

40696

E340-POU-I

**ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES**

**SERVICE DE PHARMACIE & TOXICOLOGIE**

**SERVICE D'AQUACULTURE & PATHOLOGIE AQUACOLE**

---

**RAPPORT DE CONTRAT IFREMER/ENVNANTES**

**AVRIL 1993**

**INFLUENCE DES REJETS  
D'ANTIBIOTIQUES PISCICOLES  
SUR L'ENVIRONNEMENT CONCHYLICOLE**

**PREMIERE PARTIE**

**MISE AU POINT ET VALIDATION  
D'UNE METHODE DE DOSAGE DE L'ACIDE OXOLINIQUE  
DANS L'EAU DE MER, LE SEDIMENT,  
L'HUÎTRE CREUSE (*CRASSOSTREA GIGAS*)  
ET LA PALOURDE (*RUDITAPES PHILIPPINARUM*)**

**Hervé POULIQUEN**

40  
-I

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL10743

**ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES**

**SERVICE DE PHARMACIE & TOXICOLOGIE  
SERVICE D'AQUACULTURE & PATHOLOGIE AQUACOLE**

---

**RAPPORT DE CONTRAT IFREMER/ENVNANTES**

**AVRIL 1993**

**INFLUENCE DES REJETS  
D'ANTIBIOTIQUES PISCICOLES  
SUR L'ENVIRONNEMENT CONCHYLICOLE**

**PREMIERE PARTIE**

**MISE AU POINT ET VALIDATION  
D'UNE METHODE DE DOSAGE DE L'ACIDE OXOLINIQUE  
DANS L'EAU DE MER, LE SEDIMENT,  
L'HUÎTRE CREUSE (*CRASSOSTREA GIGAS*)  
ET LA PALOURDE (*RUDITAPES PHILIPPINARUM*)**

**Hervé POULIQUEN**

# **AVANT-PROPOS**

**La première partie de ce projet de recherche s'inscrit dans le programme d'études conduit dans le cadre du contrat établi entre l'IFREMER et l'ENVNantes sous la responsabilité de M. Hervé LE BRIS, Maître de Conférences associé et responsable du Service d'Aquaculture & Pathologie Aquacole.**

**Les travaux ici rapportés ont été réalisés du mois d'octobre 1992 au mois de mars 1993 sous la direction de M. Hervé POULIQUEN, AERC attaché au service de Pharmacie & Toxicologie (Professeur Louis PINAULT), avec la contribution des personnels de ce service et notamment de Mlles Michaëlle LARHANTEC et ChristelleMORICEAU, aides-techniques de laboratoire.**

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	5
<b>1 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	6
<b>1 - 1 L'ACIDE OXOLINIQUE</b>	6
1 - 1 - 1 STRUCTURE	6
1 - 1 - 2 PROPRIETES PHYSIQUES	6
1 - 1 - 3 PROPRIETES CHIMIQUES	6
<i>1 - 1 - 3 - 1 CARACTERE ACIDE</i>	6
<i>1 - 1 - 3 - 2 PROPRIETES CHELATRICES</i>	7
1 - 1 - 4 ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	7
1 - 1 - 5 PHARMACOCINETIQUE (CHEZ LE POISSON)	9
1 - 1 - 6 TOXICITE (CHEZ LE POISSON)	9
<b>1 - 2 METHODES D'ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE</b>	9
<b>2 - DESCRIPTION DES PROTOCOLES D'ANALYSES</b>	11
<b>2 - 1 MATERIEL ET METHODES</b>	11
2 - 1 - 1 REACTIFS	11
2 - 1 - 2 APPAREILLAGE CHROMATOGRAPHIQUE	12
2 - 1 - 3 CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES	12
2 - 1 - 4 PREPARATION DES ECHANTILLONS	13
<i>2 - 1 - 4 - 1 EAU DE MER</i>	13
<i>2 - 1 - 4 - 2 SEDIMENT</i>	13
<i>2 - 1 - 4 - 3 HUITRE CREUSE ET PALOURDE</i>	13
2 - 1 - 5 PREPARATION DES SOLUTIONS MERE ET FILLES	16
<b>2 - 2 RESULTATS</b>	16

<b>3 - VALIDATION DES METHODES DE DOSAGE</b>	<b>17</b>
3 - 1 SPECIFICITE	17
3 - 2 LINEARITE	18
3 - 3 FIDELITE	21
3 - 3 - 1 REPETABILITE	21
3 - 3 - 2 REPRODUCTIBILITE	21
3 - 4 SENSIBILITE	23
3 - 5 RENDEMENT D'EXTRACTION	24
3 - 6 STABILITE	24
3 - 7 PRATICABILITE	24
3 - 8 BILAN ET DISCUSSION	27
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>28</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>29</b>
<b>ANNEXE : CHROMATOGRAMMES</b>	

# INTRODUCTION

Des piscicultures marines se sont développées sur le littoral Manche-Atlantique qui offre de nombreux sites abrités et faciles d'accès. Ces élevages piscicoles, le plus souvent situés à proximité de zones de tradition conchylicole, sont sources de rejets de substances organiques (aliments non consommés, fèces), minérales (produits azotés) et zoosanitaires (médicaments) (Gowen et Bradbury, 1987).

Ce n'est que depuis environ cinq ans que des équipes de recherche, pour la plupart scandinaves, se sont plus particulièrement intéressées aux substances chimiques, notamment aux antibiotiques, rejetées dans le milieu des piscicultures marines en cage (Samuelsen, 1989 ; Bjorklund *et al.*, 1990 ; Lunestad et Goksoyr, 1990; Bjorklund *et al.*, 1991). Ces études montrent la persistance de certains antibiotiques, tels que l'oxytétracycline, dans le sédiment et la contamination de la faune sauvage (invertébrés et poissons) située à proximité des élevages. Nous nous sommes, pour notre part, intéressés aux rejets des piscicultures de marais maritimes atlantiques, modèle de pisciculture différent de celui en cage. Une étude en conditions expérimentales a montré la persistance de l'oxytétracycline dans le sédiment et les mollusques placés sous un effluent piscicole contenant l'antibiotique (Pouliquen *et al.*<sup>2</sup>, 1992; Le Bris *et al.*, 1992).

Si, en France, l'oxytétracycline et les nitrofuranes sont actuellement les antibiotiques les plus utilisés en pisciculture marine, l'acide oxolinique est devenu l'antibiotique le plus utilisé en Norvège (Steffenak *et al.*, 1991; Samuelsen *et al.*, 1992). A cela, plusieurs raisons : meilleure biodisponibilité et distribution tissulaire que l'oxytétracycline chez le saumon atlantique (Bjorklund et Bylund, 1991) et moindre persistance que l'oxytétracycline dans les sédiments (Bjorklund *et al.*, 1991). Il est donc probable que l'acide oxolinique sera de plus en plus utilisé dans les piscicultures françaises dans les années à venir.

Le premier objectif de ce projet de recherche était de mettre au point puis de valider une méthode de dosage de l'acide oxolinique dans l'eau de mer, le sédiment, l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et la palourde (*Ruditapes philippinarum*) par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Jusqu'ici, les techniques CLHP ont été principalement utilisées pour doser l'acide oxolinique dans le plasma et les tissus de poissons, mais rarement pour le doser dans l'eau de mer, le sédiment et les mollusques bivalves. Notre méthode de dosage devait être simple, rapide, fidèle et posséder un seuil de détection le plus faible possible.

Cette méthode analytique doit permettre d'étudier, en conditions expérimentales puis en conditions normales d'exploitation piscicole marine en cage, la persistance de l'acide oxolinique dans l'eau de mer, le sédiment et les mollusques bivalves marins, et ce de manière comparative à l'oxytétracycline.

# 1 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

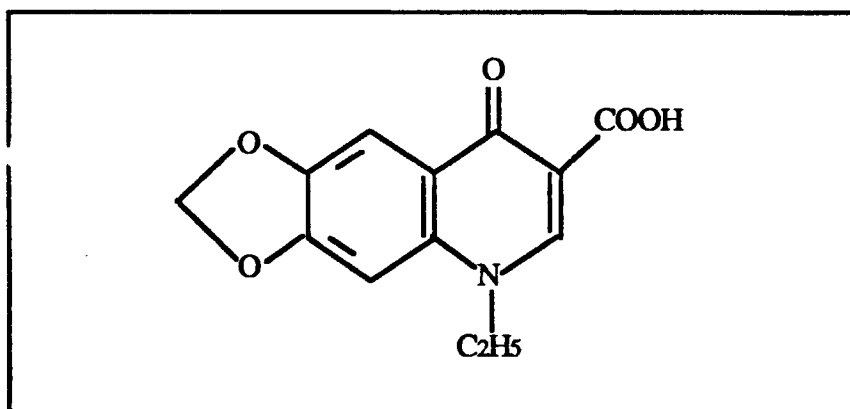
## 1 - 1 L'ACIDE OXOLINIQUE

L'acide oxolinique est un antibiotique antibactérien de la famille des quinolones de première génération. D'origine artificielle, il est caractérisé sur le plan chimique par la présence d'un noyau quinoléine, et doué d'une activité antibiotique bactéricide à spectre étroit sur les bactéries à Gram négatif.

### 1 - 1 - 1 STRUCTURE

L'acide oxolinique se caractérise sur le plan structural par :

- un noyau aromatique hétérocyclique, le noyau quinoléine,
- une fonction cétone en position para de l'azote hétérocyclique,
- une fonction acide carboxylique -COOH en C3.



### 1 - 1 - 2 PROPRIETES PHYSIQUES

L'acide oxolinique se présente comme une poudre cristalline blanche de masse relative 261.2 g et de point de fusion 313 °C. Sous sa forme non ionisée, il est insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques. Il est soluble dans les solutions alcalines.

La présence de plusieurs systèmes de doubles liaisons conjuguées explique son absorption dans l'UV avec un maximum d'absorption aux alentours de 260 nm. Cette propriété est exploitée pour son dosage dans les milieux biologiques et les préparations pharmaceutiques.

### 1 - 1 - 3 PROPRIETES CHIMIQUES

#### 1 - 1 - 3 - 1 Caractère acide

L'acide oxolinique possède une fonction acide carboxylique dont le pKa est d'environ 5.5. Cette fonction a des conséquences très importantes, à la fois

galéniques, pharmacocinétiques et toxicologiques. Elle permet notamment la préparation de sels de sodium facilement ionisables et dissociables, donc hydrosolubles.

### 1 - 1 - 3 - 2 Propriétés chélatrices

La fonction cétone, opposée à l'atome d'azote hétérocyclique, portée par une structure aromatique plane et placée en position  $\beta$  par rapport à la fonction acide carboxylique, est à l'origine de propriétés chélatrices avec les cations divalents du magnésium, du fer ou du cuivre. L'acide oxolinique est capable de fixer un ou deux cations divalents par molécule et de former ainsi deux types de chélates. Ces propriétés chélatrices expliquent, en partie, son activité antibactérienne.

Les principales propriétés chimiques de l'acide oxolinique et leurs conséquences pratiques sont résumées sur la figure 1.

### 1 - 1 - 4 ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

L'acide oxolinique possède un spectre d'activité étroit dirigé contre les bactéries à Gram négatif (Figure 2). Sa C.M.I. est comprise entre 1 et 10  $\mu\text{g/mL}$ . Il est en revanche inactif sur les bactéries anaérobies à Gram positif (clostridies) ou négatif (bactéroïdes) ainsi que sur les mycoplasmes. Chez les poissons, il est notamment actif contre *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Pasteurella piscida* et *Yersinia ruckeri*. (Rodgers et Austin, 1983; Bowser et House, 1990; Lewis et Hastings, 1990; Martinsen *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1992)

GRAM POSITIF			GRAM NEGATIF		
Clostridium	Staphylocoques pénicillinase +	Staphylocoques pénicillinase - Streptocoques Corynebacterium	Pasteurella	Salmonella E. coli Klebsiella	Pseudomonas aeruginosa Proteus

Figure 2. Spectre antibactérien de l'acide oxolinique

L'acide oxolinique, sous forme de chélates magnésiens, inhibe l'ADN-gyrase responsable du surenroulement des chaînes d'ADN. Son action bactéricide résulte donc du blocage de la réplication de l'ADN (Gleckman *et al.*, 1979).

L'acide oxolinique ne présente pas de résistances plasmidiques mais seulement chromosomiques. Ces résistances sont croisées entre les différents représentants du groupe des quinolones et avec l'oxytétracycline.



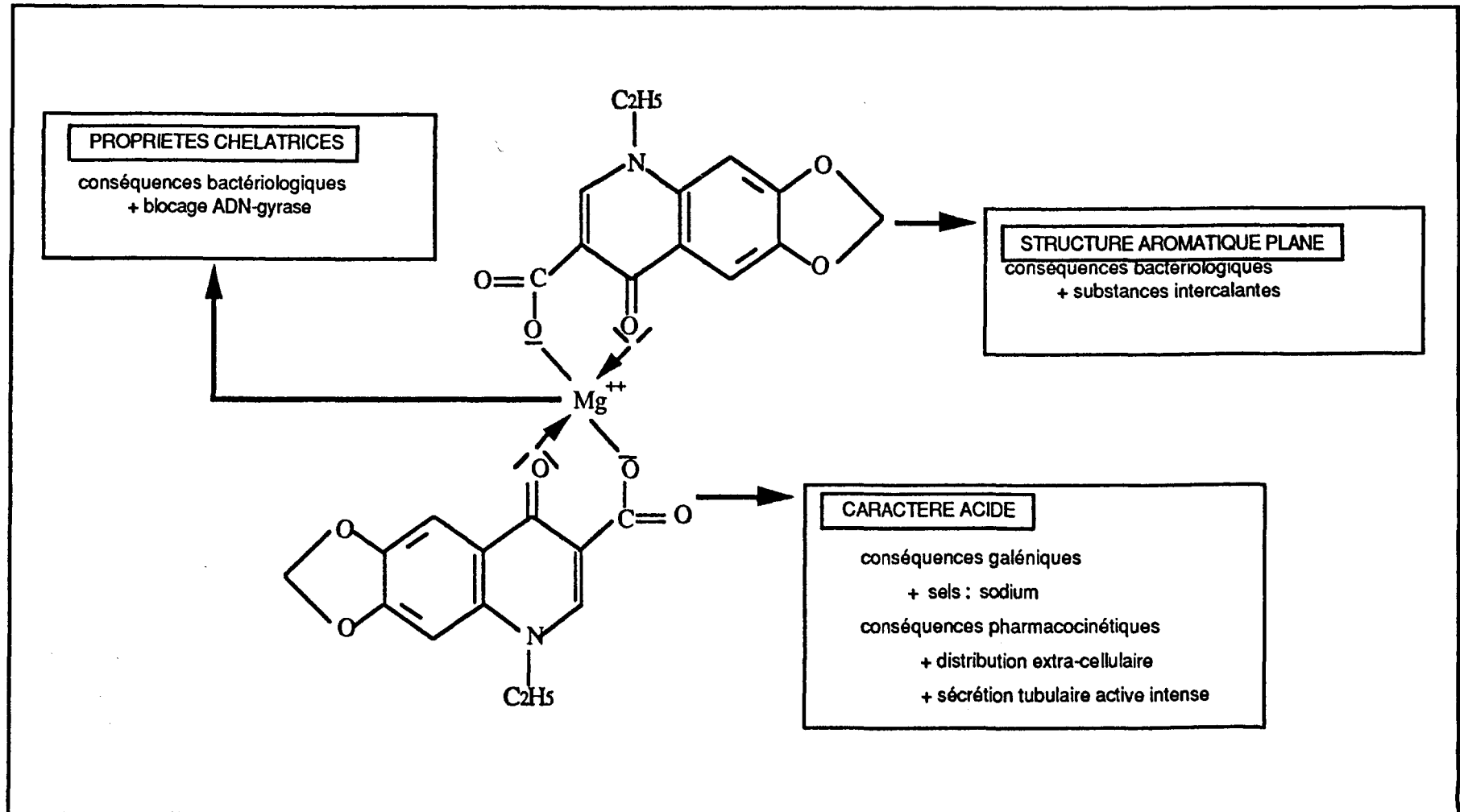


Figure 1. Conséquences pratiques de la réactivité chimique de l'acide oxolinique

## 1 - 1 - 5 PHARMACOCINETIQUE (CHEZ LE POISSON)

La résorption orale et parentérale de l'acide oxolinique, du fait de son caractère lipophile, est rapide. Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), après administration intraveineuse de 10 mg/kg, sa demi-vie de distribution à 16°C est de 0.31 h (Bjorklund et Bylund, 1991). Sa biodisponibilité absolue par voie orale chez la truite arc-en-ciel est comprise entre 14.3 et 38.1 % (Cravedi *et al.*, 1987; Hustvedt *et al.*, 1991).

La distribution de l'acide oxolinique, du fait de ses caractères lipophile et acide, est plutôt extracellulaire. Après administration orale chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), sa distribution s'effectue préférentiellement et par ordre décroissant dans les reins, le foie et le tissu musculaire (Ishida, 1989; Jacobsen, 1989). Son volume de distribution chez la truite arc-en-ciel est de 1.94 l/kg à 16°C (Bjorklund et Bylund, 1991).

L'acide oxolinique subit très peu de biotransformations dans l'organisme, celles-ci se limitant pratiquement à des hydroxylations et des glucuroconjugaisons.

Enfin, l'acide oxolinique est éliminé principalement sous forme inchangée par les urines et les fèces (Ellis, 1991). Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), après administration intraveineuse de 10 mg/kg et orale de 75 mg/kg, ses demi-vies d'élimination à 16°C sont respectivement de 42.8 et 69.7 h (Bjorklund et Bylund, 1991).

## 1 - 1 - 6 TOXICITE (CHEZ LE POISSON)

L'acide oxolinique présente une faible toxicité par voie orale, son indice thérapeutique étant supérieur à 20. Chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*), la dose létale orale 50 est supérieure à 4 000 mg/kg (Bjorklund et Bylund, 1991).

## 1 - 2 METHODES D'ANALYSES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Le dosage de l'acide oxolinique, comme celui de tout antibiotique, peut être réalisé par voie microbiologique ou physico-chimique. Le dosage microbiologique des antibiotiques présentant généralement une moindre spécificité et une moindre sensibilité que leur dosage physico-chimique, nous avons travaillé sur la mise au point d'une méthode de dosage physico-chimique de cet antibiotique.

La méthode physico-chimique devait permettre la séparation, l'identification et le dosage de l'acide oxolinique et de ses éventuels produits de dégradation. La chromatographie liquide s'imposait comme la méthode de référence, d'autant plus qu'il existait de nombreuses publications concernant le dosage de l'acide oxolinique par CLHP et une seule par chromatographie gazeuse (Takatsuki K, 1992).

Nous avons limité notre étude aux méthodes CLHP récentes, réalisables chez les poissons, les mollusques, les crustacés et dans les sédiments, suffisamment performantes pour permettre l'analyse d'une dizaine d'échantillons par jour, et possédant une limite de détection la plus faible possible. Le tableau I rassemble une liste non exhaustive des méthodes permettant de déceler de faibles quantités d'acide oxolinique (50 à 100 µg/ml ou µg/g).

**Tableau I. Revue générale des méthodes CLHP de dosage de l'acide oxolinique dans les poissons, les organismes benthiques et le sédiment**

Auteurs	Année	Phase stationnaire	Phase mobile	pH	Matrice
Cravedi <i>et al.</i>	1987	Spherisorb ODS 5 µm	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 M : acétonitrile (50 : 50)	3,0	Aliment, fèces
Archimbault <i>et al.</i>	1988	Waters Novapak C18 5 µm	Eau : méthanol (58 : 42) contenant Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1.88 g/l) et paire d'ions (0.75 g/l)	-	muscle, peau et plasma
Hustvedt et Salte	1989	Waters Novapak C18 4 µm	Tampon phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) : méthanol (60 : 40)	8,2	plasma
Rogstad <i>et al.</i>	1989	Polymer PLRP-S 5 µm	acide phosphorique 0.002 M : acétonitrile : tétrahydrofuran (65 : 20 : 15)	-	muscle, foie, intestin, peau
Björklund	1990	Regis GFF ISRP 5 µm	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1 M : acétonitrile (90 : 10)	2,0	muscle, foie, plasma, sédiments
Samuelsen	1990	MOS-Hypersil C8 3 µm	Acide oxalique 0.025 M : acétonitrile : méthanol : tétrahydrofuran (gradient d'élution)	3,2	plasma, muscle, foie, moules, crabes
Carignan <i>et al.</i>	1991	RP C18 5 µm	[acétonitrile : méthanol (3 : 1)] : acide oxalique 0.01 M (35 : 65)	-	muscle
Hustvedt <i>et al.</i>	1991	Polymer PLRP-S 5 µm	acide phosphorique 0.002 M : acétonitrile : tétrahydrofuran (65 : 20 : 15)	-	muscle, foie
Steffenak <i>et al.</i>	1991	Polymer PLRP-S 5 µm	acide phosphorique 0.002 M : acétonitrile : tétrahydrofuran (64 : 21 : 15)	-	plasma

Ces méthodes utilisent, dans leur grande majorité, la chromatographie en phase inverse qui donne de meilleurs résultats que la chromatographie par échange d'ions, en terme de nombre et de hauteur de plateaux théoriques. L'acide oxolinique étant une molécule modérément polaire, il est en effet logique de choisir une phase inverse peu polaire ; le choix d'une phase silice greffée octadécyle (C<sub>18</sub>) par rapport à une C<sub>8</sub> s'explique par sa moins grande fragilité.

La phase mobile est généralement composée d'un solvant de base, un tampon, de polarité inverse à celle de la phase stationnaire pour augmenter l'affinité de l'acide oxolinique pour la C<sub>18</sub>, et d'un cosolvant ou éluant peu polaire, tel que le méthanol ou l'acétonitrile.

## **2 - METHODES DE DOSAGE**

Nos critères de sélection de la méthode étaient les suivants :

- Sensibilité : notre limite de dosage devait être la plus faible possible, de l'ordre de 100 µg/ml ou µg/g.
- Rapidité : la méthode devait permettre le traitement de 10 prélèvements par jour.
- Faisabilité et simplicité : la méthode devait être la plus simple possible et compatible avec l'équipement courant d'un laboratoire.
- Spécificité : elle devait être suffisante.
- Linéarité, répétabilité et reproductibilité : elles devaient être acceptables.

A partir de ces critères, nous avons mis au point les méthodes d'extraction de l'acide oxolinique dans l'eau de mer, le sédiment et les mollusques.

### **2 - 1 MATERIEL ET METHODES**

#### **2 - 1 - 1 REACTIFS**

Acétonitrile qualité CLHP (BDH Chemicals, Toronto, Canada).

Méthanol qualité CLHP (Carlo Erba, Milan, Italie).

Acétate d'éthyle (Janssen, Geel, Belgique).

Chloroforme, acide orthophosphorique, soude, acide chlorhydrique, dihydrogénophosphate de potassium (Merck, Darmstadt, Allemagne).

## 2 - 1 - 2 APPAREILLAGE CHROMATOGRAPHIQUE

Chromatographe : Varian 5 000 (Varian, Palo Alto, CA, USA) équipé d'une colonne LiChroCart 125 X 4 mm et d'une précolonne identique de 4 X 4 mm remplies de phase stationnaire LiChroSpher 100 RP-18 "endcapped" (5 µm) (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Détecteur photométrique : Vari-Chrom UV 50 (Varian).

Intégrateur : D-2500 (Merck) permettant de calculer les hauteurs de pics et les concentrations par standardisation externe.

Traitement des données : microordinateur Deskpro 386/s modèle 50 3.5 (Compaq, Houston, TX, USA) équipé du logiciel HPLC Manager (Merck).

## 2 - 1 - 3 CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Les premières phases mobiles testées étaient un mélange, en proportions variables, d'un tampon contenant des sels ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) et d'acétonitrile. Toutes étaient à l'origine d'un médiocre rapport signal/bruit, d'une dérive importante de la ligne de base et d'un dépôt de sels au niveau des différentes férules du chromatographe.

Pour toutes ces raisons, notre choix de phase mobile s'est arrêté sur celle utilisée pour le dosage de l'oxytétracycline (Pouliquen et *al.*, 1992).

Nous dissolvions 2.3058 g d'acide orthophosphorique à 85 % dans un litre d'eau ultra-pure, de façon à obtenir une solution aqueuse d'acide orthophosphorique 0.02 M. Nous mélangions 760 mL de cette solution à 240 mL d'acétonitrile. Le mélange de pH 2.3 était alors filtré sur une membrane en nylon de porosité 0.20 µm (Whatman, Maidstone, Angleterre) à l'aide du système de filtration Millipore (Bedford, MA, USA), puis dégazé aux ultrasons pendant 15 minutes.

La proportion d'acétonitrile dans la phase mobile était déterminée de telle façon que le temps de rétention de l'acide oxolinique n'excède pas 10 minutes

La colonne était conditionnée en passant, à un débit de 0.2 mL/min, un mélange eau : acétonitrile [25 : 75 (v/v) pendant 2 heures, 50 : 50 (v/v) pendant 2 heures, 60 : 40 (v/v) pendant 2 heures, 70 : 30 (v/v) pendant 2 heures] puis la phase mobile pendant 5 heures. Par ailleurs, après chaque journée de travail, la colonne était régénérée en passant à un débit de 0.2 mL/min, pendant 2 heures, un mélange eau : acétonitrile (50 : 50 v/v). Cette régénération à un pH neutre permettait d'augmenter la durée de vie de la colonne, car les phases inverses sont relativement instables à un pH de 2.3 qui est celui de la phase mobile.

Le débit choisi était de 1.0 mL/min et correspondait à une pression d'environ 60 atmosphères.

La température était de 25°C. Les conditions opératoires du détecteur étaient les suivantes :

- longueur d'onde.....262 nm
- échelle de sensibilité.....0,01 AUFS

- constante de temps.....1 s
- bande passante.....16 nm

### **3 - 1 - 4 PREPARATION DES ECHANTILLONS**

#### **3 - 1 - 4 - 1 Eau de mer**

Un échantillon d'eau de mer de 2 ml était aspiré dans une seringue à usage unique, puis filtré sur membrane en acétate de cellulose de porosité 0.45 µm (Analytore, OSI, Paris, France). Nous déposons 1.5 ml du filtrat dans un tube en polypropylène de 1.5 ml. Ce tube était alors mis à centrifuger à 10 000 trs/min pendant 5 min à + 4°C. Cinquante microlitres de surnageant étaient injectés dans la colonne chromatographique.

#### **3 - 1 - 4 - 2 Sédiment**

*(Figure 3)*

La seule méthode d'extraction de l'acide oxolinique dans le sédiment avait été publiée par Björklund (1990). Cette méthode d'extraction en phase solide, que nous mettions en œuvre au laboratoire, nous donnait des rendements d'extraction de l'antibiotique faibles et variables d'une concentration à l'autre (moyenne 40.1 %, coefficient de variation, 18.9 % pour n = 20).

Nous avons optimisé, de ce fait, une méthode d'extraction en phase liquide sur le principe de la solubilité différentielle de l'acide oxolinique en solutions aqueuse et organique. Trois extractions successives de l'acide oxolinique en solution aqueuse alcaline étaient suivies d'une étape de passage de l'antibiotique en solution organique après acidification du milieu, de telle façon à pouvoir procéder à une évaporation à sec dans des conditions optimales. La reprise du résidu sec dans 500 µL de phase mobile permettait de "concentrer" l'acide oxolinique par rapport à ce qu'il était dans l'échantillon initial de 1 g de sédiment.

#### **3 - 1 - 4 - 3 Huître Creuse et palourde**

*(Figure 4)*

Plusieurs méthodes d'extraction en phases solide et liquide de l'acide oxolinique dans les huîtres et les palourdes ont été comparées. L'extraction en phase solide donnant de meilleurs résultats, notamment en terme de rendements d'extraction, les méthodes de Björklund (1990) et d'Hustvedt (1991) - appliquées à l'extraction en phase solide de l'acide oxolinique dans les mollusques - ont, à leur tour, été comparées. La méthode de Björklund (1990) s'est révélée de meilleure qualité que celle d'Hustvedt (1991).

La méthode de Björklund (1990) a donc été modifiée après comparaison de l'efficacité des colonnes d'extraction en phase solide C<sub>8</sub> et C<sub>18</sub> et essai de différents types de solvants (de conditionnement, de lavage et d'élution).

L'établissement d'un gradient d'élution (Figure 5) a montré que le solvant d'élution devait théoriquement être constitué de 70 % de méthanol. Nous avons cependant choisi un solvant d'élution contenant 90 % de méthanol de façon à rendre l'évaporation à sec plus rapide et donc plus économique.

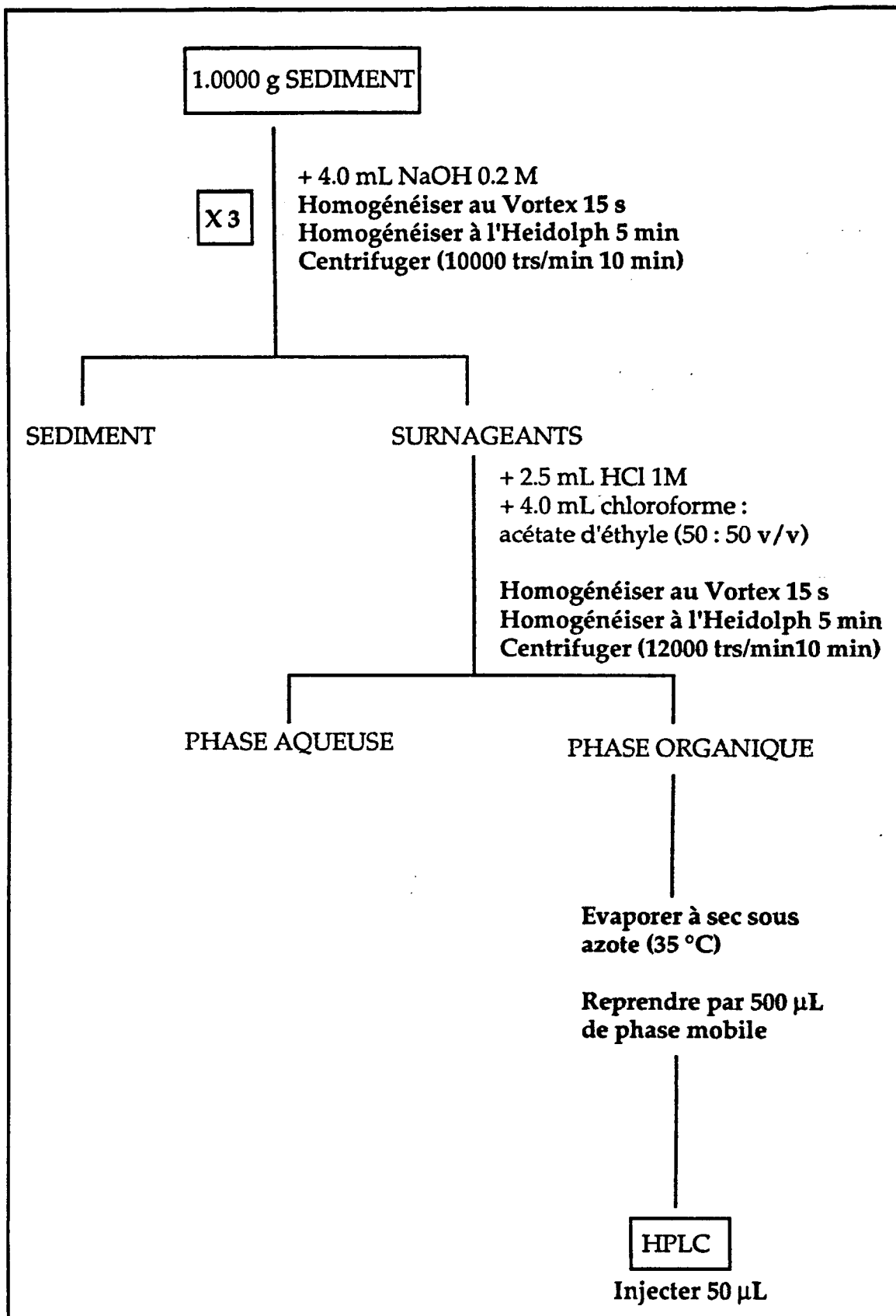


Figure 3. Méthode d'extraction de l'acide oxolinique dans les sédiments

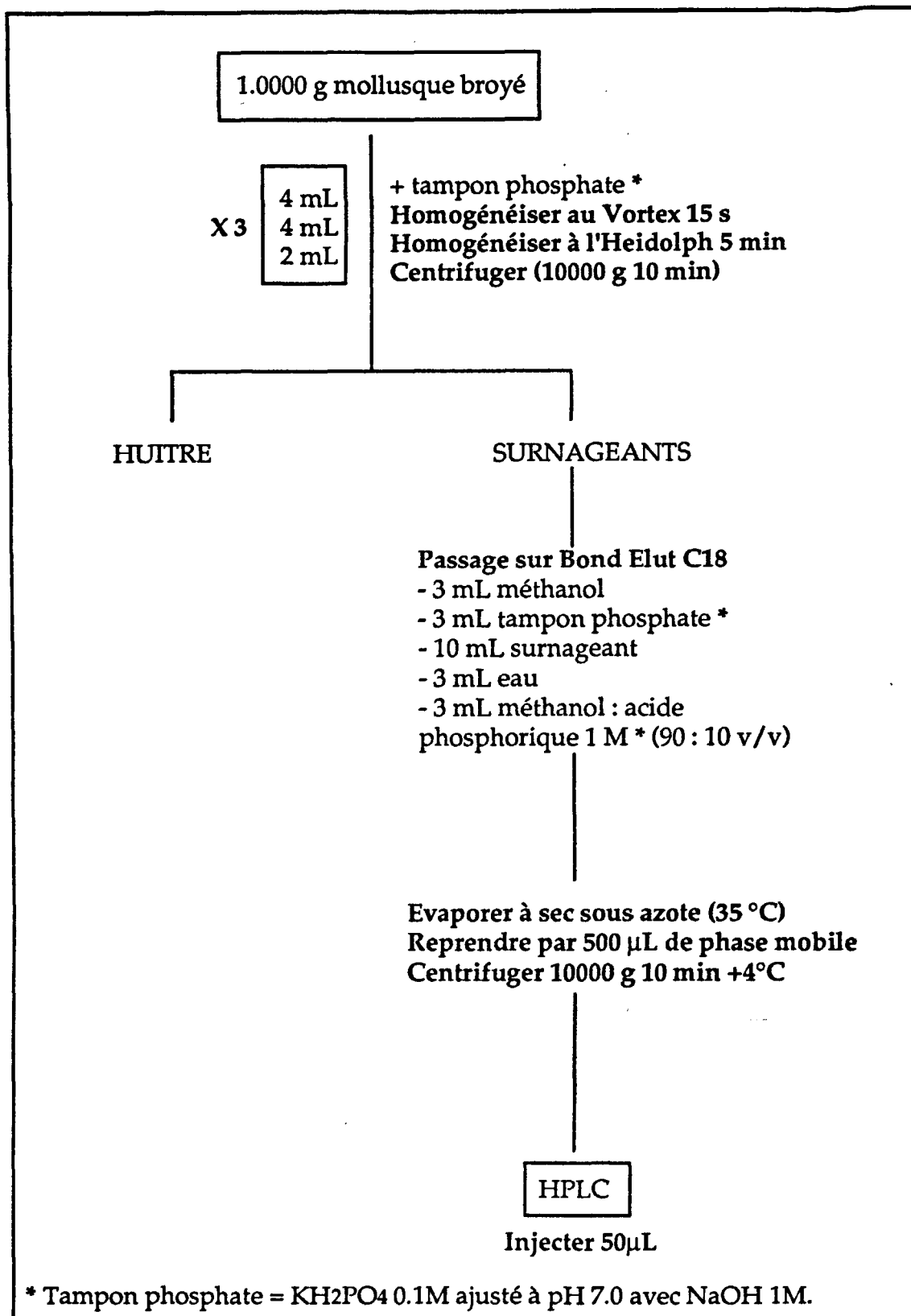


Figure 4. Méthode d'extraction de l'acide oxolinique dans les huîtres et les palourdes



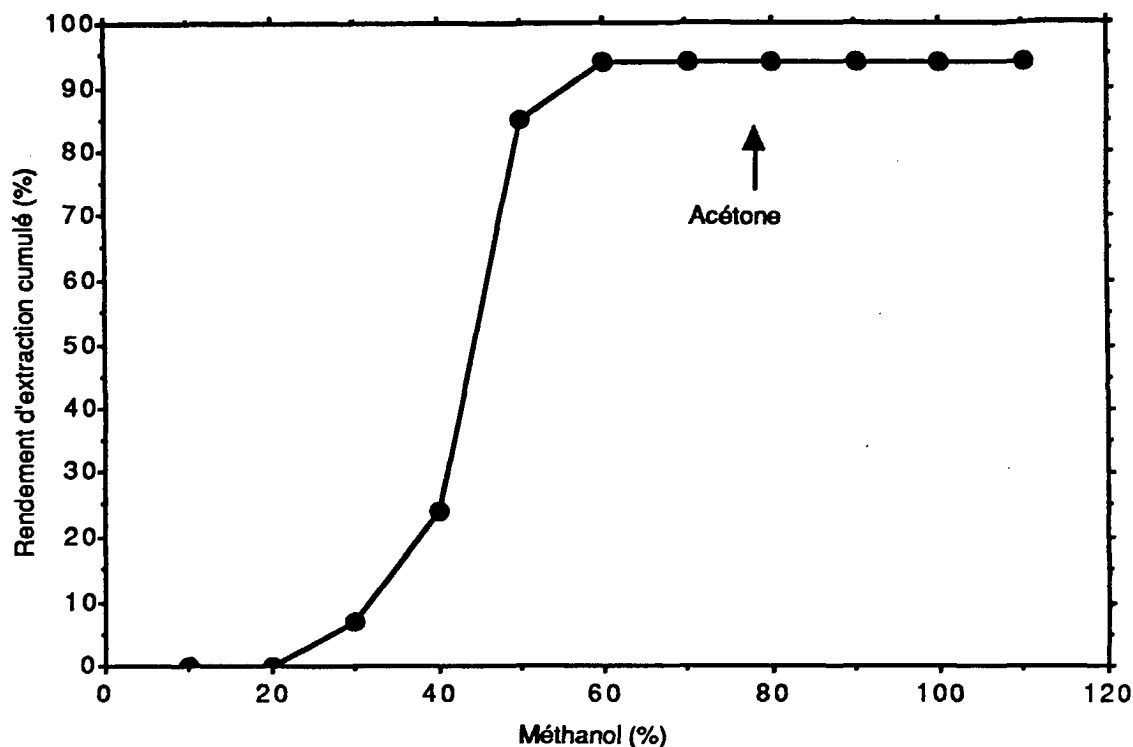


Figure 5. Gradient d'éluion de l'acide oxolinique par le méthanol

### 3 - 1 - 5 PREPARATION DES SOLUTIONS MERE ET FILLES

Une solution mère d'acide oxolinique était préparée dans de la soude 0.03 M à la concentration de 1 000 µg/mL, puis conservée à +4°C pendant un mois.

Chaque jour, des solutions filles étaient préparées dans l'eau à partir de la solution mère, aux concentrations désirées.

### 3 - 2 RESULTATS

A la longueur d'onde de 262 nm, l'acide oxolinique était élué en 6.5 min. Il n'y a pas eu de variation du temps de rétention de cet antibiotique au cours de l'usage en continu de la colonne chromatographique. Cette méthode permettait donc de réaliser 5 à 6 injections par heure.

Il n'y avait ni dérive importante de la ligne de base, ni pic interférent au cours de l'essai.

La détermination du facteur de symétrie et du nombre de plateaux théoriques était réalisée à partir d'un chromatogramme obtenu par injection d'une solution d'acide oxolinique à 1 µg/mL. Leurs valeurs étaient respectivement de 1.34 et 2755 lors de la mise en place de la colonne chromatographique.

La validation de notre méthode de dosage CLHP de l'acide oxolinique dans l'eau de mer, le sédiment, l'huître et la palourde pouvait donc être entreprise sur la base des protocoles analytiques décrits au paragraphe 2 - 1.

### **3 - VALIDATION DES METHODES DE DOSAGE**

Le but de la validation d'une méthode d'analyse, quelle qu'elle soit, est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue. Dans le cas présent, il s'agit d'appliquer cette méthode à l'étude de la cinétique de contamination et de décontamination de l'eau de mer, du sédiment et des mollusques par les effluents de pisciculture contenant de l'acide oxolinique.

Or, cette étude ne peut être réalisée que lorsque la validité de la méthode a été vérifiée, ce qui impose d'effectuer plusieurs manipulations dont le but est d'estimer :

- la spécificité,
- la linéarité,
- la répétabilité,
- la reproductibilité,
- la sensibilité,
- le rendement d'extraction,
- la stabilité,
- la praticabilité.

Les protocoles de validation ont été réalisés de façon complète pour l'eau de mer, le sédiment et l'huître (*Crassostrea gigas*) et de façon simplifiée pour la palourde (*Ruditapes philippinarum*).

#### **3 - 1 - SPECIFICITE**

La spécificité d'une méthode d'analyse est sa capacité à fournir un signal analytique pour un constituant donné, à l'exclusion de tout autre constituant présent dans le milieu.

Elle était déterminée ici par le choix de la colonne chromatographique, de la phase mobile, du pH de travail, du temps de rétention et de la longueur d'onde de détection.

Elle a été évaluée très simplement en comparant les chromatogrammes obtenus :

- sur une référence d'acide oxolinique pur,
- sur une matrice (eau de mer, sédiment, huître et palourde)
- sur une eau de mer, un sédiment, une huître et une palourde enrichis de la référence d'acide oxolinique pur.

De cette façon, on s'assurait que le pic correspondant à l'acide oxolinique ne coéluait pas avec d'autres substances et possédait toujours le même temps de rétention. Notre méthode de dosage de l'acide oxolinique dans l'eau de mer, le sédiment et les mollusques est une méthode spécifique.

### 3 - 2 - LINEARITE

La linéarité d'une méthode d'analyse se définit comme sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle de concentration, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en substance à examiner dans l'échantillon.

Une gamme était réalisée dans l'eau de mer supplémentée en acide oxolinique aux concentrations 0.05 - 0.10 - 0.25 - 0.50 - 1.00 et 2.50 µg/ml et dans le sédiment et les mollusques (*Crassostrea gigas* et *Ruditapes philippinarum*) supplémentés en acide oxolinique aux concentrations 0.05 - 0.10 - 0.25 - 0.50 - 1.00 et 2.50 µg/g. Chaque point de gamme, réalisé en duplicata, était injecté dans le chromatographe en double au cours de chacune des journées de manipulation à la fin desquelles était déterminée une équation de régression de la forme:

$$C = bH + a, \text{ avec :}$$

H , hauteur du pic chromatographique (en µV) et  
C , concentration en acide oxolinique (en µg)

Les résultats de ces manipulations figurent dans le tableau II. Le test de linéarité montrait que l'on réussissait, pour chacune des matrices et pour chacune des journées de manipulation, à trouver une zone linéaire. En outre, pour une même matrice, les pentes des droites de régression linéaire n'étaient pas significativement différentes au seuil de 95 % (Tableau III).

Les droites moyennes de régression estimées à partir des différentes journées de manipulation étaient les suivantes :

$$\text{Eau de mer : } C = 1.192 \cdot 10^{-4} H + 0.017$$

$$\text{Sédiment : } C = 9.295 \cdot 10^{-5} H + 0.020$$

$$\text{Huître : } C = 6.064 \cdot 10^{-5} H - 0.095$$

$$\text{Palourde : } C = 5.485 \cdot 10^{-5} H + 4.117 \cdot 10^{-4}$$

Tableau II. Principaux paramètres d'estimation de la linéarité

		Eau de mer	Sédiment	Huître	Palourde
Pente	Jour 1	$1.173 \cdot 10^{-4}$	$9.513 \cdot 10^{-5}$	$6.193 \cdot 10^{-5}$	$5.489 \cdot 10^{-5}$
	Jour 2	$1.139 \cdot 10^{-4}$	$9.114 \cdot 10^{-5}$	$5.970 \cdot 10^{-5}$	$5.477 \cdot 10^{-5}$
	Jour 3	$1.261 \cdot 10^{-4}$	$9.258 \cdot 10^{-5}$	$6.086 \cdot 10^{-5}$	
Ordonnée à l'origine	Jour 1	0.002	0.037	- 0.125	- 0.001
	Jour 2	0.012	0.014	- 0.080	0.003
	Jour 3	0.007	0.008	- 0.081	
Coefficient de corrélation	Jour 1	0.999	0.992	0.981	0.999
	Jour 2	0.999	0.970	0.980	0.999
	Jour 3	0.998	0.998	0.980	
Valeur du F de linéarité	Jour 1	15600.94*	1755.69*	306.93*	4145,47*
	Jour 2	12121.68*	325.55*	541.07*	1815,73*
	Jour 3	5606.87*	7253.07*	295.05*	

\* Absence de différence significative entre la pente calculée et 0 au seuil de 1 pour 1 000.

Tableau III. Comparaison deux à deux des pentes de droites de régression linéaire obtenues au cours des différentes journées de manipulation.

		Eau de mer	Sédiment	Huître	Palourde
Jour 1/Jour 2	V ( $10^{-12}$ )	29.257	388.602	19.079	2.378
	tc	0.629	0.202	0.511	0.078
	ti	2.056	2.064	2.110	2.228
Jour 1/Jour 3	V ( $10^{-12}$ )	55.756	101.344	25.050	-
	tc	1.179	0.253	0.214	-
	ti	2.056	2.048	2.110	-
Jour 2/Jour 3	V ( $10^{-12}$ )	58.568	325.045	19.141	-
	tc	1.594	0.080	0.265	-
	ti	2.056	2.064	2.179	-

V : variance d'échantillonnage de la différence des pentes

tc : t calculé = différences des pentes /  $(V)^{0.5}$

ti : t lu au seuil de 95 % (Table de Student)

Pour chacun des dosages ultérieurs, il sera donc possible de comparer la pente de la droite de régression obtenue à cette pente commune.

Quelques chromatogrammes correspondant à la gamme réalisée dans l'eau de mer, le sédiment et les deux mollusques sont reproduits en annexe.

### **3 - 3 - FIDELITE**

#### **3 - 3 - 1 REPETABILITE**

La répétabilité d'une méthode d'analyse exprime sa fidélité sous des conditions identiques :

- même analyste,
- même équipement,
- mêmes réactifs,
- court intervalle de temps.

Elle exprime donc l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène, dans des conditions identiques.

Les échantillons étaient de l'eau de mer supplémentée en acide oxolinique à 0.50 µg/ml, du sédiment et des mollusques supplémentés en acide oxolinique à 0.50 µg/g. Pour chacune des matrices, cinq échantillons étaient préparés puis injectés dans le chromatographe en double au cours de la même journée et par le même analyste. La concentration en acide oxolinique était alors déterminée à partir de l'équation de la droite de régression obtenue en analysant une gamme dans l'eau supplémentée en acide oxolinique à 0.50 et 1.00 µg/ml.

Les résultats figurent dans le tableau IV. Dans cette étude, qui permettait d'observer les différentes variations à l'intérieur d'une même manipulation, les résultats étaient exprimés par la moyenne, la déviation standard de répétabilité, le coefficient de variation de répétabilité.

Quelle que soit la matrice, le coefficient de variation de répétabilité ne dépassait pas 5,00 %, ce qui faisait de notre méthode d'analyse une technique répétable.

#### **3 - 3 - 2 - REPRODUCTIBILITE**

La reproductibilité d'une méthode d'analyse exprime sa fidélité sous des conditions différentes :

- réactifs de différentes sources,
- analystes différents,

Tableau IV. Principaux paramètres d'estimation de la précision.

	Eau de mer		Sédiment		Huître		Palourde
	Jour 1 (n = 10)	Jour 2 (n = 10)	Jour 1 (n = 10)	Jour 2 (n = 10)	Jour 1 (n = 10)	Jour 2 (n = 10)	
Moyenne ( $\mu\text{g/ml}$ ou /g)	0.509	0.508	0.339	0.340	0.400	0.442	0.456
Ecart-type ( $\mu\text{g/ml}$ ou /g)	0.008	0.006	0.007	0.006	0.014	0.015	0.094
Coefficient de variation (%)	1.58	1.25	2.00	1.83	3.14	3.36	3.11
Valeur du F de Scheffé	0.202*		0.095*		0.002*		-

- jours différents,
- appareillages différents.

Les échantillons étaient de l'eau de mer supplémentée en acide oxolinique à 0.50 µg/ml et du sédiment et des mollusques supplémentés en acide oxolinique à 0.50 µg/g. Chacun de ces échantillons était préparé cinq fois et injecté en double dans le chromatographe au cours de deux journées consécutives de manipulation.

Les résultats figurent dans le tableau IV. La valeur de F trouvée étant inférieure à la valeur de F lue dans la table, les moyennes ne différaient donc pas significativement, quelle que soit la matrice. La méthode d'analyse utilisée était donc reproductible.

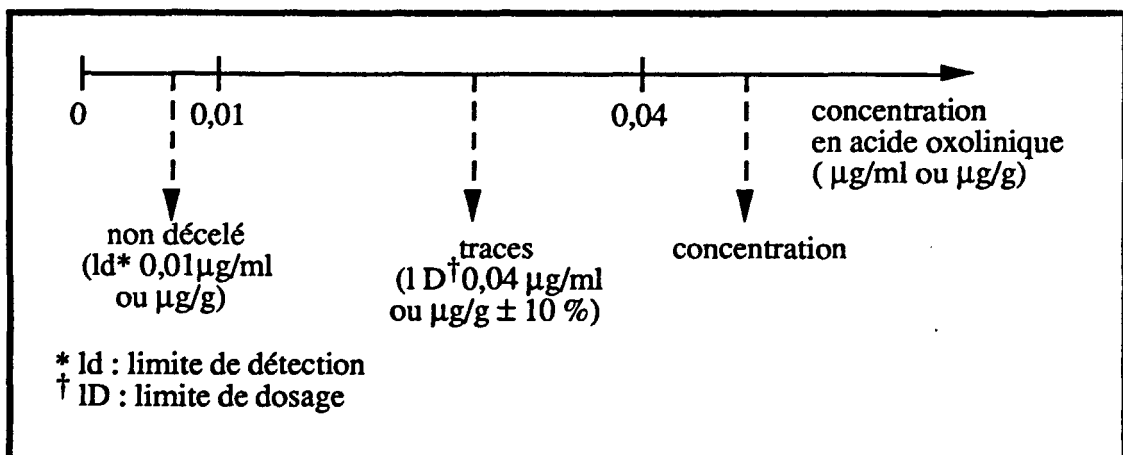
### 3 - 4 - SENSIBILITE

La sensibilité d'une méthode d'analyse est sa capacité à enregistrer de faibles variations. Elle peut s'exprimer par la pente de la droite de régression linéaire.

On peut aussi l'exprimer par la limite de détection. Cette dernière est la plus petite quantité d'acide oxolinique dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte. La limite de détection de notre méthode était de 10 ng/ml ou de 10 ng/g. Il est donc possible de détecter une telle concentration en acide oxolinique, mais non de la quantifier avec exactitude (coefficient de variation supérieur à 15 %).

On peut aussi exprimer la sensibilité par la limite de dosage. Cette dernière est la plus petite quantité d'acide oxolinique dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une précision définie (Lang et Bolton, 1991). La limite de dosage de notre méthode était de 40 ng/ml ou de 40 ng/g avec une précision de ± 10 %.

Les résultats expérimentaux ultérieurs sont donc à exprimer de la manière suivante :





### **3 - 5 - RENDEMENT D'EXTRACTION**

Le rendement d'extraction de l'acide oxolinique dans chacune des quatre matrices était constant, quelle que soit la quantité d'acide oxolinique présente dans la matrice avant la procédure d'extraction (Tableau V). Sa valeur était de  $102.1 \pm 4.5$  % (n = 47) dans l'eau de mer,  $68.1 \pm 1.7$  % (n = 30) dans le sédiment,  $88.3 \pm 2.4$  % (n = 36) dans l'huître et  $91.5 \pm 2.8$  % (n = 9) dans la palourde (moyenne  $\pm$  coefficient de variation).

La plus faible valeur du rendement d'extraction de l'acide oxolinique dans le sédiment s'explique peut-être par la possibilité pour l'antibiotique de former des complexes avec certains cations divalents présents en plus grande quantité dans le sédiment que dans l'eau de mer ou les mollusques. Cette hypothèse devrait être vérifiée dans les semaines à venir en dosant les principaux cations contenus dans le sédiment. Par ailleurs, il pourrait être intéressant de déterminer les rendements d'extraction de l'acide oxolinique dans plusieurs sédiments possédant des caractéristiques physico-chimiques différentes.

### **3 - 6 - STABILITE**

L'étude de la stabilité était réalisée pour déterminer si l'eau de mer et le sédiment contenant de l'acide oxolinique et conservés à l'abri de la lumière à une température de  $-20^\circ\text{C}$  ne subissaient aucune dégradation. Une gamme congelée a donc été dosée à différents jours (J0, J30 et J60) et comparée à une gamme réalisée dans l'eau, mais préparée le jour du dosage.

Les résultats (figure 6) faisaient l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) prenant en compte les facteurs temps et répétition (Lang et Bolton, 1991). Ces résultats montraient que ces deux facteurs n'avaient aucun effet.

Il n'y avait donc pas de chute significative des concentrations en acide oxolinique dans l'eau de mer et le sédiment conservés à  $-20^\circ\text{C}$  pendant 60 jours. L'acide oxolinique étant stable sur la période étudiée, il est par conséquent possible de conserver à  $-20^\circ\text{C}$  et pendant deux mois des échantillons d'eau de mer et de sédiment contenant cet antibiotique avant de les analyser.

Une étude de stabilité de l'acide oxolinique dans l'huître est en cours de réalisation. Les premiers résultats semblent confirmer ceux déjà obtenus pour l'eau de mer et le sédiment.

### **3 - 7 - PRATICABILITE**

La praticabilité d'une méthode d'analyse vise à estimer son coût et son délai de réponse.

Tableau V. Rendements d'extraction de l'acide oxolinique dans l'eau de mer, le sédiment et l'huître en fonction de la quantité d'acide oxolinique ajoutée. Moyenne en % (coefficient de variation en %) [nombre d'échantillons].

	Eau de mer	Sédiment	Huître
0.05 µg	98.3 (9.0) [n = 6]	-	86.3 (3.5) [n = 6]
0.10 µg	102.5 (7.7) [n = 6]	68.5 (3.0) [n = 6]	87.9 (2.3) [n = 6]
0.25 µg	104.6 (4.2) [n = 9]	68.9 (1.7) [n = 6]	88.8 (4.2) [n = 6]
0.50 µg	102.7 (3.5) [n = 10]	67.8 (1.7) [n = 6]	87.2 (1.7) [n = 6]
1.00 µg	103.6 (0.7) [n = 8]	68.2 (1.1) [n = 6]	88.5 (2.1) [n = 6]
2.50 µg	100.9 (2.4) [n = 8]	68.5 (1.0) [n = 6]	90.9 (0.6) [n = 6]

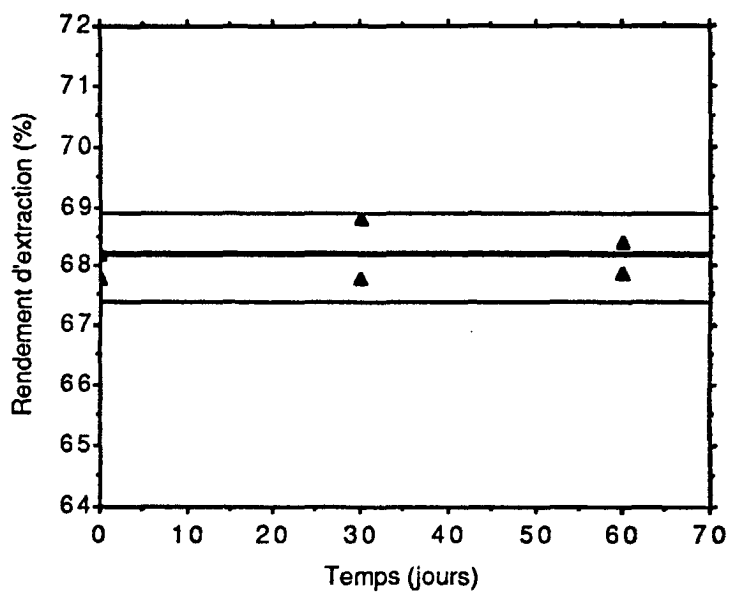
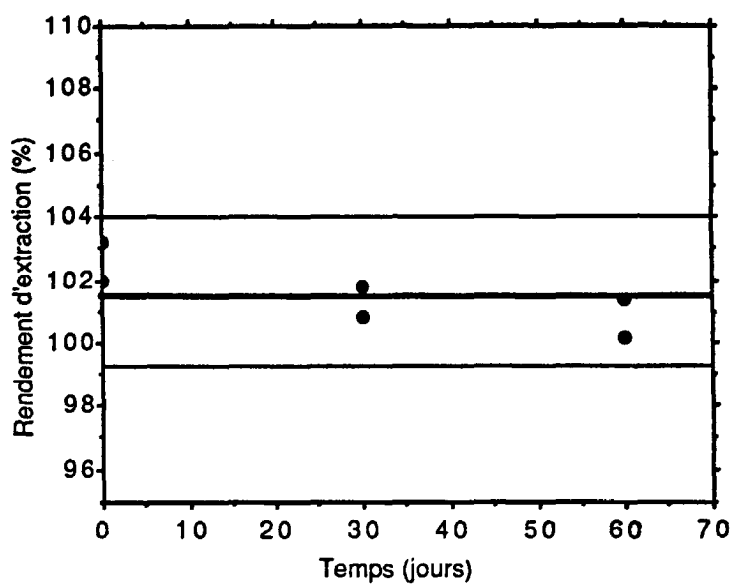


Figure 6. Diagrammes de stabilité de l'acide oxolinique dans l'eau de mer (Diagramme 1) et le sédiment (diagramme 2) conservés 60 jours à - 20°C.

Il nous fallait changer la précolonne toutes les 200 injections, et la colonne toutes les 1000 injections. Au-delà, nous observions une augmentation de la pression et une dérive de la ligne de base qui traduisaient une saturation et une dégradation des précolonne et/ou colonne. Ainsi, si le nombre de plateaux théoriques de la colonne était de 2755 au début de son utilisation, il n'était plus que de 1831 au bout de 1500 injections. Tous ces problèmes sont à mettre en relation avec l'utilisation d'une phase mobile de pH inférieur à trois.

Le délai de réponse était quant à lui court, puisque l'extraction demandait de 20 minutes à 3 heures et la sortie du pic chromatographique environ 7 minutes après l'injection dans l'appareil.

Notre méthode d'analyse dont le coût était modéré et le délai de réponse bref était donc praticable dans tout laboratoire possédant une chaîne CLHP.

### 3 - 8 - BILAN ET DISCUSSION

Les principaux résultats des manipulations visant à évaluer l'efficacité du protocole analytique choisi ont été analysés. Il en ressort que la méthode de dosage de l'acide oxolinique dans l'eau de mer, le sédiment, l'huître et la palourde, telle qu'elle a été définie, possède une spécificité suffisante et une fidélité acceptable.

La sensibilité de la méthode est suffisante et comparable à celle obtenue par d'autres auteurs. Les limites de détection obtenues par Archimbault *et al.* (1988), Bjorklund (1990), Samuelsen *et al.* (1992) et Steffenak *et al.* (1991) sont respectivement de 10 ng/g (muscle de truite), 10 ng/g (muscle et foie de truite), 10 ng/g (muscle et foie de saumon, moule et crabe) et 5 ng/g (muscle et foie de saumon et de truite).

Les rendements d'extraction de la méthode sont acceptables et comparables à ceux obtenus par d'autres auteurs dans les mêmes matrices. Samuelsen *et al.* (1992) obtenaient un rendement d'extraction dans la moule de l'ordre de 88.0 %. De même, Bjorklund *et al.* (1992) obtenaient un rendement d'extraction dans le sédiment de 70.9 %.

Notre méthode est donc apte à permettre une interprétation efficace des résultats, et est utilisable de manière satisfaisante pour le dosage de l'acide oxolinique dans l'eau de mer, le sédiment, l'huître et la palourde.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous nous étions fixés comme objectif de mettre au point et de valider une méthode analytique de dosage de l'acide oxolinique dans l'eau de mer, le sédiment, l'huître (*Crassostrea gigas*) et la palourde (*Ruditapes philippinarum*) par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

La méthode mise au point est originale dans la mesure où elle diffère des quelques méthodes CLHP jusqu'alors publiées sur le dosage de l'acide oxolinique dans le sédiment et les organismes marins vertébrés et invertébrés.

Notre méthode est spécifique, répétable, reproductible, et linéaire dans la gamme choisie (0.05 à 2.5 µg/ml ou µg/g). Son seuil de dosage est de 0.04 µg/ml ou µg/g avec une précision de  $\pm 10\%$ . La technique de préparation des échantillons permet d'obtenir des rendements d'extraction satisfaisants variant de 68.1 à 102.1 % selon la matrice. Par ailleurs, sa simplicité et sa faisabilité en font une méthode praticable dans tout laboratoire équipé d'une chaîne CLHP. Cette méthode demande néanmoins un soin rigoureux des prélèvements, car l'acide oxolinique est un antibiotique sensible à la lumière.

La mise au point et la validation de cette méthode analytique était un préalable indispensable à toute étude expérimentale ou de terrain relative à la contamination du sédiment et des mollusques bivalves par l'acide oxolinique. Cette méthode vient compléter celle précédemment acquise concernant le dosage CLHP d'un autre antibiotique, l'oxytétracycline, dans l'eau de mer, le sédiment, l'huître, la palourde et le lavagnon (*Scrobicularia plana*) (Pouliquen et Pinault, 1992; Pouliquen *et al.*<sup>1</sup>, 1992; Pouliquen *et al.*<sup>2</sup>, 1992).

La maîtrise des méthodes de dosage de l'oxytétracycline et de l'acide oxolinique doit permettre, dans les mois à venir, d'étudier, de manière expérimentale, la persistance de ces deux antibiotiques dans l'eau de mer, le sédiment et les mollusques bivalves marins. Elle doit aussi permettre de valider cette approche expérimentale par une étude en conditions normales d'exploitation marine salmonicole en cage, au cours et après traitement médicamenteux par ces deux antibiotiques. Cette dernière étude présente l'intérêt de développer le cas de figure pisciculture marine en cage / conchyliculture connu dans de nombreux systèmes estuariens.

L'ensemble du projet aboutira à terme à une meilleure connaissance, d'une part du devenir de l'acide oxolinique et de l'oxytétracycline dans l'environnement marin et d'autre part de leur possibilité de contamination des mollusques de consommation courante. Ces connaissances devront contribuer à une meilleure maîtrise des risques pour la santé humaine liés à l'emploi des antibiotiques dans les productions animales.

## REFERENCES

- Archimbault P, Ambroggi G, Nicolas S. Oxolinic acid in the trout : bioavailability and tissue residues. *Ann Rech Vet* 1988;19:39-43.
- Björklund HV. Analysis of oxolinic acid in fish by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1990;530:75-82.
- Björklund HV, Bylund G. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* 1991;21:1511-1520.
- Björklund HV, Rabergh CMI, Bylund G. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture* 1991;97:85-96.
- Bowser PR, House M. In vitro sensitivity of some fish pathogens to the quinolones naladixic acid and oxolinic acid and the fluoroquinolone enrofloxacin. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 1990;10:48-49.
- Carignan G, Larocque L, Sved S. Assay of oxolinic acid residues in salmon muscle by liquid chromatography with fluorescence detection : interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem* 1991; 74:906-909.
- Cravedi JP, Choubert G, Delous G. Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. *Aquaculture* 1987;60:133-141.
- Cuisinaud G, Ferry N, Seccia M, Bernard N, Sassard J. Determination of nalidixic acid and its two major metabolites in human plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Biomed Appl* 1980;181:399-406.
- Ellis AE. Tissue Residues of chemotherapeutants in fish. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 1991;11:22-28
- Gleckman R, Alvarez S, Joubert DW, Matthews SJ. Drug therapy reviews : oxolinic acid. *Am J Pharm* 1970;36:1077-1079.
- Gowen RJ, Bradbury NB. The ecological impact of salmon farming in coastal waters. A review. *Aquaculture* 1987;25:563-575.
- Hamamoto K. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of oxolinic acid in chicken plasma. *J Chromatogr Biom Appl* 1986;381:453-456.

- Hustvedt SO, Salte R. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of oxolinic acid in fish serum employing solid-phase extraction. *J Chromatogr* 1989;494:335-339.
- Hustvedt SO, Salte R, Kvendset O, Vassvik V. Bioavailability of oxolinic acid in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) from medicated feed. *Aquaculture* 1991;97:305-310.
- Jacobsen MD. Withdrawal times of freshwater rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimetoprim. *J of Fish Diseases* 1989;12:29-36.
- Lang JR, Bolton S. A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry - 2. Statistical analyses. *J Pharmaceut Biomed Anal* 1991;9:435-442.
- Le Bris H, Pouliquen H, Debernardi JM and Buchet V. Experimental study of the oxytetracycline kinetics in shellfish situated in contact with a treated salt-marsh fish farm effluent. (En préparation).
- Lewin CS, Hastings TS. In vitro activities of oxolinic acid, ciprofloxacin and norfloxacin against *Aeromonas Salmonicida*. *J Fish Dis* 1990;13:377-384.
- Martinsen B, Oppegaard H, Wichstrom R, Myhr E. Temperature-Dependent *in vitro* antimicrobial activity of four 4-quinolones and oxytetracycline against bacteria pathogenic to fish. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1738-1743.
- Palmer R, Kawai K, Kusuda R. In vitro activity of quinolone antibacterials against selected fish pathogens. *Gyobyu Kenkyu* 1992;27:131-142.
- Pouliquen H, Keita D, Pinault L<sup>1</sup>. Determination of oxytetracycline in marine shellfish (*Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum* and *Scrobicularia plana*) by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. *J Chromatogr* 1992;627:287-293.
- Pouliquen H, Le Bris H, Pinault L<sup>2</sup>. Experimental study of the therapeutic application of oxytetracycline, its attenuation in sediment and sea water, and implications for farm culture of benthic organisms. *Mar Ecol Pr Ser* 1992;89:93-98.
- Pouliquen H, Pinault L. Méthode de dosage de l'oxytétracycline dans l'eau de mer par chromatographie liquide haute pression. *Ann Fals Exp Chim* 1992;85:111-120.
- Rodgers CJ, Austin B. Oxolinic acid for control of enteric redmouth disease in rainbow trout. *Veterinary Record* 1983;22:83.
- Rogstad A, Hormazabal V, Yndestad M. Simultaneous extraction and determination of oxolinic acid and flumequine in fish tissues by high performance liquid chromatography. *J Liq Chromatog* 1989;12:3073-3086.
- Samuelsen OB. Simple and rapid method for the determination of flumequine and oxolinic acid in salmon (*Salmo salar*) plasma by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J Chromatogr Biomed App* 1990; 530:452-457.

**Samuelsen OB, Lunestad BT, Husevag B, Holleland T, Ervik A. Residues of oxolinic acid in wild fauna following medication in fish farms. Dis Aq Org 1992;12:111-119.**

**Steffenak I, Hormazabal V, Yndestad M. Reservoir of quinolone residues in fish. Food Additives and Contaminants 1991;8:777-780**

**Steffenak I, Hormazabal V, Yndestad M. Rapid assay for the simultaneous determination of residues of oxolinic acid and flumequine in fish tissues by high-performance liquid chromatography. J Liq Chromatogr 1991;14:61-70.**

**Takatsuki K. Gas chromatographic/Mass Spectrometric determination of oxolinic, nalidixic, and piromidic acid in fish. J AOAC Intern 1992;75:982-987.**



## ANNEXE : CHROMATOGRAMMES

A. Eau de mer contenant 0.50 µg/mL d'acide oxolinique (AO).

B. Sédiment contenant 0.40 µg/g d'AO.

A. Huître (*Crassostrea gigas*) contenant 1.40 µg/g d'AO.

### Conditions chromatographiques

Colonne, LiChrocart 125 X 4 mm remplie de phase stationnaire LiChroSpher 100 RP-18 E (5 µm)

Phase mobile, acétonitrile : acide phosphorique 0.02 M (24 : 76 v/v), pH 2.3

Débit, 1.0 mL/min

Longueur d'onde, 262 nm

Echelle de sensibilité, 0.01 AUFS

Atténuation, 3

Volume d'injection, 50 µL

