ANSES)

Molécules	Dose maximale retrouvée (ng/L)	Dose cumulée (70 ans) (mg)	Dose thérapeutique	Rapport dose cumulée/ dose thérapeutique
Oxazepam	91	4,56	20 à 150 mg/j (mini 10mg par prise)	0,228
Paracétamol	71	3,6	2 à 3 g/j (mini 500mg/prise)	0,0018
Gadolinium	12	0,6	Solution liquide préparée à partir de sels Difficilement extrapolable	
Ketoprofène	36	1,8	100 à 300 mg/j (mini 50mg/prise)	0,018
Acide salicylique	102	5,21	1 à 2g/j d'acide acétyl salicylique	Métabolite NA
Hydroxibuprofène	85	4,34	200 à 600 mg/j d'ibuprofène	Métabolite NA
17 α -éthinyloestradiol	77	3,93	20 à 30 μ g/j (prise idem)	0,19
Tylosine	20	1,02	NA (médicament vétérinaire)	NA
Danofloxacin	57	2,91	NA (médicament vétérinaire)	NA
Carbamapépine	33	1,7	600 à 800 mg/j (mini 200mg/prise)	0,0028

NA : Non Applicable

De manière générale, aucun résidu de médicaments n'est présent de manière à ce qu'on atteigne la dose thérapeutique par ingestion d'eau en une journée. Les résultats de notre analyse concordent avec les données retrouvées dans l'étude de Webb, notamment pour l'éthinyl-oestradiol.

L'extrapolation ci-dessus obtenue à partir des données de la littérature présente toutefois des limites.

D'abord, les risques avérés pour la santé humaine liés à cette absorption de faibles doses pendant la vie entière restent totalement inconnus. En effet, les données toxicologiques disponibles sont issues des dossiers d'autorisation de mise sur le marché (AMM) et correspondent aux doses efficaces et toxiques destinées à évaluer les effets à court ou moyen terme avec des doses thérapeutiques, et non les effets chroniques avec de petites doses. A partir de cette méthode, l'ingestion de résidus de médicaments à partir d'aliments contaminés soit par arrosage soit par bioaccumulation dans les tissus des animaux consommés n'est pas prise en compte. D'ailleurs, à la suite du Grenelle de l'environnement et du plan national santé environnement (PNSE 2 « Recherche de contamination des rejets urbains et des eaux superficielles par les médicaments »), un plan national de lutte contre la présence de résidus de médicaments dans les eaux a été élaboré. Les préoccupations au niveau français, européen et mondial sont surtout tournées vers les molécules pouvant avoir des effets biologiques à faibles doses.

De plus, l'impact des mélanges de résidus de médicaments, mais également les effets d'interactions des résidus de médicaments avec d'autres polluants présents dans les eaux, sont difficiles à estimer car encore trop peu étudiés et appréhendés. Ces effets peuvent par exemple être synergiques et augmenter le danger, en particulier chez les personnes sensibles comme les enfants ou les femmes enceintes.

Enfin, dans son rapport de 2008 intitulé « Médicaments et environnement », l'Académie de Pharmacie identifie un manque de données sur les effets à faible doses des molécules anticancéreuses. Pour tenter d'avancer dans ce domaine, nous mettrons en œuvre dans la troisième partie de notre travail une évaluation de ces effets.

1.5. L'ampleur du problème en France et les réponses des pouvoirs publics

Bien que les quantités de résidus de médicaments retrouvées soient infimes (de l'ordre du nanogramme), leurs conséquences environnementales et sanitaires sont encore mal connues. Les préoccupations actuelles concernent les possibles impacts chroniques sur les écosystèmes et la présence de ces résidus à faible dose dans les eaux destinées à la consommation humaine, et par conséquent leur possible impact sur la santé humaine.

Au niveau européen, la directive-cadre sur l'eau (DCE) impose l'identification et la caractérisation des eaux européennes par bassin et district hydrographiques, ainsi que l'adoption de « plans de gestion » et de « programmes de mesures » appropriés à chaque masse d'eau, le premier devant couvrir la période 2010-2015. L'objectif pour 2015 est le « bon état écologique », preuves à l'appui, des milieux aquatiques et du bassin versant, seul moyen de garantir une gestion durable et soutenable de l'eau.

Plus particulièrement, en France, un premier Plan national santé-environnement (PNSE 1) a été élaboré pour la période 2004-2008 (PNSE, 2004). Il rassemblait 45 actions classées en 8 axes et visait à couvrir le champ des interrelations entre environnement et santé, dont l'identification et une meilleure prise en compte de l'ensemble des polluants et des milieux de vie. L'un de ces axes était la mise en œuvre de la législation relative à l'eau.

Le deuxième plan national environnement santé (PNSE 2, 2009) intégrant les préconisations du Grenelle de l'environnement et adopté en 2009, propose dans l'une de ses 12 actions phares d'améliorer la connaissance et de réduire les risques liés aux rejets de médicaments dans l'environnement, en engageant des travaux en vue de l'élaboration d'un plan d'action national sur les résidus de médicaments (Grenelle de l'environnement, 2007).

En 2011, les ministères chargés de l'Écologie et de la Santé ont lancé un premier Plan national sur les résidus de médicaments dans l'eau (PNRM) pour évaluer et prioriser le risque éventuel lié à leur présence dans les milieux aquatiques, les conséquences écosystémiques et sanitaires et les modes de gestion et de contrôles possibles. Il doit aussi proposer des actions de réduction de la dispersion médicamenteuse dans l'eau, tout en développant la recherche sur les moyens d'élimination et sur les effets de ces molécules (PNRM, 2011).

Suite à ce constat, la question du pré-traitement des effluents hospitaliers avant relargage dans le réseau domestique semble inévitable. Des pistes sont avancées comme la collecte de l'urine des patients, mais aussi la filtration avant rejet dans le réseau d'assainissement, la mise en place d'une station de pré-traitement des rejets afin de diminuer la charge polluante, voire l'adjonction de traitements spécifiques adaptés au type de pollution.

La politique de développement durable et de réduction de la consommation d'eau pourrait entraîner une sur-concentration de cette pollution. Des politiques visant à rationaliser l'eau et à mettre en place des notions de suivi de la qualité de l'eau pourraient voir le jour.

1.6. Synthèse de notre revue de la littérature

Il ressort de notre revue de la littérature que des médicaments et autres polluants organiques sont déversés en grande quantité dans nos eaux usées. Les hôpitaux participent à la contamination médicamenteuse des eaux usées, mais dans une mesure n'excédant pas 15% de la pollution totale des réseaux, le reste émanant des effluents domestiques. Par contre, ils se révèlent être une source importante de composés organiques à base de nitrates du fait de

l'utilisation très fréquente de détergents-désinfectants. Le risque biologique, quant à lui, semble négligeable.

Les résidus de médicaments les plus fréquemment retrouvés dans les eaux usées sont les antibiotiques, les hypolipémiants, les analgésiques et anti-inflammatoires, les anti-dépresseurs, les hormones et les anticancéreux.

Si certaines molécules sont éliminées de façon très satisfaisante par les stations d'épuration (anti-dépresseurs et psycho-stimulants, éliminés à plus de 80%), d'autres au contraire persistent dans les effluents de STEP (diurétiques, β -bloquants, antibiotiques, éliminés à 50% environ ; hypolipémiants et produits de contraste, éliminés à 30 environ). Certains médicaments sont même retrouvés dans les effluents en concentration supérieure aux concentrations d'entrée (carbamazépine, phénomène lié à une déconjugaison du métabolite permettant de régénérer la molécule active). Ces résidus de médicaments persistants sont donc rejetés dans le milieu récepteur, où ils sont dilués.

Bien que l'eau captée pour être transformée en eau destinée à la consommation humaine soit traitée en station de potabilisation, il arrive que certains résidus de médicaments soient retrouvés dans l'eau mise à disposition du grand public. Par exemple la caféine (psycho-stimulant), l'oxazepam (psychotrope), le paracétamol (antalgique), la carbamazépine (anti-épileptique) et ses métabolites, voire même l'acide salicylique (antalgique, anti-coagulant) sont retrouvés en quantité non négligeable par certains auteurs après passage en station de potabilisation.

Bien entendu, aucune dose thérapeutique ne peut être atteinte lors de la consommation quotidienne d'eau. Cependant, la consommation cumulée « vie entière » peut parfois atteindre les doses utilisées en clinique, voire les dépasser. Cinq molécules (clembutérol, cyclophosphamide, salbutamol, 17α -éthynyl-oestradiol, terbutaline) pourraient ainsi être absorbées dans des quantités supérieures à une dose thérapeutique. Néanmoins, l'impact clinique sur la santé humaine de cette exposition à des doses infimes en continu n'a jamais pu être évalué. Si la comparaison entre les concentrations retrouvées dans l'environnement et les doses thérapeutiques quotidiennes est possible, le risque pour la santé n'est pas avéré.

D'ailleurs, la pollution de l'eau par ces molécules chimiques reste une préoccupation des autorités, et plusieurs plans nationaux de gestion de la qualité de l'eau font état de cette problématique et cherchent à améliorer la situation actuelle.

Notre état des connaissances s'est voulu exhaustif, et a été construit à partir des données disponibles dans la littérature scientifique. Cependant, les informations relatives à la pollution de l'eau revêtent parfois un caractère confidentiel, et aucune base de données accessible au grand public ou aux chercheurs n'existe dans ce domaine. Ce point sera discuté en partie 4.1 de notre travail.

Finalement, au regard de notre revue de la littérature, nous sommes parvenus à appréhender les risques sanitaires sur la santé humaine des résidus de médicaments. Toutefois, le nombre de molécules relevées dans les différents travaux est très important, et leurs concentrations sont disparates. Il s'avère impossible de conduire simultanément des travaux de recherche sur la totalité de ces molécules ; il devient donc nécessaire d'ordonner ces informations, afin de sélectionner de la façon la plus pertinente possible les molécules présentant un risque pour la

santé humaine.

C'est pourquoi, partir de ces données issues de notre revue de la littérature, nous avons construit notre démarche originale de hiérarchisation des molécules à prendre en compte dans les futures études de santé publique relatives au lien entre la santé humaine et la présence de résidus de médicaments dans les environnements aquatiques. Cette démarche est présentée dans la partie 2 de ce mémoire de thèse.

2. Méthode de hiérarchisation

Les molécules médicamenteuses sont retrouvées dans tous les compartiments aquatiques de l'environnement et particulièrement dans les eaux de surfaces et/ou dans les eaux souterraines. Elles peuvent ainsi se retrouver dans les sites de captage de l'eau qui sera potabilisée pour devenir de l'EDCH. Les stations de potabilisation ne permettant pas de les éliminer en totalité, certains résidus de médicaments vont se retrouver dans l'eau potable et seront bus par les consommateurs. Leur suivi dans l'environnement aquatique est donc une priorité afin de connaître, puis de maîtriser l'exposition des personnes.

Malheureusement, le nombre de molécules médicamenteuses et de leurs métabolites présents dans les eaux usées est très important. La non connaissance de l'exposition précise à chaque molécule, ainsi que les possibilités de mélanges quasiment infinies, rendent impossible la mise en œuvre d'une démarche « classique » d'évaluation quantitative des risques sanitaires (EQRS). Il est toutefois nécessaire de déterminer les molécules dont le suivi est pertinent en appliquant une autre méthode de hiérarchisation.

2.1. Principes généraux

Généralement, la hiérarchisation se déroule en 4 étapes

- 1- Cerner la liste des molécules candidates, c'est-à-dire la liste des substances devant être hiérarchisées.
- 2- Attribuer à chaque molécule un score de danger et un score d'exposition.
- 3- Combiner les données disponibles afin d'aboutir à un score composé final par molécule.
- 4- Proposer une liste hiérarchisée de substances en incluant éventuellement des considérations complémentaires non prises en compte lors des étapes précédentes (considérations pratiques, financières, connaissances déjà acquises, méthodes analytiques, etc.).

2.2. Évaluation de risque et méthodes de hiérarchisation déjà utilisées

Il est actuellement reconnu à l'échelle mondiale que des résidus de médicaments contaminent l'environnement. Face à cette pollution émergente, une évaluation de risque s'est révélée nécessaire dans le but de définir une stratégie d'action sur le moyen terme, pour limiter l'exposition à ces principes actifs, avant d'être confronté à des problèmes environnementaux ou de santé avérés. En raison du nombre élevé de molécules présentes sur le marché, plusieurs organismes et auteurs ont tenté de classer les produits pharmaceutiques selon des critères

pertinents (occurrence, écotoxicité, etc.) à l'aide de méthodes de hiérarchisation différentes.

- Méthodes de hiérarchisation des risques utilisées

La première, la Food and Drug Agency (FDA) a proposé en 1998 une méthode dédiée à l'évaluation de risque pour les médicaments à usage humain. Cette méthodologie a été reprise en 2006 par l'agence européenne du médicament (EMA) dans son guide pour l'évaluation du risque environnemental (EMA, 2006). Elle se base sur le calcul de quotients de risque pour lesquels la détermination d'une PEC (concentration prédite dans l'environnement) et d'une PNEC (concentration prédite sans effet) est nécessaire.

Cette méthode, dont **la figure 1** présente un schéma récapitulatif proposé par Besse et Garric en 2007, comporte trois étapes :

- La première consiste à évaluer les expositions par le calcul d'une Predicted Environmental Concentration (PEC) réalisée selon un scénario de pire cas, selon la formule suivante :

$$\text{PEC (en } \mu\text{g/L)} = [\text{SA(kg/an)} * 10^9] / [\text{nombre d'habitants} * 200 * 10 * 365]$$

où SA est la quantité de substance active vendue au cours d'une année sur la région étudiée. Ce chiffre est en effet souvent plus facile à obtenir que les données de consommation mais sous-entend que l'ensemble de la substance active vendue soit consommée ;

où le nombre d'habitants de la région étudiée constitue l'effectif rejetant des eaux usées ;

où 200 correspond à l'estimation du nombre de litres d'eaux usées éliminés par jour et par habitant ;

et 10 correspond à un facteur de dilution entre les effluents et le milieu naturel.

Lorsque la PEC ne dépasse pas 0,01 $\mu\text{g/L}$ et que rien ne laisse supposer un éventuel impact de la substance sur l'environnement, celle-ci est considérée comme sans danger et aucune investigation complémentaire n'est requise.

Pour les autres molécules, la PEC peut être affinée en prenant en compte la métabolisation dans l'organisme et l'élimination en STEP.

- La deuxième étape consiste à évaluer la relation dose-effet en calculant une Predicted No Effect Concentration (PNEC), dérivée de la No Observed Effect Concentration (NOEC) utilisée dans les tests écotoxicologiques, à laquelle est appliqué un facteur d'extrapolation (AF) compris entre 1 et 1 000 en fonction de la qualité des données et des conditions de réalisation des tests :

$$\text{PNEC} = \text{NOEC} / \text{AF}$$

- La dernière étape consiste à caractériser le risque en combinant les données obtenues aux deux étapes précédentes par le calcul d'un ratio de danger **PEC / PNEC**.

Lorsque le ratio est inférieur à 1 c'est à dire que la PEC est inférieure à la PNEC, la substance active ne représente en théorie aucun danger pour l'environnement aquatique.

A l'inverse, lorsque le ratio de danger est supérieur à 1 ou encore que la PEC est supérieure à la PNEC, la substance est considérée comme à risque pour l'environnement aquatique.

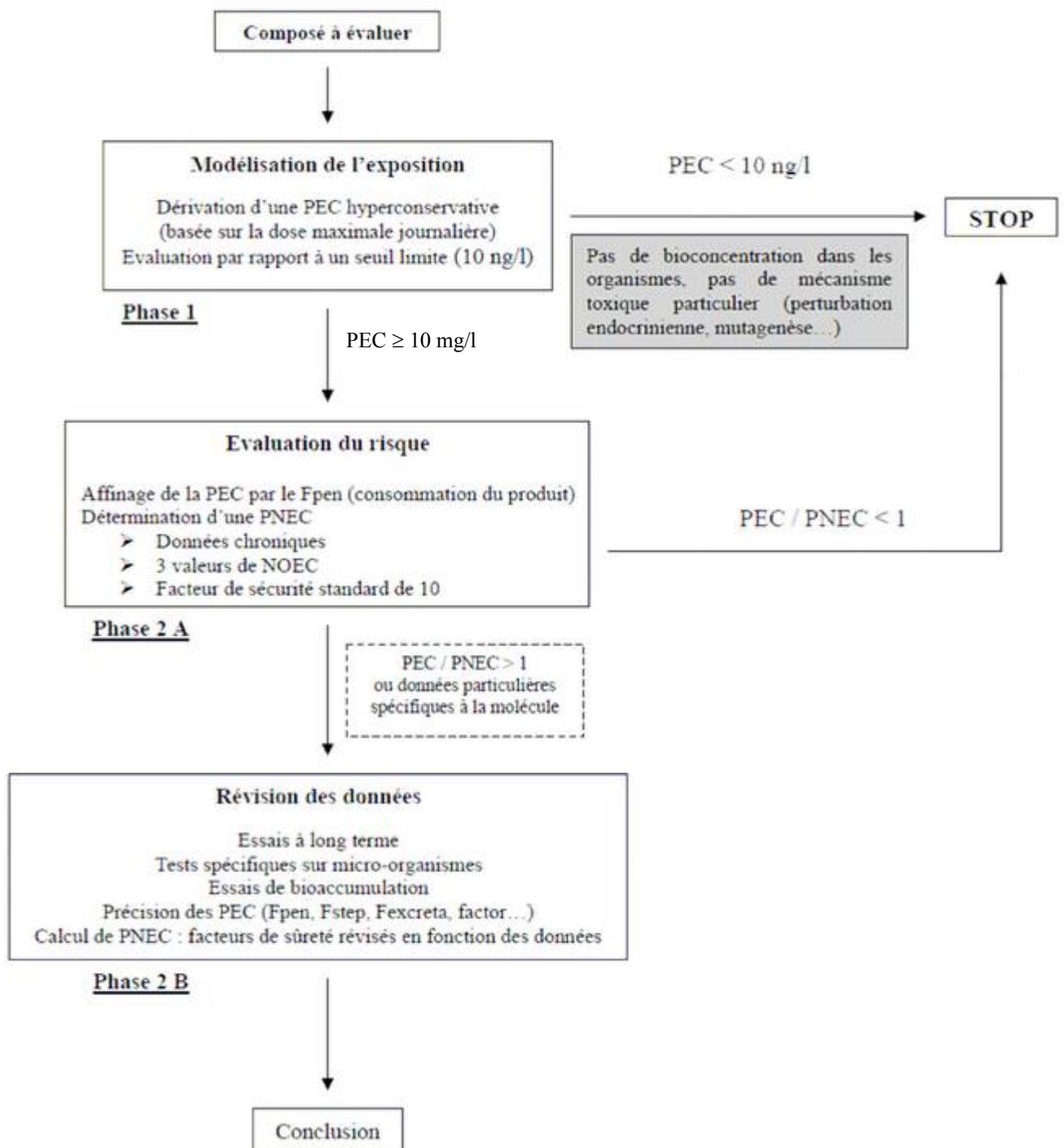


Figure 2-1. Schéma récapitulatif de la procédure EMEA 2006

Cette méthode a été utilisée dans de nombreux pays au cours des dix dernières années, notamment dans l'une des premières évaluations du risque lié à la présence de médicaments à usage humain dans l'environnement, conduite au Danemark en 2000 par Stuer-Lauridsen *et al.*

Dans cette étude, les 25 médicaments les plus consommés au cours de l'année 1997 ont été évalués et les auteurs ont retrouvé un excès de risque pour l'Ibuprofène, le Paracétamol et l'Acide acétylsalicylique.

D'autres pays européens se sont également penchés sur la question du risque environnemental induit par les résidus de médicaments. L'Allemagne a conduit en 2004 une évaluation des 111 principes actifs les plus consommés (tonnage annuel supérieur à 5 000 kg). Cette étude fut la première à introduire la prise en compte du métabolisme de ces molécules dans le calcul de la PEC (Huschek, 2004).

En Italie, Zuccato *et al.* ont mené en 2005 une étude pour mesurer la contamination de l'environnement aquatique. Les molécules étudiées ont été sélectionnées sur la valeur de la PEC, qui prenait en compte le pourcentage d'excrétion sous forme inchangée dans les urines. Les mesures de terrain ont montré que la concentration dans les effluents de STEP pour l'Ofloxacin, le Furosémide, l'Aténolol, l'Hydrochlorothiazide, la Carbamazépine, la Ranitidine, la Ciprofloxacine, le Sulfaméthoxazole et l'Ibuprofène était de l'ordre de la centaine de nanogrammes par litre.

Enfin, en France, une évaluation de risque a été menée en 2006 (Besse, 2008) selon la méthode EMEA pour 112 molécules mères.

En raison de ce manque de données d'écotoxicité, certains auteurs se sont intéressés aux méthodes alternatives permettant d'évaluer les effets biologiques des résidus de médicaments sur les organismes aquatiques, comme les modèles QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) qui corrélient l'activité biologique à la structure chimique de la molécule.

Par exemple, l'Agence environnementale du Royaume-Uni a commissionné en 2003 une évaluation de risque pour les résidus pharmaceutiques à usage humain dans le but de cibler un programme de surveillance des STEPs et des rivières anglaises. La méthodologie utilisée combinait deux approches différentes : le calcul de ratios de risque selon la méthode de l'EMA et l'évaluation des effets en utilisant un modèle QSAR dans lequel chaque substance est définie par trois critères : la persistance, la bioaccumulation et la toxicité (critères PBT). Dans cette étude, onze molécules ont été identifiées comme pouvant présenter un risque : le Triméthoprime, le Diclofénac, le Sulfaméthoxazole, le Paracétamol, l'Acide méfénamique, l'Ibuprofène, l'Erythromycine, le Dextropropoxyphène, la Lofépramine, le Tamoxifène et le Propanolol (Hilton, 2003).

En dernier lieu, la Suède a choisi une troisième approche lorsqu'une évaluation de risque a été implémentée à l'échelle nationale. L'objectif était d'apporter des informations concrètes aux praticiens prescripteurs de médicaments, afin de réduire les taux de résidus de médicaments dans les sols, l'air et le milieu aquatique. Les composés ont été classés selon deux critères : le risque environnemental d'une part, et le danger estimé par les critères PBT (Persistance, Bioaccumulation, Toxicité) d'autre part :

- la persistance a été évaluée à partir de tests de dégradation ;
- le potentiel de bioaccumulation a été apprécié au moyen du logarithme du coefficient de partition octanol / eau (log K_{ow}) ;

- la toxicité a été estimée à l'aide des tests écotoxicologiques réalisés sur trois niveaux trophiques (l'algue, le mollusque et le poisson).

Les scores de danger PBT et de risque environnemental ont ensuite été agrégés pour obtenir une classe de risque (« insignificant, low, moderate or high »). Les détails de cette étude sont disponibles en ligne sur le site de Conseil régional de Stockholm (www.janusinfo.se/environnement).

Les molécules les plus à risque sont : l'acide acétylsalicylique, le propranolol, l'oestradiol, l'amoxicilline, l'acide mycophénolique, la sertaline (« moderate risk »), ou encore l'éthinyl oestradiol (seule molécule classée en « high risk »). Toutefois, les risques inhérents à de nombreuses molécules n'ont pas pu être évalués.

Les conclusions de tous ces travaux sont similaires, à savoir que par manque de données écotoxicologiques, il n'est possible de calculer une PNEC que pour un nombre restreint de composés pharmaceutiques. Ainsi, les auteurs s'accordent à dire que les ratios de danger ne sont pas suffisants à eux seuls pour prioriser les résidus de médicaments. Par conséquent, une méthode de hiérarchisation combinant le calcul d'une PEC avec d'autres données disponibles (littérature, modèles) doit être mise en place.

- Synthèse des différentes méthodologies utilisées

Choix des molécules candidates

Les molécules candidates sont souvent les molécules les plus utilisées par la population générale ou les industries. En effet, ces molécules sont les plus à même de se retrouver en grande quantité dans les eaux usées.

Les données de consommation des produits pharmaceutiques peuvent provenir des diverses agences nationales françaises, des données fournies par les grossistes, mais également les données de production annuelle.

Pour être candidate à la priorisation, une molécule doit également avoir déjà été détectée et quantifiée dans l'environnement par d'autres auteurs. Il doit exister une méthode de dosage pour cette molécule.

Le score d'exposition

Selon les études, ce score est calculé de différentes façons. Dans les cas les plus simples, le score d'exposition correspond à la quantité produite ou consommée. Ainsi, les molécules les plus consommées obtiennent les scores les plus importants. Certains auteurs, affinent cette méthode en utilisant par exemple le métabolisme dans le corps humain pour les composés pharmaceutiques.

Le score le plus utilisé est le score PEC. Sa formule est exposée ci-dessous.

Score PEC (médicament) = dose maximale consommé par un patient traité X pourcentage de pénétration du marché (1% par défaut) / [volume d'eaux usées produit par un habitant par jour (200L par défaut) X dilution (10 par défaut)]

Les limites de ce score d'exposition sont les suivantes :

- peu de données, voire données inexistantes, pour certaines molécules émergentes,
- pas de prise en compte de la transformation dans l'environnement,
- non utilisation des données physico-chimiques des molécules (adsorption, dégradation dans les eaux, etc.).

Le score de danger

Les critères de sélection du score de danger doivent être choisis avec le plus grand soin. Ils doivent être assez discriminants pour ne pas faire entrer dans la liste définitive des polluants qui n'auraient pas d'intérêt. Par ailleurs, ils ne doivent pas être trop restrictifs sous peine de risquer de ne pas suivre des polluants d'intérêt.

Les scores de danger utilisés dans la majorité des études que nous avons retrouvées sont ceux émanant des études d'écotoxicologie (PNEC), mais certains auteurs caractérisent le danger d'un point de vue toxicologique en comparant les concentrations retrouvées dans l'environnement à d'autres dimensions :

- utilisation des doses produisant un effet pharmacologique donné (dose définie journalière par exemple) ;
- utilisation de doses maximales tolérées, dérivées à partir d'autres contextes, comme par exemple la fixation des seuils de résidus de médicaments dans les denrées animales (Webb, 2003 ; Carman 2005) ;
- utilisation de seuils de préoccupation toxicologique, qui peuvent être communs à toutes les substances chimiques possédant des propriétés données, composés pharmaceutiques ou non. Ces seuils peuvent également correspondre par défaut aux seuils critiques de 0,1 µg/L et 0,01 µg/L.

La méthode QSAR évalue le danger de manière plus théorique, au regard des groupements chimiques qui entrent dans la composition des molécules étudiées, et de leurs effets connus sur l'environnement.

Enfin, la méthodologie PBT propose un score de danger basé sur trois caractéristiques des molécules : leur bioaccumulation, leur persistance et leur toxicité dans l'environnement. Une synthèse de l'intérêt de cette méthode a été réalisée et est présentée dans l'article suivant : T. Deblonde, P. Hartemann. Environmental impact of medical prescriptions: assessing the risks and hazards of persistence, bioaccumulation and toxicity of pharmaceuticals. Public Health, 2013, article in press.

Available online at www.sciencedirect.com

Public Health

journal homepage: www.elsevier.com/puhe

Narrative Review

Environmental impact of medical prescriptions: assessing the risks and hazards of persistence, bioaccumulation and toxicity of pharmaceuticals

T. Deblonde, P. Hartemann*

Département Environnement et Santé Publique – Service d'Études et de Recherche en Environnement et Santé, Inserm U954, Faculté de Médecine, Vandœuvre les Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 January 2012
Received in revised form
12 October 2012
Accepted 30 January 2013
Available online xxx

Keywords:
Medical prescriptions
Risk assessment
Toxicity
Environmental impact

ABSTRACT

In the context of increasing concerns regarding sustainable development, healthcare workers must consider practices that are not harmful to the environment. 'Primum non nocere' is of great value for the residues of pharmaceuticals and biocides resulting from medical prescriptions. Stockholm County Council has developed a simple classification system covering both environmental risks and hazards of pharmaceuticals according to their persistence, bioaccumulation and toxicity. This classification, which is easy to understand and well accepted among Swedish medical doctors, could be a model for other countries and useful to general medical doctors wishing to be environmentally conscious in their prescribing. Limited information is available on both the fate and ecotoxicity of pharmaceuticals and biocides in the aquatic environment. The primary concern regarding the environmental impact of pharmaceuticals seems to be drug classes such as antibiotics, oestrogens, cytostatic agents, contrast agents and disinfectants. Performing a full ecological risk assessment of pharmaceuticals and biocides is difficult because of a lack of data on exposure scenarios, target aquatic species and dose–response relationships.

© 2013 Published by Elsevier Ltd on behalf of The Royal Society for Public Health.

Introduction

The elimination and disposal of many pharmaceuticals with animal toxicity, and their metabolites with unknown toxicity, risks contamination of the aquatic environment. After drug administration, pharmaceuticals are excreted by patients into the aquatic environment via wastewater (e.g. 80% of carboplatin is excreted in three days¹). During hospitalization or at home during patient recovery, some products such as

antiseptics and disinfectants are eliminated directly in the environment via wastewater or as refuse, and subject to rain runoff. Unused medications and biocides may be disposed of in drains. Developed countries have attempted to organize the collection of solid and liquid waste from hospitals, clinics and hospices to greatly reduce the improper elimination of medical waste. However, healthcare workers prescribing medications should be aware of the implications of the disposal of such medications for the environment.

* Corresponding author. Service d'Études et de Recherche en Environnement et Santé, Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandœuvre les Nancy, France. Tel: +33 3 83 68 34 80; fax: +33 3 83 68 34 89.

E-mail address: philippe.hartemann@medecine.uhp-nancy.fr (P. Hartemann).
0033-3506/\$ – see front matter © 2013 Published by Elsevier Ltd on behalf of The Royal Society for Public Health.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.puhe.2013.01.026>

Please cite this article in press as: Deblonde T, Hartemann P. Environmental impact of medical prescriptions: assessing the risks and hazards of persistence, bioaccumulation and toxicity of pharmaceuticals, *Public Health* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.puhe.2013.01.026>

Pharmaceutical compounds present in wastewater can be biologically degraded in wastewater treatment plants (WWTPs), and appear in surface water or picked up by sludge. Sludge can be used as fertilizer in agriculture, so substances can move into the soil and reach groundwater. Degradation in complex matrices such as soil is unknown. Analyses of pharmaceuticals are recent, and data on their environmental fate, behaviour and ecological effects are needed urgently.

Pharmaceuticals and biocides that enter wastewater may enter the aquatic environment if they are not biodegraded or eliminated during sewage treatment. This situation has led to increased concerns and study of issues such as toxicity to environmental species, disturbance of microbial ecology, and antimicrobial resistance to antibiotics and biocides, not to mention the eventual presence of drug residues in drinking water. Current wastewater treatment processes are designed to reduce levels of dissolved organic carbon, and sometimes nitrates and phosphates, but not residues of pharmaceuticals and active ingredients of personal and homecare products. According to Mielge et al.,² WWTPs can only remove 10% of carbamazepine, an anticonvulsant and mood stabilizer, but 85% of triclosan, an antibacterial and antifungal agent.

The improved performance of analytical tools has led to better description of the presence of such compounds in wastewater, the influents and effluents of WWTPs, and the aquatic environment. According to Kim et al.,³ the mean concentration of iopromide (a contrast agent) was 2630 ng/l in WWTP effluents and 134 ng/l in surface water in South Korea in 2005. In addition, concentrations of pharmaceuticals (all therapeutic classes) were approximately 5000 ng/l in WWTP effluents, 800 ng/l in surface water and <100 ng/l in drinking water in 2007. The risk associated with these concentrations is not known for humans and is questionable for other species.

Thus, with increasing concern for sustainable development, healthcare practitioners must consider prescribing practices that are not harmful to the environment: 'Primum non nocere!' Two ways to achieve progress in this area are official incentives and regulations, and individual sensitization to more 'eco-compatible' prescriptions. Recently, the European Commission and the European Parliament have produced important regulations such as REACH⁴ and the 'BIOCIDES' directive⁵ that will lead to a ban on environmentally toxic molecules. The same direction is now forecast for pharmaceuticals, with the inclusion of studies of the environmental impact of a drug before market authorization application to the European Medicine Evaluation Agency (EMA).⁶ These regulations should lead to less harmful pharmaceuticals and biocides in the environment; however, the sensitization of most practitioners to the issue is still in its infancy.

The Swedish example

In 2003, Stockholm County Council initiated an environmental hazard assessment of pharmaceuticals to ensure that county council operators did not add environmentally hazardous remains of medical products to the natural surroundings. The aim was for levels of the most environmentally hazardous medicinal products in WWTP effluents and surface water to be lower in 2011 than in 2005.⁷

Despite numerous problems linked to risk assessment, an environmental hazards assessment was initiated. During 2005, the classification was extended to include an environmental risk assessment by the Swedish Association of the Pharmaceutical Industry.⁸ In 2006, all data obtained (i.e. environmental hazard assessment, persistence, bioaccumulation and toxicity) were published at <http://www.fass.se/LIF/home/index.jsp>. This classification has been expanded, and gives a complete list of all pharmaceuticals marketed in Sweden in 2010. This compilation was possible because of excellent cooperation between the pharmaceutical industry, Apoteket AB (the national corporation of Swedish pharmacies), the Swedish Medicine Products Agency, Stockholm County Council and the Association of Local Authorities and Regions.⁹ The use of this system is still recommended.

In this simple, pragmatic classification, environmental risk refers to acute toxic risk to the aquatic environment. The risk is based on the ratio between the predicted environmental concentration (PEC) of the substances and the highest concentration of the substance that does not have a harmful effect in the environment (PNEC). A PEC:PNEC ratio <0.1 is considered insignificant risk; 0.1–1, low risk; 1–10, moderate risk; and >10, high risk.

Data have been added for all drug groups, including psycholytics, anti-epileptics, anti-Parkinson drugs and psycho-analitics. Most pharmaceuticals are considered to have insignificant acute toxic risk for the environment, but this risk could not be excluded for some classes such as antineoplastic agents and drugs for the nervous system. Only oestradiol and ethinyl oestradiol have high environmental risk.

In the system, the environmental hazard of a substance is classified by the following characteristics:

- persistence – ability to resist degradation in the aquatic environment;
- bioaccumulation – accumulation in adipose tissue of aquatic organisms; and
- toxicity – potential to poison aquatic organisms.

Each of these characteristics is assigned a numerical value (0–3). The total of these values constitutes the persistence, bioaccumulation and toxicity index (PBT index) for the substance, which ranges from zero to nine. The higher the PBT index of a pharmaceutical, the greater the hazard to the environment. Pharmaceuticals with a PBT index of 9 are antifungals (ketonazole, mic onazole, terbinafine), anti-infectives (ofloxacin, efavirenz), antineoplastic agents (dasatinib, docetaxel, tamoxifen, megestrol) and drugs for the nervous system (propofol, bromocriptin, clozapine, citalopram, etc.).

Two substances may have the same environmental risk values but different PBT indexes, or the same PBT index but different environmental risk assessment values. The aim for the prescriber or pharmacist is to choose the substance with the lowest risk and PBT index among those with equal therapeutic efficiency.

According to preliminary data on the evolution of drug consumption, the adherence of practitioners to the system is good, which allows for pinpointing major changes in the use of some substances, with a full change in pattern between the more toxic (now less used) and the less toxic (now mostly

Please cite this article in press as: Deblonde T, Hartmann P, Environmental impact of medical prescriptions: assessing the risks and hazards of persistence, bioaccumulation and toxicity of pharmaceuticals, Public Health [2013], <http://dx.doi.org/10.1016/j.puhe.2013.01.026>

used).⁷ Demonstrating an evolution of concentrations in water bodies is not yet possible, but no doubt this national initiative will lead to an evolution in environmental outcomes.

Need for risk assessment of potentially toxic molecules

Assessment of risk to humans is a useful analytical process providing valuable contributions to risk management, public health and environmental policy decisions.¹⁰ Risk assessment developed following demand by politicians, regulators and the public that researchers think beyond scientific observations or relationships between exposure to chemicals and pollutants to their effects on humans, the environment or test systems.²¹ Risk assessors as scientists must rely on scientific inferences and assumptions to evaluate and estimate risk. The market authorization application of a pharmaceutical addresses both the therapeutic effect and absence of toxic effects on humans. Thus, the toxicity of a pharmaceutical may be well known, but not its environmental impact.

In comparison with human health risk assessment, ecological risk assessment is poorly understood. The previously described Swedish example used very simple tools to describe the environmental issue of toxicity. A significant amount of research is needed to validate and improve the risk assessment process itself, to quantify and predict the biological effects (aquatic and terrestrial toxicology), and to better understand the behaviour of toxic chemicals in the environment (chemistry, fate and modelling). Therefore, risk assessment of pharmaceuticals in the environment is in its infancy, with only a few chemicals addressed. However, sophisticated or tentative risk assessments cannot substitute for basic knowledge of a chemical's ecotoxicity.

Ecological risk assessment of pharmaceuticals is difficult because no extensive database exists for comparative biochemistry and physiology of most non-mammalian organisms of ecotoxicological concern. Predicting ecosystem effects from environmental residues means considering biotic and abiotic processes, as well as transport and transformation of the pharmaceuticals.

The necessary steps for risk assessment of a molecule have been described internationally as follows:^{10,22}

- description of the molecule in the environment (concentration, variations, fate, etc.);
- estimation of exposure according to different eventual scenarios (ingestion, inhalation, contact);
- knowledge of dose–effect and dose–response functions for the target species; and
- calculation of risks according to different scenarios of exposure.

Thus, different questions must be addressed during the development of a conceptual model for ecological risk assessment.

- What ecological entities are affected?
- What is the nature of the effect(s)?
- What is the intensity of the effect(s)?

- As appropriate, what is the time scale for recovery?
- What causal information links the stressor with any observed effects?
- How do changes in measures of effects relate to changes in assessment endpoints?
- What is the uncertainty associated with the analysis?

Necessary data for ecological risk assessment of pharmaceuticals

Most data available for ecological risk assessment of pharmaceuticals relate to the occurrence of pharmaceuticals in various aquatic settings, but few data are available on the fate of these compounds, particularly in aquatic ecosystems, sediments and biota.

Some information exists on acute lethal toxicity, determined by testing algae, invertebrates and fish in laboratory studies. These results tend to show that acute effects are most often detected at drug concentrations >1 mg/l higher than environmental exposure concentrations.²²

Limited information exists on sublethal toxic effects, but some well-established data indicate that these effects, such as the modification of reproduction or growth rates, can occur at much lower concentrations. Some pharmaceuticals, such as oestrogenic hormones, can be toxic at low concentrations (ng/l) in several organisms such as fish, amphibians or molluscs.²³ In France, carbamazepine, diclofenac and ibuprofen are frequently isolated in surface water at concentrations >10 ng/l, the threshold above which an environmental risk assessment is required for human and veterinary pharmaceuticals.

The data used for exposure assessment may come from laboratory or field studies, or may be produced as output from a model. Field surveys may be more representative of both exposures and effects, but conditions are not controlled in these surveys. Field data variability and uncertainty may be higher than those of estimates generated from laboratory studies or theoretical models.

Several indices are used to evaluate toxic effects:

- biomarkers;
- toxicity bioassays;
- mesocosm studies (or multiple species bioassays); and
- field studies (population measurements, index of biotic integrity).

The toxicity of new chemicals may be evaluated by structure–activity relationships²⁴ or, with more advanced applications, by quantitative structure–activity relationships.²⁵

The determination and characterization of 'exposure' is based on measures of the pollutant (stressor) and its metabolites in the environment, as well as the extent and pattern of contact or co-occurrence with the receptor. The primary objective of exposure assessment is to characterize the source, type, magnitude and duration of contact with individuals and populations via pathways (for environmentally-transported processes) and routes (for biologically-transported processes). Secondary stressors can be formed by biotic or abiotic transformation processes and may be more or less toxic than the primary stressor. Therefore,

Please cite this article in press as: Deblonde T, Hartemann P, Environmental impact of medical prescriptions: assessing the risks and hazards of persistence, bioaccumulation and toxicity of pharmaceuticals, *Public Health* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.puhe.2013.01.026>

concentrations of metabolites or degradation products, as well as the chemical itself, must be measured.

'Exposure' is estimated from the total potential dose, the amount available to an organism from all exposure pathways (e.g. ingestion, inhalation, absorption). 'Uptake' is the amount of the stressor internalized into an organism, and is a function of the stressor (e.g. chemical structure and polarization states), the environment (e.g. sorptive properties), the biological membrane (e.g. integrity, permeability), and the intrinsic characteristics of the targeted organism (e.g. age, vulnerability, active uptake).²⁶ Uptake varies on a case-specific basis by the interactions among these four factors. Biomarkers and tissue residues can provide valuable evidence that exposure has occurred and help to estimate internal dose.

Thus, the conceptual model of exposure must include both exposure scenarios and exposure pathways. The principal products of the conceptual model include the following:

- a set of risk hypotheses that describe predicted relationships between stressor(s), exposure and assessment end-point (target) response, and the rationale for their selection; and
- a diagram that illustrates the relationships in the risk hypotheses.

Of course, any type of risk assessment will involve high variability, given the types of data available and the uncertainty associated with assessment techniques for pharmaceuticals in the environment and in organisms.

Another important aspect of risk assessment is which stressor–response relationship is needed. The stressor–response relationship used depends on the scope and nature of the risk assessment as defined in the formulation of the problem. The choice of stressor–response relationship is important because it is widely used as a point estimate of an effect by the following:

- median effects: expressed in terms of median lethality concentration, LC_{50} (in the diet or in water) or LD_{50} (mg/kg), or in terms of median effect concentration for growth (EC_{50} or ED_{50}); and
- no effect: expressed in terms of highest concentration for which effects are not statistically different from those of controls [no observed adverse effect concentration (NOAEC)] or lowest concentrations at which effects were significantly different from the control [lowest observed effect concentration (LOAEC)]. The range between NOAEC and LOAEC is sometimes called the 'maximum acceptable toxicant concentration'.

The determination of the NOAEC is based on the 'worst-case' scenario; that is, conditions minimizing interactions, or interferences, and maximizing exposure of target species. For a more realistic assessment, these worst-case scenarios may be adapted by focussing on case-specific data.

Still a lot of missing information

Academic interest in pharmaceutical residues in wastewater has resulted in a large number of publications.² However, the

metabolites or byproducts of degradation or treatment are rarely studied. Data are needed on the nature and quantities of these byproducts, which could also have toxicological effects, sometimes more important than those of the original molecule. Identifying transformation products formed during biotic and abiotic processes is challenging. Some molecules are present in minute quantities, below the level of quantification of available analytical techniques, and transformation mechanisms are complex and often unknown.

Nanotechnology holds enormous promise for the future of medicine and health care. The design, production and application of molecules at the 0.1- to 100-nm scale has reached the healthcare sector with promising application for drug delivery, improving both the solubility and bioavailability of poorly water-soluble drugs and their release and persistence. Many of these technologies work on the premise that when the size of a drug is reduced, the surface area is significantly increased which enhances the solubility of the drug. In the environment, this increase in solubility may be harmful for some aquatic organisms. Nano-sized vehicles have been developed for 'housing' and delivering drugs; examples are liposomes and polymer-based systems. However, information on the fate of these vehicles in the environment and their ecotoxic effects is lacking. Thus, risk assessment of these nano-sized drugs is still not possible.

Risk assessment of antibiotics and disinfectants is difficult but these molecules may have serious consequences. Virtually no information is available on the degradation of antibiotics and disinfectants in wastewater and their potential impact on the development of resistant micro-organisms. Some information is available regarding the possible transfer of plasmidic resistance between bacteria during biological treatment processes, but data on the influence of selective pressure with the residues are scarce.

The discovery in 1998 that triclosan, the most widely used disinfectant in the world, has an interspecific action in bacterial cells as an inhibitor of NADH or NADPH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase¹⁷ led to a lively debate that this mode of action may induce resistance and cross-resistance.^{18,19} Many publications have demonstrated *in-vitro* inducible cross-resistance to antibiotics and bacterial triclosan-induced resistant phenotypes, although not evidenced in bacteria isolated from industrial sources. The European Commission recently concluded that 'The continued use of Triclosan as a preservative at the current concentration limit value of 0.3% in all cosmetic products is not safe for the consumer because of the magnitude of the aggregate exposure.'²⁰ This concern is also true for other disinfectants largely used in food production and health care, and disposed of in the aquatic environment.

More scientific evidence is available regarding the possibility of antibiotics inducing resistant micro-organisms, especially in WWTPs. For example, enterococci show multiple resistance to vancomycin, and aminoglycosides have been found unexpectedly in a non-hospital environment.²¹ Efflux mediation of antimicrobial resistance is the most commonly cited mechanism explaining antimicrobial resistance of environmental micro-organisms because of selection pressure.²²

Please cite this article in press as: Deblonde T, Hartemann P, Environmental impact of medical prescriptions: assessing the risks and hazards of persistence, bioaccumulation and toxicity of pharmaceuticals, Public Health (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.puhe.2013.01.026>

Which classes of pharmaceuticals are most detrimental to the environment?

Among the most-used pharmaceuticals and biocides, some classes seem to be of greater danger to the environment, despite the lack of a full ecological risk assessment.

Antibiotics are found in wastewater. According to Zuccato et al.,²³ concentrations of tylosin were 0.6–1.7 ng/l in water used for consumption, and concentrations of erythromycin, tylosin, ceftriazone, clindamycin and spiramycin were 0.7–17.4 ng/l in river water in 2000. Bioassays of sulphadimethoxine and oxytetracycline revealed toxic effects in invertebrates.²⁴

Oestrogens and oestrogen-like agents contaminate all waters, and their toxicity and endocrine disruptor effects have been confirmed; they may affect growth, reproduction and development of species in water.¹³

Cytostatic agents are mainly found in hospital wastewater, and their use increases each year by 10%. WWTPs can eliminate some cytostatic agents, but the removal rate is not equal between molecules (e.g. 25% for cyclophosphamide and 75% for methotrexate).²⁵ The effects of such subtherapeutic doses of these substances on environmental species are unknown.

Contrast agents are excreted by patients after radiography and may be detected in surface and potable waters. Removal rates of these compounds by WWTPs are low (about 8% with biological treatment and a maximum of 50% with activated carbon). These substances have no genotoxic or neurotoxic effects, but knowledge is lacking regarding subchronic and chronic effects in animals.²⁶

Biocides such as chlorine, chlorinated compounds, metals and triclosan are often detected in surface water. Chlorine disinfectant byproducts such as chloramines and haloforms may have devastating effects on some aquatic species by direct toxicity or accumulation in body fat. Triclosan is a persistent and non-degradable biocide,²⁷ and is toxic to aquatic organisms.²⁸ Chemical reactions with triclosan may form dioxins, which are bio-accumulable and toxic to the environment.²⁹ Triclosan is also an endocrine disruptor for amphibians.³⁰

The Swedish system used by medical doctors is a good first approach to raise awareness of the hazardous potential of pharmaceutical molecules. However, this model is mainly for ecotoxicological criteria. A sanitary risk assessment with a sanitary approach is necessary for quantification on human health.

Conclusions

Pharmaceuticals and biocides that enter wastewater may enter the aquatic environment if they are not biodegraded or eliminated in WWTPs. Numerous publications have reported such compounds in wastewater, the aquatic environment and, in some cases, drinking water. Thus, healthcare workers need to consider the pollution of the aquatic environment linked to medical prescriptions. Hospitals only appear to account for 15–20% of this pollution,³¹ so the role of general practitioners is important.

Limited information is available regarding the fate and ecotoxicity of these compounds in the receiving water bodies. Assessing the risk of pharmaceuticals is difficult, and the EMEA and the European Commission recognize this challenge. As such, registration of non-environmentally-harmful drugs is a long way off.

As such, general practitioners who wish to be environmentally conscious in their prescribing may look to the Swedish classification system for prescribing non-environmentally-hazardous drugs. This simple classification system covers both the environmental risk of a drug and its environmental hazard, according to the persistence, bioaccumulation and toxicity of active substances.

However, the Swedish classification system only considers the lethal effect of a pharmaceutical. The aim is to develop the system so that it also considers other effects, such as the pharmacological effects of the metabolites and residues, as well as carcinogenic, mutagenic and reproductive effects. Assessment of metabolites is of great interest. Despite its limitations, this simple classification system is an invaluable tool for healthcare workers, and could be considered for implementation by other countries and the European Commission and European Parliament.

Author statements

Ethical approval

None sought.

Funding

None declared.

Competing interests

None declared.

REFERENCES

- Castegnaro M, Hansel S. Les médicaments anticancéreux dans les effluents hospitaliers et domestiques. *Environne Risques Santé* 2006;5:266–70.
- Miège C, Choubert J-M, Ribeiro L, Eusèbe M, Coquery M. Le devenir des résidus pharmaceutiques dans les stations d'épuration d'eaux usées. Une synthèse de la littérature. *Tech Sci Méth* 2009;11:75–94.
- Kim SD, Cho J, Kim IS, Vanderford BJ, Snyder SA. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking and waste waters. *Wat Res* 2007;41:1013–21.
- European Commission. EC 1907/2006 for registration, evaluation, authorisation and restriction of chemical substances. Brussels: European Parliament Council; 2007.
- European Commission. Directive 98/8/EC of the European parliament and of the council concerning the placing of biocidal products on the market. Brussels: European Parliament Council; 1998.
- EMEA/CPMP. Note for guidance on environmental risk assessment on medicinal products for human use. In: CHMP/SWP/4447/00

Please cite this article in press as: Deblonde T, Hartemann P. Environmental impact of medical prescriptions: assessing the risks and hazards of persistence, bioaccumulation and toxicity of pharmaceuticals, *Public Health* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.puhe.2013.01.026>

- draft committee for proprietary medicinal products. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; 2005.
7. Wennmalm A, Gunnarsson B. Pharmaceutical management through environmental product labeling in Sweden. *Environ Int* 2009;35:775–7.
 8. Carlsson C, Johansson AK, Alvan G, Bergman K, Kühler T. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci Total Environ* 2006;364: 67–87.
 9. Agerstrand M, Wester M, Ruden C. The Swedish environmental classification and information system for pharmaceuticals – an empirical investigation of the motivations, intentions and expectations underlying its development and implementation. *Environ Int* 2009;35:778–86.
 10. Risk Assessment Forum US EPA. *Proposed guidelines for ecological risk assessment*. USEPA/630/R-95/002B. Washington, DC: USEPA; 1996.
 11. Presidential/Congressional Commission on Risk Assessment and Risk Management. *Framework for environmental health risk management. Final report*. Washington: USEPA; 1997.
 12. Garric J, Ferrari B. Les substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques. Niveaux d'exposition et effets biologiques: que savons-nous? *Rev Sci l'Eau* 2005;18:307–30.
 13. Matthiessen P, Sumpter JP. Fish ecotoxicology. In: Braunbeck T, Hinton DE, Streit B, editors. *Effects of estrogenic substances in the aquatic environment*. Fish Ecotoxicology, 1998. p. 319–35.
 14. Auer CM, Zeeman M, Nahholz JV, Clements RG. The US regulatory perspective. *SAR QSAR Environ Res* 1994;2:21–38.
 15. Lipnic RL. Structure activity relationships. In: Rand GM, Retrocelli SR, editors. *Fundamentals of aquatic toxicology*. London: Taylor & Francis; 1995. p. 609–55.
 16. Sutter GW, Gillet JW, Norton SB. Issue paper on characterization of exposure. IUS EPA/630/R-94/009. Washington DC: Risk Assessment Forum; 1994. p. 4.1–4.64.
 17. McMurry LM, Oettinger M, Levy SB. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 1998;394:531–2.
 18. Russel AD. Whiter triclosan? *J Antimicrob Chemother* 2004;53:693–5.
 19. Saleh S, Haddadin RNS, Bailie S, Collier PJ. Triclosan – an update. *Let Appl Microbiol* 2010;52:87–95.
 20. Scientific Committee on Consumer Protection S.C.C.P./1192/08. *Opinion on triclosan Colipa n° P32*. Brussels: Health & Consumer Protection Directorate General of the European Commission; 2008.
 21. Beire RC, Duke SE, Ziprin RL, Harvey RB, Hume ME, Poole TL, Scott HM, Highfield LD, Alali WD, Andrews K, Anderson RC, Nisbet DJ. Antibiotics and disinfectant susceptibility profiles of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) isolated from community wastewater in Texas. *Bull Environ Contam Toxicol* 2008;80:188–94.
 22. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:20–51.
 23. Zuccato E, Calamari D, Natangelo M, Fanelli R. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 2000;355:1789–90.
 24. Hernando MD, Mezcia M, Fernandez-Alba AR, Barcelo D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 2006;69:334–42.
 25. Catastini C, Mullett JU, Boukari S, Mazellier P, Levi Y, Cervantes P, Ormsby JN. Identification de molécules anticancéreuses dans les effluents hospitaliers de deux hôpitaux. *Eur J Water Qual* 2008;39:171–80.
 26. Commission internationale de la protection du Rhin. *Rapport d'évaluation: agents de contraste radiographique n° 187*. Commission Internationale de la Protection du Rhin in Allemagne (Coblence); 2011.
 27. Environment Canada. *List of substances on the DSL that are persistent and inherently toxic to the environment*. Gatineau: CEPA Environmental Registry; 2010.
 28. European Commission. *Classification, labelling and packaging regulation. Annex VI, Table 3.2.Reg. 1272/2008*. Brussels: European Parliament Council; 2009.
 29. Canosa P, Morales S, Rodriguez I, Rubi E, Cela R, Gomez M. Aquatic degradation of triclosan and formation of toxic chlorophenols in presence of low concentrations of free chlorine. *Anal Bioanal Chem* 2005;383:119–26.
 30. Jackson J, Sutton R. Sources of endocrine-disrupting chemicals in urban wastewater, Oakland, CA. *Sci Total Environ* 2008;405:153–60.
 31. Ort C, Lawrence MG, Reungpat J, Eaglesham G, Carter S, Keller J. Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital. *Wat Res* 2010;44:605–15.

Le but de cet article est d'analyser l'impact des prescriptions médicales sur l'environnement. Nous nous sommes appuyés sur la méthode PBT (Persistance, Bioaccumulation, Toxicité) initiée par les Suédois. Ceux-ci ont construit un système de classification simple basé sur la persistance, la bioaccumulation et la toxicité des substances actives. Leur méthode consistait à scorer l'impact écotoxicologique des médicaments et à mettre ces données à disposition des praticiens prescripteurs. A effet égal, les praticiens étaient incités à prescrire celle ayant le moins d'impact écotoxicologique.

Notre étude expose les avantages et limites de la méthode PBT, en mettant notamment en avant les difficultés liées au manque de données ou à la difficulté d'y accéder. De plus, cette méthode reste pour l'instant limitée au domaine écotoxicologique ; l'impact sanitaire humain n'est pas pris en compte dans la construction du score.

Il est à noter que les trois méthodologies de hiérarchisation des substances actives retrouvées dans la littérature ne concernent que le risque environnemental. Aucune n'analyse le risque sur la santé humaine.

2.3. *Elaboration d'une méthode de hiérarchisation*

L'objectif de la deuxième partie de notre travail est de construire une méthodologie permettant de hiérarchiser des molécules candidates selon le risque sanitaire qu'elles présentent. Évidemment, nous avons choisi de nous appuyer sur une méthodologie déjà existante.

A notre connaissance, il existe peu d'évaluation du risque sanitaire lié aux résidus de médicaments dans l'environnement à ce jour. Nous avons donc étudié successivement les méthodes utilisées dans la littérature concernant le risque environnemental, et en avons tiré les enseignements suivants :

- la méthode EMEA est relativement simple à mettre en œuvre lorsque les données sont disponibles. Malheureusement, seul un faible nombre de molécules a été étudié par les auteurs ;
- la méthode QSAR n'est pas adaptée à l'étude de l'impact sanitaire de molécules thérapeutiques sur la santé humaine, puisque les différents groupements chimiques composant les médicaments ne sont pas rattachés à un risque toxique mais à un effet curatif ou préventif sur la santé humaine ;
- la méthode PBT semble prometteuse, mais est pour l'instant construite afin de déterminer l'impact écotoxicologique des substances actives. Il semble néanmoins possible de la rattacher à des données de toxicologie humaine.

Ainsi, nous proposons dans ce travail une méthode de hiérarchisation originale, basée sur la méthode PBT et permettant d'évaluer les risques cliniques.

2.3.1. Liste de molécules candidates

Pour établir la liste des molécules candidates à notre méthode de hiérarchisation, nous sommes partis des données de consommation d'un centre hospitalier (CH) de 300 lits qui nous a transmis la liste de l'ensemble des médicaments (par nom commercial et par service) consommés sur la période de janvier à octobre 2011. Cet établissement, situé en Lorraine, comporte des services de Médecine, Chirurgie, Obstétrique et Réanimation.

Dans un premier temps, les consommations de chaque service ont été additionnées pour obtenir la consommation globale du centre hospitalier. Puis nous avons recherché la composition (substance(s) active(s) et quantité) de chaque spécialité grâce au résumé des caractéristiques de chaque produit (RCP) afin d'obtenir la consommation en milligrammes (mg) de chaque substance active.

Nous avons choisi d'inclure uniquement les substances actives synthétiques. Les excipients et les molécules naturelles (homéothérapie, phytothérapie, immunothérapie, oligo- et vitaminothérapie) ont ainsi été exclues de notre liste de molécules candidates.

2.3.2. Matériels et méthodes pour la hiérarchisation

2.3.2.1. Indicateurs recueillis

Selon les conventions de Genève et de Stockholm, une substance est identifiée comme indésirable si elle présente à la fois les quatre propriétés suivantes :

- Toxicité : aiguë ou chronique, pour l'Homme ou pour l'environnement ;
- Bioaccumulation : accumulation du polluant dans les tissus des organismes vivants soit par exposition directe au milieu pollué, soit par ingestion de nourriture contaminée ;
- Persistance : longévité de la molécule rejetée dans l'environnement due à sa résistance aux processus de dégradation physico-chimiques ou biologiques ;
- Potentiel de transport à longue distance : capacité de ces substances à être transportées loin de leurs sources d'émission via l'air ou l'eau.

La Commission européenne n'utilise que les trois premières propriétés pour définir les substances « PBT », persistantes, bioaccumulables et toxiques.

Pour chaque molécule, nous avons donc recueilli des indicateurs permettant d'évaluer ces trois critères, lorsqu'ils étaient disponibles :

a. Persistance

La persistance représente la capacité d'une substance à rester dans un milieu pendant de longues périodes.

La persistance dans l'environnement ne peut être évaluée qu'indirectement par une représentation du comportement de la substance dans l'environnement.

L'agence américaine de protection de l'environnement (US EPA) a développé un modèle multimédia qui simule le devenir des substances chimiques dans l'environnement à partir de leurs propriétés physico-chimiques ; ce programme s'appelle EPI (Estimation Programs Interface) Suite™.

Ce modèle fournit pour la plupart des molécules deux indicateurs permettant d'apprécier la persistance :

- **le temps de persistance (TP),**
- **la demi-vie dans l'eau, c'est-à-dire le temps mis par une substance pour diminuer de moitié sa valeur initiale.**

b. Bioaccumulation

Pour évaluer le potentiel de bioaccumulation des différentes substances actives, nous avons recueilli 3 indicateurs différents :

- **le coefficient de partage octanol /eau (Kow)** qui mesure, dans des conditions de température et de pression données, la solubilité différentielle des composés chimiques entre deux solvants, l'octanol et l'eau, et qui permet ainsi d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule. Plus cette constante est élevée, plus la substance est lipophile et a tendance à s'accumuler dans les membranes biologiques des organismes vivants. Les valeurs de Kow varient sur une échelle couvrant plusieurs ordres de grandeur et sont souvent exprimées sous la forme de leur logarithme de base 10 (log Kow) ;
- **la solubilité** d'un composé qui est la concentration maximale que l'on peut dissoudre dans un solvant (le plus souvent l'eau) à une température donnée. Plus une molécule est affine pour l'eau, plus elle est soluble et moins elle a tendance à s'accumuler dans les membranes biologiques ;
- **le facteur de bioconcentration (BCF)** qui désigne le rapport entre la concentration d'une substance à l'intérieur d'un organisme vivant et sa concentration dans le milieu. Il permet d'évaluer la capacité d'une substance à se concentrer dans les êtres vivants : plus le BCF est élevé, moins la substance a tendance à se bioconcentrer (un BCF supérieur à 500 indique qu'une substance a une forte tendance à s'accumuler dans l'organisme).

c. Toxicité

Deux indicateurs ont été recueillis pour évaluer la toxicité des médicaments sur les humains : la dose létale médiane et la concentration prédite sans effet.

- **La dose létale médiane (DL50)** mesure la dose de substance causant la mort, dans des conditions expérimentales précises, de 50 % des animaux d'un lot, le plus souvent des souris ou des rats. Elle s'exprime en milli-, micro ou nano-gramme de substance active par kilogramme d'animal. Plus la valeur de DL50 est petite, plus la substance est toxique.
- **La PNEC (Predicted No-Effect Concentration)** ou concentration prédite sans effet est définie comme la concentration d'une substance chimique au-dessous de laquelle il ne devrait pas y avoir d'effets nocifs sur les organismes des écosystèmes considérés (Annexe I du

règlement REACH). Cette concentration est obtenue à partir des données d'écotoxicité aiguë (concentration efficace médiane (EC50), concentration modélisée pour laquelle l'observation des effets sur 50 % d'une population est attendue) et chronique (concentration sans effet observé (NOEC), plus forte concentration testée pour laquelle les effets observés ne sont pas significativement différents du témoin).

Lorsque plusieurs niveaux trophiques (poissons, daphnies ou algues) sont testés, la PNEC correspond à la concentration la plus basse retrouvée à laquelle est appliqué un facteur d'extrapolation (AF).

Le « Technical Guidance Document » (TGD, 2003), document d'orientation technique pour l'évaluation de risque propose d'appliquer un facteur d'extrapolation de 1 à 1000 en fonction de la qualité des données (Tableau II-1) :

Tableau II-1. Facteurs d'incertitude pour le calcul de la PNEC

Données disponibles	Facteur d'extrapolation
3 données de toxicité aiguë (EC50) (poissons, daphnies et algues)	1000
3 données de toxicité aiguë + 1 donnée de toxicité chronique (NOEC) (poissons ou daphnies)	100
3 données de toxicité aiguë + 2 données de toxicité chronique (NOEC) (poissons et/ou daphnies et/ou algues)	50
3 données de toxicité aiguë + 3 données de toxicité chronique (NOEC) (poissons et daphnies et algues)	10
Données de terrains ou modèles ou SSD (Species Sensitivity Distribution method)	1 – 5 (au cas par cas)

Seule, la PNEC est difficilement interprétable. Nous préférons utiliser le **quotient de danger** (QD), rapport de la PEC (Predicted Environmental Concentration) sur la PNEC pour la substance considérée.

Une PEC, concentration prédite dans l'environnement, a donc été calculée pour chaque substance active selon la formule suivante :

$$PEC = (Q * F_{\text{excrétée}} * (1 - R_{\text{step}})) / K * D$$

où :

- Q (en mg) est la quantité consommée de chaque substance active par le CH lorrain entre janvier et octobre 2011 ;
- F excrétée (en %) est la fraction excrétée sous forme inchangée dans les urines. Cette donnée a été recherchée pour chaque substance active à partir des RCP ou fiches médicamenteuses du Vidal ou, en cas de donnée manquante, dans les bases de données

disponibles en ligne (Toxnet) ou dans la littérature. Lorsque la fraction trouvée était un intervalle, nous avons choisi de prendre la valeur moyenne ;

- R step (en %) correspond au rendement d'élimination moyen d'une station d'épuration classique pour la substance active considérée. Cette donnée a été recueillie pour chaque principe actif sur la base de données en ligne Chemspider qui rassemble les prédictions du modèle développé par l'US EPA ;
- K est un facteur de pondération prenant en compte la quantité d'eaux usées rejetée chaque jour et par patient sur la période de janvier à octobre 2011. Comme un lit consomme environ 1 000 L d'eau par jour, comme le CH comprend 305 lits et comme la période pour laquelle nous disposons de données de consommation compte 304 jours, ce facteur est estimé à $9,272 \cdot 10^7$.
- D est un facteur de dilution entre les effluents et le milieu naturel, un facteur 10 est utilisé par défaut

Ainsi nous l'avons fait remarquer lors de notre analyse des méthodes de hiérarchisation du risque environnemental, la PNEC n'est disponible que pour un faible nombre de médicaments.

2.3.2.2 Construction des scores

Pour chacun des indicateurs recueillis, nous avons construit un score pour permettre la hiérarchisation de notre liste de molécules candidates. Ces scores sont basés sur des échelles existantes ou élaborées pour notre méthode.

a. Échelles utilisées pour la persistance

i. Temps de persistance

Pour établir notre score de persistance basé sur le temps de persistance estimé par le modèle de l'US EPA, nous avons utilisé la classification proposée par Zuccato (2000) (Tableau II-2) :

Tableau II-2. Score de persistance basé sur le temps de persistance

Temps de persistance	Indice de persistance
Moins de 1 jour	1
De 1 à 19 jours	2
De 20 à 100 jours	3
De 101 à 364 jours	4
Plus de 365 jours	5

ii. Demi-vie dans l'eau

Le modèle de l'US EPA prédit 6 valeurs différentes pour la demi-vie dans l'eau, ce qui nous a

permis d'établir un score en 6 classes (Tableau II-3) :

Tableau II-3. Score de persistance basé sur la demi-vie

Demi-vie dans l'eau	Indice de persistance
55,9 heures	1
208 heures	2
360 heures	3
900 heures	4
1440 heures	5
4320 heures	6

b. Échelles utilisées pour le potentiel de bioaccumulation

i. Log Kow

La législation européenne définit une substance comme bioaccumulable lorsque celle-ci a un log Kow égal ou supérieur à 3. Pour le système général harmonisé (SGH), système international d'étiquetage des matières dangereuses, la limite est à 4. Nous avons donc choisi de développer un score prenant en compte ces deux valeurs seuil (Tableau II-4) :

Tableau II-4. Score de bioaccumulation basé sur le log Kow

Log Kow	Indice de bioaccumulation
Inférieur à 3	0
Entre 3 et 4	1
Supérieur ou égal à 4	3

ii. Solubilité

Pour le score de bioaccumulation basé sur la solubilité dans l'eau, nous avons repris l'échelle proposée en 2008 par l'Afssaps (Tableau II-5) :

Tableau II-5. Score de bioaccumulation basé sur la solubilité

Solubilité en mg par litre	Indice de solubilité
Supérieur à 100	1 = Hautement soluble
Entre 10 et 100 inclus	2 = Modérément soluble
Entre 1 et 10 exclus	3 = Légèrement soluble
Entre 0,1 exclus et 1 exclus	4 = Faiblement soluble
Inférieur ou égal à 0,1	5 = Très faiblement soluble

iii. Facteur de bioconcentration (BCF)

Comme pour le log Kow, il existe une différence entre la valeur seuil choisie par la législation européenne et celle utilisée pour la classification SGH. L'UE définit une substance comme bioaccumulable lorsque celle-ci a un BCF inférieur ou égal à 100, pour le système international de classification il faut que le BCF soit inférieur à 500. Nous avons donc pris en compte ces deux seuils pour construire notre score de bioaccumulation basé sur le BCF (Tableau II-6) :

Tableau II-6. Score de bioaccumulation basé sur le BCF

BCF	Indice de
Supérieur à 500	3
Entre 100 exclus et 500	1
Inférieur ou égal à 100	0

c. Échelles utilisées pour la toxicité

i. Dose létale médiane (DL50)

Les toxicologues Hodge et Sterner ont développé une échelle de toxicité selon la valeur de la DL50 orale chez le rat ou la souris, échelle que nous avons reprise pour établir notre score de toxicité basé sur la DL50 (Tableau II-7) :

Tableau II-7. Score de toxicité basé sur la DL50

DL50 orale en mg/kg	Indice de toxicité
Supérieur ou égal à 15 000	1 = Relativement inoffensif
Entre 5 000 et 15 000 exclus	2 = Presque pas toxique
Entre 500 et 5 000 exclus	3 = Légèrement toxique
Entre 50 et 500 exclus	4 = Modérément toxique
Entre 1 et 50 exclus	5 = Hautement toxique
Inférieur à 1	6 = Extrêmement toxique

ii. Quotient de danger (QD)

Le rapport PEC/PNEC ou quotient de danger (QD) de la molécule représente le risque estimé pour l'environnement. Quatre groupes ont été définis par l'EMEA :

- lorsque le QD est inférieur ou égal à 0,1, l'utilisation du médicament est considérée comme présentant un risque insignifiant pour l'environnement ;
- entre 0,1 et 1, le risque est faible ;
- entre 1 et 10, il est modéré ;
- et lorsque le QD est supérieur à 10, l'utilisation du médicament présente un risque élevé pour l'environnement.

Notre score de toxicité basé sur le QD reprend ces 4 classes et est présenté dans le tableau II-8:

Tableau II-8. Score de toxicité basé sur le QD

QD	Risque
Inférieur ou égal à 0,1	0 = Risque insignifiant
Entre 0,1 exclus et 1	1 = Risque faible
Entre 1 exclus et 10	2 = Risque modéré
Supérieur à 10	3 = Risque élevé

Afin de traiter chaque variable de manière égale, les scores de chaque variable seront pondérés pour être ramenés à une valeur maximale de 6 points. Les critères seront donc cotés selon le tableau suivant :

Tableau II-9. Pondération de chaque variable

	Cotation initiale	Facteur de correction	Cotation finale
Temps de persistance	5	×1,2	6
Demi-vie dans l'eau	6	aucun	6
Log Kow	3	×2	6
Solubilité	5	×1,2	6
BCF	3	×2	6
DL50	6	aucun	6
Quotient de danger	3	×2	6

2.3.2.3 Combinaison des scores

Pour pouvoir hiérarchiser nos molécules en prenant en compte les trois critères PBT, nous avons combiné les différents scores développés ci-dessus. Les douze combinaisons possibles sont présentées dans le tableau II-10.

Tableau II-10. Combinaison des scores

	Indicateur de persistance	Indicateur de bioaccumulation	Indicateur de toxicité
Combinaison A	Temps de persistance	Log Kow	DL50
Combinaison B	Temps de persistance	Solubilité	DL50
Combinaison C	Temps de persistance	BCF	DL50
Combinaison D	Temps de persistance	Log Kow	QD
Combinaison E	Temps de persistance	Solubilité	QD
Combinaison F	Temps de persistance	BCF	QD
Combinaison G	Demi-vie dans l'eau	Log Kow	DL50
Combinaison H	Demi-vie dans l'eau	Solubilité	DL50
Combinaison I	Demi-vie dans l'eau	BCF	DL50
Combinaison J	Demi-vie dans l'eau	Log Kow	QD
Combinaison K	Demi-vie dans l'eau	Solubilité	QD
Combinaison L	Demi-vie dans l'eau	BCF	QD

Chaque molécule a été hiérarchisée selon chaque combinaison. Selon les molécules, les combinaisons comportant des données indisponibles n'ont pas été testées.

2.3.2.4 Hiérarchisation

Ainsi, nous avons pu hiérarchiser notre liste de molécules candidates avec chacune des combinaisons détaillées ci-dessus.

Un code couleur a été appliqué aux trois niveaux supérieurs de chaque combinaison. Ce code couleur a été attribué de la manière suivante pour chaque combinaison :

- un maximum de 18 point est attribué à chaque combinaison ;
- la (ou les) molécule(s) présentant le nombre de points le plus élevé (que ce score

- atteigne ou non 18 points) se voit attribuer la couleur rouge ;
- la (ou les) molécule(s) présentant un nombre de points inférieurs au score le plus élevé se voit attribuer une couleur orange ;
 - la (ou les) molécule(s) suivantes se voient attribuer une couleur jaune ;
 - les molécules restantes ne sont pas colorées et sont considérées comme ne présentant pas de risque sanitaire.

Les molécules représentées au moins une fois par la couleur rouge (c'est-à-dire appartenant au niveau supérieur pour au moins une combinaison) constituent notre liste de molécules prioritaires.

Nous avons pour terminer analysé la combinaison la plus représentative de notre liste hiérarchisée, c'est-à-dire la combinaison permettant d'identifier le plus grand nombre des molécules prioritaires en un seul calcul.

La figure 2-2 est un schéma récapitulatif de notre méthode de hiérarchisation.

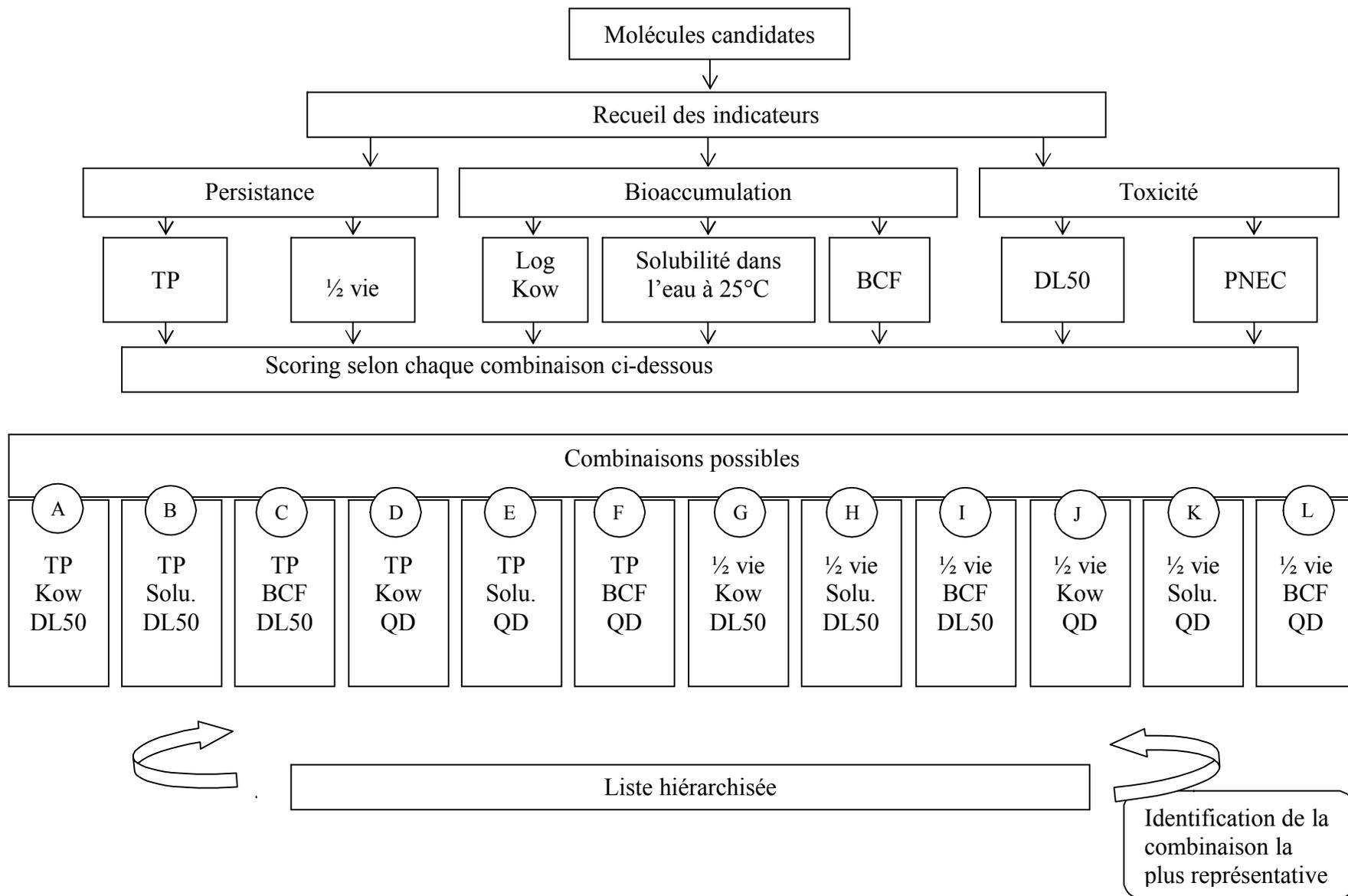


Figure 2-2. Schéma récapitulatif de notre méthode de hiérarchisation

2.3.3 Résultats

2.3.3.1 Molécules candidates

La pharmacie du centre hospitalier a distribué 1307 spécialités entre janvier et octobre 2011. Après conversion en substances actives et exclusion des excipients sans effet notoire sur la santé et des molécules naturelles, 606 substances composent notre liste de molécules candidates.

La répartition par classe thérapeutique selon le système de classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique (ATC) figure dans le tableau II-11. La catégorie « Non classés » correspond aux substances appartenant à plusieurs catégories.

Tableau II-11. Répartition par classe thérapeutique des molécules candidates à la hiérarchisation

Classe thérapeutique	Nombre de molécules
A. Système digestif et métabolisme	46
B. Sang et organes hématopoïétiques	19
C. Système cardio-vasculaire	66
D. Dermatologie	13
G. Système génito-urinaire et hormones sexuelles	15
H. Préparations systémiques hormonales à l'exception des hormones sexuelles et des insulines	14
J. Anti-infectieux (usage systémique)	70
L. Antinéoplasiques et agents immunomodulants	58
M. Système musculo-squelettique	27
N. Système nerveux	116
P. Produits antiparasitaires, insecticides et répellants	14
R. Système respiratoire	24
S. Organes sensoriels	14
V. Divers	24
NC. Non classés	86

Les vingt molécules les plus consommées sont représentées avec leur consommation en kilogramme sur la figure 2-3.

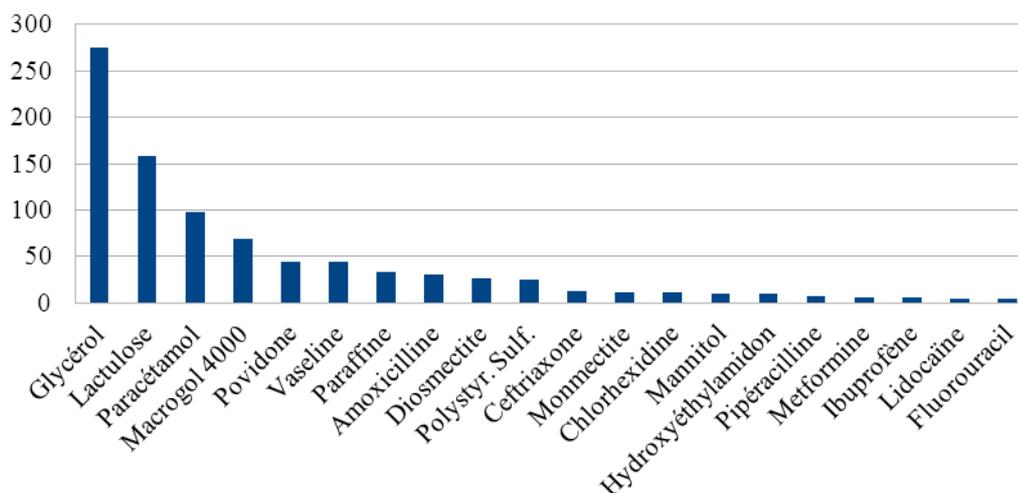


Figure 2-3. Molécules les plus consommées (en kg) par le CH entre janvier et octobre 2011 (les substances, excipients y compris sont présentées en abscisse)

2.3.3.2 Scores de persistance

Les deux indicateurs de persistance estimés par le modèle de l'US EPA ont pu être collectés pour 448 substances (74 % des molécules de notre liste).

Le score utilisant la demi-vie comme indicateur de persistance retrouve 52 molécules dans sa classe supérieure, parmi lesquelles figurent les sept molécules ressortant dans la classe supérieure du score basé sur le temps de persistance. La figure 2-4 présente la répartition des molécules candidates entre les différentes classes de ces 2 scores.

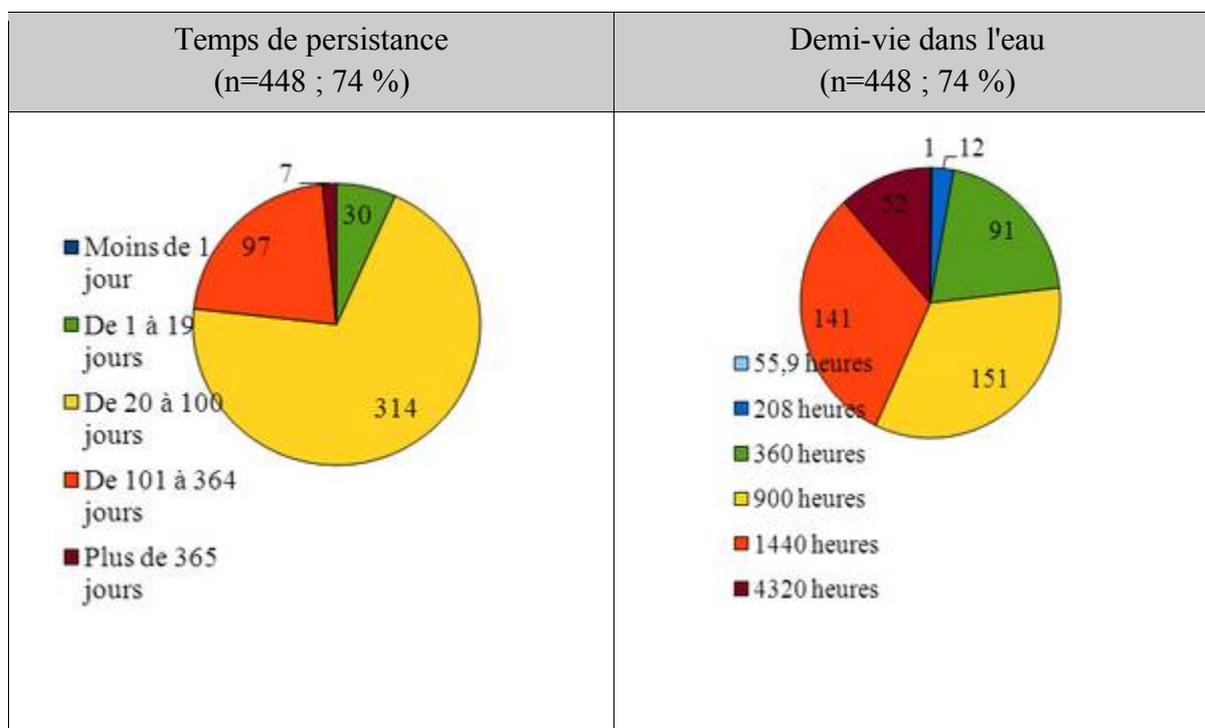


Figure 2-4 Répartition des scores de persistance en fonction de la variable testée (temps de persistance ou demi-vie dans l'eau)

2.3.3.3 Scores de bioaccumulation

Le score basé sur le BCF, recueilli pour 448 molécules est le score de bioaccumulation qui fait ressortir le plus de substances dans sa classe supérieure.

Les deux autres scores semblent donner des résultats similaires, comme le montre la figure 2-5 qui résume la répartition des molécules candidates dans les différentes classes des trois scores de bioaccumulation. En effet, les trois premières classes du score de solubilité se superposent à la première classe du score basé sur le log Kow, tandis que la quatrième classe du score de solubilité recoupe la deuxième classe du log Kow. Parmi les 95 molécules ayant un log Kow supérieur ou égal à 4, les 20 molécules ayant une solubilité inférieure ou égale à 0,1 mg/L, ainsi que 22 des 30 molécules ayant une solubilité comprise entre 0,1 et 1 mg/L sont retrouvées.

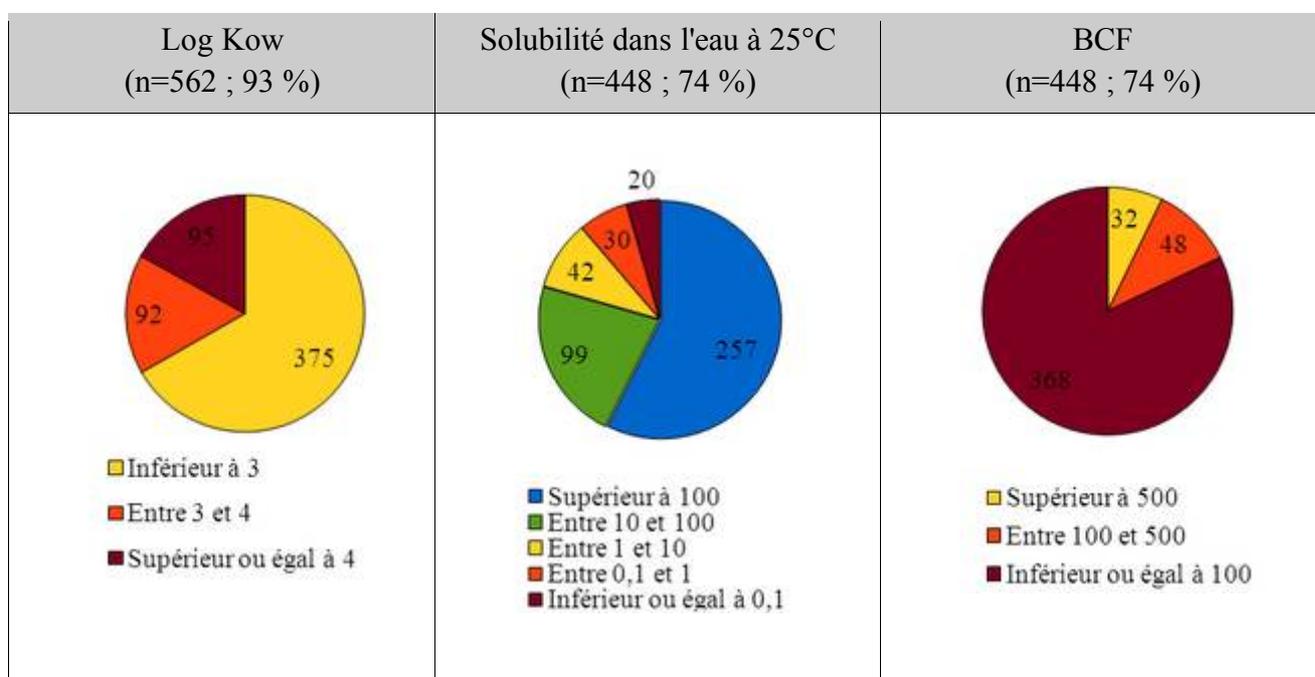


Figure 2-5 Répartition des scores de bioaccumulation en fonction de la variable testée (log KoW, solubilité dans l'eau, BCF)

2.3.3.4 Scores de toxicité

Sur les 606 molécules candidates, seules 155 PNEC ont été recueillies permettant de calculer un QD pour 129 molécules, soit 21,3% seulement de nos molécules candidates. D'après le score basé sur cet indicateur, l'utilisation de cinq molécules semble résulter en un risque élevé pour l'environnement.

Le score de toxicité basé sur la DL50 a pu, quant à lui, être calculé pour 463 molécules soit 77 % de notre liste. Trois molécules appartiennent à la classe de toxicité la plus élevée.

La répartition par classe pour nos deux scores de toxicité est résumée sur la figure 2-6.

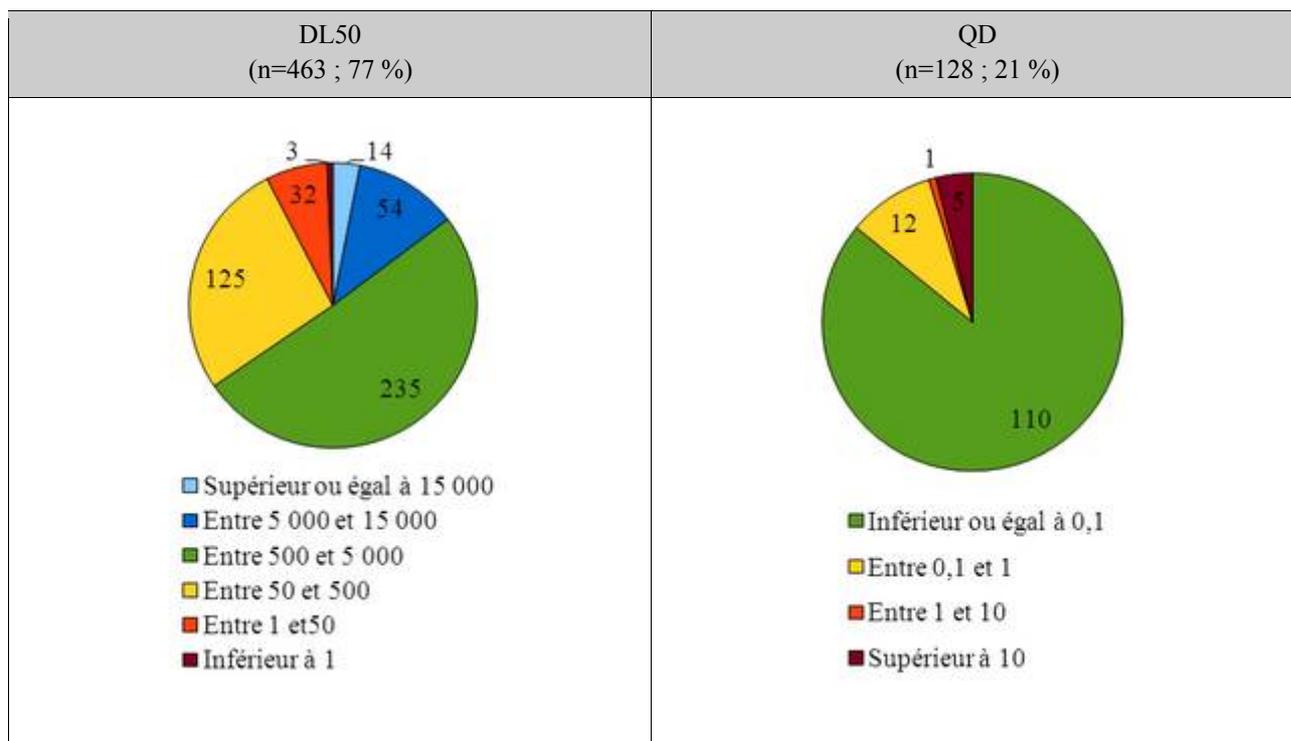


Figure 2-6 Répartition du score de toxicité pour les deux variables testées (quotient de danger QD et dose létale 50 DL50)

2.3.3.5 Hiérarchisation

Les scores des molécules candidates ont été calculés avec chaque combinaison possible (combinaison requérant uniquement des données disponibles). Selon la combinaison utilisée (A à L), le nombre de molécules hiérarchisées est variable : les combinaisons utilisant la PNEC, et plus précisément le QD, comme indicateur de toxicité n'ont pu être appliquées qu'à 103 molécules candidates (17 %), alors que les autres combinaisons ont permis de hiérarchiser plus de 60 % des substances composant notre liste. Seules 372 molécules ont pu être hiérarchisée lors de la disponibilité des données (combinaisons B, C, H et I).

Les trois premiers niveaux de points obtenus avec chaque combinaison ont été considérés comme pouvant présenter un risque pour la santé humaine.

Prenons l'exemple de la combinaison A (temps de persistance, log de Kow et DL50). Cette combinaison comprend le temps de persistance, le log Kow et la DL50 ; le total de points pouvant être attribué à une substance est de 18. L'Oxymétazoline (décongestionnant appartenant à la classe « Système respiratoire » du code ATC) obtient le score maximal de 16,8. Elle constitue le premier niveau de hiérarchisation avec la combinaison A. Cinq molécules se sont ensuite vues attribuer un score entre 15,6 et 16 points : elles appartiennent au deuxième niveau de hiérarchisation de la combinaison A. Le troisième niveau comprend quant à lui 2 molécules ayant obtenu 15 points.

Les résultats pour l'ensemble des combinaisons figurent dans le tableau II-12.

Tableau II-12. Résultats de la hiérarchisation

Combinaison	Nombre de molécules hiérarchisées	Indicateurs	Maximum points	Meilleur score obtenu	Niveaux considérés	Nombre de molécules par niveau
A	371	TP Log Kow DL50	18	16,8	16,8 (rouge) 16-15,6 (orange) 15 (jaune) < 15	1 5 2 363
B	372	TP Solubilité DL50	18	16	16 (rouge) 15,6 (orange) 15-14,8 (jaune) < 14,8	2 1 6 363
C	372	TP BCF DL50	18	16	16 (rouge) 15-14,8 (orange) 13,8 (jaune) < 13,8	3 8 5 356
D	103	TP Log Kow QD	18	14,8	14,8 (rouge) 12-11,6 (orange) 10,8 (jaune) < 10,8	1 8 39 55
E	103	TP Solubilité QD	18	14,8	14,8 (rouge) 12 (orange) 10,8 (jaune) < 10,8	1 6 12 84
F	103	TP BCF QD	18	15	15 (rouge) 12 (orange) 10,8 (jaune) < 10,8	1 7 19 76
G	371	½ vie Log Kow DL50	18	17	17 (rouge) 16 (orange) 15 (jaune) < 15	1 9 22 339
H	372	½ vie Solubilité DL50	18	16	16 (rouge) 15-14,6 (orange) 13 (jaune) < 13	3 8 18 343
I	372	½ vie BCF DL50	18	16	16 (rouge) 15 (orange) 14 (jaune) < 14	5 9 5 353

J	103	½ vie Log Kow QD	18	15	15 (rouge) 13 (orange) 12 (jaune) < 12	1 1 18 83
K	103	½ vie Solubilité QD	18	15	15 (rouge) 12,2-12 (orange) 11,2 (jaune) < 11,2	1 10 1 91
L	103	½ vie BCF QD	18	12	12 (rouge) 11 (orange) 10 (jaune) < 10	11 18 6 68

En mutualisant les premiers niveaux de chaque combinaison, nous avons obtenu une liste de 12 molécules prioritaires qui sont regroupées par classe thérapeutique dans le tableau II-13.

Tableau II - 13. Liste de molécules prioritaires

A. Système digestif et métabolisme	C. Système cardio-vasculaire	D. Dermatologie	J. Anti-infectieux (usage systémique)	L. Antinéoplasiques et agents immuno-modulants
Lopéramide		Econazole		Estramustine
M. Système musculo-squelettique	N. Système nerveux	P. Produits antiparasitaires, insecticides et répellants	R. Système respiratoire	S. Organes sensoriels
	Buprénorphine Clomipramine Lévomépromazine Pimozide Sertraline	Perméthrine	Ebastine Oxymétazoline	

+ Miconazole (classable en A, D, G, J ou S selon la pathologie traitée)

La Perméthrine (insecticide présent dans les traitements anti-poux) et le Lopéramide (anti-diarrhéique) ressortent sur un des trois niveaux de hiérarchisation avec respectivement 10 et 12 combinaisons.

2.3.3.6 Identification de la combinaison la plus représentative

Le tableau II-14 présente les résultats de la hiérarchisation pour les molécules que nous avons identifiées comme prioritaires, avec nos 12 combinaisons. Il doit nous permettre d'identifier la combinaison la plus représentative, c'est-à-dire la combinaison permettant d'identifier le plus grand nombre de substances prioritaires parmi nos 12 molécules prioritaires.

Tableau II-14. Résultats du classement par ordre de priorité de la hiérarchisation pour le centre hospitalier

substance active	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
buprénorphine	rouge	jaune	rouge	orange		orange	orange	jaune	rouge	jaune		rouge
clomipramine	jaune		jaune				orange		rouge			
ébastine							jaune	orange	orange			
éconazole	jaune	jaune	jaune				orange	rouge	rouge			
estramustine	orange	orange	orange				jaune	orange	orange			
lévomépromazine	jaune		jaune				jaune		orange			
lopéramide	rouge	rouge	rouge	orange	orange	orange	orange	rouge	rouge	jaune	orange	rouge
miconazole	orange	orange	orange				jaune	orange	orange			
oxyétazoline	rouge	jaune					rouge	jaune				
perméthrine	jaune	jaune		rouge	rouge	jaune	jaune	orange		rouge	rouge	orange
pimozide	rouge	rouge	rouge				orange	rouge	rouge			
sertraline	jaune		jaune			jaune	jaune		orange			orange

La combinaison A, associant **TP, Log Kow et DL50**, fait ressortir 11 molécules parmi les 12 molécules prioritaires identifiées. Mais seules 4 appartiennent au premier niveau de hiérarchisation (rouge). Par ailleurs, elle identifie 7 autres molécules appartenant aux 3 niveaux de hiérarchisation pris en compte.

La combinaison C, associant **TP, BCF et DL50**, fait ressortir 11 molécules parmi les 12 molécules prioritaires identifiées. Mais seules 3 appartiennent au premier niveau de hiérarchisation (rouge). Par ailleurs, elle identifie 6 autres molécules appartenant aux 3 niveaux de hiérarchisation pris en compte.

La combinaison G, associant **demi-vie, Log Kow et DL50**, permet de faire ressortir la totalité des 12 molécules prioritaires. Cependant, une seule est identifiée comme appartenant au premier niveau de hiérarchisation (rouge). De plus, elle identifie de nombreuses autres molécules appartenant aux 3 niveaux de hiérarchisation pris en compte, et ne nous permettrait donc pas de hiérarchiser nos molécules candidates de manière pertinente.

Enfin, la combinaison I, associant **demi-vie, BCF et DL50**, fait ressortir 10 substances sur les 12 de notre liste de molécules prioritaires. Parmi ces 10 molécules, 5 appartiennent au premier niveau de hiérarchisation (rouge).

Les combinaisons A, C et I ont un fort potentiel de discrimination par rapport aux autres combinaisons possibles.

Les combinaisons C et I ne diffèrent que par le critère de persistance (temps de persistance ou demi-vie). La différence entre la combinaison A et la combinaison C, se situe au niveau de la bioaccumulation : pour la combinaison A, le Log Kow a été pris en compte, alors que le facteur de bioconcentration est utilisé dans la combinaison C.

En ce qui concerne le facteur de toxicité, le choix se porte clairement sur la DL50 à cause du manque de donnée permettant la construction du quotient de danger (QD).

Notre choix de combinaison se portera sur la combinaison I (demi-vie ; BCF ; DL50) car les données de demi-vie sont plus facilement accessibles et modélisables que les données de « temps de persistance ».

Un article reprenant l'ensemble du travail concernant l'élaboration de la méthode de hiérarchisation ainsi que son application au centre hospitalier lorrain a été soumis dans la revue Water Research.

Ce dernier reprend l'ensemble du travail de hiérarchisation effectué sur les données de l'établissement de 300 lits. Il s'agit d'exposer une comparaison entre deux méthodes de priorisation construites à l'aide des mêmes critères de cotation, l'une avec une cotation homogène (chaque variable a le même poids), l'autre avec une cotation pondérée.

Assessment of indicators used in methods for prioritizing pharmaceutical residues in surface water

DREYER Marion^a ; DEBLONDE Tiphanie^{a-b} ; FLORENTIN Arnaud^{a-b} ; HARTEMANN
Philippe^{a-b}

^a Université de Lorraine, DESP-SERES (Département Environnement Santé Publique - Service d'Études et de Recherche en Environnement et Santé), Vandœuvre-lès-Nancy, F-54500, France

^b INGRES, EA 7298, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54500, France

Corresponding author at :

Marion Dreyer

Service d'Études et de Recherche en Environnement et Santé

Faculté de Médecine

9, avenue de la Forêt de Haye

54500 Vandœuvre-lès-Nancy

France

Tel: +33 3 83 68 34 80

Fax: + 33 3 83 68 34 89

e-mail address: marion.dreyer8@etu.univ-lorraine.fr

Abstract

Background: In industrialized countries, pharmaceuticals rejected by urine are poorly eliminated by conventional methods of water treatment and accumulate in substantial amounts in the environment. Faced with this emerging pollution, some risk assessment should be conducted in order to define a strategy to limit the impact of these substances on ecosystems. Due to the large number of human drugs available in the pharmaceutical market, a prior classification of molecules is necessary.

The aim of our study was to assess which indicators are the most relevant and accessible to take into account in methods of prioritizing to estimate the risk of pharmaceuticals in surface water.

Methods: We assessed different models using indicators of persistence (half-life in water and persistence time), of bioaccumulation (Log Kow, bioconcentration factor (BCF) and solubility in water) and toxicity (median lethal dose (LD50) and predicted no effect concentration (PNEC)) to rank a list of candidate molecules.

Results: More than 300 molecules were ranked. In terms of completeness, Log Kow for bioaccumulation and LD50 for toxicity were the most accessible indicators. In terms of relevance, half-life in water for persistence, BCF for bioaccumulation and PNEC for toxicity were the best indicators.

Conclusion: The model combining half-life in water for persistence, bioconcentration factor for bioaccumulation and median lethal dose for toxicity was the best model used in our method to estimate the risk of pharmaceuticals in surface water.

Keywords:

pharmaceutical residue; surface water; prioritization method;

^ Introduction

Between 50 and 90 % of an administered dose of many pharmaceuticals ingested by human are excreted unchanged in the urine [Montague (1998)]. In the absence of separate collection system, these residues joined the waste-water network. Not designed to remove specific and complex organic pollutants, conventional waste-water treatment plants have various average removal efficiencies from one class of drugs to another (from 0 % for anti-epileptics, to 50 % for antibiotics and almost 100 % for antidepressants and psycho-stimulants) [Deblonde *and al.* (2012)]. Pharmaceutical's residues which are not degraded are discharged directly in the environment.

During the last years, recent advances in analytical methods allowed a better knowledge of the aquatic compartment. Studies highlighted a global contamination (surface water, groundwater, sea water, etc.) by pharmaceutical compounds with concentrations between few nanograms and several milligrams per liter [Mullot (2009)].

Futhermore, scientists recognized that these pharmaceutical residues are toxic to ecosystems living in these aquatic environments. Indeed, sub-lethal effects, especially on reproductive, behavioural or developmental functions, have been observed during prolonged exposures to low concentrations in many aquatic species (fish, invertebrates and algae) [Report of the French national pharmacy academy (2008)]. Numerous hypotheses about the eventual impact of these residues on human health are often developed in the media, especially dealing with the "cocktail effect".

Is this context, assessment of risks associated with this emerging pollution is necessary to develop a strategy for action before being confronted with proven environmental problems and eventual human health consequences.

However conventional approaches do not allow simultaneously assessing several molecules. In addition, few data on dose response relationships are available for pharmaceuticals, especially for low concentrations found in the environment. Thus most of the actual studies were performed in the objective of environmental risk assessment: this will be also the scope of this work.

In alternative, methods of prioritizing aim to classify the hundreds of active substances available on the market to target future risk assessments. Thus, the Food and Drug Administration (FDA) has developed in 1998 a method for prioritizing, recovery in 2005 by the European Medicines Agency (EMA), taking place in two phases [FDA (1998); EMA (2006)]. The first one is the assessment of exposure by calculating a Predicted Environmental Concentration (PEC) in surface water with a worst case scenario. This value is then compared to a maximum value in the medium (i.e. $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ for FDA and $0.01 \mu\text{g.L}^{-1}$ for EMA). Compounds for which the calculated PEC is lower than the threshold and which have no proven environmental concern are considered as not presenting significant risk to the environment. For other compounds, a second phase is to assess the risk by calculating a hazard ratio (HR), ratio of the PEC on a Predicted No Effect Concentration (PNEC) on aquatic organisms. When the ratio is greater than 1, the compound is considered to present a risk to the environment.

Due to a lack of ecotoxicological data, especially chronic one, for pharmaceutical compounds, this method allows to calculate a PNEC only for a small number of molecules [Stuer-Lauridsen *and al.* (2000); Jones *and al.* (2002); Länge *and al.* (2002); Carlsson *and al.* (2006); Crane *and al.* (2006); Fent *and al.*, (2006); Besse *and al.* (2008)]. In addition, the PEC calculation which takes into account consumption, metabolism and elimination in sewage treatment plants, depends on the consumption patterns of the study area, genetic differences

between individuals and the processes used to water treatment. The results are therefore difficult to generalize from one country to another and even from one region to another, especially as the guide values differ between the two agencies.

Other methods for prioritizing substances have thus emerged in recent years to measure the environmental impact of pharmaceutical compounds. Sweden has introduced in 2003 a system of classification of pharmaceutical substances whose aim is to increase the demand for drugs with a low environmental impact [Stockholms County Council (2012)]. Each molecule is represented by a hazard class and a risk class. Risk is expressed with EMEA guidelines (HR = PEC/PNEC). Hazard is expressed in terms of the pharmaceutical's persistence (P), potential to bioaccumulation (B), and eco-toxicity (T).

According to the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)'s test guidelines:

2. Biodegradability is assessed based on criteria for ready biodegradation (test 301) or another equivalent test of biodegradability;
3. Potential bioaccumulation is assessed on the partition coefficient n-octanol/water (reported as K_{ow} in the Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) and as P_{ow} in the European Union (EU) legislation), in which substances with $\log K_{ow}$ (or $\log P_{ow}$) > 3 are judged to be potentially bioaccumulating (OECD test 107 or 117);
4. Toxicity for aquatic organisms is assessed based on the results of toxicity tests including three trophic levels: fish, Daphnia and algae (OECD test guidelines 203, 202 and 201 or equivalent). Data for the most sensitive organisms are used in the assessment.

However, today there is an ongoing debate in the scientific community on the indicators that should be used to estimate these "PBT criteria" [Renner *and al.* (2002); Linkov *and al.*

(2005)].

In this context, the aim of our study was to assess which indicators are the most relevant and accessible to take into account in methods of prioritizing to estimate the environmental risk of pharmaceuticals in surface water.

▲ Material and method

To achieve our goal, we ranked candidate molecules with multiple models using different indicators to assess the PBT criteria.

Candidate substances: Our preliminary database contains all the synthetic active substances (excluding naturally occurring molecules and excipients) consumed in a French regional hospital center between January and October 2011.

Collect of indicators: Data on these compounds were obtained by searching in online chemical databases, relevant scientific literature and drug manufacturer information. For each pharmaceutical, available information on their physicochemical properties, especially persistence, bioaccumulation and toxicity properties (PBT criteria), were compiled. For persistence, we collected two indicators from a multimedia model (EPI [Estimation Programs Interface] Suite™) developed by the United States Environmental Protection Agency (US EPA) that simulates the fate of chemicals in the environment from their physicochemical properties: the persistence time (PT) and the half-life in water [US EPA (2012)]. To assess the bioaccumulation potential of the different active substances, we collected three indicators: the logarithm of the octanol-water partition coefficient (Log K_{ow}), the solubility in water at 25°C and the bioconcentration factor (BCF). For toxicity, we collected two indicators: the median lethal dose (LD₅₀) and the Predicted No Effect Concentration (PNEC).

Rankings:

- Raw scores

Initially, for ranking our candidate drugs, we constructed, for each indicator, a score based on scales from literature.

- Weighted scores

In a second step, to attribute the same weight to all the indicators, we applied a correction factor to the different scores.

Raw and weighted scores are presented with their source in Table I.

Table I. Raw and weighted scores for the rankings of molecules [sources used for scales]

PERSISTENCE INDICATORS									
Persistence Time [Zuccato(2000)]			Half-life in water [US EPA (2012)]						
	R	W				R	W		
Less than one day	1	1.2	55,9 Hours				1	1	
Between 1 and 19 days	2	2.4	208 Hours				2	2	
Between 20 and 100 days	3	3.6	360 Hours				3	3	
Between 101 and 364 days	4	4.8	900 Hours				4	4	
More than 365 days	5	6	1 440 Hours				5	5	
			4 320 Hours				6	6	
BIOACCUMULATION INDICATORS									
Log Kow*			Solubility mg per liter [AFSSA, 2008]			BCF*			
	R	W		R	W		R	W	
Inferior to 3	0	0	Superior to 100			1	1.2	Inferior or equal to 100	
Between 3 and 4	1	2	Between 10 and 100			2	2.4	Between 100 and 500	
Superior or equal to 4	3	6	Between 1 and 10			3	3.6	Superior to 500	
			Between 0.1 and 1			4	4.8		
			Inferior or equal to 0.			5	6		
TOXICITY INDICATORS									
LD50 mg/kg [Hodge and Sterner]			PNEC mg						
	R	W				R	W		
Superior or equal to 15 000	1	1	Superior or equal to 100			1	1.2		
Between 5 000 and 15 000	2	2	Between 10 and 100			2	2.4		
Between 500 and 5 000	3	3	Between 1 and 10			3	3.6		
Between 50 and 500	4	4	Between 0.1 and 1			4	4.8		
Between 1 and 50	5	5	Inferior to 0.1			5	6		
Inferior to 1	6	6							

R = raw; W = weighted; AFSSA = Agence française de sécurité sanitaire des aliments (French agency for the food security)

*For BCF and Log Kow, we developed scores which are taking into account the difference in threshold between the EU law and the Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS).

To rank our molecules taking into account the three PBT criteria, we combined the different scores developed above in both sets (raw and weighted). Twelve different combinations for each set of scores were used to do 12 rankings of the pharmaceuticals. The twelve combinations or models are presented in Table II.

Table II. Models used to rank our candidate molecules

	Persistence Indicators	Bioaccumulation Indicators	Toxicity Indicators
Model A	Persistence Time	Log Kow	LD50
Model B	Persistence Time	Solubility	LD50
Model C	Persistence Time	BCF	LD50
Model D	Persistence Time	Log Kow	PNEC
Model E	Persistence Time	Solubility	PNEC
Model F	Persistence Time	BCF	PNEC
Model G	Half-life in water	Log Kow	LD50
Model H	Half-life in water	Solubility	LD50
Model I	Half-life in water	BCF	LD50
Model J	Half-life in water	Log Kow	PNEC
Model K	Half-life in water	Solubility	PNEC
Model L	Half-life in water	BCF	PNEC

For each set of scores (raw and weighted), we developed a list of priority molecules by considering all molecules that obtained the highest score with each model.

A comparison between the two lists was made and for each list, we analysed the model which is the most representative, allowing us to appreciate what indicators are most relevant and accessible to take into account how to assess exposure and biological effects of pharmaceuticals on aquatic organisms.

^ Results

From January to October 2011, 1307 specialities were distributed by the pharmacy of the hospital center. After conversion in active substances and exclusion of excipients and natural molecules, 605 molecules were composing our list of candidate substances for prioritization.

Table III shows the rates obtained for each indicator collected.

Table III. Rate collection of indicators

Indicators	Number of molecules (n=605)	Percentage (%)
Persistence time	448	74
Half-life in water	448	74
Log Kow	562	93
Solubility	448	74
BCF	448	74
LD50	463	77
PNEC	155	26

Taking into account one indicator for each PBT criteria, we constructed, for each set of scores (raw and weighted), 12 models (A to L) to rank our list of candidate molecules (Table II). Depending on the indicator used, the number of molecules prioritized was variable: models using the PNEC can be applied only to 103 molecules (17 %) while other combinations could rank more than 60 % of substances in our list.

For each set (raw and weighted) and for each model (A to L), we considered molecules with the highest score. The table IV presents the results of the prioritization for each model.

Table IV. Results of the rankings

Model	Indicators	Number of prioritized molecules (%)	Raw scores			Weighted scores		
			Total points	Best score	Number of molecules with best score	Total points	Best score	Number of molecules with best score
A	PT Log Kow LD50	371 (61)	14	13	1	18	16.8	1
B	PT Solubility LD50	372 (61)	16	14	3	18	16	2
C	PT BCF LD50	372 (61)	14	12	3	18	16	3
D	PT Log Kow PNEC	103 (17)	13	12	4	18	16.8	4
E	PT Solubility PNEC	103 (17)	15	14	2	18	16.8	2
F	PT BCF PNEC	103 (17)	13	12	3	18	16.8	3
G	Half-life Log Kow LD50	371 (61)	15	14	1	18	17	1
H	Half-life Solubility LD50	372 (61)	17	15	3	18	16	3
I	Half-life BCF LD50	372 (61)	15	13	5	18	16	5
J	Half-life Log Kow PNEC	103 (17)	14	13	4	18	17	2

K	Half-life Solubility PNEC	103 (17)	16	15	1	18	17	1
L	Half-life BCF PNEC	103 (17)	14	13	2	18	17	1

By pooling the results of the 12 models, we obtained a list of 11 priority molecules with the raw set of scores and a list of 9 molecules with the weighted set of scores. These lists are presented in Table V. Nine molecules are present on the two lists.

Table V. Priority lists

Priority list with raw scores		Priority list with weighted scores	
Atovaquone	Loperamide	Atovaquone	Oxymetazoline
Buprenorphine	Oxymetazoline	Buprenorphine	Permethrin
Clomipramine	Permethrin	Clomipramine	Pimozide
Econazole	Pimozide	Econazole	Sertraline
Etravirine	Sertraline	Loperamide	
Latanoprost			

The model I, which combines half-life in water, BCF and LD50, highlights the most of molecules (five of the eleven substances in the raw list and five of the nine substances in the weighted list).

♣ Discussion

A method of prioritizing is based on the implementation of a simplified assessment of human or environmental risks [Jean (2008)]. This assessment needs to take into account limited data or easily available data to be applied to many molecules. Then these molecules are classified according to the risk they pose for defining a list of priority molecules to analyze. The effectiveness of such an approach is based on the relevance of the indicators chosen and the

completeness of the collection in order to compare all candidate substances.

Completeness: Log Kow is a more accessible indicator than BCF and solubility to measure the bioaccumulation of active substances (collection rate of 93 % versus 74 %). For PNEC, we found a collection rate of 26 %. This result is in accordance with the feedback five years after the implementation of the classification system in Sweden, since risk assessment was missing for 47 % of the molecules classified, corresponding to 50 % of active substances consumed [Wennmalm *and al.* (2009)]. In contrast, the LD50 seems more approachable (collection rate of 77 %). For persistence, the two chosen indicators have the same rate of collection (74 %).

Relevance: There is an ongoing debate in the scientific community on the criteria that should be used to estimate the overall persistence [Environmental Health Analysis Center (2012)]. Persistence time is an indicator wider than half-life in water. Indeed, persistence time comprehensively measure the duration of persistence of the chemical in the environment, taking into account the possible exchanges between compartments (air, soil, sediments). The half-life, meanwhile, measures the time taken for a substance to lose half of its activity. A half-life is generally estimated in each environmental medium (air, water, soil and sediment) and do not take into consideration partitioning into or out of the medium or physical transport. Thus, it seems to be a more suitable indicator for the fate of chemicals in surface water.

Persistence can be assessed only indirectly by a representation of the behaviour of the molecule in the environment. Thus, persistence time and half-life in water are both predicted indicators. The validity of model predictions for risk assessment is a subject of continuing debate. However individual estimation programs and/or their underlying predictive methods and equations used in the EPI Suite™ program have been described in numerous journal

articles in peer-reviewed technical journals [US EPA (2012)].

Log Kow and solubility in water are two indicators widely used to estimate exposure, accumulation and sorption to soils and sediments. But the uncertainty associated with these indicators can be high and small changes in their value may result in significant differences in estimated human or ecological risk [Linkov *and al.* 2005]. Scientists agreed that there are significant uncertainties in solubility values because of a lack of good analytical methods and because QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) programs fail to yield “good” estimates [Renner *and al.* (2002)].

Pontolillo *and al.* (2001) reviewed approximately 700 publications with data on aqueous solubility and Log Kow for organochlorine pesticides, dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and 1,1-dichloro-2,2bis(p-chlorophenyl)-ethylen (DDE). They found egregious errors in reporting data and references (until 2-4 orders of magnitude differences with original data) and poor data quality and/or inadequate documentation of procedures (95-100 % of the database literature is of poor or unevaluatable quality). In this work, for Log Kow, we preferentially used measured data with reference to the original study.

BCF which appreciates the concentration in aquatic organisms by direct aqueous way is a more informative parameter than Log Kow and solubility to assess the bioaccumulation potential of pharmaceuticals. But this indicator is estimated from the Log Kow and tainted of the same uncertainties as described above. However, in this study, the predicted data used came from the EPI Suite™ Program which used measured data (when available) of Log Kow to estimate the BCF. Moreover BCFWIN, the program who estimates fish BCF and its logarithm uses two different methods: a traditional regression based on the Log Kow plus any applicable correction factors and a method which calculates BCF from mechanistic first principles [US EPA (2012)].

PNEC, which is the concentration of a chemical below which it should not have any harmful effects on organisms in aquatic ecosystems, is by definition a more relevant indicator of toxicity to consider in the prioritization methods of drug residues than LD50 which assess the acute toxicity in rodents. Furthermore, the 50% survival of animals is not a sufficient public health goal. But, due to lack of ecotoxicological data, already pointed out by several studies [Stuer-Lauridsen *and al.* (2000); Jones *and al.* (2002); Länge *and al.* (2002); Carlsson *and al.* (2006); Crane *and al.* (2006); Fent *and al.*, (2006); Besse *and al.* (2008)], the PNEC does not seem appropriate to prioritize hundreds of active substances available on the French market. In many studies, the PNEC is used in a hazard ratio with a PEC. It allows taking into account the consumption of the molecules. In this study, we choose to use the PNEC and not the HR in order to compare PNEC and LD50. *Deblonde and al.* [Results not published], found a priority list of 12 molecules with eight in common with this study when the HR is used as toxicity indicator with the same data.

Priority list

With consumption data in a regional hospital center, we established a list of 11 priority molecules with the raw scores and a list of nine molecules with the weighted scores. In the results, only the first level of prioritizing is presented. The two additional molecules with raw scores, Etravirine and Latanoprost were in the second level with weighted scores.

In the Swedish classification [Stockholms County Council (2012)], each of the criteria PBT is assigned a score between 0 and 3, the sum of these values is the PBT index of the substance. A PBT index of 0 means that the drug is biodegradable, non-toxic and low bioaccumulative. In contrast, an index of 9 corresponds to a dangerous substance for the environment.

Atovaquone and Permethrin have a maximal PBT index and Loperamide, an index of 8. Except for Pimozide which was not evaluated and for Econazole and Latanoprost for which no hazard evaluations were done, the other molecules have a moderate PBT index (5 or 6) linked to a difference in the appreciation of the bioaccumulation potential. According to the US EPA model, Log Kow for Buprenorphine, Clomipramine, Etravirine, Oxymetazoline and Sertraline are all superior to 4 (4.98, 5.25, 4.02, 4.87 and 5.29 respectively) [US EPA (2012)]. However in the Swedish classification, they have a bioaccumulation score of zero.

Among our priority lists, 4 molecules (Buprenorphine, Clomipramine, Sertraline and Pimozide) belong to the central nervous system (CNS) class according to the Anatomical Therapeutic Chemical classification system (ATC). Cooper *and al.* in 2008, have also found that for most rankings, the pharmaceuticals most commonly ranked in the top 100 were those classified as CNS.

With the development of the degenerative diseases linked to elderly population, this class of drugs is the most prescribed after cardiovascular pharmaceuticals [AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé - French agency for the drug security) (2011)]. In to the objective to reduce the environmental impact by increasing the demand for drugs less toxic for ecosystem, risk assessments must target this class in priority.

In human health, future risk assessments must also consider other routes of exposure. The ingestion of antibiotic residues in fish and shellfish, but also in meats, can disrupt the normal intestinal flora and cause problems of allergy or toxicity [Haguenoer (2010)]. Interactions with other drugs and even other chemicals substances should also be studied.

⤴ Conclusion

In this study, more than 300 molecules were ranked using different models to assess which indicators to take into account to estimate the risk of pharmaceuticals in surface water. The results show that the half-life in water for the persistence and the BCF for the bioaccumulation potential are the most relevant indicators to be considered in the prioritization methods of pharmaceuticals. Although less informative than the PNEC, the median lethal dose could be used, due to its accessibility in the online databases, to assess toxicity.

Due to their high consumption, the future risk assessments should target drugs from the CNS which commonly emerge in different rankings like priority.

⤴ Acknowledgements

We are grateful to Dr. Nathalie Diguio, for her contribution in this research.

⤴ References

Académie nationale de pharmacie, 2008. Médicaments et environnement. [Report]

AFSSA, 2008. Hiérarchisation des résidus de médicaments d'intérêt pour l'analyse des ressources des eaux traitées. [Report]

AFSSAPS, 2011. Vente de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France : chiffres clés 2010. [Report]

Besse, JP., Kausch-Barreto, C., Garric, J., 2008. Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment : Application to the French situation and preliminary prioritization. Human and Ecological Risk Assessment 14 (4): 665-695.

Carlsson, C., Johansson, AK., Alvan, G., Bergman, K., Kühler, T., 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants ? Part I : Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. Sci Tot Environ 364 :67-87.

Crane, M., Watts, C., Boucard, T., 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. Science of the Total Environment 367 (1):23-41.

Cooper, E., Siewicki, T., Phillips, K., 2008. Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. Science of the total environment, 398, 26-33.

Deblonde, T., Dreyer, M., Hartemann, P., 2012. Résidus médicamenteux et eau destinée à la consommation humaine. Hegel Vol. II N°3.

EMA, 2006. European Medicine Agency Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use. EMA/CHMP/SWP/4447/00.

Environmental Health Analysis Center, 2012. PBT Profiler. <http://www.pbtprofiler.net/>

European Commission, 2007. Comparison between EU and GHS Criteria: Human health and environment. GHS ST/SG/AC. 10/30/Rev2. [Draft]

FDA, 1998. Guidance for Industry-Environmental Assessment of Human Drugs and Biologic Applications. FDA, CDER/CBER, CMC 6, rev. 1.

Fent, K., Weston, AA., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol*, 76,122-159.

Haguenoer JM. Les résidus de médicaments présentent-ils un risque pour la santé publique? *Environnement et santé publique*. 2010. 22-3:325-342.

Jean, J., 2008. Identification et priorisation des substances médicamenteuses bioaccumulables rejetées dans les effluents hospitaliers. [These]

Jones, OAH., Voulvoulis, N., Lester, JN., 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research* 36 (20):5013-5022.

Länge R., Dietrich, D., 2002. Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances - conceptual considerations. *Toxicology Letters* 131(1-2):97-104.

Linkov, I., Ames, M., Crouch, E., Satterstrom, K., 2005. Uncertainty in Octanol-Water Partition Coefficient: Implication for risk assessment and remedial costs. *Environmental science and technology*, 39(18), 6917-6922.

Montague, P., 1998. Drug in water. *Environment and Health Weekly* #614. Environmental Research Foundation.

Mulot, JU., 2009. Modélisation des flux de médicaments dans les effluents hospitaliers. [These]

Pontolillo, J., Eganhouse, RP., 2001. The search for reliable aqueous solubility (Sw) and Octanol-Water Partition Coefficient (Kow) data for hydrophobic organic compounds: DDT and DDE as a case study. U.S. Geological Survey, Water-Resources Investigation Report.

Renner, R., 2002. The Kow controversy. *Environmental science and technology*, 411-13.

Stockholms County Concil, 2012. Environmentally classified pharmaceuticals. <http://www.janusinfo.se/environment>

Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, LP., Holten-Lützhof, HC., Halling-Sorensen, B., 2000. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere* 40, 783-793.

US EPA, 2012. Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v 4.11.

Wennmalm, A., Gunnarsson, B., 2009. Pharmaceutical management through environmental product labelling in Sweden. *Environ Int.*, 35(5):775-7.

Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., Fanelli, R., 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet*. 20;355(9217):1789-90.

Les données de consommation de spécialités pharmaceutiques d'un centre hospitalier de 300 lits ont été analysées à l'aide de différents critères de persistance, de bioaccumulation et de toxicité.

Dans ce travail, le quotient de danger (PEC/PNEC) a été remplacé par la PEC pour un souci de représentativité des données. En effet, le faible nombre de données de PNEC rendait le calcul de quotient de danger (QD) et l'exploitation de ce paramètre limité.

2.3.4 Le cas particulier des anticancéreux

Le centre Alexis Vautrin (CAV), désormais appelé Institut de cancérologie Lorraine (ICL), est le seul établissement hospitalier de la région Lorraine qui consacre la totalité de son activité médicale et paramédicale au diagnostic et au traitement des cancers. Il a été créé en 1924 et se situe sur le plateau de Brabois à proximité du CHU à Vandoeuvre les Nancy. Comptant 180 lits, le CAV prend en charge annuellement 12000 patients, dont 3400 nouveaux cas. Ces patients bénéficient de 32500 consultations, 35000 journées d'hospitalisation, 8500 journées d'hospitalisation de jour et 8500 prescriptions de chimiothérapie.

Les données de consommation de médicaments de ce centre de soins ont été demandées, fournies et analysées. Seules les données concernant les substances actives appartenant au groupe L (classification ATC) « antinéoplasiques et agents immunomodulants » ont été incluses pour la poursuite de notre étude. Ces données de consommation sont présentées dans la figure 2-7.

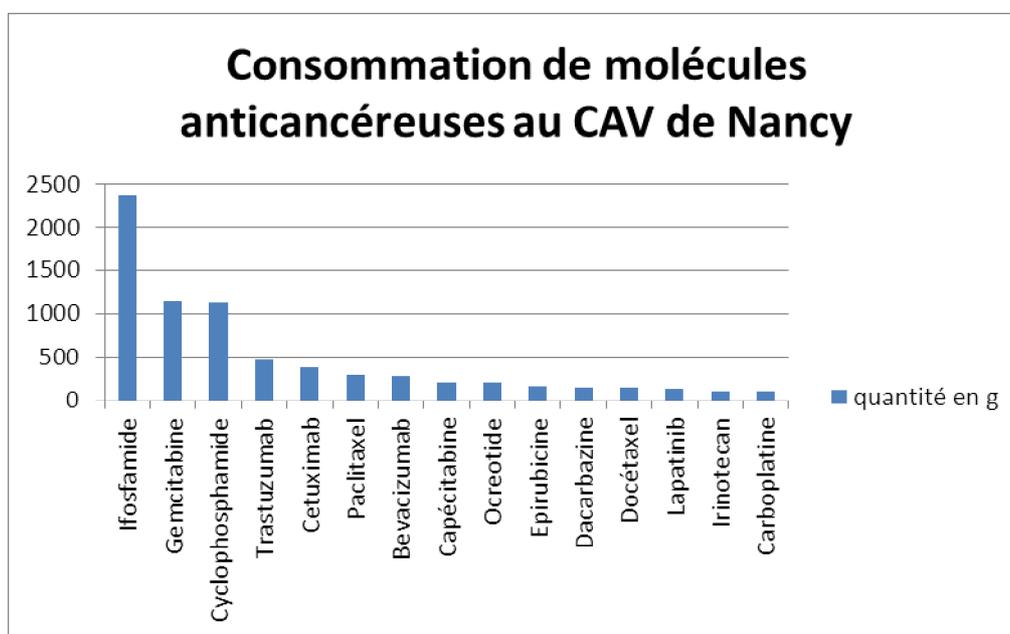


Figure 2-7 : données de consommation de molécules anticancéreuses au CAV de Vandoeuvre les Nancy (année 2011)

A l'aide de la combinaison optimale de critères de sélection (demi-vie ; BCF ou log Kow ; DL50), nous avons cherché à hiérarchiser les molécules anticancéreuses à partir des données disponibles, en les pondérant avec un 4^{ème} critère (quantité consommée). L'introduction de ce 4^{ème} critère va permettre de sélectionner les molécules de façon réaliste.

La cotation du critère de quantité ainsi que sa répartition sont détaillées dans les tableaux II-15 et II-16 ci-dessous.

Tableau II-15 Score de quantité calculé pour les molécules anticancéreuses délivrées par le CAV (2011)

Quantité (en g)	Indice de quantité
Supérieur ou égal à 2000	18
2000 exclus à 1500	16
1500 exclus à 1000	14
1000 exclus à 500	12
500 exclus à 250	10
250 exclus à 100	8
100 exclus à 50	6
50 exclus à 10	4
10 exclus à 1	2
< à 1	1
0	0

Le score basé sur la quantité délivrée pour chaque molécule anticancéreuse au centre Alexis Vautrin s'étale de 0 à 18.

Tableau II-16 Représentation de la répartition du nombre de molécule par indice de quantité

Indice de quantité	Nombre de molécules concernées
18	1
16	0
14	2
12	1
10	3
8	8
6	2
4	11
2	12
1	20
0	1

D'après ce tableau, nous remarquons qu'une seule molécule obtient un score de 18 (ifosfamide). La majorité des molécules obtiennent un indice de quantité entre 1 et 4 puisque 43 molécules se trouvent dans cette fourchette de score.

Tableau II-17 Score final hiérarchisant les 10 molécules ayant le plus haut score

Molécules	Score obtenu
Ifosfamide	26
Cyclophosphamide	22
Gemcitabine	21
Estramustine	19
Dacabazine	15
Tamoxifène	15
Capécitabine	14
Mitotane	14
Sunitinib	14
Fluoro-uracile	13

Suite à cette étude de hiérarchisation, l'Ifosfamide et le Cyclophosphamide seront étudiés dans la poursuite du travail. L'évaluation des risques se fera en priorité sur ces molécules.

2.4. Synthèse concernant la hiérarchisation des molécules

- État de la littérature sur la hiérarchisation des molécules concernant le risque environnemental

Notre revue de la littérature concernant les méthodes de hiérarchisation des molécules présentant un risque environnemental nous a montré que 3 méthodologies pouvaient être employées : la méthodologie EMEA, la méthodologie QSAR et la méthodologie PBT.

La méthodologie EMEA est celle qui a fait l'objet du plus grand nombre de publications. Facile à mettre en œuvre lorsque les données sont disponibles, elle fait intervenir un quotient de danger (QD), quotient entre la concentration prédite dans l'environnement et la dose sans effet environnemental. Néanmoins, elle nécessite la connaissance de ces 2 informations, situation peu fréquente pour les médicaments, et est donc peu adaptée à la hiérarchisation des molécules quant à leur risque pour la santé humaine.

La méthodologie QSAR permet de calculer un score de danger en se basant sur la structure chimique des substances étudiées. A chaque groupement chimique correspond un effet environnemental. Bien adaptée au milieu environnemental, cette méthodologie n'a pas de sens lorsqu'elle est adaptée au risque sanitaire puisque les groupements chimiques des médicaments ont pour objectif de donner des effets bénéfiques (curatifs ou préventifs).

Enfin, la méthodologie PBT a été employée par quelques auteurs, et exploitée jusqu'à application clinique en Suède. Ainsi, le Conseil régional de Stockholm a mis en ligne un score de risque environnemental (basé sur des critères de persistance, bioaccumulation et toxicité dans l'environnement) à destination des médecins prescripteurs. A effet thérapeutique équivalent, les praticiens sont encouragés à utiliser les molécules qui auront le moindre effet environnemental.

Chacune de ces méthodologies permet d'identifier une liste de molécules présentant un risque environnemental. Toutefois, ces listes ne se recoupent que pour quelques médicaments (aspirine, notamment). Cette absence de lien peut être liée au fait que toutes les molécules n'ont pas été hiérarchisées au moyen de chaque méthode.

Notre partie discussion (paragraphe 4.2.1.) présentera un argumentaire plus détaillé des avantages et limites de chaque méthodologie.

- Construction de notre méthode de hiérarchisation

Nous avons dans une seconde partie recherchée un moyen de hiérarchiser des molécules candidates (par exemple molécules très utilisées en thérapeutique humaine) quant au risque qu'elles pouvaient présenter sur la santé humaine. Le choix de nos molécules candidates a été dicté par les données de consommation médicamenteuse d'un établissement lorrain de 300 lits. La pertinence de l'utilisation de ces données sera discutée en paragraphe 4.2.1.

Au regard des avantages et limites des méthodes présentées ci-dessus, nous avons choisi de les hiérarchiser selon une méthodologie originale que nous avons construite à partir de la méthode PBT. Cette méthodologie supposait le recueil, pour chaque molécule, de plusieurs critères :

- critères de persistance : temps de persistance, demi-vie dans l'eau ;

- critères de bioaccumulation : solubilité, facteur de bioconcentration, log Kow ;
- critères de toxicité : quotient de danger, dose létale médiane.

Ces 7 indicateurs étaient ensuite combinés de différentes manières (12 combinaisons envisagées) pour calculer des scores de hiérarchisation ; trois niveaux de hiérarchisation étaient définis pour chaque combinaison. Chaque molécule candidate a ensuite été scorée selon toutes les combinaisons possibles (combinaisons pour lesquelles les données étaient disponibles). Les molécules pour lesquelles au moins une combinaison identifiait un niveau 1 de hiérarchisation étaient dites « prioritaires ».

Enfin, nous avons recherché la combinaison la plus représentative, qui nous permettait d'identifier en un seul calcul le plus grand nombre de molécules prioritaires.

Tous ces choix méthodologiques seront argumentés dans la discussion.

- Résultats de notre méthode de hiérarchisation

Cette méthodologie appliquée aux 606 substances actives consommées dans un CH lorrain de 300 lits nous a permis d'identifier 12 molécules prioritaires, à suivre lors des études de génotoxicité et de l'évaluation de risque finale.

Nous avons ensuite appliqué la combinaison la plus représentative sur des molécules candidates différentes (consommation en anticancéreux d'un centre anticancéreux), en y ajoutant un critère de quantité consommée. Deux autres molécules prioritaires ont été identifiées par ce moyen : le cyclophosphamide et l'ifosfamide ressortent comme les deux molécules prioritaires à évaluer d'un point de vue génotoxique. Le 5 fluorouracile a été ajouté à cette liste car la littérature fait mention de cette molécule comme celle qui est principalement administrée en établissement de soins et à domicile.

Ces molécules n'ont pas toutes pu être étudiées par les auteurs publiant sur le risque environnemental du fait de données manquantes fréquentes. Nous discuterons l'apport de notre méthodologie dans l'évaluation du risque pour la santé humaine.

3. Évaluation des risques pour les molécules anti-cancéreuses

Notre méthode de hiérarchisation des molécules anti-cancéreuses nous a conduit à poursuivre notre évaluation des risques pour le cyclophosphamide et l'ifosfamide. Nous y avons ajouté le 5 fluoro-uracile du fait de son utilisation fréquente dans les traitements administrés à domicile. Cette molécule n'apparaît pas comme prioritaire bien que ce soit la molécule anticancéreuse la plus distribuée en France, le profil de consommation du centre anticancer lorrain semble être particulier d'où notre choix de l'inclure dans la suite de ce travail.

3.1. *Rappels sur l'évaluation quantitative des risques*

3.1.1. Rappels méthodologiques

La démarche d'évaluation des risques présente le grand intérêt d'apporter une méthode structurée dans un contexte de connaissances limitées et incertaines. Même lorsque de nombreuses incertitudes sont présentes dans la démarche ou dans les données utilisées, elle fournit un cadre uniforme propre à prendre en compte et organiser dans la transparence toutes les informations disponibles, à des fins décisionnelles.

L'évaluation quantitative des risques comporte 4 étapes listées ci-dessous (European commission, 2003).

3.1.1.1. L'identification du potentiel dangereux

a. Recensement des agents contaminants

Cette étape consiste à lister l'ensemble des substances ou agents présents dans les milieux environnementaux et auxquels les populations étudiées sont potentiellement exposées. Elle comprend donc une évaluation des émissions, mais également des diffusions, transports, transferts et transformations de ces molécules dans les milieux. L'exhaustivité est souvent difficile à cette étape du fait des manques de connaissances et/ou d'une grande complexité des situations.

En effet, en dehors des situations accidentelles, la contamination des milieux de vie est en général faible, mais fréquemment variable dans le temps et l'espace. Par ailleurs, certains milieux tels que les sols peuvent se comporter comme de véritables réacteurs chimiques dont le fonctionnement et les substances qui en sont issues sont difficiles à analyser. Ce constat, complété par des difficultés d'ordre métrologiques et/ou méthodologiques (seuils de détection, coût des analyses, modélisation des transferts de polluants, etc.), rend souvent délicat le recensement précis des agents susceptibles d'être présents dans les milieux d'exposition.

Lorsque l'inventaire des substances ou agents présents est important, une sélection ou une priorisation peut devenir nécessaire lors de cette phase. Il importe dans tous les cas d'être

transparent quant aux critères de sélection des agents ou substances retenus (quantité de substance rejetée, comportement de la substance dans l'environnement et dans la chaîne alimentaire, dangerosité, etc.).

Cette étape a fait l'objet de la partie 2 de notre travail.

b. Recensement des effets indésirables

Les effets indésirables peuvent être de nature et de gravité très variées : il peut s'agir par exemple de cancers, de gastro-entérites banales ou de simples désagréments cutanés. Ces effets doivent donc toujours être bien définis.

i. Les études épidémiologiques

Elles constituent l'outil de référence pour établir une association entre une cause et la survenue d'une maladie au sein d'une population. Elles sont toutefois peu adaptées à la mise en évidence d'effets multifactoriels ou correspondants à des expositions à faibles doses. En effet, dans ces situations, les associations sont particulièrement difficiles à mettre en évidence et les études épidémiologiques sont très sensibles aux erreurs de différentes natures (facteurs de confusion, biais de recueil ou d'analyse, etc.). Le nombre d'individus nécessaires pour les établir de manière statistiquement significative est parfois supérieur au nombre de personnes exposées. Néanmoins, des études épidémiologiques ont permis, en s'intéressant à des populations plus fortement exposées comme les travailleurs ou les populations soumises à une catastrophe, de montrer un lien (ou une relation de causalité) entre la survenue d'une pathologie et l'exposition à un agent dangereux, voire d'en déduire des relations dose-réponse ou dose-effet qui sont ensuite utilisées dans les évaluations de risques.

ii. Les études toxicologiques

Les études toxicologiques expérimentales sur animaux de laboratoire constituent la deuxième source majeure d'informations dans les évaluations de risque. Elles sont plus faciles à mettre en œuvre, moins coûteuses et mieux contrôlables quant aux différents facteurs interférents, que les études épidémiologiques.

Néanmoins, afin de pouvoir observer et quantifier les effets produits par un agent sur un nombre réduit d'animaux, les doses d'exposition employées dans les études toxicologiques sont souvent supérieures à celles retrouvées dans des situations environnementales réelles. Il est possible donc dans certains cas être confronté au risque de faire apparaître une toxicité pouvant masquer d'autres effets (cancéreux par exemple) qui pourraient apparaître au sein des populations exposées en situation réelle.

L'identification du potentiel dangereux d'une situation se complexifie encore lorsque l'on a affaire à des expositions à des agents multiples, de même nature (plusieurs substances chimiques par exemple) ou de natures différentes : physique, chimique ou biologique. En dehors de quelques cas (radon et tabac ou amiante et tabac par exemple), les phénomènes

d'interactions entre agents dangereux sont très mal connus. Leurs effets peuvent être additifs, synergiques ou antagonistes. Les phénomènes de promotion (accroissement de l'action d'un agent par un autre agent qui, en lui-même, n'a pas d'effet observé) sont également peu connus.

3.1.1.2. L'estimation de la relation dose-effet ou dose-réponse

Cette étape a pour but de définir une relation quantitative entre une dose d'exposition et un niveau d'effet, ou entre une dose d'exposition et une probabilité de survenue d'un effet. Les co-expositions (exposition de façon concomitante à plusieurs agents) ne sont pas, dans la très grande majorité des cas, prises en compte dans l'estimation de cette relation. Une valeur toxicologique de référence est extraite de cette relation dose-effet ou dose-réponse. Elle dépend de la nature des effets étudiés : déterministes ou stochastiques.

a. Les effets déterministes

Il s'agit d'effets dont la gravité augmente avec la dose d'exposition de l'individu. Pour les agents (chimiques ou autres) à l'origine d'un effet déterministe, il est admis qu'il existe un seuil d'exposition en deçà duquel aucun effet néfaste n'est observable (y compris au sein des organes après autopsie). Il est également question d'effets à seuil de dose, et ce seuil est à estimer pour l'Homme grâce aux expérimentations sur animaux ou aux études épidémiologiques. Pour les substances chimiques, la VTR (Valeur Toxicologique de Référence) correspond à ce seuil (Bonvallot, 2002).

b. Les effets stochastiques

Il s'agit des effets sanitaires de certains agents, en particulier cancérigènes, dont la fréquence (et non la gravité) croît avec la dose d'exposition. Il est généralement considéré que ces effets peuvent survenir sans seuil, autrement dit dès qu'une exposition existe, aussi faible soit-elle. Il est donc question d'effets sans seuil de dose. Dans ce cas, la valeur toxicologique de référence sera la probabilité de survenue d'un effet par unité de dose.

La figure (3-1) ci-après présente ces notions sous forme de graphiques.

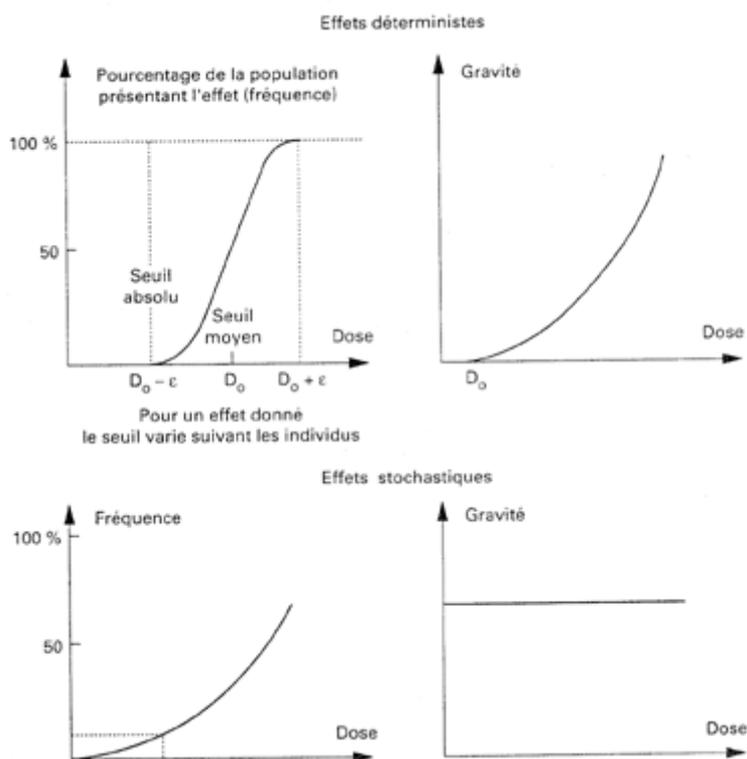


Figure 3-1 : Différences entre les effets déterministes et les effets stochastiques. D'après <http://www.uvp5.univ-paris5.fr/RADIO/Info/ciprfig1.asp>

c. Les difficultés de la quantification

Quel que soit le type d'effets indésirables, la quantification de la relation dose-effet ou dose-réponse se heurte à plusieurs difficultés. D'une part, les données relatives à de nombreuses substances ou agents sont encore absentes ou largement insuffisantes. D'autre part, la transposition des résultats observés sur l'animal (pour des expositions élevées sur des périodes de temps relativement courtes) aux situations réelles chez l'Homme, impose de recourir à des extrapolations ou à des facteurs d'incertitude dont il est très difficile de vérifier la pertinence. Même lorsque la relation dose-réponse est issue d'une étude épidémiologique, celle-ci a souvent été effectuée en milieu professionnel et pour des doses d'exposition supérieures à celles de l'environnement. Là encore, des extrapolations sont nécessaires pour passer de fortes doses à des doses plus faibles, d'un mode d'exposition à un autre, d'une population particulière à la population générale. Enfin, il faut souligner qu'en général, la même relation dose-réponse est appliquée à tous les individus (hommes, femmes, jeunes, personnes âgées, malades, etc.), quels qu'ils soient (US-EPA, 2005).

3.1.1.3. L'évaluation de l'exposition

L'estimation des expositions s'appuie sur une succession d'étapes dont l'objectif final est de décrire et de quantifier aussi précisément que possible les expositions à un agent, dans un milieu donné, pour une voie d'exposition donnée et pour un groupe d'individus donnés.

Doivent être analysées :

- la contamination du milieu : zones ou médias d'exposition concernés, localisation, distribution des contaminations dans le temps et dans l'espace, etc. ;
- les populations concernées par cette contamination (nombre d'individus, profil) et leur mode de vie ;
- les voies d'exposition de ces populations ainsi que les fréquences et les durées de contact avec l'agent dangereux ;
- l'exposition à proprement parler, produit du niveau de contamination par la durée de contact avec cette contamination.

L'évaluation de l'exposition impose de recourir largement à l'utilisation de la modélisation, en particulier en l'absence de mesures possibles pour l'estimation des concentrations au sein des différents milieux contaminés, des transferts de pollution dans la biosphère ou dans la chaîne alimentaire. Elle passe également par la création de scénarios concernant les habitudes de vie des populations, l'alimentation ou l'utilisation de certains produits. Le recours à ces outils de modélisation, simulations et scénarios limite pour certains la confiance que l'on peut accorder aux résultats.

Aux données de modélisation peuvent donc être préférées les données de mesure. Néanmoins, le programme de mesure (milieux, endroits, substances, seuils de détection, etc.) reposera lui-même sur la modélisation conceptuelle (qualitative) voire numérique (quantitative) des phénomènes. Les résultats sont en outre également sujets à d'importantes incertitudes, liées en particulier à la variabilité spatiale et temporelle des paramètres mesurés et aux limites des moyens de prélèvement et d'analyse. C'est par la combinaison et la confrontation de la modélisation et de la mesure que la solidité des conclusions est renforcée.

L'étape d'évaluation des expositions est maintenant considérée comme une science à part entière : l'expologie. (AFSSET, 2008)

3.1.1.4. La caractérisation du risque

Cette étape est la synthèse des précédentes. Elle présente une estimation de la probabilité de survenue et de la gravité des effets indésirables susceptibles de se produire dans une population humaine, en raison de l'exposition à l'ensemble des agents présents dans la situation étudiée. Le nombre de personnes pour lesquelles un effet est susceptible d'apparaître (ou la proportion de la population concernée) peut également être calculé. L'identification des groupes les plus à risque peut aussi faire partie des résultats utiles.

La présentation des résultats diffère suivant que l'effet considéré est déterministe ou stochastique.

Dans le premier cas, la conclusion est faite sur la possibilité ou non, compte tenu des incertitudes de l'évaluation, que le quotient de danger (rapport de la dose d'exposition sur la dose sans effet estimée) dépasse la valeur de 1, c'est-à-dire que la dose d'exposition soit supérieure à la dose sans effet pour toute ou partie de la population étudiée.

Dans le second cas, est présenté l'excès de risque individuel auquel les personnes peuvent être soumises. Cette notion correspond à l'augmentation de la probabilité de survenue de l'effet indésirable considéré chez un individu suite à son exposition au polluant étudié.

Les calculs de risque sont réalisés dans un premier temps pour chaque agent et chaque mode d'exposition (ingestion, inhalation, etc.) pris individuellement. Même si l'on a décrit de manière qualitative certaines possibilités d'effets synergiques ou antagonistes, il n'existe pas de règle générale de quantification des effets combinés.

Suivant la nature de l'étude (rétrospective ou prospective), la nature de l'exposition (aiguë ou chronique), le nombre d'agents en cause, la nature des données sources (résultats d'études épidémiologiques ou toxicologiques, mesures ou modélisations), les hypothèses de travail seront différentes et les incertitudes plus ou moins quantifiables. Le niveau de confiance que l'on pourra accorder au résultat final sera donc variable et dépendra de la quantité et de la qualité des données disponibles. L'ensemble des hypothèses émises au cours de la démarche et des incertitudes relatives à ces résultats doit être présenté même si ces dernières ne sont pas toutes quantifiables.

3.1.2. Problématique spécifique des anticancéreux

Le plan cancer 2003-2008 dénombrait, en France, 278 253 nouvelles personnes atteintes annuellement d'une pathologie cancéreuse ; le nombre total de patients soignés ne cesse donc d'augmenter avec, en parallèle, l'emploi de substances anticancéreuses. Ces substances peuvent avoir une activité cancérogène, mutagène ou tératogène.

La présence des substances anticancéreuses dans les rejets liquides hospitaliers peut être due à des déversements lors de la préparation de ces médicaments (peu vraisemblable au regard des précautions mises en œuvre en France dans les Unités Centralisées de Reconstitution des Cytostatiques), mais surtout aux excréctions des malades. La manipulation des médicaments anticancéreux étant très réglementée, les rejets physiologiques de patients traités pourraient représenter la seule voie de décharge. Cette hypothèse est corroborée par certaines études menées sur la composition biologique et chimique de l'urine de patients sous thérapie anticancéreuse (Giumiani, 1996). Une étude menée à Pékin (Yin, 2010) sur les effluents de 21 hôpitaux chinois a montré que certaines substances anticancéreuses (méthotrexate, étoposide) sont retrouvées dans leurs effluents. La présence des anticancéreux dans les rejets liquides hospitaliers étant bien démontrée, nous pouvons nous interroger sur leur devenir dans le réseau d'assainissement.

Des essais effectués sur la biodégradation des antitumoraux dans les effluents hospitaliers, mais aussi dans les effluents urbains, ont montré que certains anticancéreux, tel que l'ifosfamide, sont non biodégradables et non adsorbés par les boues (Kümmerer, 1997). De plus, d'autres études (Steger-Hartmann, 1996 ; Aherne, 1990 ; Catastini, 2008) ont prouvé que certaines substances anticancéreuses (cyclophosphamide, ifosfamide et méthotrexate) peuvent subsister après traitement des eaux usées par les STEPs, pouvant ainsi intégrer le cycle de l'eau à faible concentration toutefois, il existe très peu d'étude sur le sujet.

En France, le dernier rapport de l'Académie de Pharmacie, 2008 conclut sur le manque de

connaissances des effets liés à la présence à faible dose de cytostatiques dans les eaux.

Au regard de ces données, ainsi que des résultats de notre hiérarchisation des molécules à risque, nous avons décidé de focaliser notre évaluation des risques sur trois molécules anticancéreuses : le cyclophosphamide, l'ifosfamide et le 5 fluoro-uracile.

Le cyclophosphamide et l'ifosfamide sont issus de la méthode de hiérarchisation, ce sont les deux molécules ayant obtenues le plus haut score au regard des scores combinés de persistance, bioaccumulation, toxicité et quantité consommée.

Le 5 fluoro-uracile a été ajouté à cette liste car la molécule anticancéreuse est la plus prescrite en France. Il semble que le centre Alexis Vautrin est un profil de consommation spécifique. Il donc apparu judicieux de l'inclure dans la liste des molécules qui nécessite une évaluation quantitative des risques.

3.2. Identification du potentiel dangereux

L'ifosfamide (code ATC : L01AA06) est un anticancéreux de la famille des alkylants, c'est-à-dire qu'il est responsable de l'alkylation de certaines bases de l'ADN, aboutissant à la formation de ponts stables entre les deux brins d'ADN ou au sein d'un même brin. Sa cytotoxicité s'exprime par le blocage de la transcription et de la réplication de l'ADN à cause de ce pontage, par l'excision des guanines alkylées (mécanisme de réparation de la chaîne d'ADN) et par la libération de radicaux libres entraînant des cassures de la chaîne d'ADN.

Cette molécule doit se transformer dans l'organisme pour pouvoir agir (il s'agit d'une pro-drogue). L'ifosfamide est généralement administré par voie intraveineuse.

Le cyclophosphamide (code ATC : L01AA01) est également un anticancéreux alkylant ; il présente donc le même mécanisme d'action que l'ifosfamide. Il peut être administré par voie orale (comprimés) ou en perfusion intraveineuse.

Le 5 fluorouracile est un antimétabolite de la sous-classe des pyrimidines (code ATC : L01BC02). Il est transformé au sein de la cellule en différents métabolites cytotoxiques qui seront incorporés à l'ADN et l'ARN à la place des bases, induisant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Son administration intraveineuse au moyen de diffuseurs portables est relativement fréquente.

Le CIRC a classé le cyclophosphamide en tant que cancérigène reconnu (groupe 1 : agents cancérigènes certains pour l'Homme) ; l'ifosfamide n'a pas été classé ; le 5FU se trouve dans le groupe 3 (inclassables quant à sa cancérigénicité pour l'Homme).

Ces anticancéreux sont également responsables de nombreux autres effets indésirables chez l'Homme (nausées et vomissements, néphrotoxicité, digestifs, cardio-vasculaires...) que nous ne développerons pas dans notre travail.

3.3. Relation dose - réponse

La relation entre les différentes concentrations d'anticancéreux retrouvés dans les eaux et les effets sur les organismes n'est pas encore clairement définie dans l'état actuel des connaissances.

Nous nous sommes donc fixés dans ce travail l'objectif de définir une relation dose-réponse pour les faibles concentrations d'anticancéreux qui peuvent être rencontrées dans différents milieux aquatiques.

3.3.1. Matériel et méthode de notre évaluation de la dose-réponse

Trois tests de toxicité ont été mis en œuvre à différentes concentrations pour nos trois molécules étudiées (ifosfamide, cyclophosphamide et 5FU) :

- un test de viabilité cellulaire au bleu de Trypan, qui permet de dénombrer les cellules mortes (effet cytotoxique) ;
- un test des comètes, permettant de mesurer les cassures induites sur les brins d'ADN (effet génotoxique),
- un test des micro-noyaux, qui permet de détecter les dommages induits sur les chromosomes (effet génotoxique).

3.3.1.1. Lignée cellulaire utilisée et entretien

La lignée HepG2 est issue d'hépatocarcinome humain différencié. Ce sont des cellules avec des capacités d'adhérence. Ses capacités enzymatiques sont intactes.

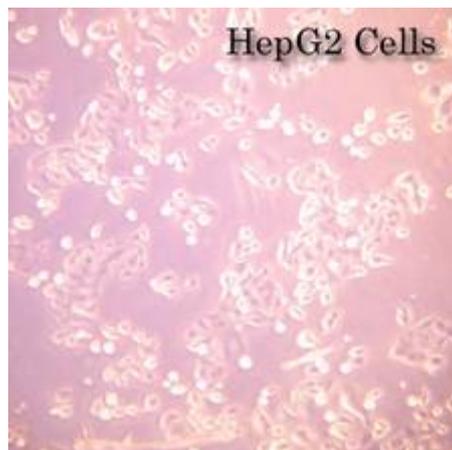


Figure 3-2 Cellules HepG2 (source Hepg2.com)

Nous avons choisi de travailler sur des cellules hépatiques car elles sont responsables de la métabolisation de nombreux médicaments. D'ailleurs, l'activation de l'ifosfamide et du cyclophosphamide est hépatique.

Méthode de culture et entretien de la lignée

La culture cellulaire est réalisée dans des flasques de 25 ou 75 cm² contenant respectivement 8 ou 24 mL de milieu nutritif de type MEM (milieu minimum essentiel d'Eagles ; Sigma M-0643). Ce milieu contient du sérum de vœu fœtal à 10% (Sigma F-7524), un mélange antibiotique de pénicilline-streptomycine (Sigma P-4333 ; 10 000 unités de pénicilline et 10 mg de streptomycine par mL), de HEPES (Sigma H-4034), du bicarbonate de sodium (Sigma S6297), du pyruvate de sodium (Sigma P5280) et de l'eau ultra-pure filtrée. Les cellules sont maintenues dans un incubateur à CO₂ à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et à 95% d'humidité relative.

Pour l'entretien de la lignée cellulaire, le milieu nutritif est renouvelé 3 fois par semaine : les lundis, mercredis et vendredis. Chaque semaine, les flasques conservées pour entretien sont repiquées au tiers de leur concentration.

Pour la réalisation d'échantillon ou de repiquage, nous éliminons l'ancien milieu puis nous rinçons trois fois notre flasque avec du PBS (Sigma D-5652). Nous introduisons dans la flasque de la trypsine – EDTA (prolabo) pendant 5 minutes, afin de remettre en suspension et d'individualiser les cellules devenues adhérentes à leur support. Ensuite, nous ajoutons du MEM pour neutraliser la trypsine. La suspension est alors recueillie dans un tube à centrifuger de 50mL qui est centrifugé à 300G pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire remis en suspension à l'aide de MEM. La suspension cellulaire obtenue est répartie dans les nouvelles flasques en respectant un ratio d'environ 1/3 à 1/6 du volume.

Réalisation d'échantillon :

Avant toute réalisation d'échantillon pour nos tests, la viabilité cellulaire est étudiée grâce à un test au bleu de Trypan. Nous avons choisi de respecter le seuil de viabilité supérieur à 80%. En cas de mortalité excessive, la lignée est jetée avant utilisation dans nos protocoles.

3.3.1.2. Produits pharmaceutiques testés et conditions d'exposition

Choix des molécules

Le choix des molécules pour lesquelles la relation dose-réponse était étudiée, a été réalisé sur la base de notre méthode de hiérarchisation présentée en partie 2.

Les produits pharmaceutiques testés étaient le cyclophosphamide (Sigma C0768) dont le numéro CAS est 50-18-0, l'ifosfamide (Sigma I4909) dont le numéro CAS 3778-73-2 est et le 5 fluorouracile (Sigma F6627) dont le numéro CAS est 51-21-8.

Un mélange de ces trois produits a également été testé. Dans ce mélange, les concentrations des 3 produits étaient identiques.

Délai d'exposition

Nous avons choisi 2 temps d'expositions différents pour les tests de viabilité cellulaire au bleu de Trypan et les tests de comètes : une exposition de 24h et une exposition de 72h. Les tests des micronoyaux seront réalisés uniquement avec une exposition de 24h au toxique.

Concentrations testées

Pour chaque molécule, un test négatif (ou « blanc ») et un test positif ont été effectués. Pour le test des comètes, le Benzo[a]pyrène a été utilisé ; pour celui des micronoyaux, nous avons employé la mitomycine C. Les différentes concentrations d'anticancéreux sont 100, 50, 10, 1, 0,1 et 0,01 µg/L.

3.3.1.3. Tests réalisés

a. Test de viabilité cellulaire au bleu de Trypan

Le bleu de Trypan, connu également sous le nom de Niagara Blue ou Diamine Blue, est un dérivé du toluène ; il a été synthétisé pour la première fois en 1904 par Paul Ehrlich. la coloration au bleu de Trypan permet de différencier au microscope les tissus ou cellules vivants de tissus ou cellules morts. En effet, la diffusion du bleu de Trypan pénètre dans les cellules mortes, celles-ci seront donc vues en bleu au microscope. Les cellules vivantes rejettent le colorant à l'extérieur, elles apparaissent donc en transparent au microscope. Toutefois, la coloration au bleu de Trypan ne permet pas de différencier les cellules nécrotiques (mortes de manière non naturelle, par exemple mort induite par des toxiques), des cellules apoptotiques (mortes de manière physiologique).

Pour les deux temps d'exposition, la procédure mise en œuvre est la même :

- réalisation de 8 échantillons dans des flasques de 25 cm² incubées 24 heures pour laisser adhérer les cellules.
- à 24 heures, le milieu de culture est remplacé et le toxique est introduit aux concentrations voulues. Les flasques sont remises à incuber pendant 24 ou 72 heures.
- puis le milieu contenant le toxique est éliminé. Chaque flasque est rincée 3 fois avec du PBS, puis 1 mL de trypsine-EDTA est introduite. La réaction est stoppée avec l'ajout de MEM. Le milieu contenant les cellules est alors transféré dans un tube à centrifuger puis centrifugé à 300 G.
- le surnageant est éliminé, le culot cellulaire est remis en suspension dans 3 mL de MEM.

Pour chaque suspension, nous réalisons un comptage au moyen d'une cellule de Malassez. Cette technique est décrite en annexe.

Pour chaque concentration de toxiques, nous évaluons la viabilité des cellules grâce au bleu de Trypan. Après environ 3 minutes d'attente, nous réalisons la lecture au microscope. Le comptage est réalisé sur les 25 rectangles quadrillés de la cellule de Malassez. Le calcul de pourcentage de viabilité est réalisé pour chaque concentration testée des 3 produits pharmaceutiques et du mélange ainsi pour le témoin positif (benzo[a]pyrène : 100µg/L) et le témoin négatif c'est-à-dire l'eau ultrapure utilisée comme solvant.

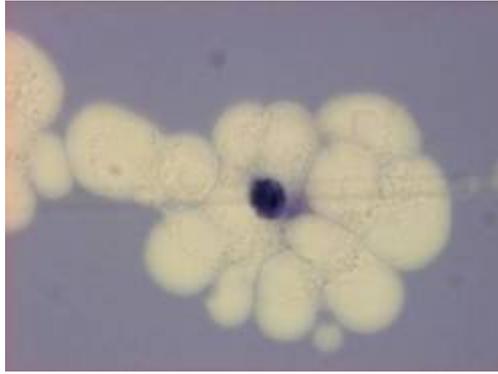


Figure 3-3 Cellules HepG2 coloré au bleu de Trypan

b. Test des comètes

Le test des comètes (ou “single cell gel electrophoresis assay”) est une technique d’électrophorèse sur gel d’agarose permettant de détecter des fragmentations de l’ADN de cellules individualisées. L’ADN des cellules est placé dans un champ électrique permettant la migration différentielle des fragments. Compte tenu du faible voltage et ampérage, les molécules d’ADN intactes sont trop “lourdes” pour être déplacées par le champ électrique et vont créer une sphère compacte. Un ADN endommagé va, quant à lui, voir migrer ses fragments les plus courts en dehors de cette sphère, formant ainsi un “halo” d’ADN s’étirant en direction de l’anode. Les figures ainsi engendrées sont comparables à des comètes. L’analyse des images obtenues permet la quantification des effets observés.

Le test des comètes est réalisé selon le protocole décrit par Tice *et al.* (2000) avec quelques modifications mineures. Le test des comètes selon cette méthode est réalisé à froid et en milieu basique. Il permet de mettre en évidence un nombre plus important de types de lésions d’ADN.

Pour chaque échantillon à tester, la viabilité cellulaire est vérifiée par un test au bleu de Trypan. Seules les concentrations en toxique pour lesquelles le test de viabilité cellulaire a permis de retrouver une viabilité supérieure à 80% sont retenues. Deux témoins sont réalisés : un témoin négatif représentant le solvant utilisé pour l’échantillon testé (c’est-à-dire l’eau) et un témoin positif avec le benzo[a]pyrène (concentration utilisée : 100µg/L). Les suspensions cellulaires sont diluées pour obtenir une concentration entre $5 \cdot 10^5$ et $2 \cdot 10^6$ cellules par millilitre.

La veille du test, des lames nettoyées à l’alcool sont enduites sur une face d’une préparation d’agarose de routine (Sigma A-5093), puis séchées dans une étuve sèche à 37°C. Le jour du test, ces lames sont recouvertes d’agarose à point de fusion normal (Sigma D-5652) sur lequel nous déposons une lamelle enlevée avant durcissement complet de l’agarose. 100µL de chaque suspension cellulaire sont inclus dans 600µL d’une préparation d’agarose à bas point de fusion (Sigma A-4018). Le mélange est homogénéisé puis déposé sur une lame et recouvert d’une lamelle. Après solidification, les lamelles sont retirées. Les lames sont alors immergées dans une solution de lyse froide de pH 10 (2,5M de NaCl (Sigma S-9625), 100mM de Na₂EDTA (Sigma E-5134), 10mM de Tris (Sigma T-1378), 10% de DMSO, 1% de Triton X-100 (Prolabo 28817295)) pendant au moins une heure. Après égouttage, les lames sont

ensuite transférées pendant 20 minutes dans une solution d'électrophorèse froide de pH 13 (1mM de Na₂EDTA, 300mM de NaOH (Sigma S-0899)) pour permettre le déroulement des brins d'ADN. Les lames sont ensuite déposées dans une cuve à électrophorèse horizontale contenant la même solution. L'électrophorèse est réalisée pendant 20 minutes à 24 Volts et 300 milliampères. Après cette étape, les lames sont égouttées puis neutralisées grâce à un rinçage dans une solution de Tris à 0,4M de pH 7,5.

Pour permettre leur lecture, 50 µL de bromure d'éthidium (Boehringer Mannheim), concentré à 10 µg/mL, sont déposés sur les lames puis recouverts d'une lamelle juste avant lecture.

La lecture est réalisée sous le logiciel Komet 5, relié à un microscope à fluorescence Olympus BX-40. Deux lames sont réalisées pour chaque concentration. Sur chaque lame 50 cellules sont mesurées. Afin d'assurer la reproductibilité des résultats, l'expérience est répétée 3 fois pour chaque produits et pour le mélange.

Trois paramètres sont recueillis lors de lecture des comètes :

- le pourcentage d'ADN dans la queue = intensité lumineuse de la queue divisée par l'intensité lumineuse globale et multipliée par 100 ;
- l'Olive Tail Moment = distance entre le centre de la tête et le centre de la queue, multipliée par le pourcentage d'ADN dans la queue ;
- l'Extent Tail Length = longueur de la queue (distance entre la fin de la tête et la fin de la queue).

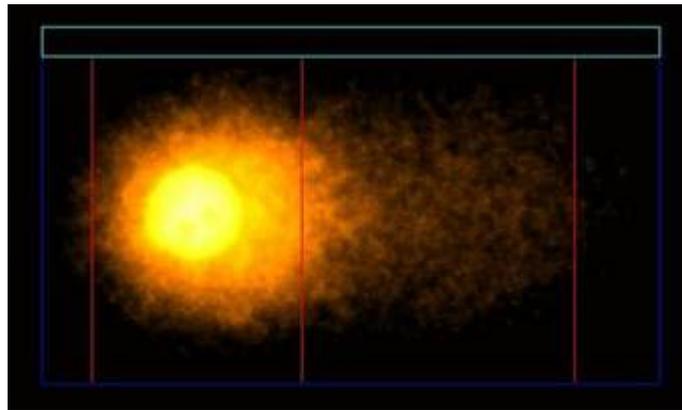


Figure 3-4 Comète lue avec le logiciel Komet5

c. Test des micronoyaux

Le test des micronoyaux est utilisé pour mettre en évidence des effets clastogènes (fragmentation chromosomique acentrique, les fragments étant exclus du noyau de la cellule fille pendant la division cellulaire) ou aneugènes (perte d'un ou plusieurs chromosome(s) en entier lors de la division cellulaire) liés à des agents toxiques. Les micronoyaux sont des entités cellulaires indépendantes du noyau principal, présentes au sein du cytoplasme. Ils proviennent de la perte de fragments chromosomiques, voire de chromosomes entiers qui ne sont pas intégrés au noyau au cours de la division cellulaire. Leur formation est souvent la conséquence d'une cassure chromosomique ou d'un dysfonctionnement du fuseau mitotique. Ils reflètent une action génotoxique directe ou un mécanisme épigénétique, qui aboutissent tous deux à l'apparition de mutations chromosomiques stables et héréditaires. Ainsi, ils sont à

l'origine de clones de cellules initiées constituant la première étape de la cancérogenèse.

Ce test est basé sur la numération des cellules micronuclées. Il est maintenant largement validé et fait l'objet d'une recommandation de l'OCDE (N°487).

Pour visualiser le noyau cellulaire et ces fragments, plusieurs colorants sont disponibles, dont l'acridine orange. Ce colorant a la particularité de se fixer sur l'ADN et l'ARN. Grâce à une excitation dans le spectre bleu, l'ADN fluoresce en vert et l'ARN en rouge.

Des lames nettoyées à l'alcool sont placées dans des boîtes de pétri de 10 cm de diamètre, puis stérilisées par UV pendant une heure. Un échantillon est préparé dans une flasque de 75 cm². A partir de cet échantillon, nous préparons une suspension cellulaire de 1.10^4 cellules par millilitres. 1 mL de cette suspension est déposé sur chaque lame. Pour assurer une décantation et un début d'adhésion, nous attendons environ 30 minutes. Ensuite 10 mL de MEM sont ajoutés dans chaque boîte de pétri. Les boîtes sont incubées pour une durée de 24 heures.

A l'issue des 24 heures, le milieu de culture est retiré par aspiration et 10 mL de milieu contenant le toxique sont introduits. Un témoin positif est réalisé par intoxication à la mitomycine-C à 0,025 µg/mL (Sigma M-0503). Pour chaque concentration de toxique, nous avons réalisé deux boîtes. Celles-ci sont incubées pour une durée de 24 heures. A l'issue de ce délai, le milieu de culture est éliminé et nous introduisons un milieu contenant de la cytochalasine B (Sigma C-6762) (bloquant la division cellulaire en mitose) à une concentration de 3µg/L. Après une nouvelle incubation de 24 heures, le milieu est retiré et les lames sont plongées dans une solution froide de chlorure de potassium. La lame est ensuite immergée dans une solution de Carnoy (mélange acide acétique / méthanol) pour fixer les cellules sur la lames de manière définitive. Les lames sont mises à sécher. Juste avant lecture, une coloration est réalisée à l'acridine orange (Sigma A-6014) à 40 µg/mL pour mettre en évidence l'ADN. La lecture est réalisée sous un microscope à fluorescence Olympus BX-40 (cube Olympus UMNb).

Chaque test est réalisé 3 fois pour gagner en répétabilité. Chaque lame est parcourue 10 fois dans sa largeur. L'ensemble des cellules visibles sont dénombrées et classées selon leur nombre de noyaux pour le calcul de l'indice de division nucléaire et leur nombre de micronoyaux. Sur chaque lame, un minimum de 500 cellules est lu. Le taux de micronoyaux est alors calculé. L'indice de division nucléaire n'est utilisé que pour évaluer la qualité des lames lues. Il doit rester inférieur à 2.

3.3.2. Analyses statistiques

Pour chaque expérimentation, une analyse descriptive a été réalisée. Pour les études à faible effectif, des tests non paramétriques ont été utilisés. Pour les tests à effectif suffisamment important, la normalité de la distribution a été testée et des tests paramétriques ont alors été utilisés.

Le logiciel SPSS version 19 a été utilisé.

3.3.3. Résultats

3.3.3.1. Test de viabilité cellulaire au bleu de Trypan

Les tests de viabilité cellulaire ont été effectués en tripliquat sur chaque composé à plusieurs concentrations, ainsi que sur le mélange des trois, pour les deux temps d'exposition testés (24h et 72h). Les résultats sont présentés dans les figures 3-5 à 3-8 ci-après ainsi que dans les tableaux en annexes.

a. L'ifosfamide

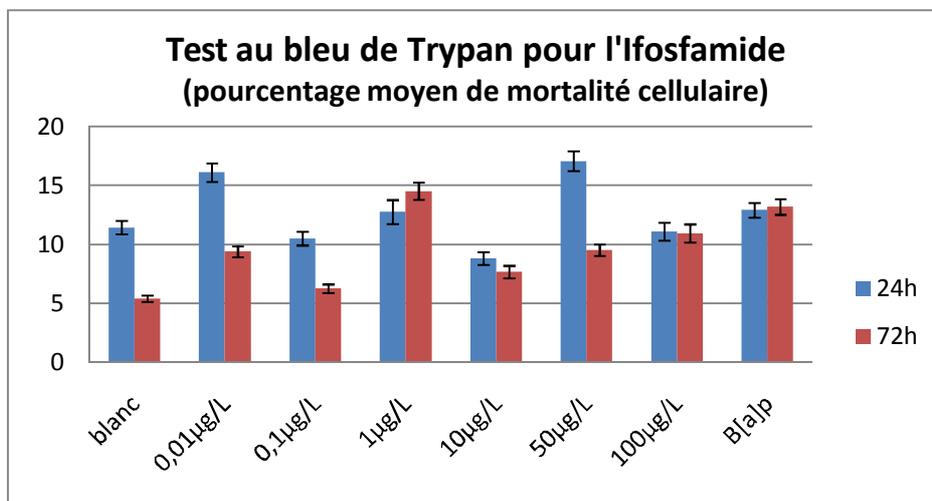


Figure 3-5 Histogramme présentant la mortalité cellulaire (+/- écart-type) pour différentes concentrations d'ifosfamide pour 2 temps d'exposition

L'observation de la mortalité cellulaire à l'aide du test au bleu de Trypan montre une mortalité inférieure à 20% pour chaque concentration en ifosfamide.

De manière générale, la mortalité cellulaire est supérieure pour une exposition de 24h par rapport à une exposition de 72h (sauf pour les concentrations de 1µg/L et 100µg/L). Cet état de fait est retrouvé dans le témoin négatif.

Toutefois, la mortalité cellulaire à 24h et 72h est significativement plus élevée parmi les cellules exposées à l'ifosfamide que parmi les cellules du témoin négatif.

b. Le cyclophosphamide

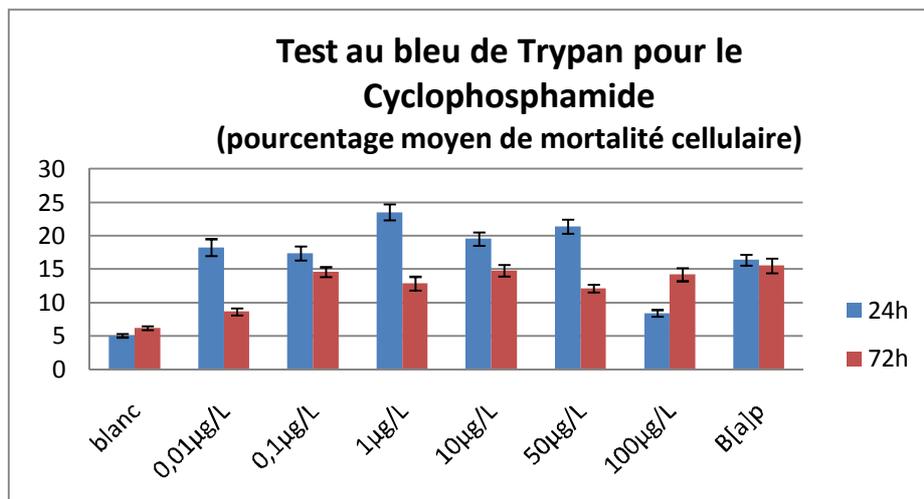


Figure 3-6 Histogramme présentant la mortalité cellulaire (+/- écart-type) pour différentes concentrations de cyclophosphamide pour 2 temps d'exposition

Dans le cas du cyclophosphamide, les concentrations de 1 et 50µg/L ont une mortalité cellulaire légèrement supérieure à 20% avec respectivement 23,53 et 21,41%, le manque de cohérence avec les résultats de mortalité à 100µg/L (<20%) nous a conduit à poursuivre avec ces concentrations. Globalement la mortalité cellulaire est plus importante pour une exposition au toxique pendant 24h que pour une exposition pendant 72h.

c. *Le 5 Fluoro-uracile*

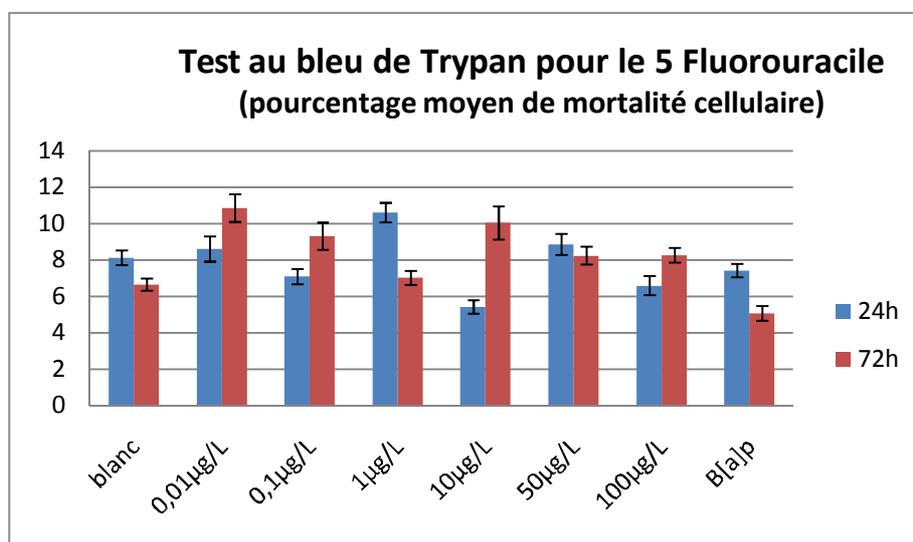


Figure 3-7 Histogramme présentant la mortalité cellulaire (+/- écart-type) pour différentes concentrations de 5 Fluoro-uracile pour 2 temps d'exposition

La mortalité cellulaire pour une exposition au 5 fluoro-uracile reste, quelque soit le temps d'exposition, inférieure à 12%. Dans le cas de cette molécule, la mortalité est plus importante à 72h d'exposition qu'à 24h d'exposition.

d. Le mélange des 3 composés anticancéreux

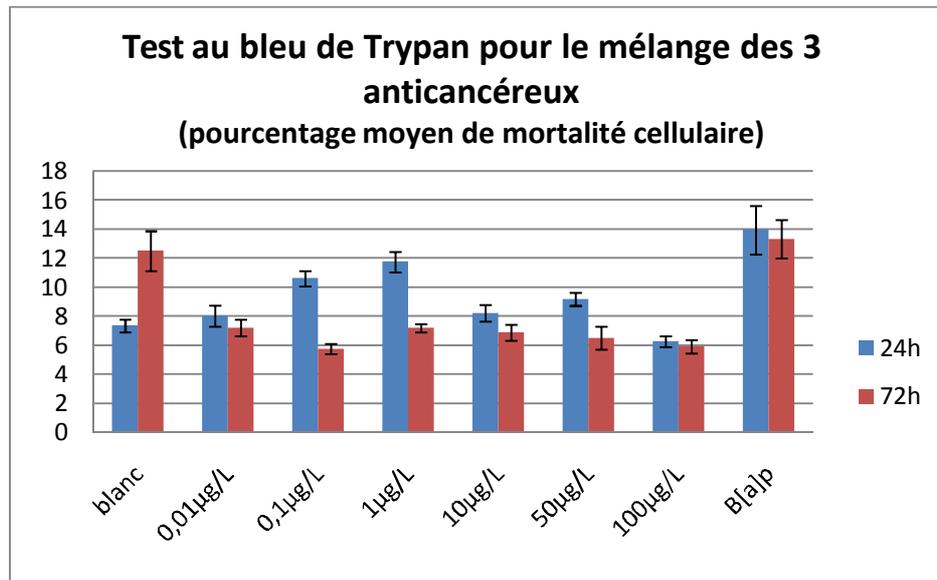


Figure 3-8 Histogramme présentant la mortalité cellulaire (+/- écart-type) pour différentes concentrations d'un mélange de 3 anticancéreux pour 2 temps d'exposition

Lors du mélange de concentrations identiques des trois anticancéreux, la mortalité cellulaire reste inférieure à 14% pour le benzo[a]pyrène et inférieure à 12% pour les mélanges de toxiques. L'exposition à 24h de toxique induit plus de mortalité cellulaire que l'exposition à 72h.

Les tests au bleu de Trypan montrent une mortalité cellulaire généralement inférieure à 20%, ce qui nous permet de poursuivre les tests de génotoxicité avec les concentrations déjà testées.

3.3.3.2. Test micronoyaux

Les résultats des tests des micronoyaux sont présentés dans le tableau III-5. Le témoin négatif correspond à de l'eau ultra-pure (solvant utilisé pour mettre en solution les anticancéreux), le témoin positif est de la mitomycine C. Le temps d'exposition est de 24h, les tests sont réalisés en tripliquats. C'est la moyenne des résultats qui est présentée dans le tableau III-1.

Tableau III-1 résultats des tests micronoyaux (exposition 24h)

	Cyclophosphamide		Ifosfamide		5 Fluoro-uracile		Mélange	
	Indice de division nucléaire	Taux de micronoyaux (%)	Indice de division nucléaire	Taux de micronoyaux (%)	Indice de division nucléaire	Taux de micronoyaux (%)	Indice de division nucléaire	Taux de micronoyaux (%)
Mitomycine C	1,73	1,87	1,74	2,11	1,75	1,97	1,78	2,25
100µg/L	1,72	2,22	1,44	1,26	1,6	1,81	1,63	1,53
50µg/L	2,02	1,64	1,84	1,84	1,76	1,01	1,71	1,48
10µg/L	1,68	1,81	1,75	2,46	1,58	1,15	1,69	1,54
1µg/l	1,605	1,69	1,67	2,25	1,56	1,82	1,63	1,52
0,1µg/L	1,57	1,52	1,59	2,48	1,49	1,69	1,62	1,42
0,01µg/L	1,56	1,63	1,57	2,46	1,44	1,58	1,59	1,47
Blanc	1,69	1,15	1,71	0,96	1,475	0,99	1,68	0,97

L'intérêt de l'indice de division nucléaire est d'évaluer la qualité des lames lues. Cet indice doit rester inférieur à 2. Dans la plupart des cas, cet indice est inférieur à 2 sauf pour la concentration en cyclophosphamide de 50µg/L, qui a un indice de 2,02.

Concernant le taux de micronoyaux, dans le cas de l'ifosfamide les plus faibles concentrations (0,01, 0,1, 1 et 10µg/L) présentent un taux de micronoyaux plus élevé que le témoin positif (mitomycine C). Dans le cas du mélange des trois anticancéreux, le taux de micronoyaux est compris entre les taux du témoin négatif (0,95‰) et du témoin positif (2,25‰). Le cyclophosphamide semble être la molécule la plus toxique. Toutefois, les tests statistiques ne montrent pas de différence significative entre les taux de micronoyaux.

3.3.3.3. Test comètes

Les résultats des tests des comètes sont présentés dans les figures 3-9 à 3-12. Elles regroupent les données de pourcentage d'ADN dans la queue, pour une exposition à chacune des molécules ainsi qu'au mélange des trois anticancéreux. Le témoin négatif correspond ici à de l'eau ultra-pure et le témoin positif à du benzo[a]pyrène pour les deux temps d'exposition. Pour chacune des expositions, 300 mesures ont été réalisées. Le tableau III-2, situé dans un paragraphe ultérieur, présente les résultats de ces tests.

Les tests comètes ont été effectués sur 24 et 72h, ils ont été répliqués 3 fois (lecture de 300 cellules par concentration et par temps d'exposition). Le pourcentage d'ADN dans la queue (données présentées en annexe), le Tail Extent Moment et l'Olive Tail Moment ont été relevés.

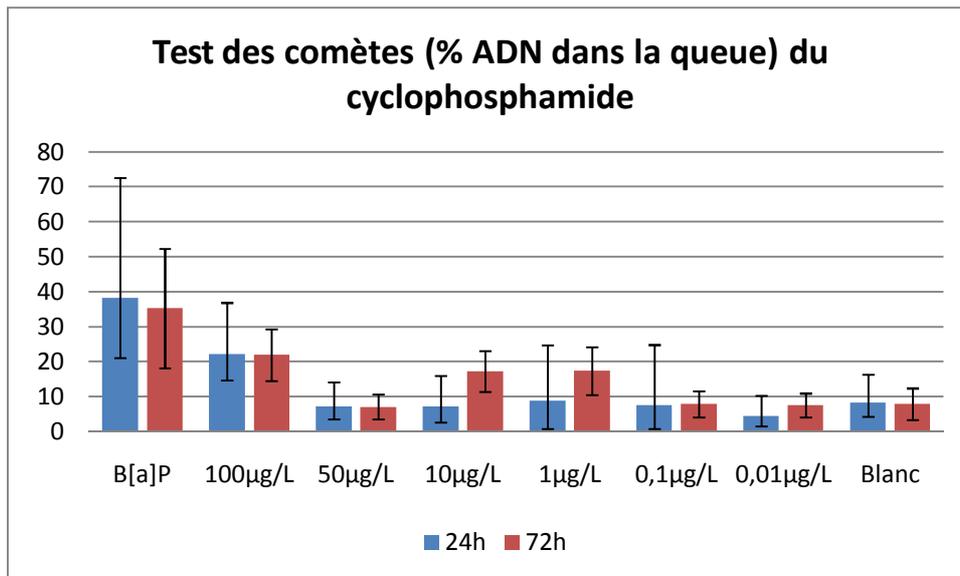


Figure 3-9 Histogramme présentant le pourcentage d'ADN dans la queue pour les tests comètes effectués sur des cellules HepG2 pour différentes concentrations de cyclophosphamide et deux temps d'exposition (24 et 72h)

Pour le cyclophosphamide, l'exposition à 72h de toxique augmente le pourcentage d'ADN dans la queue. Le taux d'ADN dans la queue est plus élevé que le témoin négatif pour une concentration de 100µg/L (exposition 24 et 72h) et pour des concentrations de 10 et 1µg/L (exposition de 72h).

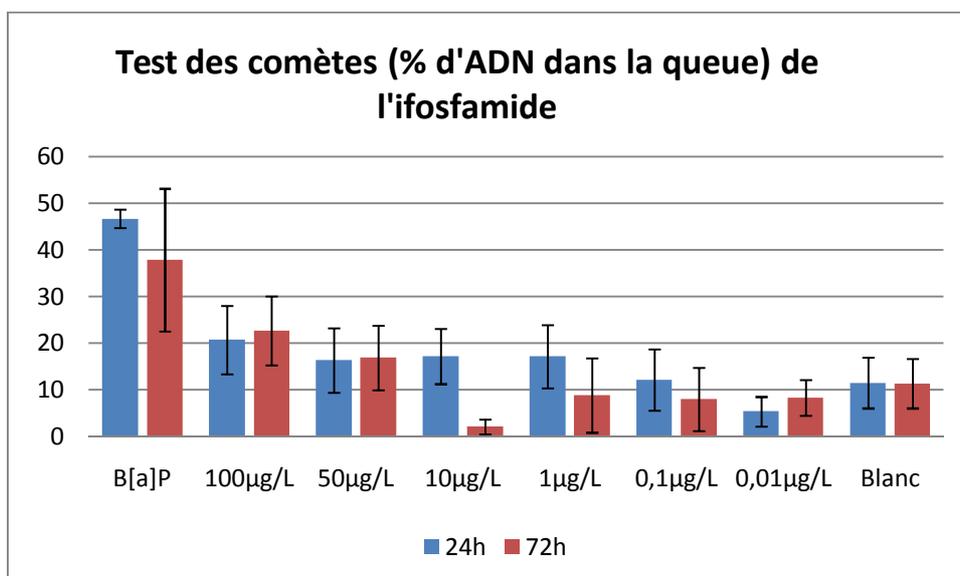


Figure 3-10 Histogramme présentant le pourcentage d'ADN dans la queue pour les tests comètes effectués sur des cellules HepG2 pour différentes concentrations d'ifosfamide et deux temps d'exposition (24 et 72h)

Dans le cas de l'ifosfamide, toutes les concentrations de toxique pour une exposition de 24h à l'exception de la concentration 0,001µg/L sont supérieures au témoin négatif. Pour l'exposition de 72h, seules les deux plus fortes concentrations (100 et 50µg/L) sont supérieures au blanc.

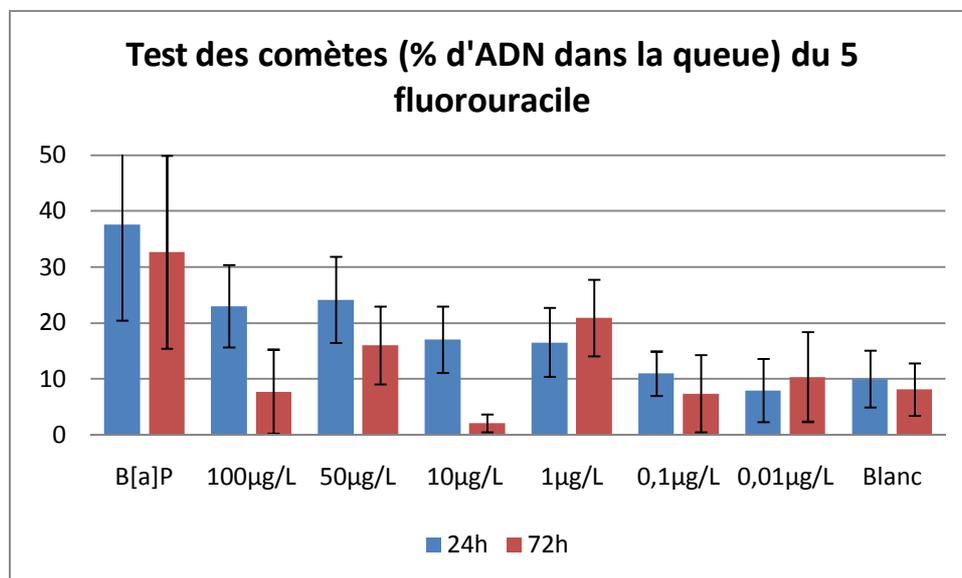


Figure 3-11 Histogramme présentant le pourcentage d'ADN dans la queue pour les tests comètes effectués sur des cellules HepG2 pour différentes concentrations de 5 fluorouracile et deux temps d'exposition (24 et 72h)

Sur les six concentrations en 5 fluorouracile testées, seules trois sont supérieures au témoin négatif (50, 1 et 0,01µg/L). De plus, la moitié des tests d'exposition à 24h montre une toxicité supérieure aux tests avec 72h d'exposition.

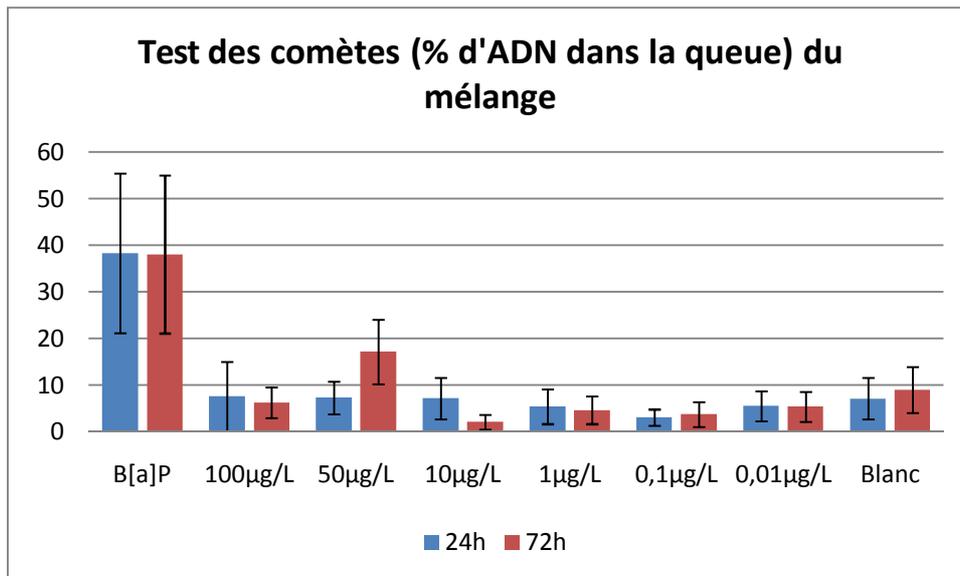


Figure 3-12 Histogramme présentant le pourcentage d'ADN dans la queue pour les tests comètes effectués sur des cellules HepG2 pour différentes concentrations d'un mélange des trois anticancéreux et deux temps d'exposition (24 et 72h)

Dans le cas du mélange à concentrations égales des trois anticancéreux, l'exposition à 50µg/L pendant 72h présente le plus de pourcentage d'ADN dans la queue. De façon générale, l'exposition pendant 24h au mélange d'anticancéreux induit une quantité supérieure d'ADN dans la queue que l'exposition à 72h.

Afin de quantifier la différence entre les temps d'exposition et les différentes concentrations étudiées, des tests statistiques ont été réalisés. Le tableau III-6 présente les résultats statistiques de ces tests.

De manière globale, les résultats des témoins négatifs et des témoins positifs sont cohérents entre eux. Pour ce test (comètes, % d'ADN dans la queue), aucun anticancéreux ne s'avère aussi toxique que notre témoin positif. Pour la première fois dans nos tests de toxicité, une relation dose-réponse semble se dessiner, dans la mesure où les concentrations en anticancéreux les plus fortes génèrent des pourcentages d'ADN dans la queue plus importants que les faibles doses. Pour le test des comètes, il ne semble pas y avoir de différence de toxicité entre l'exposition pendant 24h et l'exposition pendant 72h. Aucune molécule ne semble beaucoup plus toxique que les autres au cours de ce test de génotoxicité.

Résultats des tests statistiques

Tous les résultats des tests de Kruskal-Wallis réalisés montrent une différence significative avec un degré de significativité inférieure à 0,001 par rapport au témoin négatif.

Il est donc nécessaire d'effectuer des tests complémentaires (test Mann-Withney) afin de déterminer la nature de ces différences. Ces résultats sont présentés dans le tableau III-2.

Tableau III-2 : résultats des tests statistiques par toxique et temps d'exposition, présentation des valeurs de p (seuil de significativité fixé à 5%)

	Exposition 24h			Exposition 72h		
	% ADN	TailEM	OliveTM	% ADN	TailEM	OliveTM
Cyclophosphamide						
Benzo[a]pyrène	0,001	0,032	0,029	0,002	0,036	0,047
100µg/L	0,017	0,005	0,011	0,001	0,029	0,024
50µg/L	0,749	0,513	0,463	0,385	0,724	0,226
10µg/L	0,753	0,492	0,774	0,001	0,299	0,245
1µg/L	0,534	0,572	0,443	0,044	0,007	0,078
0,1µg/L	0,222	0,683	0,710	0,180	0,476	0,125
0,01µg/L	0,295	0,743	0,211	0,495	0,570	0,645
Ifosfamide						
Benzo[a]pyrène	0,002	0,033	0,021	0,003	0,041	0,025
100µg/L	0,009	0,006	0,011	0,015	0,006	0,011
50µg/L	0,003	0,046	0,047	0,004	0,041	0,052
10µg/L	0,001	0,365	0,471	0,120	0,559	0,201
1µg/L	0,038	0,007	0,078	0,175	0,340	0,448
0,1µg/L	0,367	0,391	0,322	0,367	0,391	0,322
0,01µg/L	0,559	0,797	0,213	0,579	0,758	0,234
5 Fluorouracile						
Benzo[a]pyrène	0,002	0,024	0,038	0,048	0,041	0,036
100µg/L	0,009	0,006	0,011	0,781	0,436	0,638
50µg/L	0,043	0,024	0,034	0,048	0,016	0,019
10µg/L	0,001	0,365	0,471	0,032	0,071	0,645
1µg/L	0,011	0,070	0,026	0,036	0,076	0,035
0,1µg/L	0,542	0,573	0,282	0,772	0,698	0,794
0,01µg/L	0,184	0,119	0,120	0,256	0,232	0,583
Mélange						
Benzo[a]pyrène	0,034	0,022	0,063	0,001	0,041	0,048
100µg/L	0,538	0,273	0,110	0,195	0,474	0,272
50µg/L	0,201	0,153	0,072	0,045	0,041	0,040
10µg/L	0,33	0,494	0,332	0,694	0,584	0,525
1µg/L	0,413	0,498	0,534	0,272	0,849	0,524
0,1µg/L	0,701	0,680	0,461	0,288	0,188	0,576
0,01µg/L	0,748	0,716	0,373	0,369	0,613	0,510

%ADN : pourcentage d'ADN dans la queue

TailEM : Tail Extent Moment

OliveTM : Olive Tail Moment

Les résultats significatifs sont présentés en gras dans le tableau. Dans le cas du cyclophosphamide pour une exposition 24h, seule la concentration de 100µg/L montre une différence significative avec le témoin négatif alors que pour une exposition de 72h, la toxicité obtenue pour les concentrations de 100, 10 et 1µg/L est significativement différente du blanc de référence.

Pour l'ifosfamide, les concentrations 100 et 50µg/L sont significativement différentes du témoin négatif pour les deux temps d'exposition. Pour le temps de contact de 24h, les concentrations 10 et 1µg/l sont également différentes du blanc.

Dans le cas du 5 fluoro-uracile, les concentrations 100, 50, 10 et 1µg/L sont significativement différentes du test négatif pour une exposition à 24h de toxique. Les conclusions sont les mêmes pour l'exposition à 72h sauf pour la concentration de 100µg/L.

Dans le cas du mélange des 3 anticancéreux, seule une concentration de 50µg/L de chaque molécule pendant 72h montre des résultats différents de la concentration négative.

En dernier lieu, les résultats de chaque molécule et temps d'exposition pour lesquels plusieurs concentrations sont significativement différentes, ont fait l'objet d'une analyse statistique à la recherche d'une corrélation entre la dose de toxique et le taux d'ADN dans la queue des cellules testées. Le test statistique du taux-B de Kendall a donc été effectué sur ces concentrations et sont présentés dans le tableau III-3.

Tableau III-3 Résultats des tests de corrélation sur les molécules et temps d'exposition considérés

	Coefficients de corrélation	Significativité (p)
Cyclophosphamide 72h	0,091	<0,001
Ifosfamide 24h	0,281	<0,001
5 fluorouracile 24h	0,018	0,478
5 fluorouracile 72h	0,003	0,904

Les deux temps d'exposition au 5 fluoro-uracile présentent de faibles coefficients de corrélation (0,018 et 0,003 pour 24h et 72h d'exposition respectivement) ; d'ailleurs, le seuil de significativité à 5% est dépassé chaque fois avec une significativité de 0,478 et 0,904.

L'exposition à 72h de cyclophosphamide présente un coefficient de corrélation très faible (0,091) avec un p d'une valeur inférieure à 0,001.

Une exposition à 24h d'ifosfamide montre un coefficient de corrélation de 0,281 avec une significativité inférieure à 0,001. La dose de toxique à laquelle les cellules sont exposées est donc faiblement corrélée à l'apparition de comètes, et plus particulièrement au pourcentage d'ADN présent dans la queue des cellules.

3.3.4. Synthèse de notre recherche de relation dose-réponse

Notre évaluation des risques spécifique aux molécules anti-cancéreuses est pertinente car des concentrations non nulles de cytostatiques sont retrouvées dans les eaux usées issus

d'établissements de soins. Notre méthode de hiérarchisation a permis d'identifier trois molécules prioritaires pour réaliser une EQRS : l'ifosfamide, le cyclophosphamide et le 5 fluoro-uracile.

Cependant, lorsque nous avons souhaité poursuivre notre méthodologie d'évaluation quantitative des risques pour ces médicaments, nous nous sommes heurtés à un manque de données concernant l'existence ou non d'une relation dose-réponse.

Nous avons donc mis en place une étude toxicologique pour ces trois anti-cancéreux (ainsi que pour leur mélange à concentrations égales), étude comprenant des tests de viabilité cellulaire au bleu de Trypan et des tests de génotoxicité (micronoyaux et comètes). Deux temps d'exposition étaient testés (24h et 72h), ainsi qu'un gradient de concentrations pour chaque molécule (100µg/L, 50µg/L, 10µg/L, 1µg/L, 0,1µg/L et 0,01µg/L). Pour chaque test, un témoin négatif et un témoin positif étaient également réalisés.

En premier lieu, nos tests de viabilité cellulaire ont montré que la mortalité cellulaire est supérieure pour une exposition de courte durée aux toxiques (24h) par rapport à une exposition de longue durée (72h). Ces résultats peuvent paraître surprenants, mais ils ont été retrouvés pour les deux molécules alkylantes (ifosfamide et cyclophosphamide), ainsi que pour nos témoins négatifs, témoin positif et pour le mélange d'anti-cancéreux. Néanmoins, un phénomène inverse est observé dans notre travail pour une exposition au 5FU : dans ce cas particulier, la mortalité cellulaire est plus importante pour 72 h d'exposition que pour 24h.

De plus, nos tests de viabilité cellulaire ont mis en évidence que la toxicité des alkylants est plus importante que celle de l'anti-métabolite (< 10% de mortalité cellulaire pour le 5FU versus > 10% pour l'ifosfamide et le cyclophosphamide). Ils n'ont pas montré de relation dose-effet évidente.

Ensuite, l'effet génotoxique de nos molécules a été étudié au moyen de tests des micronoyaux. Cette fois, les résultats obtenus pour les témoins négatifs et pour les témoins positifs sont cohérents entre eux (les valeurs sont proches).

La molécule présentant le plus grand taux de micronoyaux, et donc engendrant une fragmentation chromosomique plus importante que les autres, est l'ifosfamide. Le 5FU et le cyclophosphamide ne se distinguent pas l'un de l'autre. Pour l'ifosfamide, les doses plus faibles semblent engendrer un taux de micronoyaux plus important que les doses plus élevées. Là encore, aucune relation statistique n'est observée entre l'augmentation de la concentration d'exposition et la toxicité de la molécule.

Enfin, un second effet génotoxique de nos molécules prioritaires a été étudié grâce à la réalisation de tests des comètes. Pour ces tests, nous avons analysé tout particulièrement les résultats relatifs au pourcentage d'ADN dans la queue (les résultats des autres valeurs obtenues, à savoir le Tail Extent Moment et l'Olive Tail Moment, variaient de façon similaires). Les valeurs obtenues pour tous les témoins négatifs étaient proches entre elles, et tous les témoins positifs présentaient des résultats similaires.

De manière globale, aucune molécule ne semble plus toxique que l'autre. Les toxicités après exposition à 24h et à 72h ne sont pas très différentes. Par contre, une relation dose-réponse se dessine puisque les concentrations en anti-cancéreux les plus fortes génèrent des pourcentages

d'ADN dans la queue plus importants que les faibles doses.

Cette ébauche de relation dose-réponse est confortée lorsque nous réalisons les tests statistiques ; pour la majorité des molécules, les concentrations élevées montrent une différence statistiquement significative de toxicité avec le témoin négatif, alors que les concentrations basses ne sont pas différentes de ce blanc. Et effectivement, le test de corrélation réalisé afin de rechercher une relation entre la dose de toxique à laquelle les cellules sont exposées et la toxicité (exprimée par le pourcentage d'ADN dans la queue) montre l'existence d'une corrélation pour le cyclophosphamide à 72h d'exposition et pour l'ifosfamide à 24h d'exposition. Cela dit, les coefficients de corrélation sont faibles.

Les résultats de nos deux tests de génotoxicité semblent donc en contradiction. Nous discuterons cette situation dans notre partie 4.

3.4. Évaluation de l'exposition aux anti-cancéreux

3.4.1. Sources d'exposition professionnelle pour l'Homme

Les principales sources de contamination se trouvent dans le milieu professionnel, lors de la préparation et de l'administration des chimiothérapies. Dans les années 70, des risques liés à la manipulation des anticancéreux dans un milieu professionnel ont été mis en évidence (Sessink, 1994). Ils ont conduit à la mise en place des unités centralisées de reconstitution des cytostatiques (URC) dans les établissements hospitaliers, afin de mieux protéger les manipulateurs.

3.4.1.1. L'indice de contact cytotoxique (ICC)

Cet indice vise à quantifier l'exposition des professionnels. Il prend en compte la fréquence de préparation et d'administration d'anticancéreux pendant une période définie pour une même personne, et sur la durée de présence de cette personne pendant la période.

Il se définit selon la relation suivante :

$$\text{ICC} = (nR + nA) / nH$$

où nR représente le nombre de reconstitutions ou de préparations réalisées par une même personne pendant une période déterminée,

nA représente le nombre d'administrations réalisées par une même personne pendant la même période

nH représente le nombre d'heures de travail de la personne durant la période de temps déterminée

L'interprétation de cet indice se fait de la manière suivante :

- $ICC > 3$ = niveau III → dans ce cas, une unité centrale de reconstitution est justifiée ;
- ICC est compris entre 1 et 3 = niveau II → dans ce cas, une unité centrale de reconstitution centralisée est souhaitable ;
- $ICC < 1$ = niveau I → dans ce cas, le niveau de précaution est minimale.

Toutefois, l'indice de contact cytotoxique ne prend pas en compte :

- le risque lié à la substance chimique,
- la toxicité cumulative,
- le type de présentation des spécialités (lyophilisats, solution, etc.),
- le mode d'administration du médicament (intratubulaire, intravésicales, etc.).

Or ces éléments peuvent influencer sur l'exposition des agents.

3.4.1.2. Les voies de contamination

Les différentes voies de contamination des humains par les cytostatiques sont :

- l'inhalation : lors de la reconstitution, les poudres cytotoxiques ou les liquides ayant dissous la poudre peuvent s'aérosoliser. En effet, cette manipulation provoque souvent une surpression dans le flacon qui contient la poudre. Cette surpression peut s'échapper de manière incontrôlée par le bouchon en caoutchouc du flacon, et polluer l'environnement immédiat. De plus, le cyclophosphamide, le 5 fluoro-uracile et le cisplatine sont susceptibles de se volatiliser à température ambiante ;
- le contact cutané : différentes surfaces peuvent être contaminées par les cytotoxiques ; par exemple les flacons de médicament, les poches de reconstitution, les paillasse, les sacs poubelle, les manchettes d'isolateur, les surfaces intérieures des isolateurs - PSC ou PSM, les sols des pièces de reconstitution ou d'administration, les poignées de portes ou de tiroirs, les combinés téléphoniques, les claviers d'ordinateur, etc. Le passage cutané bien que difficilement quantifiable reste donc une source d'exposition.
- l'ingestion : la principale source d'ingestion est le portage des mains souillées à la bouche.

La diffusion hors du poste de préparation ou d'administration reste donc possible soit via la création d'aérosols lors de la préparation, soit par le contact avec des objets (flacons, bacs, plateaux) ou des EPI souillés, soit encore par des fuites des enceintes de protection collective.

L'inhalation et le contact cutané direct sont les principales voies d'exposition professionnelle.

L'INRS a mis au point une méthode d'analyse pour le dosage de cytotoxiques ou de leurs métabolites dans les urines. Les molécules testées sont le cyclophosphamide, le 5fluoro-uracile, le méthotrexate et l'ifosfamide.

3.4.1.3. Les mesures de protection sociale

Il est prouvé dans la littérature que la manipulation des cytostatiques présente un risque pour la santé. Le tableau suivant (III-4) décrit les risques encourus par les personnes manipulant régulièrement les cytostatiques.

Tableau III-4 Tableau présentant les effets néfastes observés chez les manipulateurs de cytotoxiques (source : CCLin Sud Ouest juillet 2002)

DCI	ATTEINTE CUTANEE	AUTRES CONTACTS NEFASTES
Amsacrine	Irritation	
Bléomycine	Allergie - causticité Absence d'absorption	
Chlormétine	Irritation - causticité	Muqueuse nasale
Cisplatine	Allergie	
Cyclophosphamide	Irritation	
Cytarabine	Absence d'absorption	
Dacarbazine	Irritation	Muqueuse nasale
Dactinomycine	Causticité	
Daunorubicine	Irritation	Muqueuse nasale
Doxorubicine	Irritation - absence d'absorption	
Estramustine	Irritation	Muqueuse nasale
Fluoro-uracile	Irritation	
Ifosfamide	Irritation	
Lomustine	Causticité	Muqueuse nasale
Méthotrexate	Irritation	
Mitomycine	Irritation	
Mitoxantrone	Absence d'absorption	Oculaire
Plicamycine	Irritation	
Vinblastine	Irritation	
Vincristine	Irritation	
Vindésine	Irritation	Oculaire

De plus, un effet tératogène est craint. C'est pourquoi, selon la directive 92/85 CE du 19 octobre 1992, les femmes désirant une grossesse doivent prévenir le médecin du travail. Celui-ci donne alors des recommandations pour l'évaluation du risque concernant la manipulation des cytotoxiques (annexe 1) et pour une éventuelle éviction des tâches à risque. Le décret du 1^{er} février 2001 renforce cette mesure : les femmes enceintes ou allaitantes ne peuvent être affectées ou maintenues à des postes de travail les exposants à des agents avérés toxiques pour la reproduction.

Mais les femmes enceintes ne sont pas les seules à être protégées : la sécurité et le suivi médical de tout le personnel des établissements de santé sont également très encadrés, notamment par le décret du 3 décembre 1992 qui prévoit la prévention du risque chimique chez les agents exposés aux substances cancérigènes dans le secteur hospitalier. Le décret du 1^{er} février 2001 vient également compléter ce dernier en fixant des règles particulières de prévention des risques cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction qui modifient le code du travail. En effet, un travailleur ne peut exercer un travail en rapport avec un agent cancérigène, mutagène ou reprotoxique que suite à un examen effectué par un médecin du travail ; la fiche d'aptitude du travailleur doit être renouvelée tous les ans après examen médical. Le dossier médical doit, quant à lui, indiquer la nature et la durée du travail exposant, ainsi que les résultats des examens médicaux. Ce dossier doit être conservé au moins cinquante ans après la fin de la période d'exposition.

3.4.1.4. Les techniques de protection en établissement

Les reconstitutions de cytotoxiques doivent faire l'objet de protections collectives et individuelles (EPI).

Les isolateurs, enceintes en surpression dans lesquelles l'accès au volume de travail se fait de façon étanche à l'aide de gants à manchettes, sont les équipements collectifs les plus protecteurs. Ils interdisent tout contact entre les toxiques et les personnes qui les manipulent. L'air insufflé dans l'isolateur et l'air sortant sont filtrés par des filtres HEPA, et les transferts de matériels vers l'intérieur ou l'extérieur de l'isolateur se font par des portes étanches, des tunnels ou des sas. Dans ce cas, la protection des personnels repose sur l'étanchéité de l'enceinte, le port de gants épais et les filtres.

D'autres types d'enceintes peuvent être utilisés, non étanches mais dont les circulations d'air maîtrisées (toujours vers l'intérieur de la hotte) sont sensées protéger les préparateurs. Il s'agit de postes de sécurité cytotoxique (PSC) ou de postes de sécurité microbiologique (PSM). Dans ce cas, l'utilisation de protections respiratoires individuelles contre les aérosols solides et contre les vapeurs doit être évaluée en fonction de l'efficacité des postes (présenté dans le tableau III-5).

Tableau III-5 Equipements de protections individuelles utilisés en unité centralisée (CCLin Sud Ouest juillet 2002)

1 – UNITES DE RECONSTITUTION CENTRALISEE

HOTTE A FLUX LAMINAIRE	ISOLATEURS
Vêtement	
Veste + pantalon ou combinaison stérile : veste couvrante, à manches longues resserrées aux poignets, col montant sur la cagoule, bas du pantalon enserré dans les bottes	Vêtement protecteur normal (blouse, pantalon et veste...) non stérile, couvrant, à manches longues resserré aux poignets
Masque	
respiratoire à usage unique (type FFP2 ou FFP3) <i>Si utilisation correcte de la hotte, le port du masque est facultatif.</i>	Non
Lunettes de protection	
Facultatives si utilisation correcte de la hotte	Non
Gants	
Stériles, usage unique, latex, non poudrés, épaisseur au moins égale à 0,009 inches ou 230 µm (épaisseur équivalente à celle des gants de chirurgie) double paire (la première paire en dessous des poignets de la blouse stérile, la deuxième paire à manchette longue recouvrant les poignets de la tunique) jonction entre le gant et le vêtement : absence de partie découverte du poignet et du bras	Stériles, latex
Cagoule	
Couvrant l'ensemble de la chevelure	
Chaussures spécifiques	
Bottes désinfectées ou stérilisées	Surchaussures

L'utilisation d'un gant intérieur en nitrile et d'un gant externe en latex peut être envisagée.

Il peut parfois arriver qu'une reconstitution de cytostatiques non centralisée soit nécessaire, notamment en dehors des heures de fonctionnement des URC. Dans ce cas, les personnels soignants sont incités à se protéger de manière à éviter tout contact avec les cytostatiques (présentation dans le tableau III-6).

Tableau III-6 Equipements de protections individuelles nécessaires lors d'une reconstitution non centralisée, en unité de soins (CClin Sud Ouest juillet 2002)

Eléments de la tenue	Caractéristiques
Surblouse	Manches longues, resserrée aux poignets, usage unique
Masque	De soins (éviter la contamination de la préparation)
Lunettes de protection	
Gants	<ul style="list-style-type: none"> • Stériles, usage unique, latex, non poudrés, épaisseur au moins égale à 0,009 inches ou 230µm (épaisseur équivalente à celle des gants de chirurgie) • Double paire (la première paire en dessous des poignets de la blouse stérile, la deuxième à manchettes longue recouvrant les poignets de la tunique)
Cagoule	Couvrant l'ensemble de la chevelure
Chaussures spécifiques	Surchaussures

Certaines mesures d'hygiène collectives et individuelles doivent être observées au sein des unités de reconstitution des cytostatiques :

- existence d'un vestiaire permettant de séparer les vêtements de ville et les vêtements de travail ;
- ne pas boire, manger, fumer ou mâcher de chewing gum dans les locaux de travail ;
- manger dans des locaux propres, après avoir quitté ses vêtements sales et s'être nettoyé le visage et les mains ;
- ne pas emporter les vêtements de travail à l'extérieur. Leur nettoyage doit être organisé par l'entreprise ;
- l'entretien des locaux doit faire l'objet d'un programme particulier et être effectué par du personnel formé et informé.

Dans les établissements de soins, la préparation des cytostatiques est sous la responsabilité de la Pharmacie à Usage Intérieure. Pour les centres référant en cancérologie, la centralisation est obligatoire ; elle est recommandée dans les autres établissements de santé.

La conception des locaux dans lesquels sont préparés les cytotoxiques doit répondre à des critères de choix des matériaux (ex. : choix des sols, des murs, des plans de travail, des faux

plafonds, etc.). Lorsque la reconstitution se fait dans une unité centralisée, d'autres critères doivent être pris en compte comme la proximité de l'approvisionnement en matières premières et consommables, ou la relation avec les services consommateurs des spécialités préparées.

Tableau III-7 Descriptifs des locaux en fonction du type d'équipements pour la reconstitution des cytotoxiques (source : CCLin Sud Ouest juillet 2002)

Tableau : Descriptif des locaux en fonction du type d'équipement pour la reconstitution des cytotoxiques

HOTTE A FLUX LAMINAIRE	ISOLATEUR
Pièce de stockage réservée aux opérations suivantes Ouverture des cartons, stockage primaire des solutions de grand volume, des spécialités et des consommables.	
Bureau avec une zone d'archivage Il sert à l'acte pharmaceutique avec entre autres la documentation, le dossier patient, le système informatique et les protocoles de préparation.	
Sas d'habillage Divisé en <u>2 pièces</u> <ul style="list-style-type: none"> ▪ une dite "sale" pour le déshabillage et le lavage des mains ▪ l'autre dite "propre" pour l'habillage spécifique avec un traitement de l'air de classe B = ISO 5 Autres éléments <ul style="list-style-type: none"> ▪ Equipement du poste de lavage des mains dans la zone dite "sale" ▪ Pas de porte coulissante Pas d'ouverture simultanée des différentes portes	Sas d'habillage <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1 seule pièce permettant le déshabillage, le lavage des mains et l'habillage spécifique
Sas d'entrée des dispositifs médicaux et des médicaments	
Pièce de préparation <i>Climatisation pour la conservation des médicaments stockés</i> Deux zones de paillasse <ul style="list-style-type: none"> ▪ une pour la préparation du matériel et des médicaments introduits sous hotte ou isolateur ▪ la seconde pour le contrôle des préparations et du conditionnement. Zone de stockage avec étagères pour les produits consommables et un réfrigérateur pour les spécialités à conserver à +4°C. Visible de la zone du bureau	
Qualité de l'air exigée par les bonnes pratiques de fabrication	
Classe B = ISO 5 Système de surpression et de filtration d'air Moyen de communication avec le bureau (interphone, téléphone...) Système d'évacuation extérieure de l'air de la hotte	Classe D = ISO 8 Système d'évacuation et d'extraction des gaz vers l'extérieur Dispositif d'extraction de l'acide peracétique Installation d'air comprimé et d'un évier pour le test d'étanchéité des gants.

Dans tous les cas, une pièce doit être réservée à l'activité de reconstitution des cytostatiques dans les unités de reconstitution. Ce local doit avoir un système de traitement d'air adapté et un sas d'habillage. La maintenance et les contrôles des équipements doivent faire l'objet d'une traçabilité. Chaque établissement doit mettre en place une politique de contrôle d'air intérieur présentée dans le tableau III-8. La norme ISO 14644-1 définit le nombre de points à prélever. Plus récemment, la norme révisée ISO 90-351 (avril 2013) impose des contraintes techniques (taux de renouvellement d'air, cinétique de décontamination...).

Tableau III-8 Listes des points à prélever en fonction de la norme ISO 14644-1(CClin Sud Ouest juillet 2002)

LIEUX	NOMBRE	TYPE DE PRELEVEMENTS	QUAND	RESULTATS ATTENDUS
Salle de préparation avec hotte	2 à 3 prélèvements à chaque point	Particulaire	En repos	3 500 particules $\geq 0,5\mu\text{m}^3$
		Aérobicollecteur	En activité	10 UFC/m ³
Salle de préparation avec isolateur	2 à 3 prélèvements à chaque point	Particulaire	En repos	3 500 000 particules $\geq 0,5\mu\text{m}^3$
		Aérobicollecteur	En activité	200 UFC/m ³
Hotte à flux laminaire	2 à 3 prélèvements à chaque point	Particulaire	En repos	3 500 particules $\geq 0,5\mu\text{m}^3$
		Aérobicollecteur	En activité	Pas d'indication ¹
Isolateur	2 à 3 prélèvements à chaque point	Particulaire	En repos	3 500 particules $\geq 0,5\mu\text{m}^3$
		Aérobicollecteur	En activité	$\leq 1\text{UFC}/\text{m}^3$

¹En raison de contraintes techniques

Les prélèvements doivent être effectués au repos, en absence de personnel, à l'arrêt de production après un bref temps d'épuration de 15 à 20 minutes. Ils visent à évaluer la qualité du système de traitement d'air et du bionettoyage.

3.4.1.5. Les mesures de protection en soins à domicile

Le dernier Plan Cancer souhaite faciliter l'administration de chimiothérapies à domicile (il favorise de manière plus générale tous les soins à domicile). Le rapport de la commission d'orientation sur le cancer va également dans ce sens : le chapitre 4 met en avant le développement de la chimiothérapie à domicile. Dans le même rapport, le chapitre 6 soulève des questions qui devront être réglées : sur le plan réglementaire mais aussi sur le plan de la sécurité des soins. Il y est notamment fait état de l'importance de la protection des travailleurs.

La préparation et l'administration de cytotoxiques à domicile sont donc encore mal encadrées pour l'instant. Une des propositions visant à améliorer cette situation consiste en l'appartenance des personnes autorisées à manipuler les produits cytostatiques à un réseau de santé.

3.4.1.6. La gestion des déchets

Les déchets très concentrés générés à l'intérieur des enceintes de préparation doivent être jetés dans une poubelle placée à l'intérieur de l'enceinte. Les EPI (gants, surblouse, protection respiratoire) doivent être collectés dans des sacs dédiés et étiquetés. L'ensemble de ces déchets est traité par une filière d'élimination spécifique « cytostatiques » : il sera incinéré à plus de 1200°C. En effet, l'OMS recommande l'élimination par incinération à une température de 1200°C avec double foyer de combustion pour les médicaments anticancéreux.

Les cytostatiques dilués (par exemple les poches administrées au patient de façon incomplète) sont éliminés dans la filière des déchets d'activités de soins à risque infectieux (DASRI, à plus de 850°C).

Enfin, les médicaments périmés peuvent être soit éliminés en filière DASRI, soit retournés aux laboratoires pharmaceutiques.

Aucune mesure d'élimination des excréta de patients traités à l'aide d'anticancéreux n'est recommandée.

3.4.2. Exposition environnementale

L'exposition aux cytostatiques présents dans l'environnement est effective par le biais de l'eau : baignade dans une eau contaminée, ingestion d'eau contenant des traces médicamenteuse.

3.4.2.1. Les eaux de baignade

Le contrôle de la qualité des eaux de baignade est défini par la directive européenne 76/160/CEE de 1975, transposée dans les articles L.1332-1 (et suivants) et D.1332-1 (et suivants) du Code de la Santé Publique, relatifs aux baignades et aux piscines. Les dangers visés par ces textes sont essentiellement microbiologiques (gastro-entérite, ORL).

La nouvelle directive européenne du 15 février 2006 fait évoluer la réglementation. Elle remplacera la directive de 1975 progressivement jusqu'au 31 décembre 2014. Cette directive doit modifier la gestion et le contrôle de la qualité des eaux de baignade. Dans ce nouveau texte, seuls deux paramètres microbiologiques seront pris en compte (les entérocoques intestinaux et *E. coli*). Du point de vue du risque chimique, les phénols et les huiles minérales sont recherchés ; la recherche des paramètres physico-chimiques est devenue facultative. Cette nouvelle directive a été transposée au droit français avec la loi sur l'eau et les milieux aquatiques du 30/12/2006. Le décret 2008-990 du 18 septembre 2008, ainsi que les deux arrêtés du 22 et 23 septembre 2008, ont achevé sa transposition réglementaire.

3.4.2.2. L'ingestion

L'évaluation de l'exposition par ingestion est extrapolée de la manière suivante : il est classiquement admis qu'un adulte ingère 2L d'eau par jour pendant une durée de vie moyenne de 70 ans. La durée a été choisie en fonction de la publication de Webb, 2003 (présentée en partie 1). Cette extrapolation nous a permis d'appréhender les doses cumulées de résidus de médicaments ingérées avec l'eau de boisson, et de les comparer aux doses thérapeutiques pour chaque molécule.

3.5. *Calcul du risque*

Nous avons l'intention de faire l'évaluation du risque selon deux scénarios d'exposition.

Le premier était un scénario d'exposition professionnel tenant compte de trois voies d'exposition qui étaient l'inhalation, le contact et l'exposition via l'alimentation.

Le second scénario s'appliquait à la population générale et concernait l'exposition par voie alimentaire.

Le nombre d'hypothèses à appliquer pour la réalisation du scénario professionnel est trop important pour pouvoir construire un calcul de risque. En effet, il est difficile de quantifier l'exposition réelle des professionnels à l'inhalation, au contact et à l'ingestion de molécules anticancéreuses via les eaux usées avec lesquels ils sont en contact car rien dans la littérature, sauf pour la voie d'inhalation, ne nous renseigne sur de telles données. En particulier l'exposition par contact est théoriquement impossible pour le passage trans-cutané chez les professionnels respectant les mesures d'hygiène au travail mais cependant possible en cas d'accident ou de non-respect de ces mesures conduisant à une prise de risque difficile à estimer.

En revanche, on pourrait être tenté de déterminer le risque par ingestion d'eau contenant de l'Ifosfamide pour la population générale. En effet, le paramètre caractérisant l'exposition par la boisson est internationalement reconnu et cette molécule est la seule pour laquelle les tests de génotoxicité en laboratoire ont montré des résultats positifs.

Selon la nature génotoxique de la molécule étudiée, la construction de la VTR est sans seuil de dose en accord avec l'arbre décisionnel construit par l'AFSSET (figure 3-13).

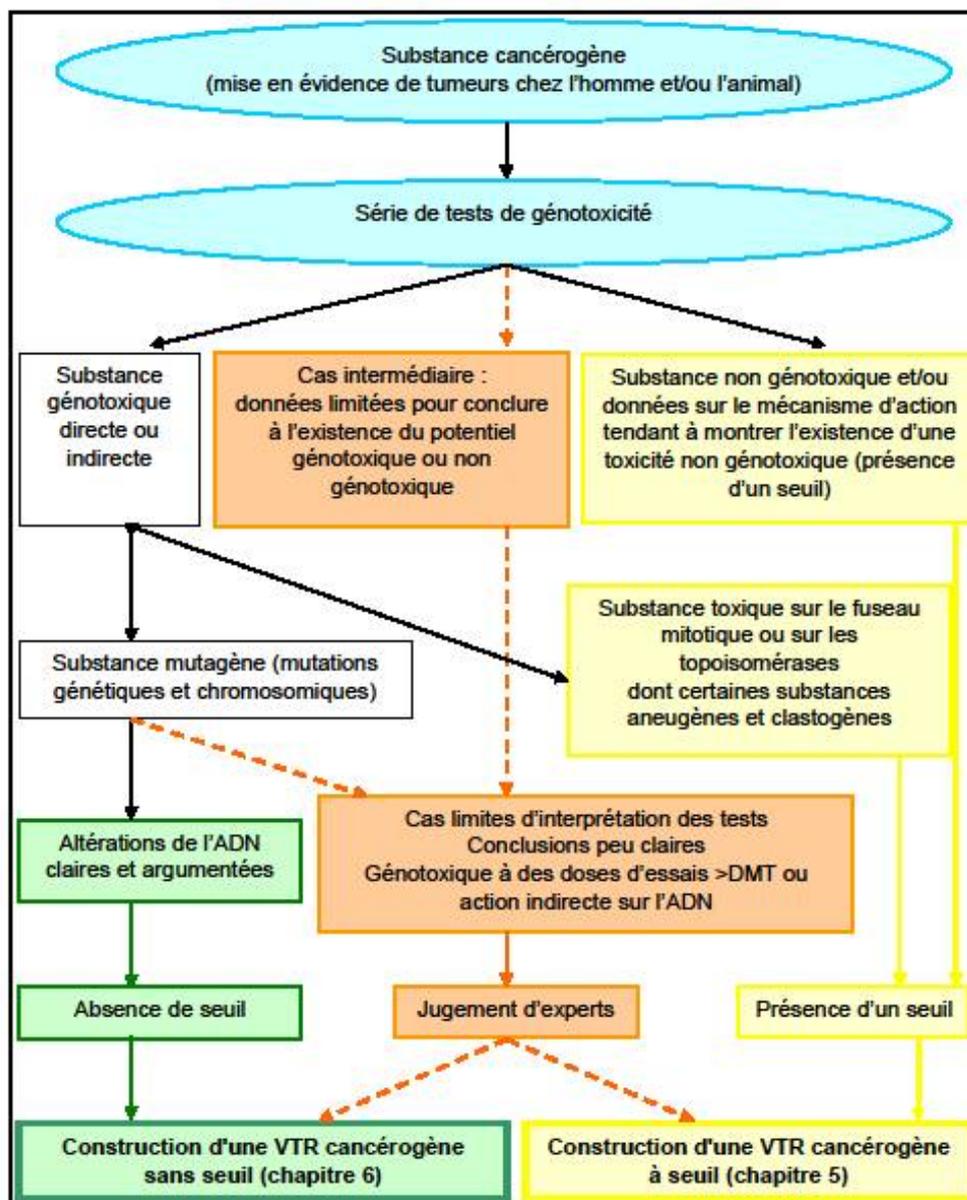


Figure 2 : Schéma d'aide à la décision sur l'hypothèse de construction des VTR cancérigènes

Figure 3- 13 Schéma d'aide à la décision sur l'hypothèse de construction de VTR cancérigène (source : AFSSET, 2010)

D'après la campagne nationale d'analyses relative à la présence de résidus de médicaments dans les eaux, la concentration d'Ifosfamide serait inférieure au nanogramme par litre. (ANSES, 2010). Le peu de données retrouvées dans la littérature, nous mène à extrapoler cette valeur à partir des concentrations retrouvées en sortie de station d'épuration.

D'après l'AFFSET (2008) les concentrations en sortie de STEP sont de l'ordre de 0,1 µg/L, en respectant les gradients de concentrations retrouvés dans les environs aquatiques (développés en partie 1) et selon Kim, 2007, une concentration d'environ 0,1ng/L d'Ifosfamide dans l'eau destinée à la consommation humaine seraient retrouvée.

Dans le cas d'une construction de VTR sans seuil de dose, on peut reprendre la relation dose-effet identifiée dans la partie 4.3 page 124. Cette courbe peut être assortie d'un intervalle de confiance à 95%. Sa représentation est présentée sur la figure 3-14.

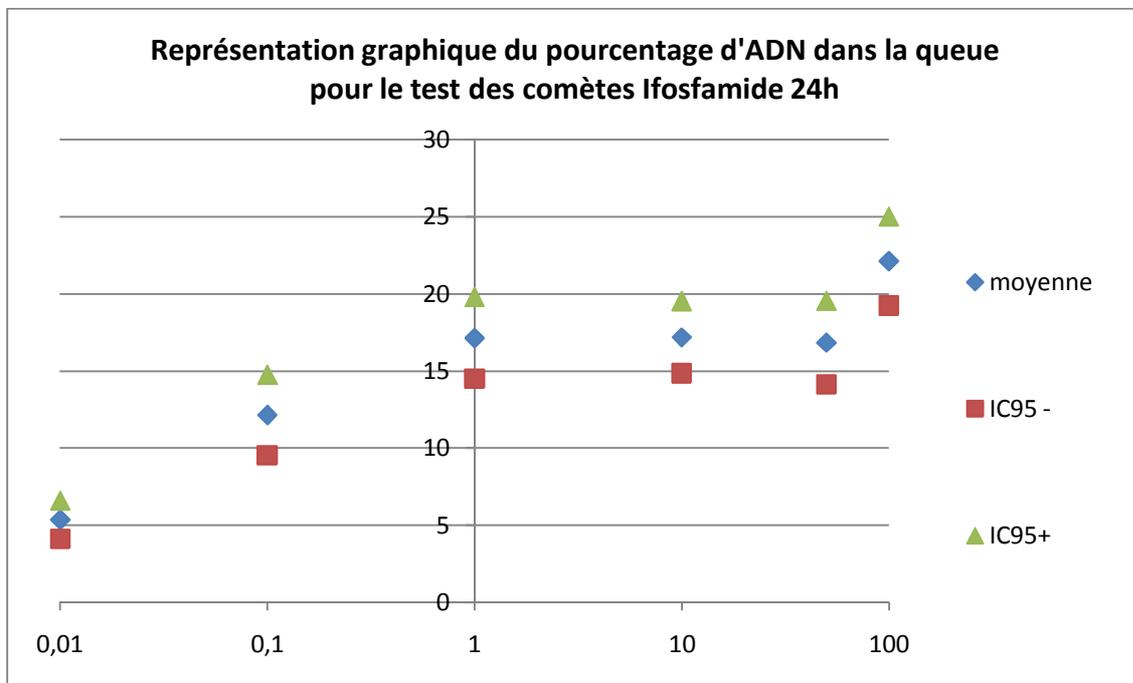


Figure 3-14 Représentation graphique du pourcentage d'ADN dans la queue lors du test comète pour les cellules HepG2 exposées à 24h d'Ifosfamide

L'excès de risque unitaire (ERU) est généralement représenté par la pente de la droite figurant la relation entre les doses testées et les effets induits. Ici nous avons choisi de ne pas figurer la pente de la droite de l'intervalle de confiance à 95% puisque la relation ne semble pas suivre une relation linéaire.

Ces résultats nous semblent trop incertains pour pouvoir conclure sur un éventuel risque pour la santé publique.

De plus, plusieurs auteurs ont montré une très faible probabilité de risque pour la santé humaine due à l'ingestion d'eau contaminée par de l'Ifosfamide, même aux doses retrouvées

dans les eaux superficielles. Ainsi Kümmerer *et al.* en 2010 montraient qu'une ingestion d'Ifosfamide de 10g lors d'un traitement anti cancer sur quelques mois augmenterait le risque de 1,5 (Risque Relatif = 1,5). L'apport par l'eau de boisson, c'est-à-dire 2 litres d'eau par jour pendant 70 ans apporterait de 10⁻³ à 10⁻⁴ fois moins d'Ifosfamide que cette dose thérapeutique, ce qui conduirait en première approximation à n'absorber l'équivalent de cette dose thérapeutique que sur une vie entière environ.

3.6. Synthèse de l'évaluation des risques

Notre évaluation des risques a été réalisée en suivant la méthodologie classique d'une évaluation quantitative des risques ; elle comprenait une première étape d'identification du potentiel dangereux en ayant une connaissance du mode d'action des molécules étudiées, puis une évaluation d'une potentielle relation dose-effet, puis une évaluation de l'exposition des populations aux anticancéreux, pour terminer avec un calcul de risque.

Pour les anticancéreux sélectionnés, nous nous sommes aperçus du manque de données relatives à leur toxicité. Ainsi, il a fallu déterminer s'il existait une relation dose-effet ; notre méthodologie s'est basée sur la conduite de tests génotoxiques *in vitro* (test des comètes et test des micronoyaux). Ces tests ont été pratiqués sur une lignée cellulaire issue d'hépatocarcinome humain, avec capacités enzymatiques préservées. La disponibilité et la connaissance de la lignée HepG2 ont fait que les tests étaient plus aisés à faire. De plus, le foie est le premier organe à métaboliser le cyclophosphamide et l'ifosfamide ; l'utilisation cette lignée semblait donc adaptée. Néanmoins, une autre lignée cellulaire, non issue d'un carcinome, aurait peut être donné lieu à des résultats différents. Ainsi, afin de garantir la fiabilité de nos résultats, il serait nécessaire de répéter nos tests sur des cellules saines.

Les concentrations testées sont celles retrouvées dans les différents compartiments aquatiques (eaux usées avant et après station d'épuration et avant et après station de potabilisation) c'est-à-dire 0,01, 0,1, 1, 10, 50 et 100µg/L. Le test de mortalité cellulaire au bleu de Trypan ne présentait pas de mortalité élevée pour ces concentrations. Nous avons donc choisi d'utiliser ces concentrations pour chaque test de génotoxicité.

Le test micronoyaux ne montrait pas différence significative entre le témoin négatif et les différentes concentrations testées. Des tests complémentaires pourraient permettre de confirmer ces résultats qui restent à confirmer par d'autres tests *in vitro*, *in vivo* et des études épidémiologiques.

Le test des comètes, par contre, montre des différences significatives avec le témoin négatif (eau ultra pure) pour les cellules exposées à 72h de cyclophosphamide, à 24h d'ifosfamide et aux deux temps d'exposition pour le 5 fluoro-uracile. Aucune différence significative n'a cependant été mise en évidence pour le mélange des trois anticancéreux. Le test de corrélation du Tau-B de Kendall montre une très faible corrélation (0,091) entre la dose de cyclophosphamide et les dommages sur l'ADN dans le cas d'une exposition à 72h de cyclophosphamide. Dans le cas de l'exposition à l'ifosfamide, une corrélation un peu plus importante a été mise en évidence (0,281), mais elle reste faible. Une de nos hypothèses à

cette corrélation faible est que la relation entre la dose de toxique reçue et les effets sur l'ADN des cellules n'est pas linéaire mais suit une courbe à seuil de doses. Cette hypothèse a été envisagée lors du calcul du risque

L'évaluation de l'exposition hors contexte professionnel semble être limitée à l'ingestion d'eau de boisson contaminée, ou d'aliments rincés avec une eau contenant des anticancéreux. L'exposition par contact dans les eaux de baignade par exemple est difficile à évaluer en raison du manque de connaissances sur le passage transcutané de molécules anticancéreuses.

L'exposition professionnelle reste la principale source d'exposition. La réglementation a évolué en instaurant la préparation en unité centrale de production, un suivi médical plus adapté et une restriction de préparation aux femmes enceintes ou allaitantes.

L'augmentation des chimiothérapies à domicile transfère les sources d'exposition et nécessite une mise en place d'équipements de protection individuelle et de gestion des déchets adaptés.

Le calcul du risque a été envisagé selon deux scénarios ; un professionnel qui prendrait en compte les trois principales voies d'exposition et un second qui tiendrait compte de la voie d'exposition orale via l'alimentation pour la population générale. Le calcul de ce risque est pour le moment impossible à réaliser les hypothèses sont trop nombreuses pour construire un calcul vraisemblable.

En revanche le calcul du risque pour le scénario par l'ingestion d'eau de la population générale, nous conduisent à un excès de risque unitaire de 0,29. Ce résultat est alarmiste compte tenu de la littérature sur le sujet qui avance une absence de risque pour la santé de la population.

Une publication concernant l'évaluation des risques pour une utilisation d'eau potentiellement chargée en anticancéreux est en cours d'écriture et sera soumise à la revue International Journal of Hygiene and Environmental Health.

4. Discussion générale

L'objectif de ce travail de thèse est d'évaluer le risque pour la santé des populations qui utiliseraient de l'eau potentiellement contaminées par des résidus de médicaments et en particulier des molécules anticancéreuses.

4.1. État des lieux de la présence des résidus de médicaments dans l'environnement aquatique et risque inhérent pour la santé

- Accessibilité des données

Le travail effectué lors de notre collecte des données couvre un panel très important de molécules (médicaments, phtalates, bisphénol A), retrouvées dans les eaux usées mais aussi jusqu'au robinet du consommateur. Cette étude de grande ampleur a été menée dans l'objectif de caractériser la qualité de l'eau. Elle nous a permis d'objectiver la présence de nombreuses classes thérapeutiques dans les différents types d'eaux environnementales. Toutefois, cette masse de données induit la nécessité de faire des choix.

Ainsi, en premier lieu, nous avons choisi de focaliser nos recherches sur les eaux les plus à même de représenter un risque pour la santé humaine :

- les eaux usées puisqu'elles sont rejetées dans les eaux de surface après traitement dans une station d'épuration,
- les eaux destinées à la consommation humaine.

En second lieu, nous ne pouvons mener nos études de risque sur la totalité des molécules identifiées dans les eaux environnementales. De ce fait, nous avons été amenés à construire une méthodologie originale de hiérarchisation des risques inhérents aux résidus de médicaments. Cette méthodologie est présentée de manière détaillée dans la partie 2, elle n'est donc pas explicitée dans cette partie.

Bien entendu, les données entrées dans notre modèle de hiérarchisation des risques en santé humaine liés aux résidus de médicaments sont issues de notre revue de la littérature.

Le recueil de données s'est effectué à travers des publications de niveaux national et international. Mais nous n'avons pas pu nous contenter de cette source de données car beaucoup de travaux concernant la présence environnementale de résidus de médicaments sont restés confidentiels, non publiés. Ainsi, nous avons également inclus des données issues de thèses d'exercice et de doctorat. Des rapports d'agences telles que l'ANSES, ANSM, l'Académie de pharmacie, l'Agence de l'eau (Seine-Normandie, Rhin-Meuse) concernant les masses d'eaux ont aussi été consultés, analysés et exploités. Enfin, afin de compléter nos connaissances, nous avons été amenés à utiliser des données locales propres au CHU de Nancy et à la STEP de Maxéville qui gère les eaux usées de cet établissement.

Bien que minutieuses et extrêmement chronophages, nos recherches n'ont pas pu être exhaustives puisque beaucoup de données ne sont pas publiées à l'heure actuelle. Il est certain que des données complémentaires permettraient d'affiner les connaissances concernant la

pollution médicamenteuse des eaux.

Aujourd'hui, aucun organisme public n'est mandaté afin de collecter les données de pollution médicamenteuse des différentes masses d'eau. En effet, la réglementation française n'oblige ni les collectivités territoriales, ni les industriels à rechercher une pollution d'origine médicamenteuse de façon systématique et obligatoire. Et lorsqu'ils recherchent cette notion, les industriels du domaine de « l'eau » gérant de station de traitement des eaux usées ou de distribution de l'EDCH ne communiquent pas les résultats d'analyses menées de façon interne.

De cette façon, le consommateur n'a aucune information sur la qualité de l'eau qu'il utilise (d'un point de vue médicamenteux) ; pourtant la qualité de l'eau en général et sa contamination potentielle en micropolluants (ex. : pesticides, médicaments) sont des questions récurrentes et constituent une préoccupation permanente pour l'opinion publique.

Des initiatives telles que celles de l'institut national de la consommation (INC) à travers le magazine « 60 millions de consommateurs » (avril 2013), qui analysent de l'eau en bouteille et de l'eau du robinet à la recherche de résidus de médicaments et de pesticides, alertent les consommateurs et insistent sur la question du non-contrôle systématique de ces pollutions dans les eaux de consommation.

Toutefois, cette absence de transparence peut être amenée à changer dans les années qui viennent.

Nous avons rencontré la même absence de résultats pour les prélèvements d'effluents des centres de soins. Il est vrai que les établissements de soins, eux non plus, ne sont pas tenus de pratiquer des recherches de pollution d'origine médicamenteuses dans leurs effluents. Lorsqu'elles sont réalisées, les analyses se font donc suite à une étude menée par le service « environnement » du centre hospitalier lorsque le budget le permet, ou lors de campagnes d'analyses issues de projets de recherche financés par des organismes souvent indépendants des établissements concernés. Certaines données recueillies lors de ce travail sont donc issues de travaux internes (CHU de Nancy), de travaux de thèses (Mullot, 2009) ou de travaux internationaux (Swedish Medical Product Agency, 2004). Ces données et leur exploitation sont donc parcellaires et propres à l'environnement particulier auquel appartient l'établissement de soins dans lequel elles ont été réalisées.

A défaut de données de qualité d'eaux usées, les quantités de médicaments délivrés aux patients ont été recherchées auprès des pharmacies à usage intérieur de plusieurs établissements de soins. Dans ce cas encore, les données ne sont pas faciles à obtenir. Pour preuve : seul un centre hospitalier a accédé à notre demande.

- **Cohérence des données**

Comme expliqué dans le premier paragraphe de notre discussion, les données dont nous disposons sont issues de sources d'information très disparates. Nous avons donc tenu à vérifier la cohérence des informations recueillies par les différentes sources. La question que nous nous posions était la suivante : y a-t-il des molécules présentes dans les effluents de STEP qui n'ont pas été étudiées dans les EDCH ?

Enfin, une des limites de notre analyse est que les stations d'épuration dont les données ont été traitées, sont toutes équipées de traitements primaire, secondaire et tertiaire (niveau de traitement le plus couramment utilisé en France). Il serait intéressant de rechercher les capacités d'épuration des molécules médicamenteuses par des stations avec un traitement quaternaire, ou incluant un traitement à l'ozone.

Nous n'avons pas pu retrouver de données explorant cette situation.

4.2. Méthode de hiérarchisation

Suite au constat du rejet dans les eaux usées de nombreux résidus de médicaments non épurés par les stations d'épuration ou de potabilisation, nous nous sommes intéressés aux risques pour la santé humaine de la consommation quotidienne d'eau potentiellement polluée en résidus de médicaments. La quantité de molécules potentiellement présentes étant importante, il s'avère impossible de mettre en œuvre une évaluation des risques pour chacune d'entre elle. Une solution a donc été recherchée afin de connaître les molécules prioritaires pour lesquelles le risque doit être évalué en premier lieu. Ainsi, nous avons proposé une méthode de hiérarchisation des résidus pharmaceutiques.

4.2.1. Etat des connaissances

Il est mondialement établi que des résidus de médicaments contaminent l'environnement et sont responsables d'effets toxiques sur les écosystèmes présents dans les milieux aquatiques. Afin d'évaluer l'impact de ces polluants émergents dans ces milieux, plusieurs méthodes de hiérarchisation ont déjà été mises en place dans différents pays européens et en France.

Ces études, qui se basent le plus souvent sur la méthode développée par l'agence européenne du médicament (EMA) pour l'évaluation de risque lié à la présence de composés pharmaceutiques dans l'environnement, permettent de calculer un ratio de danger entre une concentration prédite dans l'environnement (PEC) et une concentration prédite sans effet (PNEC).

La principale limite de cette méthode, déjà soulignée par plusieurs études (Fent, 2006 ; Stuer-Lauridsen, 2000 ; Besse, 2008 ; Carlsson, 2006 ; Crane, 2006 ; Jones, 2002 ; Länge, 2002), est liée au manque de données d'écotoxicité ne permettant le calcul d'une PNEC que pour un nombre restreint de molécules.

Par ailleurs, le calcul de la PEC qui prend en compte la consommation, le métabolisme et l'élimination en station d'épuration dépend des profils de consommation de la zone d'étude, des différences génétiques entre les individus et des procédés utilisés pour le traitement des eaux dans les stations d'épuration. Les listes de molécules prioritaires qui sont identifiées au moyen de cette méthodologie ne sont donc pas forcément généralisables d'un pays à un autre, voire d'une région à une autre.

D'autres méthodes de hiérarchisation basées sur les propriétés physico-chimiques des substances actives, en particulier sur leurs potentiels de persistance et de bioaccumulation, ont donc vu le jour ces dernières années. Mais là encore des disparités spatio-temporelles peuvent être observées en raison de la multitude des facteurs influençant ces paramètres dans l'environnement : la saison, la météorologie, la nature du milieu récepteur, etc.

C'est pourquoi il paraît nécessaire de répéter des évaluations de risque à petite échelle (région, département, commune ou encore établissement hospitalier) pour ensuite appliquer les résultats à des zones d'études plus importantes, présentant un profil de consommation et des caractéristiques hydrogéologiques comparables. Ces spécificités apparaissent d'ailleurs dans les résultats des articles que nous avons analysés.

4.2.2 Construction de notre méthodologie de hiérarchisation

4.2.2.1. Molécules candidates

Seules les substances actives et les molécules synthétiques ont été incluses à notre liste de molécules candidates. Les excipients sont en effet par définition des molécules dénuées d'action pharmacologique et par conséquent moins susceptibles d'induire des effets toxiques sur les organismes aquatiques. Certaines études ont cependant montré que ces composés ne sont pas totalement inoffensifs puisque des phénomènes allergisants ont été observés chez l'Homme (Barbaud, 2005 ; Bourgeois, 1989). Les molécules naturelles utilisées en thérapeutique, qui ne comptent plus que pour 5 % de la pharmacopée, contribuent quant à elles à une part très minime de la concentration retrouvée dans l'environnement. Au Danemark, Christensen en 1998 a calculé les quantités de 17β -estradiol et de ses métabolites excrétés naturellement par les femmes et les animaux femelles, ainsi que la part liée aux rejets médicamenteux. Il a ainsi établi que l'utilisation médicamenteuse du 17β -estradiol ne représentait que 5 % des émissions naturelles.

Dans notre travail, les molécules candidates ont été sélectionnées à partir des médicaments consommés par un établissement de soins. Ces données sont celles auxquelles nous avons eu accès. Evidemment, elles ne sont pas représentatives de la pollution médicamenteuse globale des réseaux d'eaux usées puisque la majorité des principes actifs sont prescrits dans le milieu communautaire. De plus, les établissements de santé ne disposent pas dans leur arsenal thérapeutique de la totalité des substances actives disponibles dans chaque classe ATC : des appels d'offres lancés régulièrement conduisent les pharmacies à usage intérieur à faire un choix de molécules mises à disposition des praticiens hospitaliers parmi toutes celles existantes. Les prescriptions médicales au sein de l'établissement de soins seront donc limitées à cette liste de médicaments disponibles.

Ainsi, des données de consommation médicamenteuse issues de la Caisse Nationale d'Assurance Maladie (CNAM) auraient permis d'obtenir une meilleure vue d'ensemble de la consommation médicamenteuse hospitalière et communautaire, et d'obtenir une liste quelque peu différente de molécules candidates. Certaines molécules sont par exemple prescrites

essentiellement en ville et n'apparaîtrons pas dans notre liste de molécules candidates (ex : spécialités non agréées à l'usage en collectivité, pilule contraceptive). Néanmoins, l'autorisation d'accès à la base de données de la CNAM en vue de réaliser une recherche scientifique est compliquée à obtenir.

Il faut également rappeler que la contamination liée aux rejets des établissements hospitaliers est particulièrement intéressante à évaluer, en raison de la forte toxicité des composés utilisés (chimiothérapie, antibiothérapie à large spectre réservée à l'usage hospitalier, etc.). En plus de permettre de cibler les programmes de surveillance des eaux usées, de telles études permettent d'orienter la recherche et le développement de méthodes de traitement ou de gestion spécifiques aux effluents hospitaliers. Ainsi des stations de traitement des eaux usées commencent à s'implanter directement à la sortie des hôpitaux. Des stratégies de gestion spécifique des effluents hospitaliers, comme cela est réalisé pour les déchets d'activité de soins à risque infectieux (DASRI), pourraient également être envisagées. Par exemple, les urines de patients collectées par sondage urinaire sont actuellement déversées dans les eaux de toilettes ; elles pourraient être éliminées d'une façon plus durable pour l'environnement.

Pour évaluer les risques liés à la présence de résidus de médicaments d'origine hospitalière dans les milieux aquatiques, nous avons développé une méthode de hiérarchisation des molécules candidates associant la méthode de l'EMEA (european medicines agency) à une évaluation du danger en fonction des propriétés de persistance, de bioaccumulation et de toxicité des substances actives. Celle-ci a été appliquée à l'échelle locale, aux molécules issues d'un centre hospitalier lorrain de 300 lits de médecine-chirurgie-obstétrique (MCO) et réanimation. L'objectif secondaire de cette étude était d'envisager quels indicateurs sont les plus pertinents à considérer pour ce type d'évaluation.

4.2.2.2. Choix des indicateurs pris en compte

Par les quantités introduites en continu dans l'environnement, les substances médicamenteuses présentent un potentiel de pseudo-persistance. L'OCDE décrit, dans ses lignes directrices pour les essais chimiques, des tests de dégradation qui permettent d'apprécier ce potentiel de persistance de façon expérimentale, en dosant la consommation d'oxygène et la production de CO₂. Cette méthode a été utilisée par l'équipe suédoise (Swedish Medical Product Agency, 2004) pour son évaluation de risque ; cependant ces tests ne prennent pas en compte la multitude de facteurs influençant la dégradation des médicaments dans l'environnement (caractéristiques du milieu aquatique, présence de bactéries, rayonnement UV, etc.). C'est pourquoi, bien que présentant un certain nombre d'incertitudes, les prédictions du temps de persistance et de la demi-vie dans l'eau du modèle multimédia de l'US EPA nous apparaissaient être plus adaptées pour évaluer la persistance des principes actifs dans les milieux aquatiques.

Plus une molécule persiste dans l'environnement, plus elle a la possibilité de se concentrer dans les membranes biologiques. Pour évaluer cette tendance à la bioaccumulation, plusieurs

indicateurs peuvent être utilisés. Chacun d'entre eux présente des intérêts et des limites :

- le log Kow peut varier en fonction des conditions de température et de pression de l'expérience, expliquant ainsi la diversité des valeurs du log Kow pour une même substance selon la base de données utilisée (plusieurs bases sont disponibles en ligne) ;
- la solubilité, quant à elle, est en théorie un paramètre simple à recueillir. Cependant très peu de données expérimentales sont accessibles. Par ailleurs, les valeurs estimées par les modèles sont prédites pour des températures souvent supérieures à celles que l'on peut rencontrer dans les cours d'eau en France ;
- enfin, le facteur de bioconcentration, qui permet d'apprécier la concentration directe par voie aqueuse (branchies et épiderme) dans les organismes aquatiques, est un paramètre plus informatif que la solubilité et le log Kow pour évaluer l'impact sur les écosystèmes, mais là encore il s'agit d'un paramètre prédit.

La persistance et la bioaccumulation ne seraient sans doute pas un problème si elles ne s'accompagnaient pas d'une toxicité potentielle ou prouvée. La Predicted No Effect Concentration (PNEC) est l'indicateur le plus pertinent pour évaluer la toxicité chronique des composés chimiques sur les écosystèmes aquatiques. Cependant, comme l'ont souligné les différentes évaluations de risque sur les résidus de médicaments déjà menées en France ou dans d'autres pays, les données écotoxicologiques pour les composés pharmaceutiques sont très limitées. Un nombre restreint de quotients de danger sont donc calculables, d'autant plus que l'estimation de la Predicted Environmental Concentration (PEC) prend en compte le rendement d'élimination moyen en STEP et le métabolisme, données également difficiles à recueillir pour l'ensemble des substances actives. La dose létale médiane (DL50), plus accessible, est un autre indicateur permettant d'évaluer la toxicité des composés pharmaceutiques, cependant celle-ci estime la toxicité aiguë chez les rongeurs et est donc moins adaptée que la PNEC pour évaluer l'impact des résidus de médicaments sur les écosystèmes.

La toxicité est fonction des doses et de la durée d'exposition reçues par les organismes aquatiques et dépend donc des quantités émises dans l'environnement, c'est-à-dire de la concentration prédite.

L'estimation d'une PEC pour les résidus de médicaments suppose un certain nombre d'hypothèses avec les incertitudes que cela entraîne :

- Dans un premier temps, le calcul de la PEC prend en considération les données de consommation de la zone d'étude, pondérées par le nombre de litres d'eaux usées consommés par la population. A l'hôpital, cela suppose que l'ensemble des produits consommés sont éliminés sur place. Or les molécules administrées en hôpital de jour sont éliminées de façon diffuse sur l'ensemble du réseau d'assainissement. Intégrer le type d'hospitalisation permettrait de pallier cette limite ;
- La fraction de substance active excrétée sous forme inchangée est le deuxième paramètre pris en compte dans le calcul de la PEC. La première limite qui en découle vient de la variabilité interindividuelle, se traduisant souvent par de larges intervalles lorsque les fractions excrétées sous forme inchangées sont décrites dans les résumés des caractéristiques des produits. La deuxième limite concerne la non prise en compte de la

part excrétée sous forme de métabolites. En effet, en raison des nombreuses voies de métabolisation possibles, les métabolites de l'ensemble des molécules mères n'ont pas encore été identifiés à ce jour et par conséquent, ne sont pas encore répertoriés dans les bibliothèques de spectrométrie de masse, ce qui rend impossible leur détection dans les urines. Cette absence de prise en compte des métabolites pose un problème de plus pour les prodrogues. Absorbés sous forme de précurseurs, ces médicaments sont complètement transformés en substance active une fois dans l'organisme. Le Valaciclovir, par exemple, antiviral indiqué dans le traitement du zona et de l'herpès, est un promédicament de l'Aciclovir. Il est entièrement métabolisé dans le foie en Valine (acide aminé) et en Aciclovir. La fraction de Valaciclovir excrétée sous forme inchangée dans les urines est donc nulle. En ne prenant pas en compte les métabolites, la fraction excrétée sous forme d'Aciclovir (environ 85 %) n'est pas comptabilisée et ainsi la PEC pour l'Aciclovir est sous-estimée ;

- La PEC prend également en compte le rendement d'élimination moyen pour une station d'épuration classique. De la même façon que pour le métabolisme, cela permet de considérer uniquement les molécules rejoignant l'environnement. Cependant ce chiffre ne fait pas la distinction entre l'élimination par adsorption sur les boues, et l'élimination par biodégradation. Or les résidus de médicaments adsorbés dans les boues peuvent être retrouvés dans l'environnement lorsque les boues sont valorisées. De plus, compte-tenu de la multiplicité des mécanismes de dégradation et du nombre de substances médicamenteuses, il paraît difficile de prendre en compte avec précision les phénomènes de dégradation dans les modèles de calcul de la PEC.

- Pour finir, le dénominateur de la formule permet de pondérer la PEC par le nombre d'habitants et par le nombre de litres d'eaux usées utilisés par équivalent-habitant (EH) sur la période considérée. Dans le cadre des évaluations de risques liés aux rejets hospitaliers, c'est le nombre de lits qui est utilisé, ce qui suppose un taux d'hospitalisation de 100 % tout au long de l'année. Par ailleurs, la consommation d'eau est estimée à 1 000 L par jour et par lit.

La connaissance des effets des résidus de médicaments sur les organismes est un des domaines dans lequel de nombreuses recherches sont encore à effectuer. De même, les capacités d'épuration de ces molécules en STEP sont mal connues et pourraient devenir une source de données précieuses pour de prochaines évaluations de risque.

4.2.2.3. Construction des scores

Pour construire les scores basés sur les différents indicateurs recueillis, nous avons utilisé lorsqu'elles existaient des échelles tirées de la littérature, comme celle utilisée pour le temps de persistance extraite d'une publication de Zuccato *et al.*, 2000, celle de solubilité empruntée à l'Afssaps ou encore les échelles de toxicité de l'EMEA. Ces échelles nous ont permis de transformer une donnée qualitative (valeur de l'indicateur) en une donnée quantitative (classe) à laquelle était attribuée un certain nombre de points.

Pour les indicateurs de bioaccumulation (log Kow et BCF), aucune échelle, validée ou non,

n'était disponible ; nous avons donc du en élaborer. Pour cela, il nous a semblé pertinent de prendre en compte les divergences de valeurs seuil existant entre la législation européenne et le système international de classification des matières dangereuses. Les résultats obtenus avec le score basé sur le log Kow semblent se recouper avec ceux obtenus avec le score de solubilité (elle-même prédite à partir du log Kow). Cet élément est en faveur d'un découpage cohérent.

Ici encore, une harmonisation du système de cotation serait sans doute bénéfique à l'étude, mais pour le moment il n'existe pas de méthode de hiérarchisation transposable à tous les cas de figure possibles et l'ensemble des paramètres potentiellement à prendre en compte ne possède pas d'échelle de valeur nationale, européenne ou internationale.

4.2.2.3. Utilisation de plusieurs combinaisons d'indicateurs – apport de notre méthodologie

Pour hiérarchiser la totalité de nos molécules candidates, nous avons construit une méthodologie originale permettant, en cas de valeurs manquantes pour certains indicateurs, de pallier à cette absence de données. Pour ce faire, nous avons choisi d'agencer tous nos indicateurs en 12 combinaisons (chacune comprenant un indicateur de persistance, un indicateur de bioaccumulation et un indicateur de toxicologie). Lorsque les données d'un indicateur étaient manquantes, les scores comprenant cet indicateur n'étaient pas calculés, et la hiérarchisation de la molécule était obtenue au moyen d'une autre combinaison.

Nous avons cherché à connaître, parmi les 12 combinaisons retrouvées, quelle était la plus pertinente, c'est-à-dire quelle était la combinaison qui nous permettait d'identifier comme prioritaires les mêmes molécules que notre méthodologie globale (incluant les 12 combinaisons), sans pour autant identifier beaucoup d'autres molécules comme prioritaires. La combinaison I semblait répondre à ces critères. Néanmoins, l'application d'une seule et unique combinaison nous fait perdre le bénéfice de l'exhaustivité de notre démarche.

4.2.3. Les résultats obtenus

Le but de ce travail était de proposer une liste de substances médicamenteuses prioritaires à rechercher dans l'environnement.

Après combinaison de nos différents scores, nous sommes parvenus à élaborer à partir des données du centre hospitalier lorrain ayant participé à notre étude, une liste de 12 molécules à prendre en compte dans les programmes de surveillance des eaux usées à l'échelle locale (**Tableau II-13**).

Les deux molécules les plus représentées sont le Lopéramide et la Perméthrine. La Perméthrine, utilisée en santé humaine dans les shampoings anti-poux, est avant tout un insecticide. Elle présente donc une toxicité importante pour les écosystèmes, ce qui peut expliquer sa sélection quelque soit la combinaison de scores utilisée.

Notre liste de molécules prioritaires comporte cinq molécules appartenant à la classe

« Système nerveux » de la classification ATC (Buprénorphine (traitement substitutif des dépendances aux opiacés), Clomipramine), Clomipramine (antidépresseur), Lévomépromazine (neuroleptique), Pimozide (antipsychotique), Sertraline (antidépresseur)). Cette forte représentativité peut s'expliquer par l'ampleur du marché pour ce type de molécules.

Les autres substances répertoriées dans cette liste n'ont jamais été retrouvées dans les évaluations de risque antérieures, mais ceci peut s'expliquer par des différences d'objectif entre les évaluations de risque. En effet, certaines études avaient pour but de définir les molécules prioritaires par classe thérapeutique et non de façon globale, ou encore de définir la part des hôpitaux dans la contamination des eaux. D'autre part, comme nous l'avons mentionné précédemment, notre étude a été réalisée sur les données du centre hospitalier lorrain de 300 lits, qui dépendent des caractéristiques locales ; ses résultats ne peuvent donc être extrapolés qu'à des établissements de soins de type et de taille comparables. Ainsi les molécules consommées dans ce centre hospitalier ne sont certainement pas les mêmes que dans un établissement de taille supérieure comme un centre hospitalier universitaire. Par ailleurs, la Lorraine disposant d'un centre régional du traitement du cancer, nous pouvons supposer que l'établissement régional considéré prescrit moins de spécialités anticancéreuses par rapport à un centre hospitalier situé dans une autre région et ne possédant pas ce type de centre spécialisé (20 centres de lutte contre le cancer existent en France).

Par ailleurs, les auteurs ayant publié sur le risque environnemental ont identifié comme « à risque » des molécules ne figurant pas dans notre liste de molécules prioritaires.

Prenons pour exemple, le cas de l'éthinyl estradiol qui ne ressort pas dans notre méthode basée sur les consommations hospitalières. Cette molécule est retrouvée dans d'autres études incluant les données de consommation, cela peut s'expliquer par le fait que la prescription de pilule contraceptive se fait principalement en ville. Des données sur la consommation de ville pourrait donc, à l'image de l'éthinyl estradiol, modifier la liste des molécules prioritaires.

Cette étude nous a également permis d'évaluer quels sont les paramètres les plus pertinents pour évaluer le danger lié à une substance chimique.

Ainsi, en nous basant sur un scénario de pire cas, principe couramment utilisé dans les évaluations de risque en raison d'un manque de données extrapolables à l'Homme, nous avons déterminé que la demi-vie dans l'eau est un meilleur indicateur que le temps de persistance pour évaluer la persistance des résidus de médicaments dans l'environnement et que le BCF est l'indicateur le plus informatif pour estimer la bioaccumulation des composés pharmaceutiques. Pour la toxicité, le QD est l'indicateur le plus pertinent, mais est inadapté pour hiérarchiser les centaines de substances actives disponibles sur le marché pharmaceutique français. Le score basé sur la DL50 est calculable pour un plus grand nombre de molécules mais ne prend en compte ni la consommation, ni le métabolisme, ni l'élimination en station d'épuration.

Enfin, pour cette étude, nous avons collecté des données pour l'ensemble des substances actives synthétiques consommées dans un CH de Lorraine. Ce travail pourrait servir de point

de départ pour la création d'une base de données répertoriant l'ensemble des données nécessaires à l'évaluation de risque des résidus de médicaments, à l'instar de la base AGRITOX pour les pesticides. En effet, à l'heure actuelle, aucune base de ce type n'est disponible pour les composés pharmaceutiques. Le réseau NORMAN (Réseau européen de laboratoires de références, de centres de recherche et d'organismes associés pour la surveillance de substances émergentes dans l'environnement), mis en place en 2005, a pour projet la création d'un réseau pérenne de laboratoires de références, de centres de recherche et d'organismes associés capables d'une part de favoriser l'harmonisation des méthodes de surveillance des polluants émergents dans l'environnement, et d'autre part d'assurer un échange plus rapide et plus larges d'informations sur la présence de ces substances dans l'environnement et leur impact sur l'Homme et les écosystèmes. Dans ce cadre, il a été développé une interface d'échanges et d'information dédiée sur internet ainsi que trois bases de données :

- EMPOMAP qui recense les experts, les organismes et les projets sur les différentes catégories de substances émergentes ;
- EMPODAT, base de données de surveillance géo-référencées sur les substances émergentes couplée à l'information écotoxicologique des essais biologiques et des biomarqueurs ;
- EMPOMASS, base de données d'informations spectrométriques de masse sur les substances provisoirement identifiées et/ou inconnues.

Cependant, ces bases ne sont pas accessibles au public.

En dernier lieu, nous avons souhaité analyser plus particulièrement le risque relatif aux cytostatiques rejetés dans l'environnement car ces médicaments sont reconnus dans le domaine pharmaceutique pour être extrêmement toxiques. Cette situation conduit à la mise en place de mesures contraignantes lors de leur préparation (protection des préparateurs, utilisation de hottes à flux laminaires ou d'isolateurs...) ; pourtant, une fois le médicament anti-cancéreux administré, il est rare que les liquides biologiques émanant des patients (urine, selles...) soient traités avant élimination. Certaines instances travaillant sur le bon usage des médicaments (OMEDIT) nous rappellent néanmoins le potentiel polluant de ces excréta.

Le centre Alexis Vautrin, établissement spécialisé de 180 lits, nous a servi de modèle pour identifier les molécules les plus utilisées. En France, vingt centres spécialisés dans la lutte contre le cancer existent, mais de nombreux établissements de soins rejettent également des molécules anti-cancéreuses dans l'environnement. Certains médicaments anti-cancéreux sont aussi utilisés dans le domaine communautaire ; de plus, les traitements ambulatoires se multiplient. Nous nous sommes donc légitimement posés la question de la rémanence de ces produits dans les compartiments hydriques, et de la toxicité de ces composés.

La majorité des molécules utilisées dans le centre anti-cancéreux sont des agents alkylants (ex : ifosfamide, cyclophosphamide, estramustine). Or les effets indésirables de ces médicaments sont bien connus lorsqu'ils sont utilisés en clinique : leur mécanisme d'action consiste en une interaction directe avec l'ADN des cellules tumorales puisqu'ils forment des ponts entre les deux brins des chromosomes. Outre leur effet thérapeutique sur les cellules cancéreuses, ces médicaments s'avère posséder également une activité sur les cellules non

tumorales. Ils sont connus pour leurs effets indésirables mutagènes et tératogènes, et peuvent induire des cancers secondaires (vessie, leucémie). Le risque lié à ces molécules mérite d'être étudié spécifiquement.

Après avoir construit une vue d'ensemble du champ de la contamination des eaux usées avant et après station d'épuration et station de potabilisation, mais aussi dans l'EDCH, nous sommes rendus compte que les résidus de médicaments font partie intégrante de la pollution des eaux. Après recherche dans différents rapports d'agence de l'eau, de l'académie de pharmacie (etc.), il nous a semblé nécessaire d'évaluer les risques pour la santé humaine de l'exposition à faibles doses de cette pollution particulière. Le panel de molécules étant beaucoup trop important pour une évaluation du risque molécule par molécule, et les effets cocktails étant très mal documentés, nous avons décidé de hiérarchiser les résidus de médicaments afin de nous focaliser sur celles qui ressortent comme prioritaires. Le choix de travailler sur les anticancéreux a été motivé d'une part par le peu de documentation sur le sujet, mais aussi par le besoin avoué de renseignements et d'analyse sur cette classe thérapeutique (académie de pharmacie, 2008).

4.3. Évaluation quantitative des risques

L'objectif de cette partie de notre thèse était de définir le niveau de risque lié à l'exposition à une eau contaminée avec de faibles doses d'anticancéreux, ou à l'exposition à un mélange potentiellement présent dans les eaux.

La lignée cellulaire HepG2 utilisée est issue d'un hépatocarcinome humain ; ces cellules ont conservé leurs capacités enzymatiques. Or les molécules anticancéreuses étudiées dans ce travail sont métabolisées par le foie. Ce dernier est donc l'un des premiers organes cibles en cas de toxicité des molécules. Les cellules utilisées sont adhérentes, ce qui rend leur utilisation plus facile pour les tests micronoyaux.

Le choix des molécules anticancéreuses testées s'est effectué suite à l'application d'une méthode originale de hiérarchisation. Cette méthodologie était basée sur la consommation d'un centre hospitalier et d'un centre spécialisé dans la lutte contre le cancer, mais aussi sur le calcul d'un score combinant persistance, bioaccumulation et toxicité. Nos résultats ont permis de mettre en évidence le potentiel « dangereux » du cyclophosphamide et de l'ifosfamide. Le choix de l'ajout du 5 fluoro-uracile s'est fait suite aux constatations des fortes quantités utilisées pour cette molécule.

Les concentrations choisies (0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 50 et 100µg/L) ont été sélectionnées car elles sont représentatives des concentrations retrouvées dans les eaux aux différentes étapes d'épuration et de potabilisation.

4.3.1. Test de viabilité cellulaire : test bleu de Trypan

Nous avons réalisé un test de viabilité cellulaire pour chacune des molécules anticancéreuses sélectionnées, ainsi que pour le mélange des trois molécules, avec des temps d'exposition de 24h et 72h.

La mortalité sur les cellules HepG2 est assez élevée ; cela peut s'expliquer par la méthodologie du test en lui-même. En effet, il impose une mise en suspension des cellules, or nous pensons que cette manipulation fragilise les cellules, d'une part par le passage dans la seringue pour individualisation qui induit la perte de la protection agissant au sein du groupe de cellules et des fibres de collagènes, et d'autre part par l'exposition à la trypsine/EDTA.

La mortalité cellulaire est généralement inférieure à 20%. Pour le cyclophosphamide et l'ifosfamide, l'exposition à 72h de toxique a moins d'impact sur la mortalité cellulaire que l'exposition à 24h. Dans le cas de 5 fluoro-uracile, l'exposition à 72h de toxique induit plus de mortalité. Une des explications serait le mode d'action des molécules, le cyclophosphamide et l'ifosfamide sont des molécules alkylantes au mode d'action similaire et rapide sur la réplication de l'ADN, celui-ci est très différent de celui du 5 fluoro-uracile qui en tant qu'antimétabolite à une action plus lente.

La réparation cellulaire doit également être plus importante pour un temps d'exposition de 72h, ce qui explique en partie un taux plus faible de mortalité, surtout si cette amélioration de la réparation est couplée au temps nécessaire à la réplication cellulaire.

Un test au MTT aurait pu être réalisé : lors de ce test, les cellules sont adhérentes à leur support et potentiellement moins fragiles mais le laboratoire ne dispose pas de l'équipement nécessaire à la lecture de ce test.

L'importance des manipulations mécaniques peut expliquer la variabilité des résultats entre les témoins positifs et les témoins négatifs. Finalement, nous pensons que dans notre étude, les tests de viabilité cellulaire sont plus qualitatifs que quantitatifs. Ils nous permettent d'objectiver une certaine toxicité sans toutefois nous permettre de la quantifier de manière précise. Ils augurent aussi de la qualité de notre entretien cellulaire.

4.3.2. Test de génotoxicité

Il existe différents tests de génotoxicité, nous en avons choisi deux que nous pensons complémentaires : le test des comètes et le test des micronoyaux. En effet, ils mettent en évidence des lésions différentes sur l'ADN. Le test des micronoyaux met en évidence des lésions chromosomiques fragmentaires ou complètes, alors que le test des comètes met en évidence des lésions de type cassure simple ou double brin, mais aussi des cassures sur les sites alcali-labiles (sites de réparation incomplète). Ainsi, ce test rend compte des mutations qui ne sont pas encore définitives, alors que le test des micronoyaux met en évidence un caractère carcinogène direct.

Concernant le test des comètes, nous ne retrouvons des différences statistiquement significatives de génotoxicité par rapport au témoin négatif (eau ultra pure) que pour le

cyclophosphamide à 72h d'exposition, l'ifosfamide à 24h d'exposition ainsi que pour le 5 fluoro-uracile aux deux temps d'exposition. La corrélation entre l'effet génotoxique et le gradient de concentrations en toxique est faible pour le cyclophosphamide et l'ifosfamide, et se révèle non significative pour le 5 fluoro-uracile. S'agissant du mélange des trois molécules anticancéreuses, aucune relation n'a pu être mise en évidence. Néanmoins, deux possibilités peuvent expliquer la faible corrélation :

- soit la relation entre la dose d'anticancéreux et la toxicité est effectivement très faible. Cela semble toutefois non cohérent avec les pratiques cliniques d'intensification des doses de chimiothérapie en cas d'échappement thérapeutique ;
- soit la corrélation ne suit pas un schéma linéaire, mais il existe des paliers de doses pour lesquels le taux de comètes augmente.

Afin d'affiner et de compléter les résultats de nos expérimentations, il semble nécessaire de répéter nos manipulations à grande échelle

4.3.3. Tests micronoyaux

En ce qui concerne le test des micronoyaux, nous ne retrouvons pas de différences statistiquement significatives entre les taux de micronoyaux pour les différentes concentrations de toxiques auxquelles sont exposées les cellules. L'indice de division cellulaire reste inférieur à 2 dans tous les cas, sauf pour une exposition à 50µg/L de cyclophosphamide pour laquelle le taux est de 2,02.

En effet, selon les tests, l'ifosfamide semble plus actif à faible dose qu'à forte, ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que la mortalité cellulaire est assez importante aux plus fortes doses d'ifosfamide. Cette mortalité cellulaire pourrait constituer un biais pour l'étude des chromosomes cellulaires.

Au regard des résultats de ce test, les molécules alkylantes (cyclophosphamide, ifosfamide) semblent plus toxiques que le 5FU (antimétabolite). Par contre, aucun effet synergique n'est retrouvé avec le mélange à equi-concentrations des trois molécules. Au contraire, la toxicité semble diminuée, pourtant en clinique, il est fréquent d'associer plusieurs molécules anticancéreuses afin d'activer un phénomène synergique et de gagner en efficacité en limitant les effets indésirables. D'ailleurs, les monochimiothérapies sont extrêmement rares dans les protocoles thérapeutiques.

Des tests complémentaires en laboratoire sembleraient donc nécessaires afin de pouvoir confirmer ou infirmer les résultats obtenus.

4.3.4. L'exposition

L'exposition aux molécules anticancéreuses avant la mise en place de réglementation était principalement professionnelle, lors de la préparation et l'administration en établissement de soins. Désormais, la mise en place quasi-systématique d'unités centralisées de préparation

permet de limiter l'exposition des professionnels. Le développement des formations et la prise de conscience du potentiel danger que représentent ces molécules permettent également une meilleure sensibilisation des professionnels. Ainsi ils sont plus vigilants à leur protection. La prise en compte de ces risques d'un point de vue professionnel permet également un meilleur suivi des personnels, et surtout des femmes enceintes ou allaitantes.

Avec le développement de l'administration des chimiothérapies à domicile, l'exposition aux anticancéreux est transposée dans un nouvel environnement. Une harmonisation des formations et des modalités de gestion communautaires de ces molécules particulières est nécessaire.

Le traitement des déchets issus de la préparation (flacons, gants, blouse, etc.) et de l'administration (seringue, flacons blouse, canule, etc.) est encadré en milieu hospitalier afin d'éviter tout accident, et donc toute exposition. Néanmoins, le respect des bonnes pratiques de tri des déchets à domicile est très inégal.

Les principales voies d'exposition sont l'inhalation lors de la préparation des molécules hors d'une unité centrale de production, ou lors de leur administration, par aérosolisation des solutions. Le contact cutané est également une potentielle voie d'exposition, mais le transfert transcutané n'est pas actuellement bien connu. En milieu professionnel, la voie d'ingestion est minoritaire puisqu'elle suppose une mise à la bouche des mains ou de gants souillés.

4.3.5. Le calcul du risque

Le calcul du risque a été envisagé de selon deux scénarios différents : pour une exposition professionnelle (ingestion, inhalation, contact) et pour une exposition via l'alimentation pour la population générale. Le trop grand nombre de facteurs d'incertitudes à prendre en compte nous a conduit vers l'impossibilité de calculer le risque pour le scénario professionnel. En effet, afin de pouvoir calculer le risque, il est nécessaire de quantifier l'exposition de ces professionnels. Si l'exposition par inhalation est relativement mesurable et nécessiterait une étude épidémiologique à part entière, il est plus difficile d'en faire autant pour l'ingestion d'eau potentiellement contaminée par les molécules anticancéreuses. Pour ce qui est de la voie cutanée, le passage trans-cutané et le potentiel de perméabilité de la peau à l'Ifosfamide n'est pas connu et il n'existe que peu de référentiel sur le sujet. Toutes les incertitudes et hypothèses à prendre en compte nous ont mené à conclure à l'impossibilité de mener à bien le calcul du risque basé sur le scénario de l'exposition professionnel.

Pour le scénario « population générale », nous avons utilisé les résultats obtenus lors de l'expérimentation en laboratoire. Ces tests nous mènent à sur-estimer le risque puisque lors des expérimentations le toxique, ici l'Ifosfamide, est introduit directement sur les cellules sans possible dégradation dans l'environnement et sans mécanisme de réparation appliqué dans un organisme entier. Dans l'environnement, l'Ifosfamide peut subir une métabolisation ou une dégradation en contact avec les micro-organismes aquatiques, lors d'étape d'ozonation ou d'exposition aux ultra-violets ce qui n'est pas le cas lors des expérimentations en laboratoires.

De la même façon, le produit pur seulement mis en solution dans de l'eau ultra pure est mis en contact direct avec les cellules. De cette façon, aucune interaction visant à augmenter ou diminuer le potentiel toxique de la molécule ne peut être mis en évidence et nous amènent probablement à observer un effet toxique surexprimé. Dans le même domaine d'incertitudes, l'Ifosfamide est mis en contact direct sur les cellules, cette expérimentation *in vitro* nous permet de remarquer les dommages directs sur l'ADN mais empêche la réparation de l'ADN que l'on peut observer dans un tissu ou un système entier. Lors des tests des comètes ou des micronoyaux, les cellules de foie sont également cultivées dans un milieu optimal, à température constante, avec les nutriments nécessaires au métabolisme cellulaire en excès et en constante présence d'un milieu stérile exempt de micro-organisme. Les conditions sont donc optimisées pour mettre en évidence des dommages sur l'ADN. Toutes les conditions réunies en laboratoire sont donc rassemblées pour sur-estimer les effets génotoxiques de l'Ifosfamide sur les cellules de foie et donc pour sur-estimer le risque sanitaire.

Le choix de la non validation de notre calcul de risque a été fait pour plusieurs raisons, la première étant la nature expérimentale de l'évaluation de la relation dose-réponse, la seconde dû au fait que nous cherchons à faire une EQRS sur des faibles doses, travail fait généralement par extrapolation. La dernière raison est le fait que cette EQRS se fasse sur des molécules médicamenteuses, molécules à visée thérapeutique pour lesquelles un risque pour la santé humaine n'est pas évident.

Ces résultats vont à l'encontre de ceux retrouvées dans le rapport de l'ANSES de mai 2013 qui conclue à un risque négligeable pour la santé des populations de la consommation d'eau destinée à la consommation humaine à faibles concentrations en résidus de médicaments. Ainsi, que les travaux de Kümmerer 2010 qui montrent un effet cancérigène pour les populations exposées à l'Ifosfamide probablement négligeable. Les VTR sans seuil de risque et donc le calcul de l'Excès de Risque Unitaire nous paraissent trop préliminaires pour conclure sur ce sujet.

De la même façon, nous avons étudié trois molécules anti-cancéreuses et un mélange de celles-ci, d'autres études doivent être menées afin d'analyser les effets des anticancéreux dans un cocktail d'autres molécules et notamment constitué des molécules identifiées prioritaires lors de la méthode de hiérarchisation. Des études vivo pourraient permettre d'améliorer les connaissances sur les mécanismes de réactions de ces molécules anticancéreuses en situation proche de la réalité mais aussi de quantifier de façon plus vraisemblable les effets de ces principes actifs.

5. Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était de mener une évaluation quantitative des risques pour la santé (EQRS) des populations qui consomment de l'eau potentiellement contaminée par des résidus de médicaments.

Nous avons choisi deux axes de travail principaux : d'abord la construction d'une méthode de choix éclairé des molécules pour lesquelles une EQRS est nécessaire (méthode de hiérarchisation), puis la réalisation d'une EQRS complète pour trois molécules anti-cancéreuses identifiées comme prioritaires après déroulement de notre méthodologie de hiérarchisation.

Ainsi, dans un premier temps, notre travail a permis de construire une méthode originale de hiérarchisation des molécules selon le risque qu'elles peuvent présenter pour la santé humaine. Cette étape préliminaire à l'EQRS s'est révélée nécessaire au regard du grand nombre de résidus de médicaments présents dans les compartiments hydriques de l'environnement : cette diversité importante rend impossible le déroulement de la méthode d'EQRS pour chaque molécule successivement ; il s'est donc avéré indispensable de faire un choix pertinent des molécules pour lesquelles une EQRS devait être réalisée en priorité. Plusieurs méthodes de hiérarchisation existent déjà (EMEA, QSAR et PBT par exemple), mais chacune de ces méthodes est limitée par la disponibilité des données nécessaires au calcul du score de hiérarchisation. Nous avons proposé une méthode « hybride » permettant d'intégrer plusieurs types de données décrivant le potentiel de persistance, de bioaccumulation et de toxicité de chaque molécule. Cette évaluation de chaque facteur de toxicité au moyen de plusieurs indicateurs permet de classer par une même méthode un nombre plus important de molécules. Appliquée aux spécialités pharmaceutiques consommées dans un centre hospitalier lorrain, notre méthode de hiérarchisation nous a permis d'identifier 12 molécules prioritaires parmi les 606 principes actifs initialement utilisés.

Dans un second temps, nous avons focalisé notre EQRS sur trois molécules anti-cancéreuses très utilisées en thérapeutique, mais pour lesquelles peu de données sont publiées. Nous avons en effet identifié un manque de données relatives à cette classe thérapeutique dans le domaine de l'évaluation du risque sanitaire. Pour conduire notre EQRS, nous avons été amenés à analyser la relation dose-réponse pour ces trois molécules, ainsi que pour un mélange équiconcentration. Il semblerait découler de notre première analyse que le risque sanitaire lié à la présence environnementale de traces de cytostatiques soit sans danger pour la santé humaine. Néanmoins, cette évaluation est à relativiser du fait du caractère primaire de nos données. De la même manière, nos expériences n'ont pas permis de mettre en évidence d'« effet cocktail » des trois anti-cancéreux.

Au cours des différentes phases de notre travail, nous avons été conduits à envisager la pollution de l'eau par les résidus de médicaments de différentes manières, et donc à nous ouvrir aux perspectives suivantes.

Tout d'abord, alors que certains auteurs s'appliquent à évaluer le risque lié à la contamination

des eaux usées rejetées par les établissements de santé, nous avons quant à nous observé que la pollution médicamenteuse d'origine hospitalière n'était pas la principale source de pollution. Il semble donc nécessaire de mener des études plus approfondies afin d'identifier la nature de la pollution urbaine et de la quantifier. Les facteurs de variabilité de cette pollution peuvent également être analysés, afin de pouvoir modéliser la contamination chimique hydrique au lieu d'être dépendant de mesures régionales voire locales.

Nous avons également pu observer que les stations d'épuration (STEP) avaient un rendement d'élimination des composés pharmaceutiques moins important que les stations de potabilisation. Cette constatation peut ouvrir la porte à une évolution des STEP, en y ajoutant des étapes d'inactivation des médicaments. A moins que les autorités françaises ne décident de s'orienter vers l'obligation pour chaque établissement de soins, de traiter ses effluents de manière appropriée avant déversement dans les eaux usées.

Dans un second temps, nous avons envisagé un débouché à notre méthode de hiérarchisation. Elle pourrait par exemple servir à la définition d'indicateurs de la pollution médicamenteuse des eaux, sous réserve d'une étape de validation avec un jeu de données provenant d'un autre centre hospitalier de plus grande ampleur, ou provenant de tests réalisés sur les eaux usées d'une grande ville.

En dernier lieu, notre évaluation quantitative des risques sanitaires tend à montrer un risque significatif lié à la consommation d'eau très faiblement contaminée par des molécules cytostatiques. Afin d'affiner ce résultat, il est nécessaire de mener des études complémentaires pour déterminer de façon plus évidente leur impact sur l'organisme humain, au moyen d'études épidémiologiques par exemple. De la même manière, nos tests de toxicité n'ont pas mis en évidence d'effet cocktail pour les trois molécules testées, mais des effets de synergie pourraient être notés avec un cocktail d'autres anti-cancéreux, voire avec d'autres résidus de médicaments.

Ainsi, si notre travail a permis d'améliorer les connaissances relatives au risque lié à la consommation d'eau polluée par des résidus de médicaments, il reste de nombreuses pistes de réflexion et de recherche à explorer, et pas moins d'applications pratiques à développer dans ce domaine.

Références bibliographiques

Académie nationale de pharmacie, septembre 2008. Médicaments et environnement. Rapport.

AFSSA, déc. 2008. Hiérarchisation des résidus de médicaments d'intérêt pour l'analyse des ressources et des eaux traitées.

AFSSAPS, 2010. Vente de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France : chiffres clés. Rapport d'expertise, septembre 2011.

AFSSET, 2008 Problématique de la prise en compte systématique des ajustements temporels dans la construction des valeurs toxicologiques de référence (VTR). Mémoire d'E. Belkebir. Master « Médicaments et autres produits de santé ». 2008

AFSSET, 2010. Valeurs Toxicologiques de Références (VTR). Méthodologie de construction de valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances chimiques cancérigènes.

Agüera A., M. Mezcua, F. Mocholi, A. Vargas-Berenguel, AR. Fernandez-Alba., 2006. Application of gas chromatography-hybrid chemical ionization mass spectrometry to the analysis of diclofenac in wastewater samples. *J. Chromatogr. A*, 1133, 287-292

Aherne GW., Hardcastle A., Nield AH., 1990. Cytotoxic drugs and the aquatic environment: estimation of bleomycin in river and water samples. *J Pharm Pharmacol* 42: 741-742.

Allen Y., Scott AP., Matthiessen P., Haworth S., Thain JE., Feist., 1999. Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder (*Platichthys flesus*). *Environ Toxicol Chem*, 18, 1791-1800.

Andreozzi R., M. Raffaele, P. Nicklas., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50, 1319-1330

Annexes du Règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH)

ANSES, mai 2013. Evaluation des risques sanitaires liés à la présence de résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine : méthode générale et application à la carbamazépine et à la danofloxacin.

ANSES, février 2011. Campagne nationale d'analyse des résidus de médicaments dans l'eau: des résultats conformes aux attentes. Communiqué de presse.

Article L5111-1 du Code de Santé Publique

Barbaud A., Vigan M., Delrous H., Assier et al. 2005. Allergie de contact aux antiseptiques : 75 cas analysés par le réseau Revidal de dermato-vigilance. *Annales de Dermatologie et de*

Vénérologie. Volume 132, Issue 12, Part 1, pages 962-965.

Beausse J., 2004. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends Anal. Chem.*, 23, 753-761

Bendz D., NA. Paxéus, TR. Ginn, FJ. Loge., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden, 2005. *J Hazard Mater*, **122**, 195-204

Besse JP., Garric J., 2007. Médicaments à usage humain : risqué d'exposition et effets sur les milieu récepteurs. Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à surveiller dans les eaux de surface continentales. Agence de l'eau R.M.C. : 241 pages.

Besse JP., Garric J., 2008. Human pharmaceuticals in surface waters implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicology Letters* 176, pp 104-123.

Besse JP., Kausch-Barreto C., Garric J., 2008. Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment : Application to the French situation and preliminary prioritization. *Human and Ecological Risk Assessment* 14(4): 665-695.

Boillot C, Bazin C, Tissot-Guerraz F, Droguet J, Perraud M, Cêtre JC, Trepo D, Perrodin Y. 2008. Daily physico-chemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. *Sci Tot Environ*; 403: 113-129.

Bonvallet N, Dor F, Valeurs toxicologiques de référence : méthodes d'élaboration, InVS, janvier 2002. 84p. ISBN 2-11-092757-7.

Bound JP. et N. Voulvoulis, 2005. Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environ Health Perspect*, **113**, 1705-1711

Bourgeois M., 1989. Choc anaphylactique severe, après infiltration de cortivazol : allergie à la carboxyméthylcellulose. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* vol. 29, n°3, pages 143-144.

Boyd GR., DA. Grimm., 2001. Occurrence of pharmaceutical contaminants and screening of treatment alternatives for southeastern Louisiana. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 2001, 948, 80-89

Boyd GR., Palmeri, JM., Zhang S, Grimm DA., 2005. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. *Sci. Total Environ.*, 2004, 333, 137-148

Burkhardt MR., RC. ReVello, SG. Smith, SD. Zaugg. 2005. Pressurized liquid extraction using water/isopropanol coupled with solid-phase extraction cleanup for industrial and anthropogenic waste-indicator compounds in sediment. *Anal. Chim. Acta.*, 534, 89-100

Carballa M., F. Omil, JM. Lema, M. Lompart, C. Garcia-Jares, I. Rodriguez, M. Gomez, T. Ternes. 2004. Behaviour of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res*, **38**, 2918-2926

Carlsson C., Johansson G., Alvan et al. 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci Tot Environ* 364:67-87.

Carsten von der Ohe P., Dulio V., Slobodnik J., De Deckere E., Kühne R., Ebert R., Ginebreda A., De Comman W., Schüürmann G., Brack W., 2011. A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. *Science of the total environment* 409, pp 2064-2077.

Catastini C., Mullot JU., Boukari S., Mazellier P., Levi Y., Cervantes P., Ormsby JN., 2008 Assessment of antineoplastic drugs in effluents of two hospitals. *Eur J Water Qual* ; 39(2) :171-180.

Cclin Sud-ouest, 2002. Recommandations pour la manipulation des produits cytotoxiques dans les établissements de santé

Cêtre C, Labadie JC., 1999. Bilan et recommandations sur les conditions de rejets des effluents liquides des établissements de santé. *Techniques hospitalières*; 634: 58-61.

Christensen FM., 1998. Pharmaceuticals in the environment. A human risk? *Regul Toxicol Pharmacol*, 28, 212-221.

Coetsier C. 2009. Approche intégrée de la gestion environnementale des produits pharmaceutiques dans les rejets de stations d'épuration urbaines et leur milieu récepteur: occurrence, impact et traitements tertiaires d'élimination. Thèse de doctorat. Montpellier

Convention de Genève, 2009.

Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants, 2001. <http://chm.pops.int/default.aspx>

Cooper E. R., Siewicki T.C., Phillips K., 2008. Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Science of the total environment*. 398, pp 26-33.

Cunningham V. L., Binks S. P., Olson M.J. 2009. Human health risk assessment from the presence of human pharmaceuticals in the aquatic environment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 53, pp 39-45.

Crane M., Watss C., Boucard., 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci Tot Environ* 367(1):23-41.

Cyclamed. Forte croissance de la collecte des Médicaments Non Utilisés en 2011. Dossier de

presse 2011.

Daughton CG., 2004. Groundwater Recharge and Chemical Contaminants: Challenges in Communicating the Connections and Collisions of Two Disparate Worlds. *Ground Water Monitoring and Remediation*, 24, 127-138

Diaz-Cruz MS., MJ. Lopez de Alda, D. Barcelo., 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends Anal. Chem.*, 22, 340-350

Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.

EMA, 2006. European Medicine Agency Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use. EMA/CHMP/SWP/4447/00.

European Commission, 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment Part II.

European Commission. April 2003. The future of risk assessment in the European union. The second report of the harmonization of risk assessment procedures.

FDA, 1998. Guidance for Industry-Environmental Assessment of Human Drugs and Biologic Applications. FDA, CDER/CBER, CMC 6, rev.1.

Fent K., AA. Weston, D. Caminada., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol*, 76,122-159

Giumiani F., koller T., Wurgler FE., Maria R., 1996. Detection of genotoxic activity in native hospital waste water by the umuC test. *Mutation Research* 1996; 368: 49-57.

Grenelle de l'environnement. Les engagements numérotés du Grenelle. Document récapitulatif de la table ronde du 24 au 26 octobre 2007.

Heberer T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.*, 131, 5-17

Hignite C. et DL. Azarnoff., 1977. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci.*, 20, 337-341

Hilton MJ., Thomas KV., Ashton D., 2003. Targeted monitoring programme for pharmaceuticals in the aquatic environment. R&D Technical report P6-012/06/TR UK Environment Agency

Huschek G., Hanse PD., Mauer HH., Kregel D., Kayser A., 2004. Environmental risk

assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations. *Environmental Toxicology* 19:226-240.

Institut CSA. Collecte des Médicaments Non Utilisés des foyers. Enquête 2012.

Jones OAH., Voulvoulis N., Lester JN., 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water research* 36 (20):5013-5022.

Jux U., RM. Baginski, HG. Arnold, M. Kronke, PN. Seng.2002. Detection of pharmaceutical contaminations of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, 205, 393-398

Kim SD., Cho J., Kim IS., Vanderford BJ., Snyder SM. 2007. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking and waste waters. *Water Research* 41(5), 1013-1021.

Kreuzinger N., M. Clara, B. Strenn, B. Vogel., 2004. Investigation on the behaviour of selected pharmaceuticals in the groundwater after infiltration of treated wastewater. *Water Sci. Technol.*, 50, 221-228

Kümmerer K., T. Steger-Hartmann, M. Meyer., 1997. Biodegradability of the antitumor agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and sewage. *Water Res*, 31, 2705-2710

Kümmerer K., Al-Ahmad A., 2010. Estimation of the cancer risk to humans resulting from the presence of cyclophosphamide and ifosfamide in surface water. *Envir. Sci. Poll. Res Int.* 17(2)-486-496.

Länge R., Dietrich D., 2002. Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances – conceptual considerations. *Toxicol Letters* 131 (1-2):97-104.

Langford KH, Thomas KV., 2009. Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environment International*; 35: 766-770.

LEEM. Les entreprises du médicament en France: Éléments chiffrés. Edition 2011.

Lindberg RH, P. Wennberg, MI. Johansson, M. Tysklind, BA. Andersson., 2005. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environ. Sci. Technol*, 39, 3421-3429

Löffler D., J. Rombke, M. Meller, TA. Ternes., 2005 Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 5209-5218

Metcalf CD., XS. Miao, BG. Koenig, J. Struger., 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada.

Environ. Toxicol. Chem., 22, 2881-2889

Miao X.S., BG. Koenig, CD. Metcalfe., 2002. Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 952, 139-147

Molander L., Agerstrand M., Ruden C., 2009. WikiPharma – A freely available, easily accessible, interactive and comprehensive database for environmental effect data for pharmaceuticals. Regulatory Toxicology and Pharmacology 55, pp 367-371.

Montague P., 1998. Drugs in the water. Rachel's. Environment1Health Weekly # 614. Disponible à <http://www.monitor.net/rachel/614.html>, 05/04/2001.

Mulot JU. 2009. Modélisation des flux de médicaments dans les effluents hospitaliers. Thèse de doctorat. Paris Sud

OCDE. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Section 3 Dégradation et accumulation

Ollers S., HP. Singer, P. Fassler, SR. Muller., 2001. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. J. Chromatogr. A, 911, 225-234

OMS 2011 Guidelines for drinking-water quality, 4rd edition. Organisation mondiale de la santé Genève.

Ort C, Lawrence MG, Reungoat J, Eaglesham G, Carter S, Keller J., 2010. Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital. Wat Res 44: 605-615.

Petrovic M., S. Gonzalez, D. Barcelo., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. Trends Anal. Chem., 22, 685-696

PNRM 2011. Plan national sur les résidus de médicaments dans les eaux. Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement. Ministère de la Santé.

PNSE 2004. Plan National Santé Environnement. Ministère de la Santé et de la Protection sociale. Ministère de l'Ecologie et du Développement durable. Ministère de l'Emploi, du Travail et de la Cohésion sociale. Ministère délégué à la Recherche.

PNSE 2009. Plan National Santé Environnement 2. Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de la Mer. Ministère de la Santé et des Sports. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Ministère du Travail, des Relations Sociales, de la Famille, de la Solidarité et de la Ville.

Roberts PH., KV. Thomas., 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. Sci. Total Environ., 356, 143-153

Sacher F., FT. Lange, HJ. Brauch, I. Blankenhorn., 2001. Pharmaceuticals in groundwaters analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany. *J. Chromatogr. A*, 938, 199-210

Sessink PJ, 1994. Environmental contamination and assessment of exposure to antineoplastic agents by determination of cyclophosphamide in urine of exposed pharmacy technicians: in skin absorption an important exposure route? *Arch Environ Health*, 49(3), 165-9.

Stackelberg PE., ET. Furlong, MT. Meyer, SD. Zaugg, AK. Henderson, DB. Reissman., 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Sci. Total Environ.*, 329, 99-113

Steger-Hartmann T., K. Kümmerer, J. Schecker., 1996. Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two-step solid phase extraction and GC/MS. *J Chromatogr A*, **726**, 179-184

Stuer-Lauridsen F., Birkved M., Hansen LP., Holten-Lützhof B., Halling-Sorensen, 2000. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere* 40, 783-793.

Stumpf M., TA. Ternes, R-D. Wilken, R. Silvana Vianna, W. Baumann. 1999. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci Total Environ.*, **225**, 135-141

Swedish Medical Product Agency (MPA)., 2004. Environmental effect of pharmaceuticals and cosmetic and hygiene products (Miljöpåverkan från läkemedel samt kosmetiska och hygieniska produkter). Report.

Thomas KV., C. Dye, M. Schlabach, KH. Langford., 2007. Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works. *J. Environ. Monit.* 9, 1410-1418

Thomas KV., MJ. Hilton., 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 436-444

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221.

Vieno NM., 2006. Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *Journal Of Chromatography B, Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, Volume: 1134 Issue: 1-2 p. 101-111

Webb S., T. Ternes, M. Gibert, K. Olejniczak., 2003. Indirect human exposure to

pharmaceuticals via drinking water. *Toxicol Lett*, **142**, 157-167

Weigel S., U. Berger, E. Jensen, R. Kallenborn, H. Thoresen, H. Huhnerfuss., 2004. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere.*, 56, 583-592

Wiegel S., A. Aulinger, R. Brockmeyer, H. Harms, J. Löffler, H. Reincke, et al., 2004. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere*, 57, 107-126

Yin J, Shao B, Zhang J, Li K., 2010. A preliminary study on the occurrence of cytostatic drugs in hospital effluents in Beijing, China. *Bull of Environ Contam and Tox*; 84: 39-45.

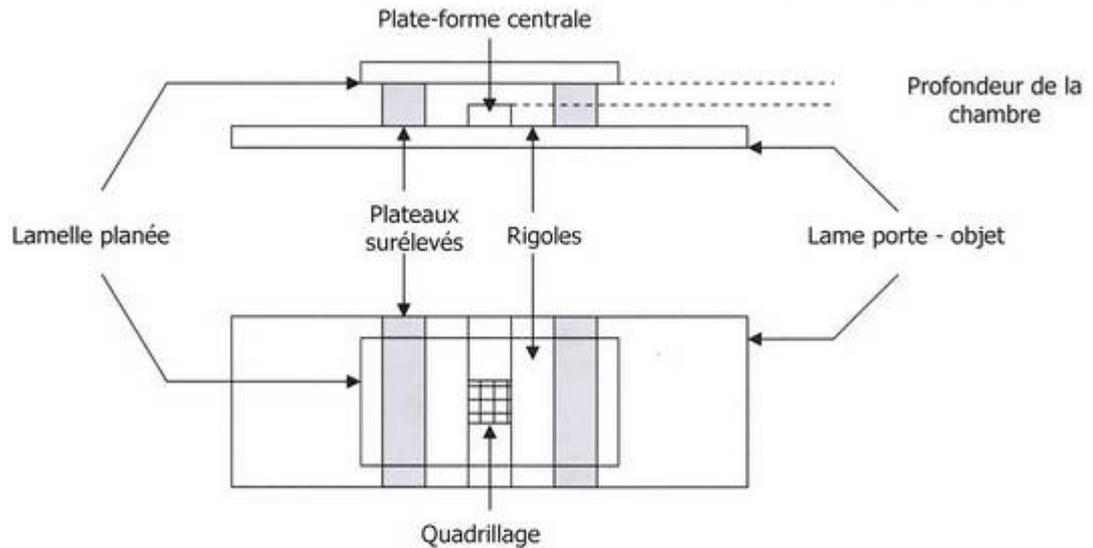
Zuccato E., Calamari D., Natangelo M., Fanelli R., 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 20;355(9217):1789-90.

Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli R., 2005. Identification of pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 122 (3):205-209.

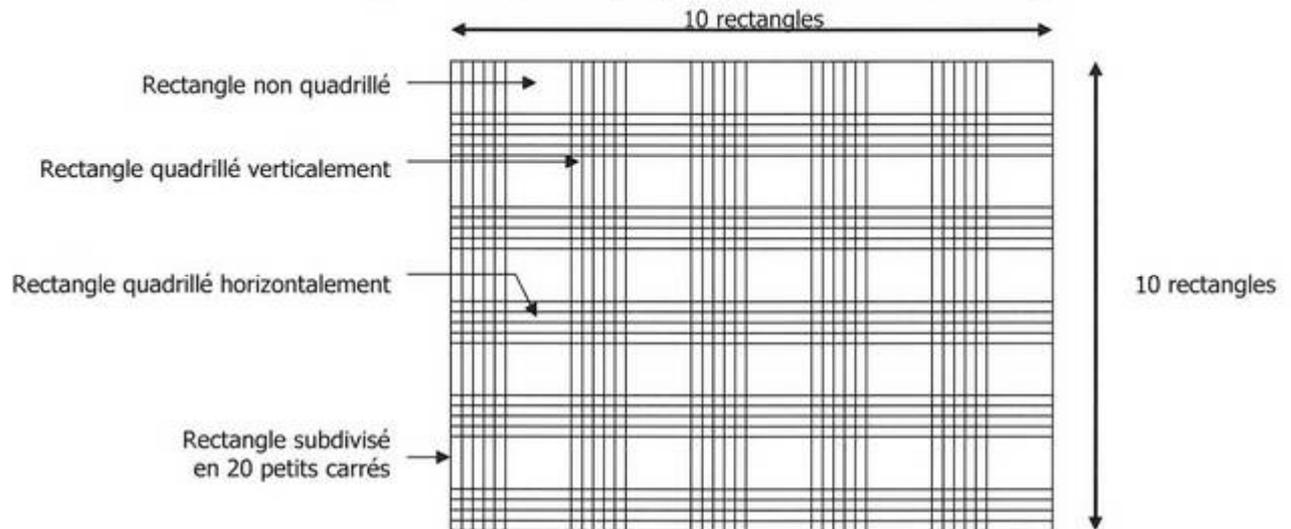
ANNEXES

ANNEXE 1

Utilisation de la cellule de Malassez



La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles :



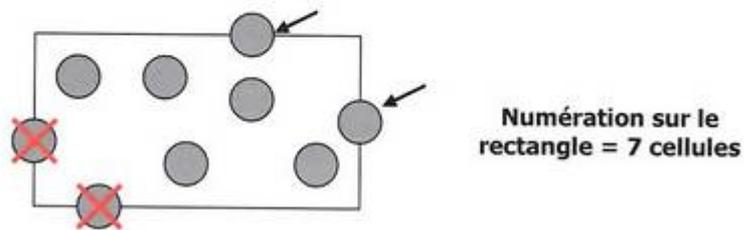
Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

→ Le volume correspondant au quadrillage total est égal à $1 \text{ mm}^3 = 10^{-6} \text{ dm}^3$

→ Chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-8} \text{ dm}^3$

L'utilisation de la cellule de Malassez se résume ainsi :

- Nous humidifions les deux plateaux latéraux. Nous faisons adhérer une lamelle qui va adhérer aux plateaux latéraux par frottement.
- Nous plaçons la cellule sur une surface plane. La cavité de comptage est remplie par capillarité avec la suspension cellulaire préalablement homogénéisée.
- Nous observons à l'objectif **x10** pour repérer la position du quadrillage et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules. Si la concentration cellulaire est trop importante, nous recommençons la manipulation après dilution de la suspension.
- Nous observons ensuite à l'objectif **x40** pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).
- Nous comptons les cellules contenues dans les 25 rectangles contenant le petit quadrillage. Pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, nous comptons uniquement celle qui chevauchent à en haut et à droite comme illustré sur la figure ci-dessous.



Nous pouvons maintenant calculer la concentration cellulaire de la suspension de cellules.

- Soient :
- n : nombre de cellules comptées sur la cellule.
 - V : volume de comptage.
 - f : facteur de dilution.
 - N : nombre de cellules par litres de suspension.

$$N \times V = n \quad \longrightarrow \quad \boxed{N = n / V}$$

Si la solution avait été diluée : $N = (n / V) \times f$

ANNEXE 2

Résultat des tests au bleu de Trypan Ifosfamide

concentrations	pourcentage moyen de mortalité (écart-type)	
	24h	72h
Blanc (témoin négatif)	11,43 (1,14)	5,41 (0,54)
0,01µg/L	16,11 (1,16)	9,39 (0,94)
0,1µg/L	10,51 (1,15)	6,25 (0,75)
1µg/L	12,76 (2,04)	14,53 (1,45)
10µg/L	8,82 (1,06)	7,66 (1,07)
50µg/L	17,08 (1,71)	9,52 (0,93)
100µg/L	11,1 (1,55)	10,95 (1,53)
B[a]p (témoin positif)	12,91 (1,29)	13,19 (1,36)

Cyclophosphamide

concentrations	pourcentage moyen de mortalité (écart-type)	
	24h	72h
blanc	5,11 (0,51)	6,25 (6,5)
0,01µg/L	18,27 (2,56)	8,68 (1,04)
0,1µg/L	17,41 (2,09)	14,62 (1,42)
1µg/L	23,53 (1,95)	12,89 (2,06)
10µg/L	19,54 (2,35)	14,83 (1,78)
50µg/L	21,41 (2,41)	12,15 (1,19)
100µg/L	8,45 (1,01)	14,24 (1,99)
B[a]p	16,38 (1,71)	15,56 (2,18)

5 Fluoro-uracile

concentrations	pourcentage moyen de mortalité (écart-type)	
	24h	72h
blanc	8,12 (0,83)	6,65 (0,69)
0,01µg/L	8,59 (1,37)	10,84 (1,51)
0,1µg/L	7,09 (0,85)	9,3 (1,48)
1µg/L	10,6 (0,99)	7,01 (0,77)
10µg/L	5,41 (0,75)	10,03 (1,80)
50µg/L	8,85 (1,15)	8,23 (0,98)
100µg/L	6,58 (1,05)	8,26 (0,81)
B[a]p	7,41 (0,74)	5,06 (0,81)

Mélange 3 anti-cancéreux

concentrations	pourcentage moyen de mortalité (écart-type)	
	24h	72h
blanc	7,36 (0,88)	12,5 (2,75)
0,01µg/L	8,02 (1,44)	7,2 (1,15)
0,1µg/L	10,61 (1,04)	5,76 (0,69)
1µg/L	11,76 (1,41)	7,2 (0,58)
10µg/L	8,22 (1,15)	6,88 (1,10)
50µg/L	9,19 (0,94)	6,51 (1,56)
100µg/L	6,25 (0,75)	5,92 (0,95)
B[a]p	13,95 (3,35)	13,33 (2,66)

ANNEXE 3

Résultats complémentaires test comète (moyenne et écart-type pourcentage ADN dans la queue)

temps d'exposition	Cyclophosphamide				Ifosfamide				5 Fluoro-uracile				Mélange			
	24h		72h		24h		72h		24h		72h		24h		72h	
concentrations	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
B[a]P	38,27	34,36	35,24	33,99	46,65	3,98	37,85	30,58	37,59	35,12	32,66	34,50	38,52	34,35	38,03	33,88
100µg/L	22,12	14,39	21,90	14,85	20,69	14,68	22,65	14,69	23,02	14,76	7,73	15,04	7,51	14,86	6,23	6,6
50µg/L	7,10	7,06	7,08	7,08	16,33	13,82	16,83	13,85	24,12	15,42	15,98	13,21	7,26	7,05	17,11	13,99
10µg/L	7,11	8,62	17,24	11,69	17,18	11,68	2,07	3,43	16,99	11,88	2,07	3,18	7,09	8,87	2,07	3,34
1µg/L	8,78	15,92	17,38	13,76	17,13	13,48	9,10	15,72	16,52	12,31	20,90	13,63	5,39	7,48	4,61	5,93
0,1µg/L	7,59	13,62	7,88	7,5	12,13	13,24	7,99	13,58	10,96	7,88	7,36	13,74	3,05	3,5	3,72	5,32
0,01µg/L	4,50	5,81	7,56	6,78	5,34	6,42	8,28	7,58	7,92	11,27	10,36	16,03	5,48	6,33	5,34	6,02
Blanc	8,31	7,97	7,87	9,1	11,47	10,88	11,31	10,56	9,97	10,13	8,12	9,3	7,08	8,88	8,93	9,88

Résumé

La pollution médicamenteuse est effective dans les compartiments hydriques de l'environnement. Les stations d'épuration et de potabilisation ne réussissent pas à éliminer la totalité des molécules présentes dans les eaux usées, et leur rendement d'épuration est variable en fonction des familles thérapeutiques. De ce fait, des résidus médicamenteux sont retrouvés dans les eaux destinées à la consommation humaine. C'est pourquoi l'objectif de notre travail était d'évaluer les risques pour la santé des populations qui consomment une eau potentiellement chargée en résidus médicamenteux.

Dans un premier temps, nous avons donc identifié la nature de la contamination pharmaceutique des eaux usées et des eaux destinées à la consommation humaine. Le nombre important de spécialités pharmaceutiques présentes rend impossible une analyse successive du risque pour chaque molécule, nous avons construit une méthode de hiérarchisation destinée à identifier rapidement les principes actifs présentant un risque plus important, afin de dérouler prioritairement la méthode complète d'EQRS pour ces produits pharmaceutiques. Cette partie de notre travail a permis d'une part d'identifier les critères à prendre en compte pour une optimisation de la hiérarchisation. Puis, nous avons pu sélectionner 12 molécules pour lesquelles une EQRS pourrait être mise en place.

Nous avons décidé de nous focaliser sur l'évaluation quantitative du risque lié à la consommation d'eau polluée par des traces de trois molécules cytostatiques identifiées comme prioritaires lors du déroulé de notre méthodologie de hiérarchisation : l'ifosfamide, le cyclophosphamide et le 5FU ainsi que pour un mélange équi-concentration de ces trois médicaments. Des tests de toxicité (bleu Trypan, comètes, micronoyaux) nous ont aidés à analyser la relation dose-réponse pour ces molécules. Ainsi, nous avons pu identifier le potentiel dangereux de ces substances, évaluer leur relation dose-réponse, puis analyser l'exposition professionnelle et environnementale des populations, pour enfin calculer le risque. Les conclusions de notre EQRS sont à relativiser en raison du caractère préliminaire de nos données.

Abstract

The drug pollution is effective on environmental water compartments. Sewage treatment plants and water purification fail to remove all the molecules present in wastewater and their removal rate varies according to therapeutic classes. Therefore, pharmaceuticals residues are found in human consumption water. The aim of our study is to build a risk assessment to the health of the population who consume water which contain pharmaceuticals residues.

As a first time, we identified the nature of the pharmaceutical wastewater contamination and human consumption water. The large number of medicinal products makes it impossible risk assessment for each molecule, we built a hierarchical method for quickly identification of active substance having a higher risk to make a complete sanitary risk assessment for these pharmaceuticals. This part of our work, allowed us to, in first step, identify the criteria to be taken into account for optimizing hierarchy. Then, we could select 12 molecules for which sanitary risk assessment could be implemented.

We decided to focus on the quantitative risk assessment of the consumption of polluted water with traces of three cytostatic molecules identified as priorities with our ranking methodology: ifosfamide, cyclophosphamide and 5-FU and a mixture of these three drugs with same concentrations. Toxicity test (Trypan blue, comets assay, micronuclei test) helped us to analyze the dose-response relationship for these molecules. Thus, we could identify the hazardous potential of these substances, assess the dose-response relationship, and analyze occupational and environmental exposure of population to finally calculate the risk. Our sanitary quantitative risk assessment conclusions must be considered with caution given the nature of preliminary data.