

N° ordre : 3702

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1
ECOLE DOCTORALE SCIENCES CHIMIQUES

Par Sophie LARDY-FONTAN

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR

SPECIALITE : CHIMIE ANALYTIQUE ENVIRONNEMENT

*Les substances émergentes dans les écosystèmes aquatiques français.
Une application aux alkylphénol-polyéthoxylés et aux substances
pharmaceutiques.*

Soutenue le 9 décembre 2008

Après avis de :

Mme H. FENET, Maître de Conférences, Université de Montpellier 1, Rapporteur
M. P. DOUMENQ, Professeur, Université Paul Cézanne Aix-Marseille III, Rapporteur

Devant la commission d'examen composée de :

M. J.M. SCHMITTER, Professeur, Université Bordeaux 1, Président et Rapporteur de soutenance
Mme H. FENET, Maître de Conférences, Université de Montpellier 1, Rapporteur
M. P. DOUMENQ, Professeur, Université Paul Cézanne Aix-Marseille III, Rapporteur
Mme H. BUDZINSKI, Directrice de recherche CNRS, Université Bordeaux 1
Mme. M. COQUERY, Directrice de recherche, CEMAGREF, Lyon, Examineur

A Marie-Thérèse Lardy

Ma grand-mère,

A André Fontan

Mon grand-père

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit est le résultat d'un travail de thèse, réalisé au laboratoire de Physico- et Toxicochimie (LPTC) des systèmes naturels de l'université Bordeaux I. Son contenu est la somme du travail d'une multitude de personnes, sans qui tout ceci n'aurait pas été possible.

Je voudrais tout d'abord remercier Hélène Budzinski, directrice du laboratoire LPTC (responsable du groupe Contaminants organiques du LPTC lors de mon doctorat) d'avoir dirigé ma thèse. Une nouvelle fois, Merci, d'avoir eu confiance en moi pour conduire cette étude.

Je remercie madame Fenet, enseignant-chercheur de l'université Montpellier 1 et monsieur Doumenq, enseignant-chercheur de l'université Marseille Paul Cézanne d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs et également pour leurs observations, remarques et conseils avisés sur ce manuscrit et ce travail de recherche.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à madame Coquery, directrice de recherche au Cemagref Lyon et à monsieur Schmitter, enseignant-chercheur à l'Institut Européen de Chimie de Bordeaux (IECB) pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je souhaiterais une nouvelle fois réaffirmer ma gratitude aux membres du LPTC pour les expériences transmises et parce que sans ce travail d'équipe, cette thèse n'aurait jamais pu aboutir. Ces remerciements s'adressent tout particulièrement à Karyn Le Menach, Sylvie Augagneur, Patrick Pardon, Laurent Peluhet, Marie-Hélène Devier. Je tiens à remercier Sylvain Coulon, Sylvain Frémy, Nicolas Blanchard et Damien Guillaume pour leur contributions «ponctuelles» à ce travail. Un grand merci à l'ensemble des thésards passés et présents et tout particulièrement à : Anne Togola, Nathalie Tapie, Coralie Soulier, Marion-Justine Capdeville pour leur soutien à ce travail. Une pensée forte pour l'ensemble des autres membres de l'équipe LPTC. Belle route à tous.

Ce travail de thèse repose sur de nombreuses collaborations et a requis la mutualisation de nombreuses forces d'action que je souhaite ici remercier : les membres du LEMA, les membres du SNS et l'ensemble des équipes impliquées dans le programme Seine-Aval ; les équipes de préleveurs et l'ensemble des équipes impliquées dans le programme AMPERES, les marins et les équipes impliquées dans le programme MEDICIS METROC ; les équipes impliquées dans le programme ECCODYN.

D'un point de vue plus personnel, je souhaiterais remercier mes proches pour leur soutien inconditionnel au cours de ces années. Merci pour votre compréhension et vos encouragements.

Pour conclure et cela n'est pas de moindre importance, merci à vous tous pour avoir cru en moi bien souvent plus que moi-même.

Sophie

SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION GENERALE	P 1
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	P 7
MATERIEL ET METHODES	P 112
SYNTHESE	P 144
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	P 193
BIBLIOGRAPHIE	P 198
PUBLICATIONS	P 232
ANNEXES	P 434

INTRODUCTION GENERALE

La prise de conscience des enjeux environnementaux a fortement progressé, en France et dans le monde, ces dernières années. Au centre des préoccupations se trouvent des thèmes comme le changement climatique, l'érosion de la biodiversité ou les liens entre pollutions et santé qu'elle soit humaine ou environnementale. Pour preuves, les projets ambitieux qui ont été initiés, le Protocole de Kyoto (1992) à l'échelle mondiale, le projet REACH, la Directive Loi Cadre sur l'air, la Directive Loi Cadre sur l'eau à l'échelle européenne (avec leurs adoptions par l'ensemble des pays membres), le plan Santé-environnement, la loi sur l'eau et les milieux aquatiques promulguée le 30 décembre 2006 à l'échelle nationale.

Nos sociétés de consommation ont imposé à l'industrie chimique une innovation constante. En conséquence, nous sommes exposés dès la vie utérine à plusieurs milliers de substances chimiques qui ont le potentiel d'engendrer des effets délétères. Depuis la publication de *Silent Spring* par Rachel Carson (1962), une inquiétude croissante quant aux capacités des composés chimiques de l'environnement à exercer des effets profonds et délétères sur les populations sauvages et la santé humaine est née. Depuis les 40 dernières années, un fort intérêt a émergé d'une part de la population scientifique et d'autre part du grand public via le relais des organisations "environnementalistes" à propos des effets délétères, que peuvent avoir certains composés, notamment quant aux systèmes endocriniens.

Contexte Sociétal

Les Français et les préoccupations environnementales

Dans un sondage IFOP pour le Monde du 18/07/2008, 36% des français sondés révélaient être extrêmement préoccupés par la pollution des eaux, en 2^{ème} position de leurs préoccupations environnementales (Figure 1).

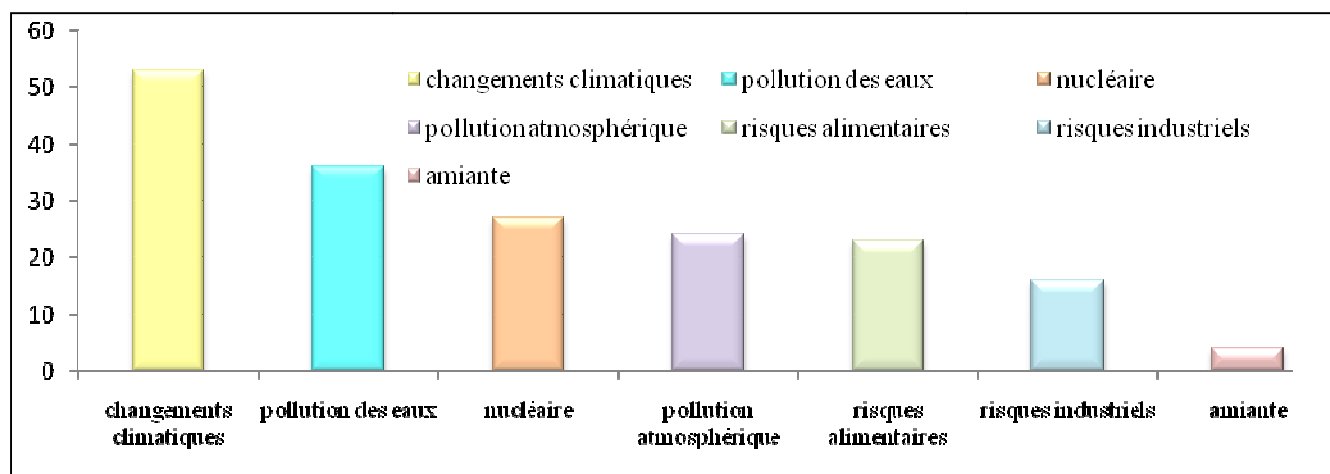


Figure 1 : Les principales préoccupations environnementales des français. Résultats d'un sondage IFOP, Le Monde (18/07/2008).

Petite de revue de presse

Afin de mieux cerner le contexte général dans lequel ce sujet d'étude se positionne, une revue de presse (non-exhaustive) a été réalisée afin de présenter le traitement journalistique des deux-trois dernières années. Parmi les titres qui ont fait la une, il peut être cité :

- ☞ “Des poissons qui changent de sexe, des humains qui deviennent résistants aux antibiotiques... Et si c'était la faute d'une nouvelle forme de pollution de l'eau causée par une consommation excessive de médicaments” Revue Prescrire cité par Alexandra Etchkenasi pour Le Parisien (02/07/07) ;
- ☞ “Environnement : les eaux polluées par les médicaments” par Martine Perez pour Le Figaro (14/10/2007) ;
- ☞ “A la recherche des nouveaux polluants dans les eaux usées. L'infiniment petit est-il infiniment polluant?” par Marielle Court pour Le Figaro (15/10/2007) ;
- ☞ “Trop de médicaments dans les fleuves français” LCI, 02/07/2007 ;
- ☞ “L'usage des stupéfiants analysé dans les égouts” par Nicolas Granet pour Le Figaro (15/10/2007) ;
- ☞ “Médicaments : gare à la pollution” par Anne Jeanblanc pour Le Point (04/06/2007) ;
- ☞ “Ces médicaments qui polluent les rivières” par Marielle Court pour Le Figaro (18/04/2008) ;
- ☞ “Les médicaments rendent les rivières malades” par Florence Pitard pour Ouest France (21/09/2008).

Tout ceci suggère que la problématique de la caractérisation de la contamination des milieux par les polluants émergents est au cœur des préoccupations des français et qu'une recherche est plus que jamais nécessaire afin d'apporter des éléments de réponse quant aux risques liés à la présence de ces molécules dans l'environnement.

Contexte de recherche

Parce que les milieux aquatiques ont toujours été intimement liés à l'essor économique : croissance démographique, essor industriel, agriculture intensive, tourisme de masse; ils sont devenus l'ultime déversoir des déchets liés à nos modes de vie. Il n'est donc pas surprenant de constater des troubles liés à des perturbations des systèmes endocriniens chez les organismes vivant dans des systèmes aquatiques fortement impactés par les activités anthropiques. Deux exemples emblématiques des phénomènes de perturbation endocrinienne en milieu aquatique sont la découverte de gardons présentant d'importantes malformations des testicules dans certaines rivières britanniques impactées par des rejets de station d'épuration (Jobling et al., 1998) et celle de gastéropodes marins masculinisés après une exposition chronique à un biocide, le tributylétain (revue par Sumpter, 2003).

D'importants efforts de recherche ont été portés, en Europe (programme POSEIDON, programme BEEP, programme COMPRENDO) et en France (PNETOX, PNSE) (Figure 2), afin d'identifier et de caractériser les sources de pressions et les molécules, dites émergentes, susceptibles d'engendrer ces effets toxiques.

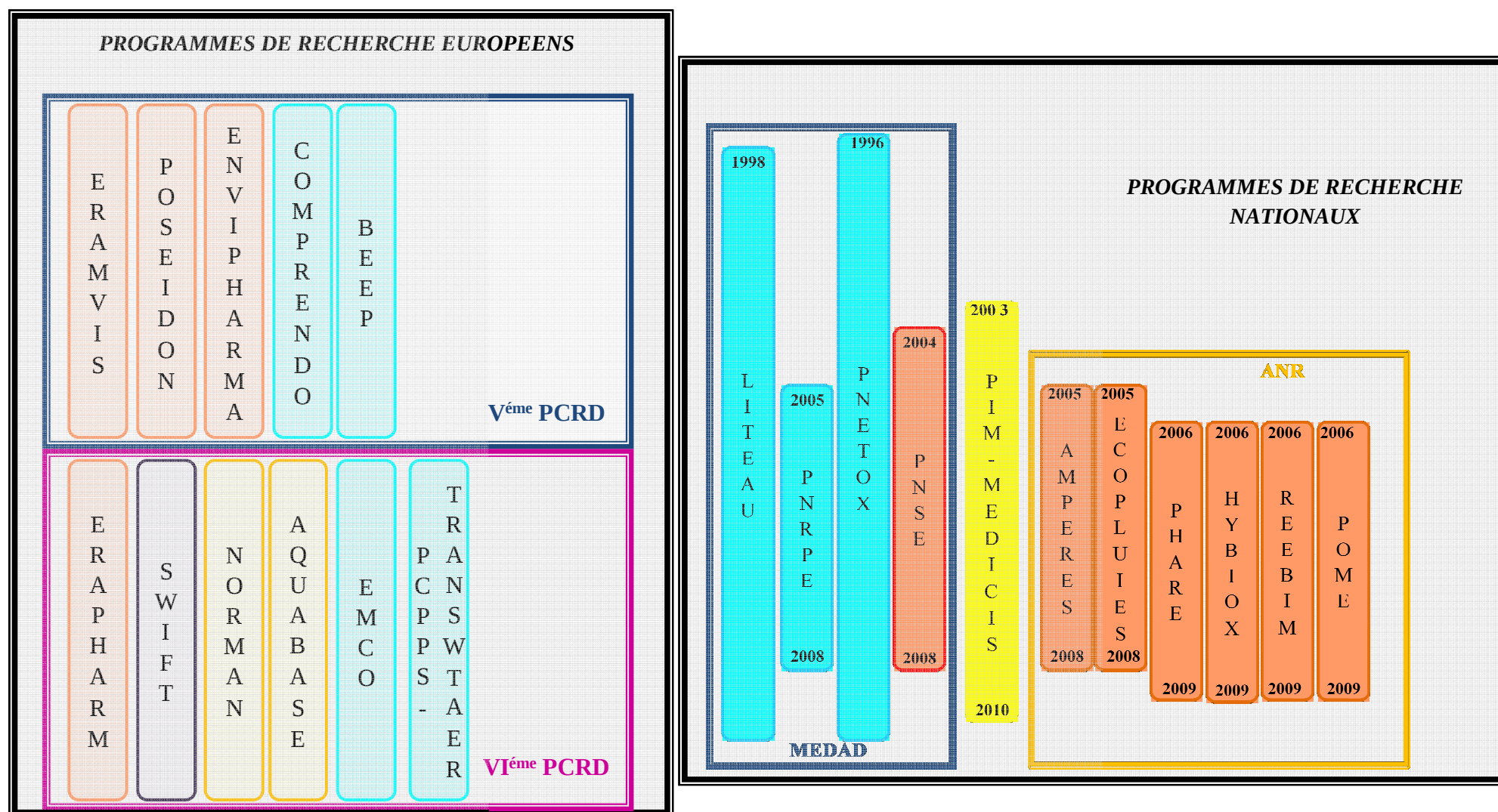


Figure 2 : Principaux programmes de recherche en Europe et en France sur la période 1998-2008.

Dès 2002, l'Agence Américaine de protection de l'environnement (EPA) avait entrepris des études visant à caractériser les pressions de contamination sur l'ensemble de son territoire. Cette investigation a récemment été reconduite et les résultats ont été publiés en 2008 par Foccazzio et al.; ils mettent en évidence que les molécules présentant un problème majeur, dans les eaux de surface et les eaux souterraines, sont les molécules dites émergentes (de part leur nombre de détection et les concentrations mesurées) : PCPP (Produits de soins corporels et pharmaceutiques, vert), pesticides et agents industriels (plastifiants et détergents, rose) (Figure 3).

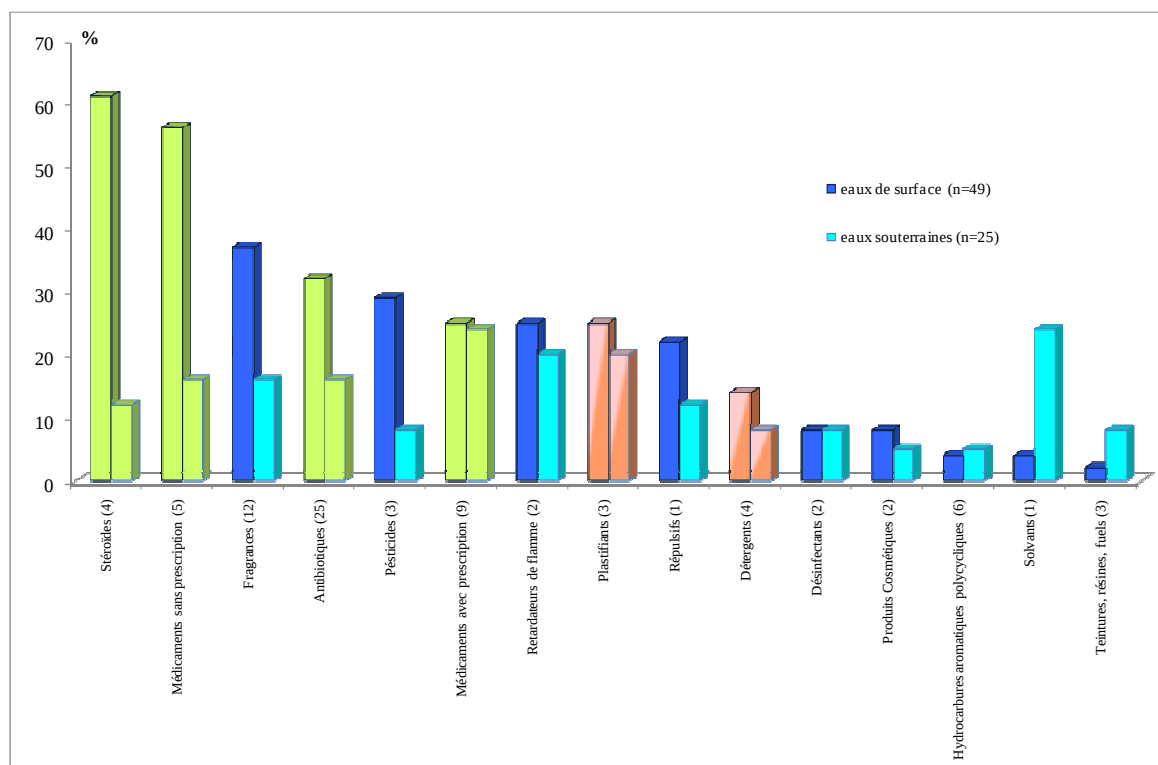


Figure 3 : Fréquence de détection de différentes classes de contaminants organiques dans les eaux de surface et souterraines aux Etats-Unis (Foccazzio et al., 2008).

Ainsi, une substance émergente est généralement définie comme une substance dont la présence dans l'environnement est avérée mais qui n'est pas encore réglementée. Sous ce terme générique, un nombre important de molécules sont regroupées : les hormones, les substances pharmaceutiques, les produits de soins corporels, les nouveaux pesticides et les perturbateurs endocriniens. En Europe, la prise de conscience des risques environnementaux s'est traduite par la mise en place d'un cadre réglementaire visant à réduire les rejets de substances dangereuses dans les milieux naturels et l'étude de leur devenir dans les milieux naturels. Les nombreux efforts conduits, notamment à l'échelle européenne, vont dans le sens d'une connaissance de la qualité environnementale (chimique) des différentes ressources en eau disponibles et de leurs évolutions. En France, contrairement à d'autres pays européens : Allemagne, Suisse, Royaume-Uni, Espagne, Italie,

Pays Nord-européens, les données de présence de ces substances sont parcellaires et ne permettent pas de conduire une réelle évaluation des risques induits par leur présence.

Dans ce contexte, les objectifs de ces travaux ont été l'étude de 3 classes de polluants organiques d'intérêt: les alkylphénol-polyéthoxylés, le bisphénol A et les substances pharmaceutiques dans les systèmes aquatiques ; d'une part par le développement et l'optimisation de méthodologies analytiques permettant leur identification et quantification dans l'environnement et d'autre part par l'étude de leur devenir et de leur présence dans les sources et dans les systèmes récepteurs.

Dans une **première partie** ce manuscrit présente un état de l'art des connaissances organisé tout d'abord autour des agents industriels: alkylphénol-polyéthoxylés et bisphénol A, ensuite autour des substances pharmaceutiques (nature des composés, études des sources, étude du devenir et données de présence dans les systèmes aquatiques, effets toxiques et risques écotoxicologiques liés à leur présence dans les écosystèmes aquatiques). Enfin, dans un troisième chapitre, une présentation des méthodologies analytiques, de l'échantillonnage à la validation des données, pour les 3 classes de molécules organiques considérées dans cette étude est donnée.

Dans une **deuxième partie**, les méthodologies analytiques développées et employées pour l'étude de ces molécules dans les systèmes aquatiques sont exposées. Les systèmes étudiés sont également présentés dans un contexte socioéconomique.

Dans une **troisième partie**, une synthèse des résultats obtenus dans le cadre de ces travaux de thèse sera présentée et discutés : méthodologies analytiques développées et validées pour l'étude des alkylphénol-polyéthoxylés dans les matrices environnementales ; les principaux résultats obtenus suite aux développements et à l'application de nouvelles méthodologies d'échantillonnages pour l'étude des écosystèmes aquatiques ; la présence et le devenir des alkylphénol-polyéthoxylés et des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration françaises ; les données acquises par les 5 années de suivi des alkylphénol-polyéthoxylés en estuaire de Seine ; les données de présence et de devenir des alkylphénol-polyéthoxylés et des substances pharmaceutiques dans les systèmes littoraux français. Ce travail sera complété par la **quatrième partie** qui présente les 10 publications réalisées dans le cadre de ce travail de thèse.

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

Sommaire

CHAPITRE A.....	12
LES AGENTS INDUSTRIELS.....	12
LES ALKYLPHENOL-POLYETHOXYLES.....	13
I Généralités sur les alkylphénol-polyéthoxylés.....	14
I.1 Voies de synthèse et production des alkylphénol-polyéthoxylés.....	14
I.1.1 Voies de synthèse des alkylphénols.....	14
I.1.2 Voies de synthèse des alkylphénol-polyéthoxylés.....	14
I.2 Les propriétés physiques et chimiques des APEO.....	15
I.3 Domaines d'usages et applications.....	16
II Les sources.....	17
II.1 Le devenir des alkylphénol-polyéthoxylés dans les stations d'épuration.....	18
II.1.1 Les phénomènes de biodégradation.....	18
II.1.2 Efficacité des processus mis en œuvre dans les STEP.....	19
II.2 Présence dans les effluents de STEP.....	22
II.3 Présence dans les boues.....	23
III Devenir dans l'environnement, cas des écosystèmes aquatiques.....	24
III.1 Les phénomènes de dégradation en milieu naturel.....	25
III.1.1 Les phénomènes de photodégradation.....	25
III.1.2 Les phénomènes de biodégradation.....	25
III.2 Les phénomènes de sorption dans les milieux naturels.....	26
III.3 Effets des APEO sur le cycle biogéochimique d'autres contaminants organiques présents dans les systèmes aquatiques.....	27
III.4 Données de présence dans les phases aqueuses.....	27
III.5 Données de présence dans les sédiments.....	29
III.6 Devenir dans les organismes vivants.....	29
III.6.1 Les propriétés de bioconcentration et bioaccumulation.....	29
III.6.2 La Biotransformation.....	31
IV La toxicité.....	33
IV.1 La toxicité aiguë.....	33
IV.2 La toxicité chronique.....	33
IV.3 Les APEO en tant que perturbateurs endocriniens.....	34
Test YES.....	35
IV.4 Autres effets toxiques des alkylphénol-polyéthoxylés.....	36
V Quelques aspects législatifs et réglementaires.....	37
LE BISPHENOL A.....	39
I Généralités sur le Bisphénol A.....	40
I.1 Voies de synthèse et production du Bisphénol A.....	40
I.2 Principales propriétés caractéristiques du bisphénol A.....	40
I.3 Domaines d'usages et applications.....	40
II Les sources de bisphénol A dans l'environnement.....	42
II.1 Le devenir du bisphénol A dans les décharges.....	43
II.2 Le devenir du bisphénol A dans les stations d'épuration.....	43
II.3 Le bisphénol A dans les effluents de STEP : données de présence.....	44
III Le devenir du bisphénol A dans l'environnement, cas des écosystèmes aquatiques.....	44
III.1 Les phénomènes de dégradation en milieux naturels.....	44
III.1.1 Les phénomènes de photolyse.....	44
III.1.2 Les phénomènes de biodégradation.....	45
III.2 Les phénomènes de sorption en milieux naturels.....	46
III.3 Les données de présence du Bisphénol A dans les systèmes aquatiques.....	46
III.4 Les propriétés de bioconcentration et bioaccumulation.....	47
III.5 Les propriétés de biotransformation.....	47
IV La toxicité.....	47
IV.1 La toxicité aiguë et chronique.....	47
IV.2 Le bisphénol A et la perturbation endocrinienne.....	48

IV.2.1	Effets in vitro	48
IV.2.2	Effets in vivo	49
V	Quelques aspects législatifs et réglementaires	50
CHAPITRE B.....	52	
LES SUBSTANCES PHARMACEUTIQUES.....	52	
I	Les produits de soins corporels et médicamenteux PCPPs (Personal Care Products and Pharmaceuticals)	53
I.1	PCPP : le cas des substances pharmaceutiques	53
I.1.1	Les grandes classes thérapeutiques de substances pharmaceutiques à usages humains..	54
I.1.2	Les données de consommation en France	59
I.1.3	Pharmacocinétique: Devenir des substances pharmaceutiques dans l'organisme.....	63
I.1.4	La notion de fraction excrétée par l'organisme de la substance active ($F_{excreta}$)	64
II	Les sources de produits pharmaceutiques dans l'environnement.....	64
II.1	Les différentes sources de substances pharmaceutiques pour l'environnement (Kummerer, 2004)	64
II.2	Les stations d'épuration : Principales sources des substances pharmaceutiques dans l'environnement.....	65
II.2.1	Les technologies courantes.....	65
II.2.2	Les paramètres d'abattement des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration	66
II.2.3	Paramètres affectant l'abattement des substances pharmaceutiques au sein des stations d'épuration	68
II.2.4	Les traitements tertiaires.....	69
II.3	Synthèse de données de présence des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration.....	70
II.3.1	Données de présence dans les phases dissoutes des effluents de stations d'épuration.....	71
II.3.2	Données de présence dans les boues de stations d'épuration.....	73
III	Le devenir des substances pharmaceutiques dans les systèmes aquatiques.....	75
III.1	Les phénomènes de dégradation en milieux naturels.....	75
III.1.1	La photodégradation.....	75
III.1.2	La biodégradation	76
III.2	Distribution dans la phase aqueuse.....	77
III.3	Phénomènes de sorption	77
III.4	Données de présence dans l'environnement.....	77
III.5	Transferts aux organismes aquatiques.....	78
IV	La toxicité des substances pharmaceutiques au sein des systèmes aquatiques.....	79
IV.1	La toxicité aiguë.....	79
IV.2	La toxicité chronique.....	80
IV.3	Effets des mélanges.....	81
IV.4	Toxicité des produits de dégradation et des métabolites.....	82
IV.5	Substances pharmaceutiques en tant que perturbateurs endocriniens.....	84
IV.6	Evaluation des risques liés à la présence de substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques.....	85
IV.6.1	Présentation du modèle d'évaluation des risques proposé par l'Agence Européenne du Médicament (EMA).....	85
IV.6.2	Valeurs de PNEC pour certaines molécules pharmaceutiques	87
IV.1	.Contexte réglementaire.....	89
CHAPITRE C.....	90	
METHODOLOGIES ANALYTIQUES	90	
I	Description conceptuelle d'une méthode analytique.....	91
I.1	Introduction.....	91
I.2	Les nouvelles approches liées à la mise en œuvre de la Directive Cadre-Eau (DCE) ...	91
II	Les techniques d'échantillonnages pour la mesure de la qualité chimique. Cas des matrices aqueuses.....	92
II.1	Les techniques d'échantillonnages in situ. Echantillonnages ponctuels	92

II.2	Les techniques de biomonitoring	92
II.3	Les nouvelles techniques d'échantillonnages : l'échantillonnage intégratif	93
II.3.1	<i>Principes de l'échantillonnage passif</i>	94
II.3.2	<i>Outils d'échantillonnages intégratifs et composés polaires.....</i>	95
III	Les techniques d'extraction	96
III.1	Les techniques d'extraction des matrices liquides.....	96
III.2	Les méthodes d'extraction des matrices solides ou semi-solides : particules, sédiments, boues, matrices biologiques	99
	Inconvénients.....	100
	Références	100
IV	Les techniques chromatographiques	101
IV.1	L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG)	101
IV.1.1	<i>Les principaux couplages</i>	101
IV.1.2	<i>Les couplages de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse</i>	101
IV.2	L'analyse par chromatographie en phase liquide (CL)	101
IV.2.1	<i>Les principaux couplages</i>	102
IV.2.2	<i>Les couplages de chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse (CL-SM)</i>	102
IV.3	Le problème des effets matriciels.....	103
IV.4	Réflexion d'harmonisation à l'échelle européenne.....	104
	Bilan.....	109
	Objectifs de thèse.....	110

CHAPITRE A

LES AGENTS INDUSTRIELS

LES ALKYLPHENOL-POLYETHOXYLES

I Généralités sur les alkylphénol-polyéthoxylés

I.1 Voies de synthèse et production des alkylphénol-polyéthoxylés

Les alkylphénol-polyéthoxylés (APEO) sont des composés chimiques d'origine anthropique, uniquement. Ils font partie de la vaste classe des surfactants non-ioniques et présentent une caractéristique essentielle : ce sont des molécules amphiphiles. L'élément de base de la molécule est un noyau phénolique sur lequel est substitué un radical alkyle. La molécule comprend un nombre variable de groupes éthoxylés (-CH₂-CH₂-O-) (Figure 1).

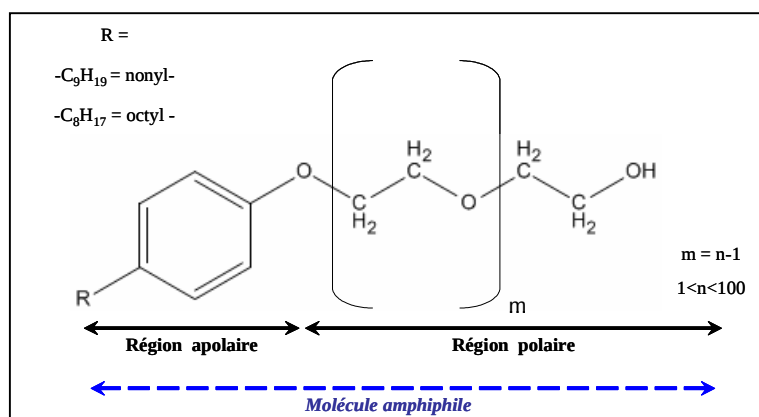


Figure 1: Molécule d'alkylphénol-polyéthoxylé.

I.1.1 Voies de synthèse des alkylphénols

Les alkylphénols d'importance commerciale sont fabriqués quasi exclusivement par réaction catalytique entre une oléfine et un phénol, un crésol ou un xylénol (Reed, 1978). Les oléfines résultent des opérations de pétrochimie. Le nonylphénol (NP) est produit industriellement par réaction entre un phénol et un mélange d'isomères du nonène, en présence d'un acide catalytique. La production européenne de nonylphénols était de 73 500 tonnes en 1997 (INERIS, 2005). L'octylphénol (OP) est issu de l'alkylation d'un phénol et du diisobutylène suivie par une distillation sous vide. Les solutions d'alkylphénols sont des mélanges d'isomères (chaînes alkyles ramifiées). Le nonylphénol technique est une solution qui contient 22 isomères du NP (Maguire, 1999). 90 % des alkylphénols présentent leur radical alkyle en position *para*, moins de 10 % en position *ortho* (Maguire, 1999).

I.1.2 Voies de synthèse des alkylphénol-polyéthoxylés

Les alkylphénols sont principalement utiles pour synthétiser des surfactants non-ioniques (un surfactant ou tensioactif est une molécule amphiphile de faible poids moléculaire, <1000 g.mol⁻¹, qui présente une partie hydrophobe (chaîne de 6 à 20 carbones en moyenne) et une partie hydrophile (COO-, (-CH₂-CH₂-O-)) de type alkylphénol-polyéthoxylés par une réaction d'éthérification. Les alkylphénols les plus utilisés sont les nonylphénol-polyéthoxylés (NPEO), et les octylphénol-polyéthoxylés (OPEO) (80% et 20% respectivement) (Figure 3). La production mondiale d'APEO a été estimée à environ 500 000 tonnes pour l'année 1998, (d'après l'ASPA, Syndicat National des

fabricants d'Agents de surface et de Produits Auxiliaires industriels), le prix des nonylphénol-polyéthoxylés (NPEO) est de 1,2€.kg⁻¹ mais varie avec la pureté du produit (INERIS, 2005).

I.2 Les propriétés physiques et chimiques des APEO

Les propriétés physico-chimiques des APEO sont déterminées d'une part par la longueur de leur chaîne éthoxylée et d'autre part par la nature de leur radical alkyle (longueur et isomérie). La solubilité augmente avec la longueur de la chaîne éthoxylée, avec l'arborescence du radical alkyle (Talmage, 1994), avec la température (2°C et 25°C) (Ahel, 1993); elle diminue lorsque la longueur du radical alkyle augmente (Tableau 1). La lipophilie (ou hydrophobicité) des APEO augmente lorsque la longueur de la chaîne éthoxylée diminue (Ahel and Giger, 1993). Les valeurs de Koc (ou constante organique des sols qui définit la distribution d'un composé entre les phases liquides et solides des sols) obtenues pour différents AP et APEO tendent à mettre en évidence que ces composés ont une bonne affinité pour la composante particulaire (sols, sédiments) et que cette affinité est d'autant plus élevée que la longueur de leur chaîne éthoxylée diminue (Tableau 1).

L'ensemble des propriétés physico-chimiques résumées dans le Tableau 1 semble montrer que les APEO et leurs métabolites possèdent de bonnes capacités de dispersion dans l'environnement et spécifiquement dans les systèmes aquatiques (bonne solubilité, valeur de log Kow laissant supposer une bonne affinité pour les phases solides, valeurs de Koc laissant supposer une bonne affinité pour les composantes organiques, valeur de pression de vapeur mettant en évidence de faibles propriétés de volatilisation).

Tableau 1 : Les principales propriétés physiques et chimiques des APEO et des AP.
(a) Ahel, 1993 (b) Ahel and Giger, 1993 (c) Ferguson et al., 2001

Nom de la molécule	Numéro de CAS	Formule chimique	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité aqueuse (mg.l ⁻¹ à 20,5°C)	Log Kow	Koc (l.kg ⁻¹)
Nonylphénol technique 4-NP	84852-15-3	C ₁₅ H ₂₄ O	220,3	5,43 ^(a)	4,5 ^(b)	245 ^(c)
Nonylphénol-monoéthoxylé 4-NP1EO	-	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	281,4	3,02 ^(a)	4,1 ^(b)	288 ^(c)
Nonylphénol-diéthoxylé 4-NP2EO	-	C ₁₉ H ₃₂ O ₃	308,5	3,38 ^(a)	4,2 ^(b)	151 ^(c)
Nonylphénol-tetraéthoxylé 4-NP4EO	-	C ₂₃ H ₄₀ O ₆	396,6	7,65 ^(a)	4,3 ^(b)	-
Nonylphénol-nonaéthoxylé 4-NP9EO	-	C ₃₃ H ₆₀ O ₁₀	616,8	Soluble dans l'eau ^(a)	4,1 ^(b)	-
Octylphénol 4-OP	140-66-9	C ₁₄ H ₂₂ O	206,3	12,6 ^(a)	4,1 ^(b)	151 ^(c)

I.3 Domaines d'usages et applications

Les APEO sont employés dans des domaines d'application très larges en tant que détergents, émulsifiants, agents de mouillage et agents dispersants (Figure 2).

Les principaux secteurs d'utilisation des APEO sont les suivants (INERIS, 2005) :

- Production et formulation de produits destinés au secteur industriel (ils sont présents dans des produits détergents, dispersants, désinfectants, des floculants pour le traitement des eaux usées),
- Polymères en émulsion et peintures,
- Produits phytosanitaires, engrais ("Alex Pack", "Agral 90"),
- Industrie électronique et électrique,
- Nettoyage industriel, institutionnel, domestique,
- Tanneries, industrie textile,
- Production de pâtes à papier,
- Additifs pour lubrifiants et carburants.

Depuis leur première synthèse dans les années 40, leur production et leurs usages n'ont cessé de croître de manière exponentielle. Dans une récente revue, Soares et al. (2008) rapportent des productions annuelles de nonylphénol de l'ordre de 154 200 tonnes aux Etats Unis, 73 500 tonnes en Europe, 16 500 tonnes au Japon et près de 16 000 tonnes en Chine. En France, les volumes de vente de nonylphénols et autres alkylphénols ne sont pas connus (INERIS, 2005).

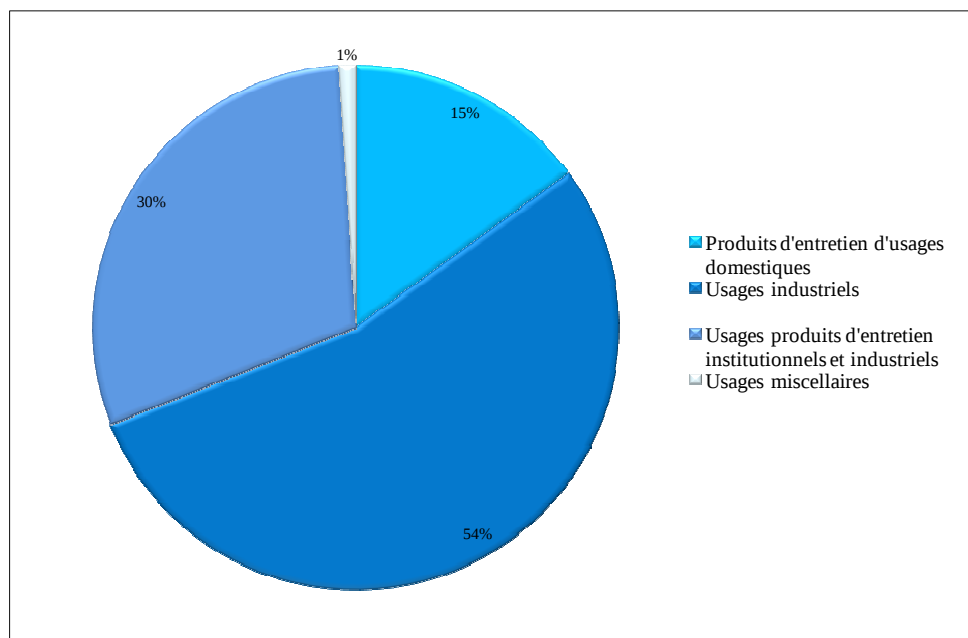


Figure 2 : Principaux usages des APEO (d'après Renner, 1997).

Les APEO sont utilisés en mélange (différentes longueurs de chaînes éthoxylées, différentes isoméries) et également en tant que composants de nombreux produits manufacturés (produits

cosmétiques, peintures, produits détergents), ce qui engendre une grande complexité quant à la maîtrise de leur devenir environnemental (multiplication des sources).

Renner (1997) estime que près de 60 % des APEO produits sont rejetés dans les écosystèmes aquatiques. Afin de comprendre leur devenir dans cet environnement, il est important d'identifier et de quantifier leurs sources, de comprendre les mécanismes conditionnant leur devenir dans les écosystèmes aquatiques (dégradation, stockage). Il est également nécessaire de connaître leur impact sur les organismes du milieu (toxicité, modes d'action).

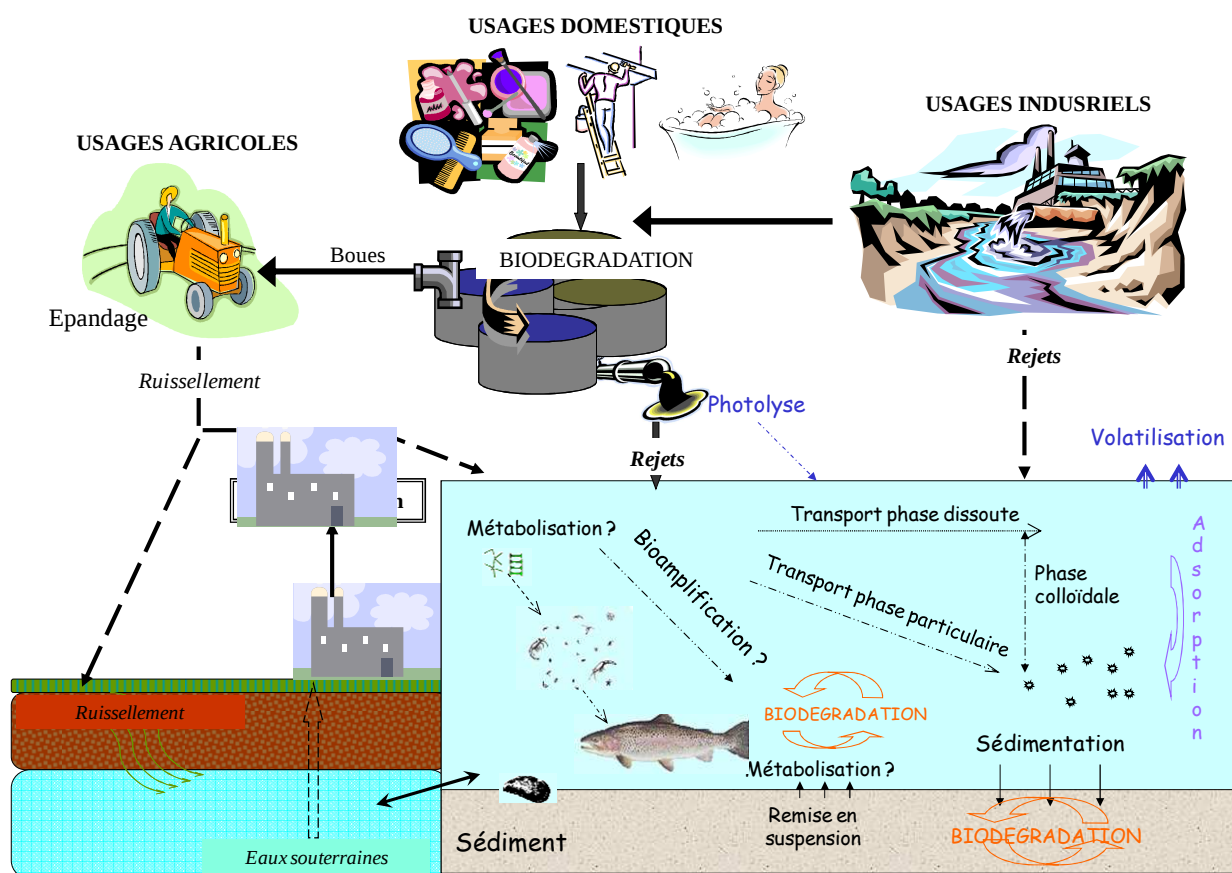


Figure 3 : Cycle biogéochimique des APEO dans l'environnement.

II Les sources

Les APEO et leurs dérivés entrent dans l'environnement par 3 voies majoritaires :

- les eaux de ruissellement

Cette source apparaît minoritaire, essentiellement liée aux usages agricoles (APEO en association aux pesticides, APEO liés aux épandages). En effet certaines études ont pu mettre en évidence une dégradation (minéralisation) rapide des NP associés aux boues lors d'épisodes d'épandage (revue par Soares et al., 2008).

- les rejets industriels

Un certain nombre d'études se sont attachées à identifier les sources d'entrée des APEO dans les écosystèmes aquatiques, les rejets industriels en font bien évidemment partie dans des proportions qui peuvent être très importantes. En France, la DRIRE de Champagne-Ardenne (INERIS, 2005) a réalisé une étude sur les rejets des grandes industries de la région. Elle annonce des rejets de l'ordre de 133 g.j^{-1} de nonylphénol (4-NP uniquement) par les industries textiles, près de 10 g.j^{-1} pour les industries agro-alimentaires. L'hypothèse que ces rejets contiennent également un grand nombre de dérivés d'APEO (non mesurés) de longueur variable du fait de la nature des produits industriels, autant de sources de NP potentielles par dégradation, peut-être avancée. Ces premières tendances ont été confirmées par les données du RSDE publiées en 2008 (INERIS).

- les rejets de stations d'épuration (urbaines et industrielles)

Les stations d'épuration (mixtes, industrielles, urbaines) apparaissent comme étant la source principale d'APEO dans l'environnement. Les processus de traitement des eaux usées sont présentés dans l'Annexe II afin de faciliter la lecture du document.

II.1 Le devenir des alkylphénol-polyéthoxylés dans les stations d'épuration

II.1.1 Les phénomènes de biodégradation

Les phénomènes de dégradation et de transformation biologiques (Figure 4 ; Ahel, 1994) sont importants dans le cas des APEO. Le mécanisme de biodégradation s'articule selon deux étapes :

a) La biodégradation primaire

C'est un procédé selon lequel la molécule d'APEO est oxydée et altérée suffisamment pour qu'elle perde ses propriétés de tensioactif. La voie majoritaire de biodégradation est la perte successive de groupements «éthoxy» (White R, 1994). En conditions anaérobies, les produits de dégradation sont majoritairement des AP1EO et AP2EO. En conditions aérobies, les produits de dégradation sont des acides alkylphénoxy-polyéthoxyacétiques (APEC), plus particulièrement AP1EC et AP2EC (Ahel, 1994) (Figure 4) des acides carboxyalkylphénoxy-polyéthoxyacétiques CAPEC (Di Corcia et al., 1998; Lu et al., 2008a; Soares et al., 2008). L'alkylphénol est quant à lui le produit de biodégradation primaire ultime, en condition aérobie et anaérobie (Ahel, 1994) (Figure 4). Des études menées en laboratoire ont également montré que la vitesse de biodégradation est d'une part dépendante de l'agitation des eaux (le phénomène est d'autant plus rapide que l'agitation de l'eau est élevée) et d'autre part de la température (lorsque la température du milieu augmente la vitesse du phénomène augmente) (Ahel, 1994). La biodégradation primaire se déroule principalement au sein même des stations d'épuration (STEP), elle est favorisée par la présence de micro-organismes (Ahel, 1994 ; Corvini et al., 2006).

b) La biodégradation ultime

Ce procédé conduit à la conversion complète des molécules en CO₂, H₂O et sels minéraux (Ahel, 1994). La biodégradation du NP par les bactéries semble être ubiquiste (Corvini et al., 2006). La plupart des micro-organismes capables de dégrader le NP sont du genre *Sphingomonas*, *Bacillus*. Ce phénomène est sous le contrôle d'un certain nombre de paramètres : position et longueur de la chaîne alkyle, structure de la chaîne alkyle, concentration initiale en NP, pH, concentration en oxygène (aération) (Corvini et al., 2006).

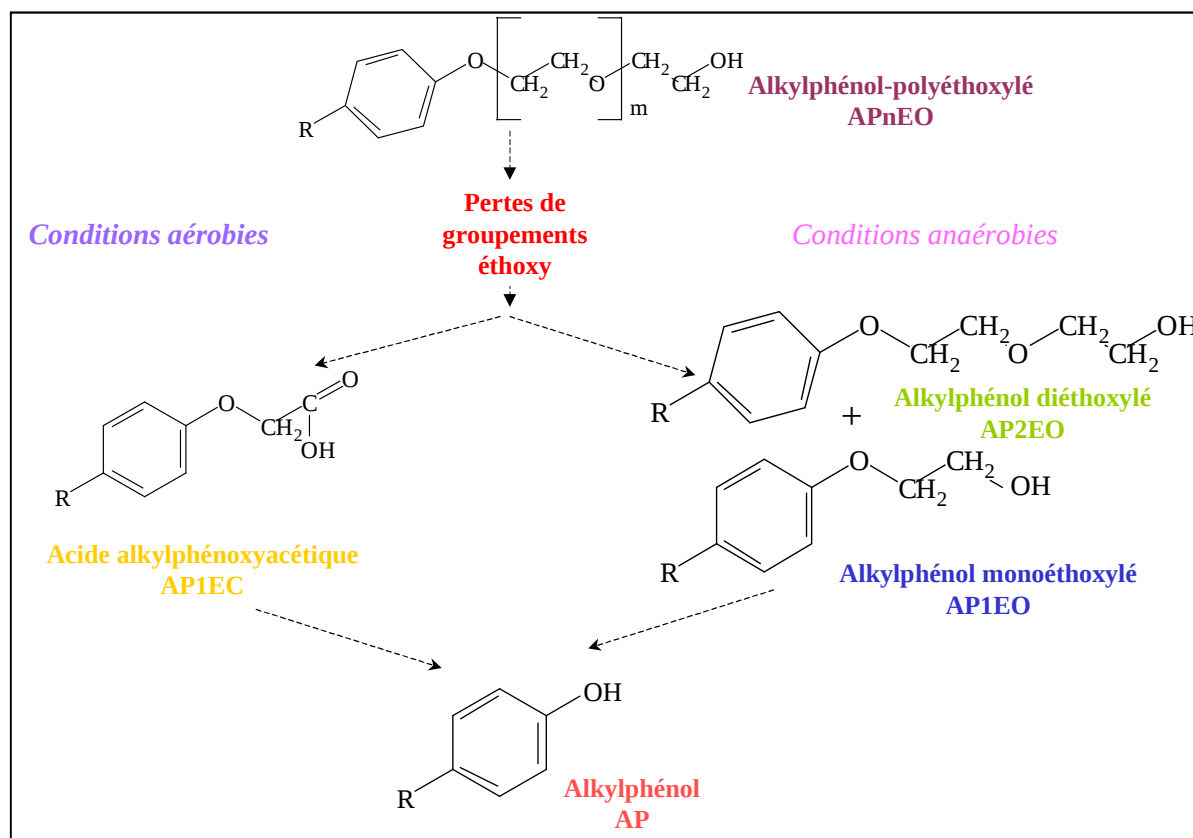


Figure 4 : Schéma de la biodégradation des APEO.

II.1.2 Efficacité des processus mis en œuvre dans les STEP

L'étude du devenir des APEO dans les stations d'épuration ainsi que l'évaluation des processus mis en œuvre est complexe (Figure 5) mais néanmoins indispensable pour conduire des évaluations des risques dans les systèmes naturels ; les principaux éléments ont récemment été résumés par Teske et Arnold (2008).

Les traitements préliminaires et primaires sont peu efficaces pour l'élimination des APEO, en particulier le NP (Keller et al., 2003). Les traitements secondaires, biologiques, sont le siège d'une activité intense qui, dans le cas des APEO, conduit à un abattement significatif dans les phases aqueuses comme le met en évidence le Tableau 2. Dès 1994, Ahel et al. concluaient que le NP était aussi sensible aux mécanismes d'abattelements secondaires que les autres contaminants organiques majeurs.

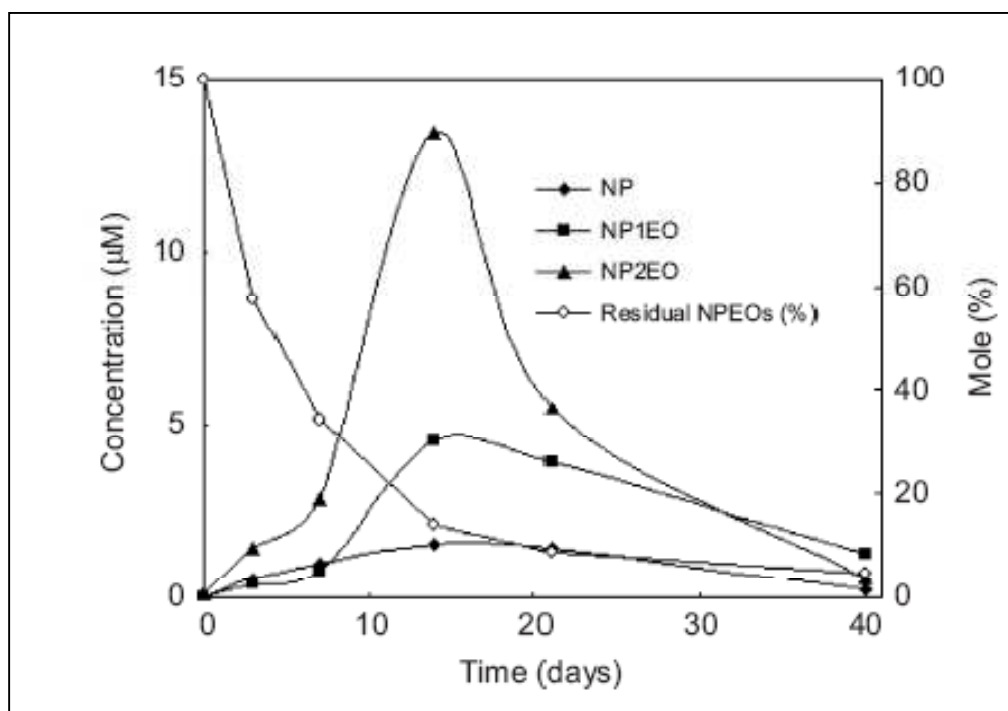


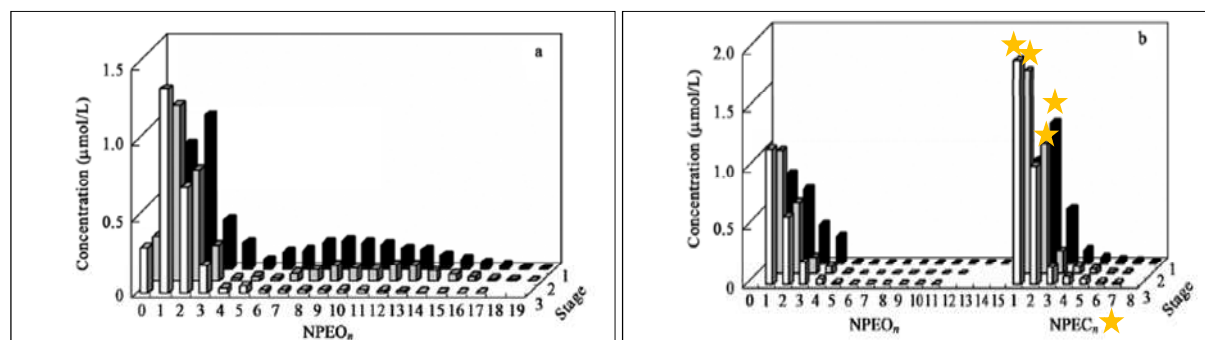
Figure 5 : Complexité du devenir des APEO et de leurs métabolites de biodégradation. Exemple des changements de concentrations en métabolites durant la période de biodégradation au cours de processus de boues activées dénitrifiantes (d'après Lu et al., 2008b).

Tableau 2 : Efficacité des traitements de STEP quant à l'abattement des APEO (Bruchet , 2006).

Type de traitements secondaires	Observations
Boues activées en aération prolongée	↘93 % NP ↘90 % NP1EO ↘91 % NP2EO ↘76 % OP
Boues activées moyennes charges	↘72 % NP ↘94 % NP1EO ↘92 % NP2EO ↘70 % OP
Biofiltres	↘93 % NP ↘97 % NP1EO ↘84 % NP2EO ↘60 % OP
Lits bactériens	↘66 % NP ↘71 % NP1EO ↘27 % NP2EO ↘30 % OP
Lagunage	↘98 % NP ↘99 % NP1EO ↘99 % NP2EO ↘98 % OP

Le devenir des APEO dans les stations d'épuration est bien renseigné (Giger et al., 1987 ; Nasu et al., 2001 ; Lu et al., 2008b ; Zhang et al., 2008a ; Soares et al., 2008 ; Corvini et al., 2006).

Les boues activées sont le siège d'une biodégradation intense, en condition anaérobie (Chang et al., 2005 ; Lu et al., 2008a) et aérobie (Ahel, 1994 ; Tanghe et al., 1998), conduisant à la formation de NP, NP1EO, NP2EO, NP1EC, NPEC et CAPEC (Loyo-Rosales et al., 2007 ; Teske et Arnold, 2008) (Figure 6). Comme récemment affirmé par Hernandez-Raquet et al. (2007), les processus de digestion en conditions anaérobies sont plus performants pour l'élimination des NP, NP1EO et NP2EO que les traitements de digestion anaérobie.



★ Présence des formes acides APEC dans les rejets issus de processus de traitements aérobie

Figure 6 : Distribution en homologues d'APEO et de leurs métabolites de biodégradation dans des effluents de STEP a) dans un effluent anaérobie ; b) dans un effluent aérobie (Zhang et al., 2008a).

Des paramètres tels que le temps de résidence hydraulique, la concentration initiale en composés d'intérêt (concentration en NPEO, concentration en NP), la nature du substrat organique sont autant de paramètres qui peuvent affecter l'élimination des APEO et AP dans les stations d'épuration (Zhang et al., 2008a ; Lu et al., 2008a ; Soares et al., 2008). Les processus de biodégradation anaérobie dans les boues sont pH-dépendants et thermo-dépendants (Lu et al., 2008a ; Zhang et al., 2008a). Selon la source de l'inoculum, des résultats très différents ont été mis en évidence, preuve que les aspects biologiques sont un des points centraux pour expliquer le devenir des APEO dans les processus mis en œuvre dans les STEP. Teske et Arnold (2008) concluent que l'élimination des NP1EO, NP2EO et NP au cours des traitements conventionnels est vraisemblablement sensible aux paramètres opérationnels des usines de traitements.

Dès 1994, Ahel et al. avaient montré que plus de 90 % des NP étaient rejetés via les boues. La principale voie d'élimination des NP est la filière boues en raison de sa grande affinité pour les phases solides ($\log K_{ow}$ et $\log K_{oc}$ élevés) (Soares et al., 2008). Ainsi la contribution du NP au caractère œstrogénique des effluents finaux apparaît comme mineure au regard de celle des œstrogènes naturels et synthétiques, cependant son accumulation dans les boues représente un risque critique pour l'environnement spécialement s'il est considéré que près de 60% sont épandues en France (Teske et Arnold, 2008). Dans de récents travaux, Das et Xia (2008) ont évalué le devenir des NP dans les filières de compostage. Ces filières sont les voies les plus fréquemment utilisées pour le traitement des boues avant valorisation. Ils ont pu mettre en évidence que les phénomènes de biodégradation étaient isomères-spécifiques ; certains isomères (α -méthyle- α -propyle) apparaissant

comme réfractaires à la dégradation. Ce qui pose une fois de plus le problème de la valorisation des déchets.

Dès 1987, Giger et al. ont constaté que les traitements dits tertiaires concouraient significativement à l'abattement des APEO : AP, AP1EO, AP2EO. Gultekin et Ince (2007) ont résumé l'efficacité des processus d'oxydation avancés (photolyse indirecte, oxydation photocatalytique, ozonation et sonolyse) quant à l'élimination du NP dans les STEP (expériences conduites en laboratoire). Ils concluent que les réactions de photocatalyse avec du dioxyde de titane (TiO_2) sont les plus efficaces pour atteindre une minéralisation des substances d'intérêt. Cependant, bien que moins efficaces, il apparaît que les traitements par ozonation et photolyse sont les plus proches des conditions existantes dans les systèmes «naturels». Petrovic et al. (2003a, 2003b) ont mis en évidence la présence de formes chlorées et bromées de NP, NP1EC dans les effluents de station d'épuration qui présentent des étapes de désinfection (chloration, bromation).

Ainsi, une considération prudente doit être conduite quant aux réels coûts / bénéfices de ces procédés tertiaires pour l'abattement des contaminants traces. Au regard, d'une part, des surcoûts (prix de l'eau) qu'ils peuvent engendrer et d'autre part du potentiel toxique des molécules formées lors de ces processus. En effet, les métabolites générés au cours des processus tertiaires nécessiteront une investigation d'un point de vue écotoxicologique (renseignement du cycle biogéochimique, données de toxicité pour les organismes vivants dans les milieux...) et toxicologique (données sanitaires).

II.2 Présence dans les effluents de STEP

Le Tableau 3 présente les gammes de concentrations mesurées dans les effluents de station d'épuration, de par le monde, pour les principaux métabolites de biodégradation des APEO. La présence du NP et des métabolites de biodégradation NP1EO et NP2EO est bien documentée dans les effluents de stations d'épuration. Au contraire, les données concernant la présence des APEC sont fragmentaires mais cependant nécessaires à la réalisation de bilans d'abattelements. Les données de présence de CAPEC sont rares, ceci peut s'expliquer par le fait qu'il n'existe, pour l'heure, aucun étalon analytique commercial de ces molécules.

Tableau 3 : Données de présence des APEO dans les effluents de STEP.
(Concentrations exprimées en $\mu\text{g.l}^{-1}$, phase dissoute)

[NP]	[NP1EO]	[NP2EO]	[NP1EC]	[OP]	[NPEO]	Références
5,11	30-65	47-77	na	na	na	Ahel and Giger, 1985
0,7-4	na	na	na	na	na	Di Corcia et al., 1994
<0,2-5,4	na	na	na	na	na	Blackburn et Waldock, 1995
0,8-15,1	na	na	na	0,12-1,7	na	Lee et al., 1997
3-343	na	na	na	na	na	Solé et al., 2000
0,08-1,24	0,21-2,96	na	na	0,02-0,48	na	Isobe et al., 2001
0,171-37	na	na	na	<lod-0,673	na	Snyder et al., 2001b
<lod-0,77	na	na	na	<lod-0,073	na	Kuch et Ballschmiter, 2001
0,140- 0,242	0,072- 0,175	0,090-0,210	0,800- 1,120	lod-0,019	na	Jahnke et al 2004
<lod-5,0	<lod-156	<lod-4,7	<lod-16	<lod-13	2,8-6,6	Gonzalez et al., 2004
0,05-1,3	na	na	na	na	na	Johnson et al., 2005
0,5-1,1	na	na	na	na	na	Nakada et al., 2006
0,26-0,73	0,19-1,3	0,05-1	0,23-4,5	0,011-0,014	na	Loos et al., 2007
0,180- 1,600	0,069- 1,800	0,042-0,830	na	0,029-0,300	na	Clara et al. ,2007
<lod-0,011	na	na	na	<lod-0,333	na	Quednow et Puttmann, 2008
0,33-2,07	3,63-4,98		na	0,13-0,33	31,3-80,4	Cespedes et al., 2008
<lod-1,267	<lod-	<lod-	na	<lod-0,586	na	Baugros et al., 2008

II.3 Présence dans les boues

La Figure 7 et le Tableau 4 présentent des données de présence de NP et divers métabolites de biodégradation des NPEO dans les boues de station d'épuration, au cours du temps (période de 1984 à 2007). De nombreux travaux ont porté sur l'évaluation des processus de traitements des boues (Tableau 4) et leur capacité à contrôler la présence de NP en leur sein. Il peut-être constaté que les concentrations en NP dans les boues finales sont extrêmement variables (quelques dizaines à plusieurs milliers de mg.kg^{-1}) et fortement dépendantes des processus mis en œuvre dans les usines de traitement (précédemment discuté).

La problématique de leur présence dans les boues est intimement liée à celle de leurs usages. En effet, le problème de leur utilisation en tant que produits valorisés pour l'agriculture commence juste à être évalué (Sjostrom et al., 2008). En France, l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) a lancé des travaux de recherche (programme AGREDE Agriculture et épandage de déchets urbains à usages agro-industriels) qui ont pour but d'évaluer la biodisponibilité et les transferts sol-plante de ces contaminants notamment le NP. Les résultats obtenus montrent qu'une part des NP présents dans les boues épandues est biodisponible pour les plantes et les micro-organismes des sols. Il apparaît qu'aux doses où il est présent, en France, le NP n'engendre pas d'effets chez les végétaux, même si certains effets ont pu être observés sur la reproduction des champignons. Ces travaux se poursuivent encore au travers de divers programmes : ERESFOR (Epandages de produits résiduels sur parcelles boisées).

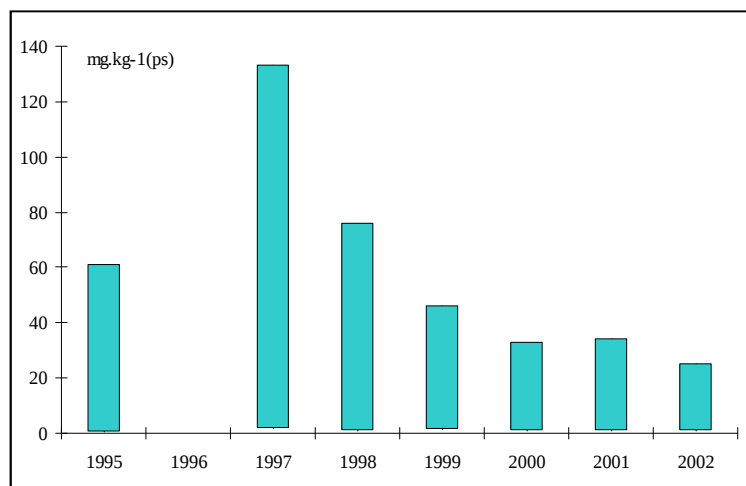


Figure 7 : Evolution des concentrations en nonylphénols (NP+NP₁EO+NP₂EO) dans les boues de stations d'épuration danoises (d'après thèse Jensen J., 2001).

Tableau 4 : Données de présence du NP dans les boues de STEP.

Pays (nombre d'échantillons)	Type de boues	[NP] (mg.kg ⁻¹ , poids sec)	Références
Suisse / Allemagne (30)	Boues anaérobies stabilisées	450-2 350	Giger et al., 1984
	Boues aérobies stabilisées	80-500	
Finlande/Suisse (29)	Boues anaérobies stabilisées	640-2 200	Brunner et al., 1988
	Boues aérobies stabilisées	120-650	
Suisse (19)	Boues finales	540-1000	Ahel, 1994
USA (1)	Boues anaérobies stabilisées	754	La Guardia et al., 2001
	Boues traitées à haute T°	496	
	Boues chaulées	470	
	Boues compostées	64	
Italie (2)	Boues avant digestion anaérobie	242	Bruno et al., 2002
	Boues anaérobies stabilisées	308	
France (3)	Boues après séchage	17,3	Ghanem et al., 2007
	Boues après chaulage	199,9	
	Boues après compostage	62,5 -130,0	
Espagne (5)	Boues finales	20-194	Cespedes et al., 2008

III Devenir dans l'environnement, cas des écosystèmes aquatiques

Le premier phénomène à se dérouler après l'introduction des APEO dans le milieu aquatique est un phénomène de dilution (de la source vers le milieu récepteur, puis du milieu récepteur vers un milieu marin ouvert), plus ou moins important selon le débit, ce dernier étant fonction des saisons (crues, étiages). Les APEO et leurs dérivés sont faiblement volatilisables (Ahel et Giger, 1993) de telle sorte que les pertes par ce mécanisme apparaissent mineures. Deux phénomènes vont contrôler le devenir des APEO et de leurs métabolites : les phénomènes de dégradation et les phénomènes de sorption.

III.1 Les phénomènes de dégradation en milieu naturel

III.1.1 Les phénomènes de photodégradation

La photolyse est la décomposition d'un composé chimique par l'action d'une énergie radiante. Des études menées en mésocosmes ont mis en évidence que pour que la photolyse du nonylphénol se déroule une intensité lumineuse de 0,05 à 0,09 m².kW⁻¹.h⁻¹ (énergie équivalente à celle du soleil à midi en été) était nécessaire (Ahel et al., 1994). De plus, il a été montré que la photolyse était plus lente pour les composés éthoxylés que pour les alkylphénols (AP) et qu'elle ne pouvait avoir une incidence que dans la couche superficielle des colonnes d'eau, sur quelques centimètres (Ahel et al., 1994). Dans les eaux naturelles, en conditions aérobies, le NP est dégradé rapidement en raison d'une photosensibilisation liée à la présence de matière organique dissoute (Ahel et al., 1994). Neamtu et Frimmel (2006b) ont mis en évidence que la photodégradation du nonylphénol était dépendante d'un grand nombre de paramètres physico-chimiques : la présence de Fe³⁺ et d'espèces réactives de l'oxygène augmentent les cinétiques de photodégradation, au contraire la présence de matières organiques dissoutes semble ralentir les cinétiques de photodégradation. Les produits intermédiaires issus de cette photodégradation (1,4-hydroxybenzène et 1,4-benzoquinone) ne semblent pas présenter de pouvoir œstrogénique.

III.1.2 Les phénomènes de biodégradation

Les molécules entrent dans l'environnement à différents stades de dégradation, les mécanismes de biodégradation initiés dans les STEP vont se poursuivre dans les milieux naturels, avec des cinétiques plus lentes (Ahel et al., 1994 ; Gross et al., 2004 ; Naylor et al., 2006). Même si ce sont les phénomènes de dégradation primaire (diminution de la chaîne éthoxylée) qui se déroulent dans la phase aqueuse (Ejlertsson et al., 1999) ; Naylor et al. (2006) ont mis en évidence que des phénomènes de minéralisation des alkylphénols étaient susceptibles de se dérouler : ouverture de l'anneau phénolique, métabolisation et minéralisation. Les nombreuses études de biodégradation conduites (Staples et al., 1999 ; Staples et al., 2001 ; Kvestak et Ahel, 1995) ont permis d'estimer un temps de ½ vie du nonylphénol entre 2,5 et 40 jours, entre 18,6 et 70,8 jours pour les NPEO et les NPEC.

Ahel et al. (1994) ont observé, d'une part, des fluctuations journalières des concentrations en NPEO attribuables aux dynamiques de fonctionnement des STEP et, d'autre part des fluctuations saisonnières (liées à la température, à l'intensité lumineuse, etc....) influençant la distribution spécifique et la variation des concentrations en APEO (Li et al., 2005 ; Li et al., 2008a ; Wang et al., 2006 ; Peng et al., 2007 ; Ribeiro et al., 2008 ; Peng et al., 2008). Les concentrations en NP ainsi qu'en NP1EO et NP2EO diminuent lorsque la température augmente. Manzano et al. (1999) ont mis en évidence que la biodégradation des APEO dans les eaux de rivière est profondément affectée par la température. En effet elle conditionne l'acclimatation des micro-organismes ainsi que les taux d'élimination des APEO. Les pourcentages de dégradation primaire varient de 68% (à 7°C) à 96% (à

25°C) ; les pourcentages de minéralisation, à 30 jours, passent de 30% (à 7°C) à 70% (à 25°C). D'autres auteurs (Li et al., 2008 ; Fu et al., 2007) ont également conclu à des tendances saisonnières. Cependant la justesse de leurs conclusions doit être considérée avec précautions puisque la plupart de ces études se sont cantonnées à deux campagnes d'échantillonnages ponctuels et ne prennent donc pas en compte les variations intrinsèques aux systèmes (variations des apports, dynamiques intrinsèques au système étudié).

III.2 Les phénomènes de sorption dans les milieux naturels

L'association entre APEO et particules joue un rôle important dans le devenir de ces composés dans les écosystèmes dulçaquicoles, estuariens et marins. En effet ces molécules possèdent des valeurs de Koc qui laissent supposer que des phénomènes d'adsorption puissent se dérouler dans les milieux aquatiques, jusqu'à l'équilibre entre la phase dissoute, la phase aqueuse et la phase colloïdale. Il semblerait que les phénomènes de sorption soient déterminés par, d'une part, la teneur en carbone organique des matériels en suspension et, d'autre part, par l'effet mélange (la présence d'APEO conduirait à la formation de micelles qui favoriseraient les phénomènes de sorption) (Hou et al., 2006). Li et al. (2004) rapportent des concentrations en NP comprises entre 8 et 190 ng.l⁻¹ dans les eaux de la rivière Han (Corée). Ils montrent également d'importantes variations des concentrations avec la saison, le pourcentage de nonylphénol dans la phase particulaire atteint 60% en août, il décroît avec la température pour atteindre 28% en décembre ; ces tendances ont également été observées par Cailleaud et al. (2007) en estuaire de Seine. Peu de données sont actuellement disponibles pour renseigner de la présence d'APEO dans les phases en suspension.

Les APEO à courte chaîne éthoxylée et les AP ont des valeurs de Koc élevées mettant en évidence leur affinité pour la phase organique des sédiments de telle sorte que les sédiments sont des puits pour ces composés. La composition spécifique est différente de celle retrouvée dans la colonne d'eau avec le NP nettement majoritaire devant les NP1EO et NP2EO. Un certain nombre d'étude ont pu mettre une corrélation positive entre les teneurs en NP mesurées dans les sédiments et leur teneur en carbone organique (Chen et al., 2005 ; Li et al., 2007b).

Les concentrations mesurées dans l'environnement (Tableau 5) laissent penser que ces contaminants s'accumulent dans les sédiments et suggèrent que les phénomènes de biodégradation y sont très lents. Il apparaît que les phénomènes de biodégradation anaérobies prévalent sur les mécanismes aérobie (Li et al., 2008). De nombreuses études (Heinis, 1999 ; Staples et al., 1999 ; Staples et al., 2001) se sont attachées à déterminer le temps de ½ vie de certains APEO dans les sédiments : entre 20 et 66 jours pour le NP, 20 jours pour le NP1EO, entre 2,5 et 69 jours pour le NP9EO (Shang et al., 1999a ; Shang et al., 1999b). Jin et al. (2008) rapportent un taux de séquestration du NP dans les sédiments de la Baie de Bohai de 0,94% par an. Peng et al (2007) ont étudié la

distribution verticale des NPEO dans des sédiments marins, ils ont pu mettre en évidence des variations des concentrations en NP liées aux usages de ces composés ainsi qu'à la mise en place des structures d'assainissement (corrélation avec l'évolution des activités économiques et industrielles) et concluent à une certaine stabilité du NP dans les sédiments (peu de phénomènes de biodégradation, pas de changement dans la distribution isomérique du NP). Ces composés apparaissent donc comme persistants dans les sédiments naturels avec un temps de demi-vie pouvant atteindre 60 années (Shang et al., 1999a ; Shang et al., 1999b).

III.3 Effets des APEO sur le cycle biogéochimique d'autres contaminants organiques présents dans les systèmes aquatiques

Il est également intéressant de signaler que les APEO, de par leurs propriétés de surfactants, pourraient affecter le cycle biogéochimique d'autres contaminants organiques. A titre d'exemple, Wang et al. (2008) ont ainsi pu mettre en évidence que la présence de NP pouvait à faible concentration inhiber la sorption du phénanthrène (en agissant sur le film d'eau) et qu'à concentration élevée elle en favorisait l'adsorption. Les auteurs suggèrent un effet cocontaminant sur les autres composés organiques présents dans le milieu. De même, Hari et al. (2005) ont mis en évidence qu'en présence de Tergitol (mélange commercial de NPEO), l'adsorption de la carbamazépine et du paracétamol était significativement favorisée.

III.4 Données de présence dans les phases aqueuses

Les nombreuses études conduites depuis plus de 20 ans ont permis de documenter la présence d'APEO dans les eaux de surface (Tableau 5), les eaux souterraines (revue par Soares et al., 2008), les eaux de boisson (revue par Soares et al., 2008) de par le monde. Beaucoup d'études se sont focalisées sur la présence du NP (seul) et concluent que la présence de ce composé dans les écosystèmes naturels est concomitante d'activités anthropiques. La comparaison de ces données est délicate tant les différences en terme d'échantillonnage (conditions des prélèvements : saisons, débit, etc...), de techniques analytiques (eaux brutes/eaux filtrées, choix du seuil de filtration, etc...), de techniques de quantification sont hétérogènes (et peuvent conduire à la production de données non valides). Ces études permettent néanmoins de conclure au caractère ubiquiste de ces composés dans l'environnement. Il peut-être également précisé que l'analyse seule du NP (métabolite ultime de biodégradation, persistant et toxique) peut conduire à une sous estimation des risques associés à la présence des APEO et de leurs métabolites de biodégradation dans les systèmes aquatiques.

Tableau 5 : Données de présence des APEO et de leurs métabolites dans les milieux aquatiques (Concentrations exprimées en ng.l⁻¹, phase dissoute).

	Site	[NP]	[NP1EO]	[NP2EO]	[NPEO]	[NP1EC]	[NP2EC]	[NP3EC]	[OP]	Références	
Eaux douces	Grands lacs (Canada)	<10-920	<20-7 800	<20-	na	na	na	na	<5-470	Bennie et al., 1997	
	Detroit (USA)	<LOD-	<LOD-332000			na	na	na	<LOD-670	Snyder et al., 1999	
	Pays Bas	<LOD-140	<LOD	na	na	na	na	na	<LOD	Voogt et al., 2000	
	Tamagawa, Sumidagawa	50-1080	40-810	na	na	na	na	na	10-180	Isobe et al., 2001	
	Back (Canada)	140-200	<9-67	na	na	na	na	na	<9	Loyo-Rosales et al., 2003	
	Cuyahoga (USA)	130-1000				na	na	na	na	Rice et al., 2003	
	Elbe (Allemagne)	13-87	<0,5-120			na	na	na	<0,5-5	Stachel et al., 2003	
	Santa Ana (USA)	0-6 200	na	na	na	na	na	na	na	Gross et al., 2004	
	Tokyo	<LOD-2870	<LOD-	na	na	470-2820	180-1770	na	<LOD-118	Isobe et Takada, 2004	
	Tevere (Italie)	130-580	60-480	40-420	na	na	na	na	na	Patrolecco et al., 2006	
	Rivière jaune (Chine)	50-170	50-140	50-450	700-1500	30-100		na	na	Wang et al., 2006	
	Guadalquivir	900-1100	na	na	na	1000-4000	na	na	800-9000	Cantero et al., 2006	
	Guadiana (USA)										
		Taiwan	<10-2600	<10-500	na	na	<10-63600			na	Cheng et al., 2006
		Rivière Ter (Espagne)	<70	<509-2910		2070-	na	na	na	<60	Cespedes et al., 2008
		Région Hesse (Allemagne)	<10-770	na	na	na	na	na	na	<10-420	Quednow et Puttmann, 2008
Eaux estuariennes	Lagon Venise (Italie)	300	800	900	na	na	na	na	na	Marcomini et al., 1990	
	Jamaica baie (USA)	201	157	320	na	na	na	na	3	Ferguson et al., 2000	
	Delta Pearl (Chine)	<20-628	na	na	na	na	na	na	<2-68	Chen et al., 2005	
Eaux marines	Catalogne et Andalousie (Espagne)	<150-4100	na	na	<200-11000	na	na	na	na	Petrovic et al., 2002	
	Catalogne (Espagne)	<50-210	<50-9200	<50-160	na	<100-220	na	na	<50-71	Gonzalez et al., 2004	
	Rhin (Allemagne)	32-478	<15-32	<6-64	<30-225	60-322	<13-247	na	na	Jonkers et al., 2005a	
	Sheldt (Allemagne, Pays Bas)	50-962	<15-443	6,8-234	<30-447	37-1030	<13-2339	na	na	Jonkers et al., 2005a	
	Mer du Nord	0.09-1,4	0,017-1,66	na	na	na	na	na	0,013-0,3	Xie et al., 2006	
	Baie de Jiaozhou	20,2-269	na	na	na	na	na	na	1,2-16,1	Fu et al., 2007	
	Baie de Masan	1229-1433	286-413	702-843	na	na	na	na	na	Li et al., 2008a	

III.5 Données de présence dans les sédiments

Les APEO et leurs produits de dégradation sont également présents dans les sédiments à des concentrations supérieures aux eaux de surface correspondantes (Ferguson et al., 2001 ; Rice et al., 2003 ; Gonzalez et al., 2004). La distribution spécifique des APEO, APEC et AP est différente de celle observée dans la phase aqueuse. Les AP et plus particulièrement le NP (composé le plus persistant) sont très largement majoritaires et peuvent être présents à des concentrations supérieures au mg.kg^{-1} (poids sec) (Tableau 6).

Tableau 6 : Données de contamination des sédiments par les APEO, les AP et les APEC ($\mu\text{g.kg}^{-1}$, poids sec).

Localisation	[NP1EO]	[NP2EO]	[NP]	[NP1EC]	[OP]	Références
Baie Jamaica USA	26-13300	16-3580	7-13700	-	<lod-45	Ferguson et al., 2001
Rivière Cuyahoga Ohio, USA	32-320	30-200	75-340	-	-	Rice et al., 2003
Rivière Han, Corée	-	-	25-932	-	-	Li et al., 2004
Barcelone Espagne Juillet 2002	21-629	9-404	5-1 731	<lod-766	<lod-25	Gonzalez et al., 2004
Barcelone Espagne Octobre 2002	<lod-56	<lod-22	18-68	5-63	3-19	Gonzalez et al., 2004
Grands Lacs (Canada)	<lod -1250	<lod -690	<lod -1750	<lod -30	<lod -52	Mayer et al., 2007
Ushikubiri (Japon)	<lod-76,4	<lod-134,3	25,5-1988,4	0,09-1,84		Li et al., 2008

III.6 Devenir dans les organismes vivants

Il est admis que la diminution de la longueur de la chaîne éthoxylée entraîne une augmentation de la valeur du Kow (Ahel et Giger, 1993). De même la ramification des chaînes alkyles affecte également les propriétés physico-chimiques de ces molécules telles que la solubilité aqueuse et la valeur de Kow, l'ensemble de ces propriétés dictant leur biodisponibilité et leur toxicité.

III.6.1 Les propriétés de bioconcentration et bioaccumulation

Il a été observé que les capacités de bioaccumulation et de bioconcentration augmentaient quand la chaîne éthoxylée diminuait, mettant en évidence que les AP et les APEO possédaient des capacités de bioaccumulation et de bioconcentration faibles à modérées (Servos, 1999).

a) La bioconcentration

Les valeurs de BCF calculées pour le NP varient de 1 à 740 pour les poissons (selon les espèces), de 1740 à 4184 chez la moule bleue (organisme entier) (Tableau 7). Ce phénomène est d'autant plus important pour les organismes du bas de la chaîne trophique. Des facteurs de bioconcentration supérieurs à 10000, pour certaines algues, ont pu être mesurés. Dans une étude récente (Cheng et al., 2006), les facteurs de bioconcentration du nonylphénol et de l'octylphénol par 2 espèces marines (huître et escargot) ont été mesurés, les valeurs sont comprises entre 2000 et 2900 pour le NP et entre 2500 et 4100 pour l'OP selon les saisons. Il semblerait que le facteur de

bioconcentration présente une saisonnalité intimement liée aux rythmes de vie des organismes considérés, les auteurs mettent en avant le rôle crucial des périodes de pontes.

b) La bioaccumulation

Le facteur de bioaccumulation est le rapport entre la concentration en composé dans l'organisme considéré sur la concentration dans la nourriture. Très peu de données permettent de se positionner quant aux capacités de bioaccumulation des APEC. En se basant sur leurs structures, les NPEO et OPEO semblent présenter des capacités de bioconcentration et de bioaccumulation faibles (Servos, 1999). Hu et al. (2005) lors d'une étude menée sur un réseau trophique de la baie de Bohay, ont mis en évidence outre la présence de nonylphénol dans l'ensemble des tissus des organismes de la chaîne trophique, l'absence de dilution trophique (Figure 8, Tableau 7) et par conséquent qu'au sein de réseau trophique il n'y avait pas ou peu de biomagnification. Bien que les données soient éparées, il apparaît que les faibles teneurs en AP dans les organismes supérieurs pourraient être liées aux activités métaboliques et d'élimination.

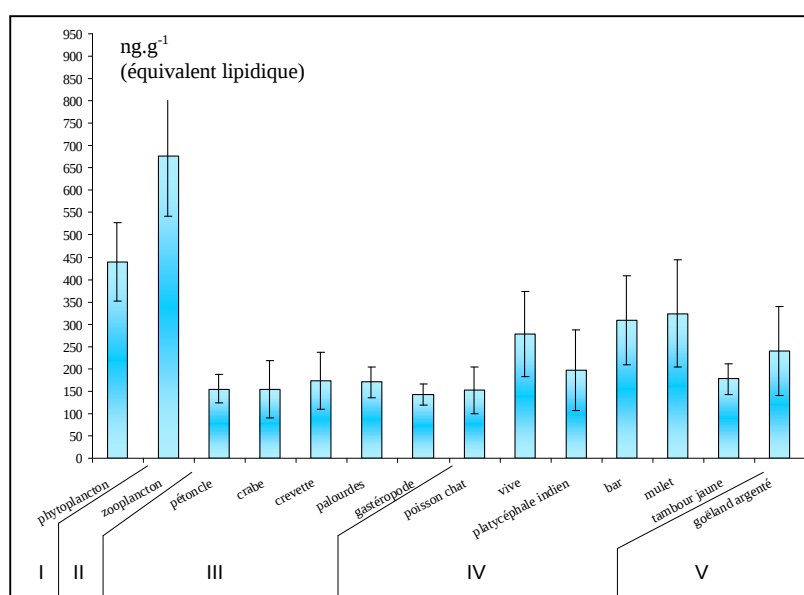


Figure 8 : Bioaccumulation du NP dans le réseau trophique de baie de Bohay (Hu et al., 2005).

Tableau 7 : Valeurs de BCF pour certains alkylphénols (d'après Staples et al., 2004).

		BCF NP	BCF OP	BCF NP1EO	BCF NP2EO
Facteurs de BCF déterminés via des études en milieu naturel					
Rivière Glatt	Poissons	6-15		1-19	0,8-37
Lac Biwa	Poisson	21	297	-	-
Facteurs de BCF déterminés via des études en milieu contrôlé					
	Poissons	75-741	113-469	-	-

III.6.2 La Biotransformation

Le degré auquel une substance est bioaccumulée dans un organisme dépend du taux d'assimilation, du taux de biotransformation ainsi que du taux d'élimination de cette substance.

a) Voies d'entrée dans l'organisme

Un certain nombre d'études ont mis en évidence que la principale voie d'exposition aux alkylphénols chez les poissons était la voie des branchies (Arukwe et al., 2000 ; Ferreira-Leach et Hill, 2001 ; Pickford et al., 2003 ; Smith et Hill, 2004). Bien que la voie trophique existe, elle ne semble pas être une voie d'exposition significative. Néanmoins il est important de garder à l'esprit que ces données sont obtenues pour des expositions *in vivo* à moyen terme, la voie majoritaire d'exposition à court terme est la voie branchiale. Cependant dès lors que l'intérêt se porte sur une exposition naturelle (sur un cycle de vie) la voie trophique peut devenir la voie majoritaire.

b) Devenir dans les organismes aquatiques

Ce devenir est conditionné par le mode d'exposition aux molécules. Arukwe et al. (2000) ont mis en évidence, au cours d'une exposition du saumon atlantique au NP-³H par la voie des branchies, que le NP-³H était initialement localisé au niveau de l'arc branchial. Après dépuration, le NP-³H était localisé au niveau des reins puis au niveau de la vésicule biliaire ainsi que dans la partie du tractus intestinal (incluant la portion proximale de l'intestin auquel est associé l'intestin) qui reçoit la bile. Ces observations tendent à montrer une clairance en 2 étapes : en premier lieu la voie biliaire et ensuite la voie urinaire. Lorsque l'exposition est réalisée par la voie trophique, le NP-³H est localisé au niveau de la vésicule biliaire, intestin proximal et cæcum intestinal associé, de même que dans le lumen intestinal. Ces conclusions sont en accord avec les résultats apportés précédemment par Thibaut et al. (1999), Snyder et al. (2001a), Smith et Hill (2004). Une fois que l'équilibre est atteint, les concentrations les plus élevées en composés alkylphénoliques se trouvent au niveau de la vésicule biliaire, de la bile, du cæcum pylorique, de l'intestin et des fèces. Les concentrations intermédiaires se situent au niveau du foie, des reins, des tissus lipidiques. Les concentrations les plus faibles se rencontrent au niveau des branchies, du cœur, des gonades, du muscle, du sang, des yeux et du cerveau (Servos, 1999).

c) La biotransformation

La biotransformation est la somme des réactions métaboliques qui visent à rendre une molécule exogène hydrosoluble donc plus facilement excrétable. Elle aboutit à la formation de métabolites qui peuvent être plus ou moins toxiques que la molécule mère.

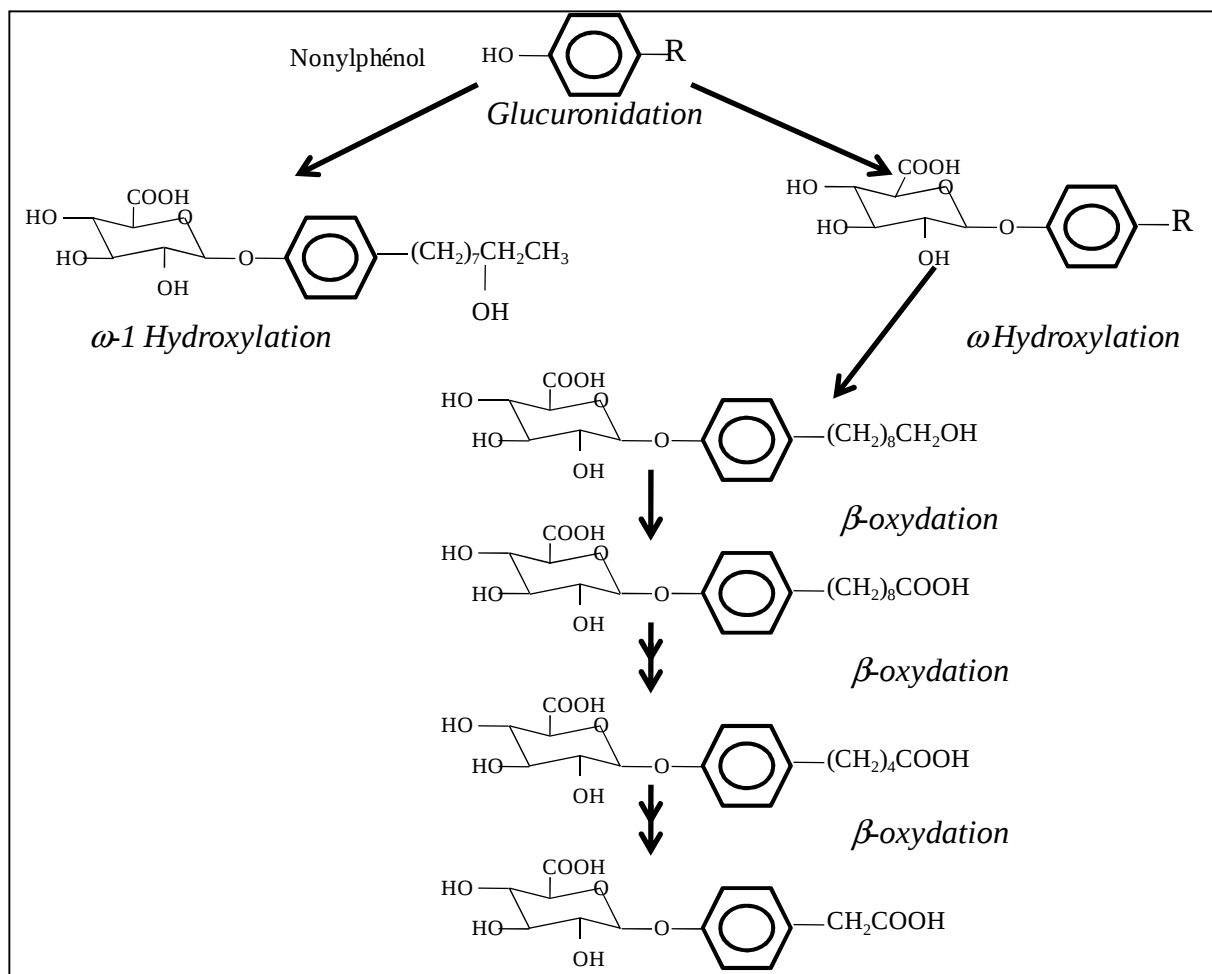


Figure 9 : Proposition de chemin de biotransformation du 4-NP chez la truite et dans les hépatocytes isolés (d'après Vazquez-Duhalt et al., 2006).

Lewis et Lech (1996) ont mis en évidence que des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), exposées au NP marqué au ^{14}C , incorporaient rapidement le NP^{14}C avec un temps de demi-vie d'environ 19 à 20 heures indiquant l'existence de phénomènes de métabolisation. Thibaut et al. (1999) ont montré que, chez *Oncorhynchus mykiss* (truite arc-en-ciel), les métabolites du NP (acide 9-(4-hydroxyphényle)-nonanoïque (ω -oxydation), acide 4-hydroxybenzoïque, acide 3-(4-hydroxyphényle) propionique et acide 3-(4-hydroxyphényle)-2-propénoïque (β -oxydation)) sont libérés par hydrolyse par une β -glucuronidase, suggérant leur existence sous forme de composés glucuronidés. Ceci a été confirmé par Arukwe et al. (2000) qui ont montré, grâce à une exposition du saumon atlantique (*Salmo salar*) à une dose de $25 \mu\text{g.l}^{-1}$ de $\text{NP-}^3\text{H}$, que le NP était conjugué à l'acide glucuronique. Le nonylphénol-glucuronide est le métabolite prédominant dans la bile et l'urine (Figure 9). Les formes hydroxylées et oxydées libres sont très minoritaires. Ils ont également pu calculer un temps de demi-vie pour le NP de l'ordre de 24 à 48 heures. Ferreira-Leach et Hill (2001) ont étudié la bioconcentration et la distribution de l'OP ($[\text{4-tert-OP}] = 4 \mu\text{g.l}^{-1}$) chez le juvénile de truite arc-en-ciel, ils ont pu observer que la concentration dans l'organisme était maximale dès le 4^{ème} jour d'exposition.

De plus ils ont mis en évidence l'existence d'un phénomène de métabolisation à l'origine de 2 métabolites : l'octylphénol-glucuronide et l'octylcatéchole. Une récente étude de Smith et Hill (2004) laisse apparaître que l'arsenal enzymatique disponible pour la métabolisation des xénobiotiques est fonction de l'espèce considérée, conférant donc des capacités d'épuration et d'élimination différentes selon les espèces.

IV La toxicité

IV.1 La toxicité aigüe

La toxicité des APEO diminue lorsque la longueur de la chaîne éthoxylée augmente (Servos, 1999). Les valeurs de LC_{50} pour *Oryzias latipes* (poisson tueur) varient de 1400 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pour le NP à 110 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pour le NP16EO (Servos, 1999) (Tableau 8). Les APEO à longue chaîne éthoxylée sont considérés comme n'étant pas toxiques. Le NP est 200 fois plus toxique que le NP9EO.

Tableau 8 : Evolution de la toxicité aigüe (LC_{50}) en fonction de la longueur de la chaîne éthoxylée des APEO, chez *Oryzias latipes*. (Servos, 1999)

Composé	LC_{50} ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
NP	1 400
NP1EO	3 600
NP6.4EO	5 400
NP9EO	12 000
NP16EO	110 000

Le nonylphénol (NP) et l'octylphénol (OP) ont des valeurs de toxicité aigüe similaires : 17-3000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ chez les poissons, 20-3000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ chez les invertébrés, 27-2500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pour les algues (Servos, 1999). A chaîne équivalente, les composés carboxylés APEC sont moins toxiques que les composés éthoxylés, ils ont des valeurs de toxicité aigüe égales à celles des APEO possédant 6 à 9 groupements «éthoxy» (Servos, 1999). Récemment, la toxicité du NP, NP1EO, NP2EO seuls et en mélange (binaire ou ternaire) sur *Ceriodaphnia dubia* et *Pimephales promelas* a été évaluée, les résultats mettent en évidence que les mixtures binaires et ternaires diminuent les valeurs de concentrations létales (LC_{50}) en conséquence d'effets additifs et synergiques (TenEyck et Markee, 2007).

IV.2 La toxicité chronique

Les valeurs de toxicité chronique pour l'octylphénol et le nonylphénol sont aussi faibles que 6 $\mu\text{g.l}^{-1}$ chez les poissons, *Oncorhynchus mykiss* truite arc-en-ciel (NOEC (No Observable Effect Concentration) sur la taille, à 91 jours) et de l'ordre de 3,9 $\mu\text{g.l}^{-1}$ chez les invertébrés (NOEL (No Observable Effect Level) sur la taille, à 28 jours) (Servos, 1999). Se basant sur les données de toxicité

du 4-NP, il est couramment admis qu'un bruit de fond environnemental de $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ suffirait à soumettre à des risques une part importante des communautés aquatiques.

Les valeurs de toxicité chronique obtenues au cours des tests de toxicité ont permis de déterminer des PNEC (Predicted No Effect Concentration) dans l'eau pour certains composés alkylphénoliques. Le PNEC_{eau} du nonylphénol est de $0,33 \mu\text{g.l}^{-1}$ (INERIS, Fiches substances : Nonylphénols), le PNEC_{eau} de l'octylphénol est de $0,061 \mu\text{g.l}^{-1}$ (INERIS, Fiches substances : Octylphénols). Si ces valeurs sont comparées avec celles mesurées dans les eaux naturelles (Tableau 2), des rapports PEC/PNEC supérieurs à 1 sont obtenus, indiquant la possibilité que des effets toxiques en milieu naturel se déroulent. Le PNEC_{eau} du NP a permis de calculer une valeur de PNEC pour les sédiments, le $\text{PNEC}_{\text{sédiment}}$ du nonylphénol est de $3,9 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (poids humide) (INERIS, Fiches substances : Nonylphénols). Si cette valeur est comparée avec celles mesurées dans les sédiments naturels (Tableau 6) des rapports PEC/PNEC supérieurs à 1 sont obtenus, indiquant la possibilité que des effets toxiques en milieu naturel se déroulent.

IV.3 Les APEO en tant que perturbateurs endocriniens

➤ Effets *in vitro*

C'est Soto et al. (1991) qui ont par hasard mis en évidence les propriétés œstrogéniques de ces molécules. En effet, lors d'une étude des cellules humaines MCF-7, ils ont trouvé que l'utilisation de nouveaux tubes en polystyrène entraînait une prolifération cellulaire. Après extraction et analyse, ils ont mis en évidence la présence de nonylphénol. De plus amples tests montrèrent que le nonylphénol pouvait induire les récepteurs à progestérone ainsi qu'une activité mitotique de l'endomètre chez le rat.

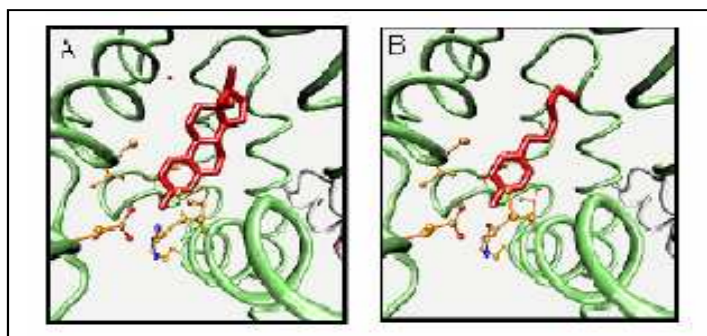


Figure 10 : Schéma de la fixation de la 17-β-œstradiol et du 4-NP au niveau du récepteur ER (d'après Vazquez-Duhalt et al., 2006).

White (1994) a étudié la capacité de certains métabolites à stimuler la synthèse de vitellogénine chez les hépatocytes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), ils ont pu mettre en évidence que les OP, NP, NP2EO, NP1EC étaient capables d'induire une synthèse de la vitellogénine

(Tableau 9) et agissaient comme des œstrogéno-mimétiques ayant une action agoniste de l'hormone naturelle (Figure 10).

Tableau 9 : Pouvoir de compétition des APEO, AP et APEC vis-à-vis de l'hormone naturelle.
(Jobling et Sumpter, 1993 ^(a) ; Hill et Smith, 2006 ^(b))

Composé		Test YES
17-β-œstradiol	1 ^(a)	7,8*10 ⁻¹¹ ^(b)
NP	9*10 ⁻⁶ ^(a)	1,4*10 ⁻⁷ ^(b)
NPBr	NA	1,4*10 ⁻⁶ ^(b)
NPBr ₂	NA	NA
OP	3,7*10 ⁻⁶ ^(a)	NA
NP2EO	6,00*10 ⁻⁶ ^(a)	NA
NP1EC	6,30*10 ⁻⁶ ^(a)	NA

Test YES : tests de détection *in vitro* de l'activité œstrogénique des xénobiotiques sur des souches de levures recombinantes.

Les AP agissent comme des agonistes du récepteur à œstrogène dans le foie (Figure 10). Il a été mis en évidence que l'efficacité du nonylphénol à se fixer sur les récepteurs à œstrogènes était intimement liée à sa structure (Routledge et Sumpter, 1996 ; Chikae et al., 2003 ; Preuss et Ratte, 2007) ; la position *para*- semblant être un pré requis indispensable. De même, il a été mis en évidence que la bromation ou la chloration du nonylphénol (qui se déroule lors du traitement tertiaire au sein de certaines STEP) engendrait une diminution du pouvoir œstrogénique des NP (Safe, 2000 ; Hu et al., 2002 ; Hill et Smith, 2006). Des études ont mis en évidence qu'en plus de son effet œstrogéno-mimétique, le NP présente des capacités anti-androgéniques (Sohoni et al., 2001a ; Hill et Smith, 2006).

➤ Effets *in vivo*

Jobling (1996) a pu mettre en évidence une inhibition du développement gonadique ainsi que l'induction de la synthèse de vitellogénine chez des poissons mâles exposés avec un ordre d'efficacité OP>NP>NP2EO>NP1EC, à partir d'une concentration seuil de 20 µg.l⁻¹ pour le NP. L'induction de la vitellogénine a également été mise en évidence chez *Cyprinodon variegatus* (Rondeau mouton) à une concentration seuil de 3 µg.l⁻¹ (Hemmer et al., 2001) mais également chez des carpes mâles adultes exposées (Chikae et al., 2003). Certains travaux récents conduits en laboratoire ont montré que, moins d'une semaine après l'arrêt de l'exposition au NP, les niveaux de vitellogénine reprenaient une valeur normale ; preuve que son usage, seul, comme biomarqueur d'exposition serait insuffisant.). Un certain nombre d'études (Gray et al., 1997 ; Tanaka et Nakanishi, 2001) semblent conclure qu'une exposition au NP dans des stades précoces du développement pourrait conduire à des altérations des processus clés du développement, pouvant aboutir à des effets délétères chez les populations. Les principaux effets observés chez des poissons exposés au nonylphénol et à l'octylphénol sont exposés dans le Tableau 10.

Bien que la majorité des études se soient focalisées sur l'induction de la synthèse de la vitellogénine chez des organismes exposés aux AP et APEO, il a été également démontré qu'une exposition à ces molécules pouvait induire une perturbation du développement testiculaire (Jobling, 1996 ; Jobling et Nolan, 1998) une perturbation du développement ovarien ainsi que du succès reproductif (Servos, 1999).

Le NP peut également induire une suppression de l'activité EROD et du Cytochrome P450 1A chez *Salmo salar*, saumon atlantique (Arukwe et al., 1997) ainsi que *Oncorhynchus mykiss* (Navas et Segner, 2001).

Tableau 10 : Les principaux effets d'une exposition aux APEO en milieu contrôlé sur les poissons (d'après Mills et Chichester, 2005).

Effets observés	Molécules ciblées	Espèce	Nombre de références
Réduction de la production d'œufs	Nonylphénol	<i>Pimephales promelas</i>	1
Sexe ratio	Nonylphénol	<i>Medaka</i>	1
Réduction de l'indice gonado somatique (♂)	Nonylphénol	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1
	Octylphénol	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1
Diminution du comportement sexuel	Octylphénol	<i>Medaka</i>	1
		<i>Guppies</i>	1
Intersexe gonadique	Octylphénol	<i>Medaka</i>	1
Diminution de la fertilité des œufs	Octylphénol	<i>Medaka</i>	1
Diminution des caractères sexuels (♂)	Nonylphénol	<i>Pimephales promelas</i>	1
Diminution de la ponte et de la viabilité des œufs	Nonylphénol	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1
Difformités physiques	Octylphénol	<i>Medaka</i>	1
Altérations des concentrations plasmatiques en stéroïdes	Nonylphénol	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1

IV.4 Autres effets toxiques des alkylphénol-polyéthoxylés

Outre les effets de dérégulation endocrinienne, les AP ont démontré d'autres effets toxiques. Pour l'heure, les informations concernant la génotoxicité des APEO, notamment NP et OP, sont assez contradictoires :

- embryotoxicité (diminution des divisions mitotiques) lors de l'exposition larvaire d'oursin de mer (Arslan et Parlak, 2007),
- pas de génotoxicité avérée chez la Tilapia du Nil (Rivero et al., 2008),
- induction d'effets génotoxiques réparables (Tayama et al., 2008),
- capacité du NP seul ou en mélange (β -naphthoflavone) à induire des anomalies nucléaires érythrocytaires chez le bar juvénile (Teles et al., 2004). De même, Isidori et al. (2007a) mettent en évidence une forte corrélation entre présence d'AP et génotoxicité dans les stations d'épuration.

Il est couramment admis qu'une exposition au NP, dans les stades précoces et adultes, aurait le potentiel d'engendrer des effets délétères sur le système immunitaire. A titre d'exemple, on pourra citer l'induction de variations de la réponse fonctionnelle des hémocytes chez la coque exposée à des concentrations sublétales de NP (Matozzo et al., 2008). Canesi et al. (2007b) ont quant à eux mis en évidence que le NP développait des effets équivalents à ceux des œstrogènes naturels sur les hémocytes de moules. De plus une étude menée sur les effets en mélanges d'estrogènes et xénoœstrogènes laissent penser que les effets sur les hémocytes pourraient être plus importants que ceux attendus lors d'expositions individuelles.

Des expositions au NP peuvent également induire des troubles du métabolisme protéique, du métabolisme lipidique, du métabolisme calcique (Christiansen et al., 1998 ; Meier et al., 2007 ; Schoenfuss et al., 2008 ; Matozzo et al., 2008 ; Li, 2008 ; Yang et al., 2008).

V Quelques aspects législatifs et réglementaires

Les premiers constats quant à la toxicité et la persistance de ces composés ont conduit à leur élimination volontaire de plusieurs usages en Europe. En 1996, les conventions d'Oslo et Paris (OSPAR) pour la prévention des pollutions marines ont noté qu'un rapport préliminaire d'évaluation des risques environnementaux révélait un PEC/PNEC (Predicted Effect Concentration/Predicted No Effect Concentration) voisin de 1 dans les eaux de rivière et les eaux côtières, indiquant la possibilité que des effets toxiques en milieu naturel se déroulent. Le nonylphénol et les nonylphénol-polyéthoxylés sont entrés dans la liste "OSPAR" des substances prioritaires en 1998, l'octylphénol en 2000. Ces composés font également partie de la liste des 33 substances prioritaires établie par la Directive européenne Loi Cadre-Eau. En conséquence, des normes de qualité environnementale ont été établies par la commission européenne (Directive fille, 2008) ; elles fixent des valeurs moyennes annuelles dans les eaux de surface (eaux douces et marines) (NQE) pour les NP et OP égales à 0,33 µg.l⁻¹ et 0,1 µg.l⁻¹, respectivement (COM (2006) 397 final). A la suite de leur inscription comme substances dangereuses, les nonylphénols et les nonylphénol-polyéthoxylés ont fait l'objet d'une restriction d'emploi et de mise sur le marché. Ainsi la Directive 2003/53/CE du 18 juin 2003 spécifie que les NP et NPEO ne peuvent être placés sur le marché ou employés comme substances ou constituants de préparations dans des concentrations égales ou supérieures à 0,1% de la masse pour les applications et usages suivants :

- le nettoyage industriel et institutionnel (sauf si les liquides sont recyclés ou incinérés),
- les produits de nettoyage domestique,
- le traitement des textiles et cuirs,
- l'usinage de métaux,
- les produits de traitement des trayons (traitement vétérinaire),
- la fabrication de papier et pâtes à papier,

- les produits cosmétiques et d'hygiène corporelle (sauf spermicides),
- coformulant dans les pesticides et biocides.

Ces dispositions de mise sur le marché et d'usages sont applicables, dans les pays membres de la communauté européenne, à compter du 17 janvier 2005 (INERIS, 2005). Il est intéressant de noter que seuls l'Europe, le Canada et le Japon ont engagé des processus de substitution et de limitations des usages de ces composés. Des pays tels que la Chine, l'Inde ainsi que certains pays sud américains continuent à produire et utiliser les AP et APEO dans des proportions importantes, sans envisager, pour l'heure, d'en limiter les usages et la production. Les Etats-Unis, au travers de leur agence de protection de l'environnement EPA, reconnaissent les risques liés à la production et aux usages des nonylphénols et ont élaboré une norme pour la qualité des eaux qui spécifie que la concentration en NP dans les eaux douces doit être inférieure à $6,6 \mu\text{g.l}^{-1}$ (norme 20 fois supérieure à la norme européenne) et $1,7 \mu\text{g.l}^{-1}$ pour les eaux marines.

LE BISPHENOL A

I Généralités sur le Bisphénol A

I.1 Voies de synthèse et production du Bisphénol A

Le bisphénol A (BPA) est le nom d'usage du 2,2-(4,4-dihydroxyphényle) propane (Figure 11). C'est un composé d'origine anthropique obtenu à partir de la réaction de 2 moles de phénol avec une mole d'acétone.

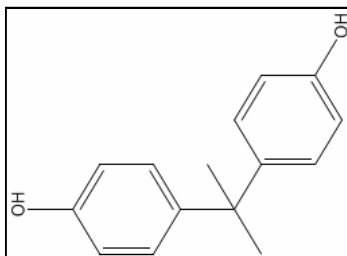


Figure 11 : Molécule de bisphénol A.

I.2 Principales propriétés caractéristiques du bisphénol A

Le Tableau 11 présente les principales propriétés physicochimiques du BPA. Ce composé semble modérément lipophile, peu volatile (Tableau 11). L'ensemble des propriétés physico-chimiques résumées dans le Tableau 11 semble montrer que le BPA possède de bonne capacité de dispersion dans l'environnement et spécifiquement dans les systèmes aquatiques (bonne solubilité, valeur de log Kow laissant supposer une bonne affinité pour les phases solides, valeur de pression de vapeur mettant en évidence de faibles propriétés de volatilisation).

Tableau 11 : Principales propriétés physico-chimiques du BPA (d'après rapport UE, 2003).

<i>Paramètres</i>	<i>Valeurs</i>
Numéro CAS	80-05-7
Masse moléculaire	228 g.mol ⁻¹
pKa	11,3
Pression de vapeur	5.3*10 ⁻⁹ KPa
Solubilité aqueuse	300 mg.l ⁻¹ , à 25°C
Log Kow	3,4
Log Koc	715 l.kg ⁻¹

I.3 Domaines d'usages et applications

Plus de 99,9% du BPA produit est utilisé comme intermédiaire dans la production des polycarbonates et des résines époxy, retardateurs de flammes et autres produits spécifiques. Les produits finaux incluent les adhésifs, les agents couvrants, les peintures en poudre, les matériaux de construction, les disques compacts, les papiers thermiques, les papiers couvrants, etc.... La production moyenne, à l'échelle européenne, était de l'ordre de plus de 684 500 tonnes pour les années 1997-1999 (Tableau 12). Il est à noter que cette consommation, notamment pour la production de polycarbonates, est en constante augmentation (Figure 12).

Tableau 12 : Usages du BPA à l'échelle européenne (d'après rapport UE, 2003).

Domaine d'usage	Tonnes /an	Principales applications	% consommation à l'échelle européenne
Production de polycarbonates	486 880	CD, Contenants pour l'alimentation, applications médicales, industrie électrique et électronique	71,1
Production de résines époxy	171 095	Agents de protection, applications électriques, adhésifs, composés de construction, plastifiants électriques	25,0
Résines phénoplastes	8 800	-	1,3
Production de résines polyester	3 000	-	0,4
Fabrication protection de boîtes	2 460	-	0,4
Utilisation dans les processus de production du PVC	2 250	-	0,3
Production de BPA alkylé	2 020	-	0,3
Production de papier thermique	1 400	-	0,2
Production de polyols/ polyuréthanes	950	-	0,1
Production polyamides modifiés	150	-	<0,1
Production pneus	110	-	<0,1
Fluides de frein	45	-	<0,1
Autres usages	5 990	-	0,9
Consommation européenne	684 650	-	

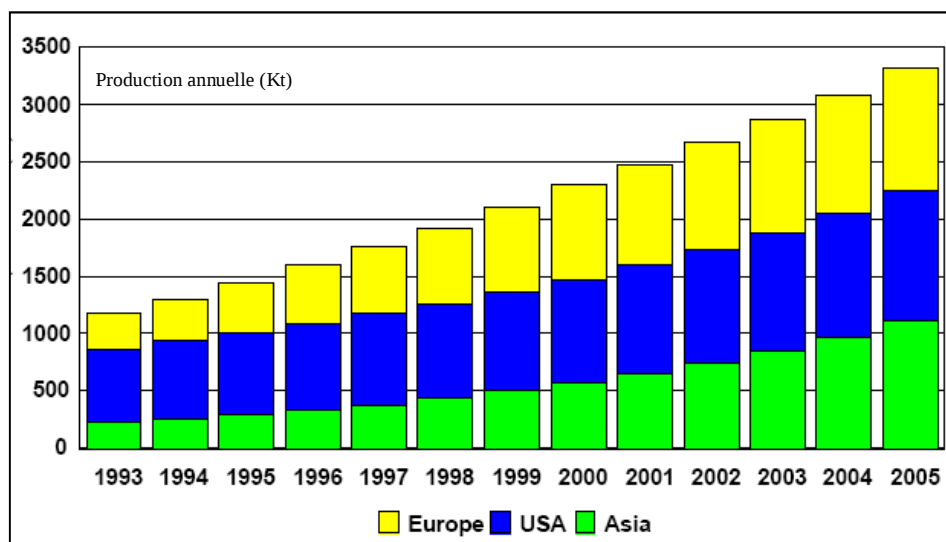


Figure 12 : Evolution de la production de BPA de 1993 à 2005 (d'après rapport UE, 2003).

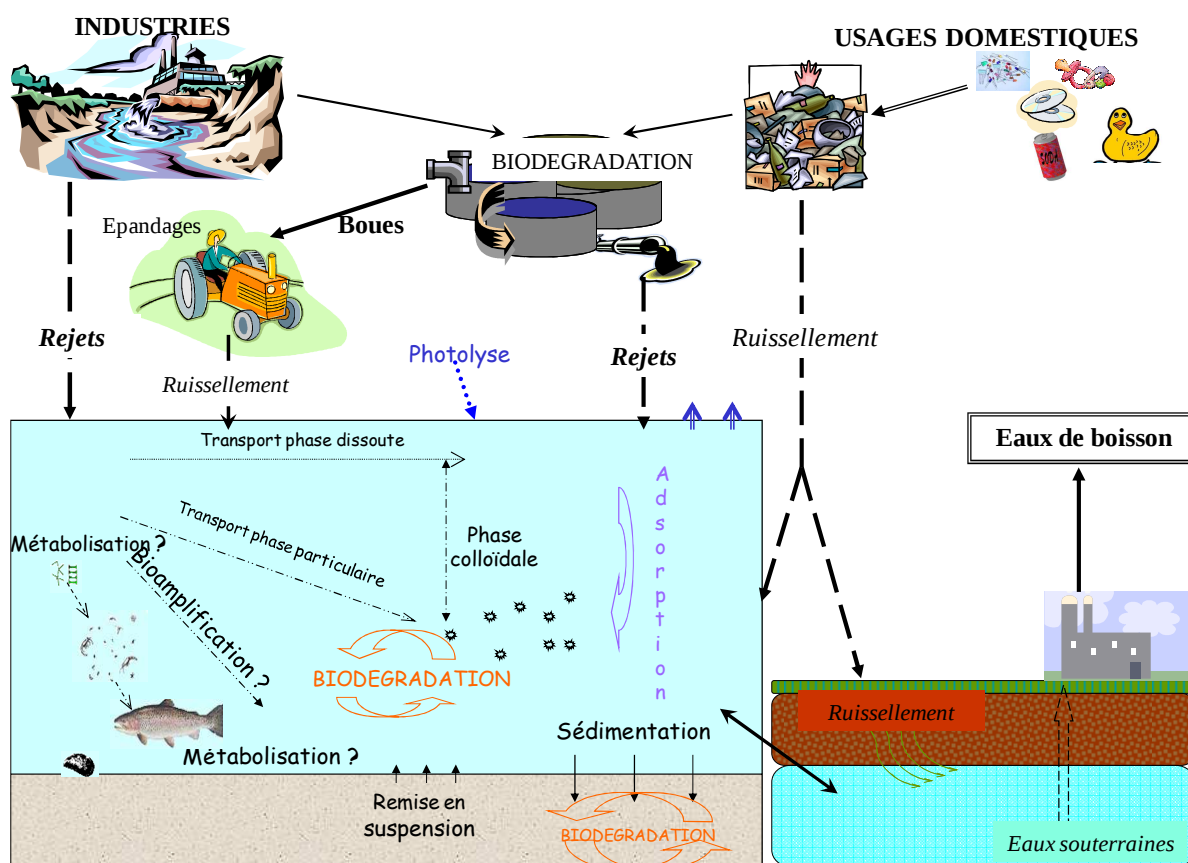


Figure 13 : Cycle biogéochimique du BPA dans l'environnement.

II Les sources de bisphénol A dans l'environnement

L'Union Européenne, dans son rapport d'évaluation des risques (2003), rapportait un scénario d'émission continental (Figure 14) dans lequel près de 80 % du BPA serait rejeté via les stations d'épuration (industrielles majoritairement) et près de 10 % via les rejets des décharges urbaines. En conséquence, il est raisonnable de conclure que les systèmes aquatiques seront les milieux récepteurs ultimes du BPA. Ces constatations auxquelles s'ajoutent les priorités physico-chimiques intrinsèques de la molécule permettent de conclure à l'ubiquité du BPA dans l'environnement.

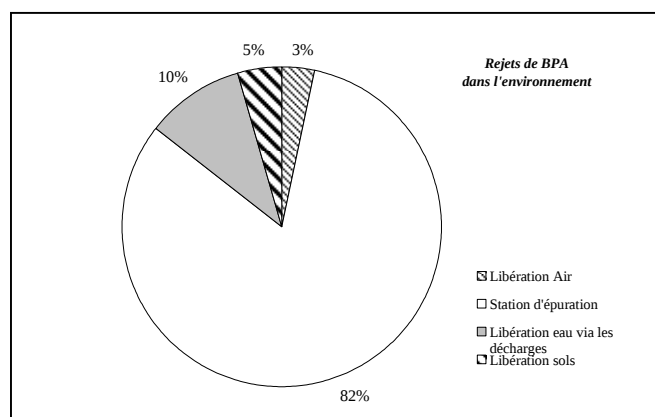


Figure 14 : Les principales sources de BPA dans l'environnement (d'après rapport UE, 2003).

II.1 Le devenir du bisphénol A dans les décharges

Constituant de base d'un très grand nombre d'objets liés à nos modes de vie, le BPA est éliminé via les mises en décharges. Yamamoto et al. (2001) ont estimé que 11 % du BPA était rejeté dans l'eau après 2 semaines en décharges. Ils ont également mesuré les concentrations en BPA dans les lixiviats, les valeurs étaient comprises entre quelques centaines de ng.l^{-1} jusqu'à plus de $17\,200\,\mu\text{g.l}^{-1}$ concluant que les décharges peuvent représenter d'importantes sources de BPA dans l'environnement. De même, Urase et Miyashita (2003), rapportaient des valeurs de $3400\,\mu\text{g.l}^{-1}$ dans les décharges d'ordures ménagères et 15 à $3000\,\mu\text{g.l}^{-1}$ dans les décharges industrielles.

II.2 Le devenir du bisphénol A dans les stations d'épuration

Les relargages de BPA via les stations d'épuration sont essentiellement liés aux processus industriels (recyclage des papiers thermiques). Comme le montre le Tableau 13, ce composé est très facilement dégradé dans les stations d'épuration : à la fois par les traitements physico-chimiques et par les traitements biologiques, avec des taux d'abattement supérieurs à 90%. Il est remarquable que dans la plupart des études menées (données non fournies), les taux d'abattement n'ont pas pu être calculés du fait des trop faibles sensibilités des protocoles analytiques mis en œuvre. Les taux d'abattement importants ont été reliés à l'affinité de ce composé pour les boues (Lee et Peart, 2000). Zhao et al. (2008a, 2008b) ont mis en évidence, dans une expérimentation en laboratoire, que ce phénomène était extrêmement rapide. Dans une étude récente, Clara et al. (2004b) ont mis en évidence que les phénomènes d'adsorption du BPA sur les boues étaient pH-dépendants et concentration-dépendants. Des phénomènes de relargages vers la phase dissoute peuvent avoir lieu si le pH est proche de la valeur de pKa. De plus, la biodégradation apparaît d'autant plus importante que la température et la concentration des boues (matériel en suspension) sont élevées (Zhao et al., 2008b).

Tableau 13 : Efficacité des différents types de traitements mis en œuvre dans les STEP pour l'abattement du BPA (D'après rapport UE, 2003).

	<i>Mesure / étude</i>	<i>Résultats</i>
Traitements biologiques	Biodégradation primaire	Abattement > 99.8%
	Abattement BPA	72 % COD abattu en 24heures 57 % BOD abattu en 24 heures
	Biodégradation primaire	92-96 % abattement
	Biodégradation primaire	Abattement >99 % si bactéries acclimatées pendant 14 jours
Traitements abiotiques	Abattement BPA	Filière : neutralisation pH, filtration, Adsorption sur résines XAD Abattement > 85 % BPA

Tan et al. (2007) rapportent des taux d'abattement extrêmement variables, compris entre 38 et 99 %, dans les stations d'épuration australiennes. Même s'il est globalement bien abattu dans les STEP, il n'en demeure pas moins que la part non dégradée de BPA représente malgré tout un risque écotoxicologique pour les milieux récepteurs. Un intérêt récent s'est porté sur l'efficacité des

traitements tertiaires à éliminer les traces de BPA présentes dans les effluents. Comme pour beaucoup d'autres perturbateurs endocriniens, il s'est avéré que les procédés oxydants avancés (de type UV, H₂O₂, photocatalyse) étaient non seulement capables d'abattre la molécule mais également d'abattre son pouvoir œstrogénique (d'après revue par Esplugas et al., 2007).

II.3 Le bisphénol A dans les effluents de STEP : données de présence

Le Tableau 14 présente les concentrations en BPA mesurées dans les effluents de station d'épuration en Europe et aux Etats-Unis. Il peut être observé une large gamme de présence selon les pays considérés avec des concentrations comprises entre quelques ng.l⁻¹ jusqu'à plusieurs dizaines de µg.l⁻¹. De nombreux auteurs rapportent des variations importantes de concentrations mesurées quelle que soit l'échelle de temps considérée.

Tableau 14 : Données de présence du bisphénol A dans les effluents de STEP (phase dissoute).

Localisation	[BPA] µg.l ⁻¹	Sources
Espagne	0,14-0,98	Gomez et al., 2006
Espagne	<lod	Ballesteros et al., 2006
Belgique	<lod-0,006	Loos et al., 2007
Italie	<lod-0,005	
France	0,056-208,543	Baugros et al., 2008
Allemagne	<lod-14,444	Hohne et Puttmann, 2008

III Le devenir du bisphénol A dans l'environnement, cas des écosystèmes aquatiques

Plusieurs processus abiotiques et biotiques régissent le devenir du BPA dans les écosystèmes aquatiques. De par ses propriétés physico-chimiques, ce composé apparaît peu volatilisable et hydrolysable dans les eaux naturelles. Les phénomènes majeurs qui vont concourir à son devenir dans les systèmes aquatiques sont les phénomènes de dégradation et de sorption.

III.1 Les phénomènes de dégradation en milieux naturels

III.1.1 Les phénomènes de photolyse

Un certain nombre d'études récentes ont porté sur l'étude de la photolyse (directe et/ou indirecte) du BPA. Elles concluent que le BPA est une espèce très sensible à ce type de réaction de dégradation et que, par conséquent, ces réactions de dégradation peuvent jouer un rôle primordial dans le devenir de ce composé dans les écosystèmes. La photolyse a été démontrée comme étant très fortement dépendante des conditions du milieu, comme par exemple de la présence de matière organique dissoute. Chin et al. (2004) ont mis en évidence que la photolyse indirecte du BPA était favorisée par les photo-oxydants générés par l'irradiation de la matière organique dissoute. La présence d'espèces réactives de l'oxygène (Neamtu et Frimmel, 2006a ; Chen et al., 2006), la présence de

catalyseurs tels que NaCl, Fe^{3+} (Sajiki et Yonekubo, 2002 ; Sajiki et Yonekubo, 2004), la présence d'acides humiques et d'algues (Peng et al., 2006b ; Zeng et al., 2003 ; Zhan et al., 2007) sont également des paramètres qui peuvent affecter l'efficacité des phénomènes.

III.1.2 Les phénomènes de biodégradation

Différentes expériences ont été menées en laboratoire et ont mis en évidence une biodégradation rapide du BPA dans les systèmes aquatiques et dans les stations d'épuration en présence de populations bactériennes non-acclimatées et acclimatées. Ces études ont été résumées par Staples et al. (1998). Plus récemment Kang et Kondo (2005) ont comparé les mécanismes de biodégradation du BPA dans les rivières où ce mécanisme se déroule dans des conditions aérobies uniquement (Kang et Kondo, 2002) sous dépendance de la température (la biodégradation augmente lorsque la température du milieu augmente, (Kang and Kondo, 2002) et de la richesse du milieu en bactéries (Staples et al., 1998)) et les mécanismes de biodégradation du BPA en milieu marin où ils semblent suivre des cinétiques plus lentes en conséquence d'un temps d'acclimatation très long des bactéries (estimé à 50 jours par Ying et Kookana, 2003). Ils concluent que, dans les milieux d'eaux douces telles que les rivières, les mécanismes de biodégradation sont prévalents dans le devenir du BPA, au contraire dans les milieux marins les mécanismes de photodégradation sembleraient être majoritaires. Lobos et Spivak (cités par Staples et al., 2000) ont étudié les voies de la dégradation du BPA, ils ont pu mettre en évidence 2 voies de dégradation. La voie majoritaire conduit à la formation de 2 métabolites : l'acide 4-hydroxybenzoïque et le 4-hydroxy-acétophénone, qui sont rapidement dégradés en CO_2 et incorporés aux cellules bactériennes (Figure 15).

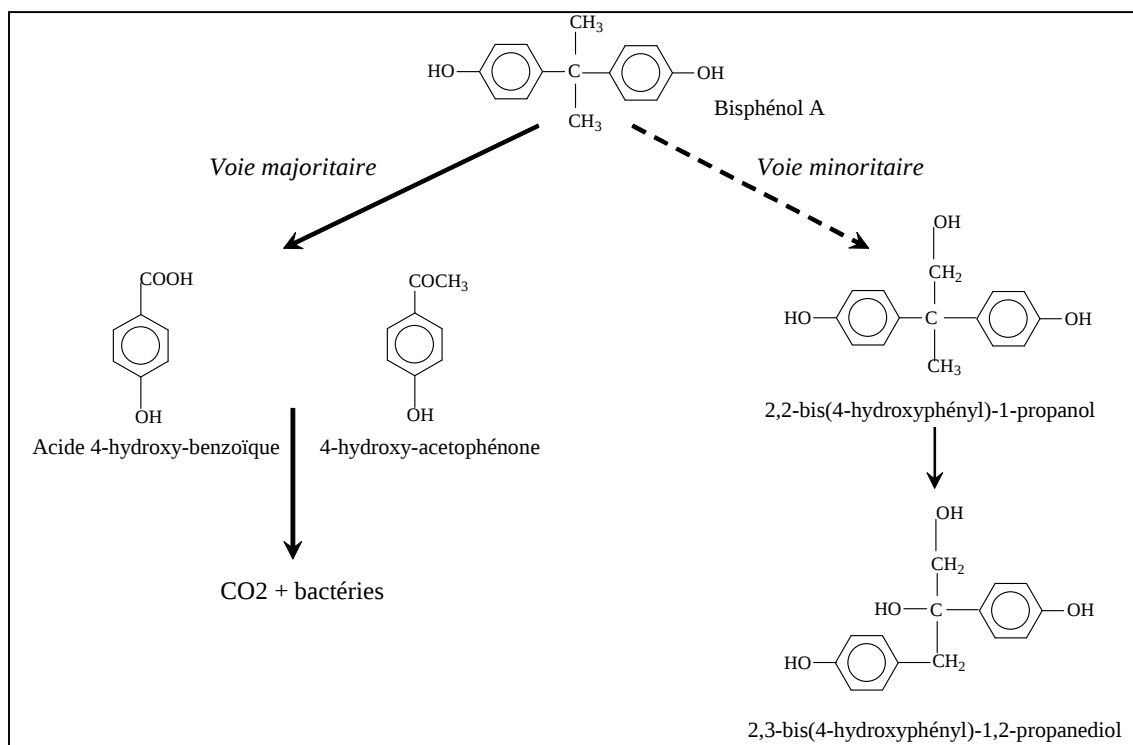


Figure 15 : Une approche des voies de dégradation du BPA (d'après Staples et al., 2000).

III.2 Les phénomènes de sorption en milieux naturels

Les valeurs de Koc pour le BPA mettent en évidence une faible affinité de ce composé pour les particules en suspension, les sédiments et les sols. Certaines études ont pu mettre en évidence l'effet de la présence d'autres contaminants inorganiques et organiques sur les phénomènes de sorption/désorption du BPA (Li et al., 2007a ; Xu et al., 2008). Li et al. (2008b) ont mis en évidence que la présence de métaux lourds et de surfactants cationiques favorisait les phénomènes de sorption du BPA sur les particules du sol et qu'au contraire la présence de certains types de surfactants favorisait les phénomènes de désorption. De même, certains travaux ont également montré que la dynamique de sorption/désorption était dictée par la nature des substances humiques (Sun et al., 2006) et par la physicochimie. Comme pour les APEO, la présence de BPA dans des phases solides en suspension est peu documentée (Patrolecco et al., 2006 ; Xu et al., 2008).

III.3 Les données de présence du Bisphénol A dans les systèmes aquatiques

Le BPA a fait l'objet d'un certain nombre d'études qui ont documenté sa présence dans les eaux de surface, les eaux souterraines et dans les sédiments. Une synthèse est présentée dans le Tableau 15. Comme suggéré précédemment, les eaux de ruissellement issues des décharges apparaissent comme une des sources majoritaires pour ce composé dans l'environnement avec des concentrations de l'ordre de plusieurs de $\mu\text{g.l}^{-1}$. Les eaux courantes présentent un niveau moindre de contamination avec des concentrations de l'ordre de la centaine de ng.l^{-1} pour les plus contaminées.

Tableau 15 : Données de présence du BPA dans différents systèmes aquatiques de par le monde.

	Localisation	Milieu	[BPA] ng.l^{-1} (phase dissoute)	Références
Eaux de surface	Portugal	Estuaire	<80-10700	Ribeiro et al., 2008
	Japon	Eaux marines et eaux courantes	<10d-80	Kawahata et al., 2004
	Chine	Eaux marines et eaux courantes	6-881	Peng et al., 2008
	France	Eaux de surface et eaux souterraines	40-175	Baugros et al., 2008
	Rivières (exutoires rejets manufactures)	Eaux courantes	<1000	Staples et al., 2000
	Baden Württemberg (Allemagne)	Eaux courantes	<50-272	Bolz et al., 2001
	Allemagne	Eaux de boisson	2	Kuch et Ballschmiter, 2001
	Pays bas	Estuaire	330	Belfroid et al., 2002
	Pays bas	Eaux courantes	14-320	Belfroid et al., 2002
	Allemagne	Eaux de surface	5-410	Fromme et al., 2002
	Italie	Lagon	30	Pojana et al., 2004
	Rivière Tama, Tokyo	Eaux courantes	0,6-700	Kawaguchi et al., 2006a
	Datianshan Guangzhoo	Décharges	17 000-2 923 000	Li et al., 2006
	Ouse (Sussex)	Eaux courantes	<0,1-12	Zhang et al., 2006
	Localisation	Milieu	[BPA] $\mu\text{g.g}^{-1}$ (poids sec)	Références
Sédiments	Berlin	Eaux de surface	<0,005-150	Fromme et al., 2002
	Corée	Eaux marines	<0,001-0,19	Koh et al., 2006
	Japon	Aires urbaines	<120-22000	Kitada et al., 2008
		Aires rurales	<10d-6800	

III.4 Les propriétés de bioconcentration et bioaccumulation

Miti et al. (1977) furent les premiers à étudier la bioaccumulation du BPA chez un poisson *Cyprinus carpio*. Avec une valeur de facteur de bioconcentration comprise entre 20-68, ils conclurent que le BPA était faiblement bioaccumulable. Plus récemment, un facteur de bioconcentration égal à 196 a été estimé à partir de la valeur de Kow (Howard, 1989). Le BPA présente donc des capacités de bioconcentration faibles à modérées (cité dans EDC, 1999).

III.5 Les propriétés de biotransformation

Très peu d'études se sont intéressées aux voies et processus d'exposition des organismes aquatiques au BPA. Lindholm et al. (2001) ont exposé des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) par la voie directe ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$), ils ont pu observer un état d'équilibre après 6 à 12 heures d'exposition. Ils mettent en évidence la présence de métabolites notamment de Bisphénol A glucuronidé. Certains travaux ont par ailleurs mis en évidence que les capacités de biotransformation existent dès les premières semaines du développement embryonnaire (Bjerregaard et al., 2008). Le BPA peut également être hydroxylé et oxydé en une orthoquinone. Ce composé ayant la capacité de se fixer à l'ADN, il semblerait que ceci soit à relier au caractère mutagène "indirect" du BPA (Atkinson et al., 2002). Daidoji et al. (2006) ont mis en évidence que chez la carpe les phénomènes de métabolisation et d'excrétion du BPA étaient dépendants de la température de l'eau. Ils concluent que durant la période de pré-reproduction une exposition à ce xénobiotique augmente ses effets défavorables sur les organes cibles tels que les gonades et le cerveau. En outre, Nakajima et al. (2007) ont pu mettre en évidence les capacités de biotransformation développées par des microalgues d'eau douce vis-à-vis du BPA : activité de glycosilation. Parce que ces métabolites peuvent être bioaccumulés chez les algues et les plantes et par la suite peuvent être digérés en BPA par des β -glycosidases (après ingestion) dans les intestins d'organismes supérieurs. Les auteurs concluent que la prise en compte des métabolites de BPA pour conduire des études de risques est nécessaire.

IV La toxicité

Comme exposé précédemment, le BPA est rapidement dégradé dans l'environnement et possède un faible potentiel de bioaccumulation. Les organismes aquatiques qui vivent à proximité des sources de BPA sont les plus exposés aux effets nocifs de ce composé.

IV.1 La toxicité aigüe et chronique

Les valeurs concernant la toxicité aigüe et la toxicité chronique du BPA sont résumées dans le

Tableau 16. Il est important de considérer les 2 valeurs qui ont permis de définir les $\text{PNEC}_{\text{aqua}}$ pour ce composé, à savoir la valeur de NOEC (No Observable Effect Concentration) pour

l'éclosion des œufs chez *Pimephales promelas* qui est égale à $16 \mu\text{g.l}^{-1}$ et la valeur de LOEC (Lowest Observable Effect Concentration) pour un effet sur les cellules spermatiques chez la même espèce qui est égale à $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ (D'après rapport UE, 2004).

La valeur de PNEC chronique eaux douces (calculée avec la méthode du facteur d'extrapolation) est égale à $1,6 \mu\text{g.l}^{-1}$. Pour tenir compte de l'effet sur le développement des cellules spermatiques une valeur de PNEC conservatrice égale à $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ a été déterminée. En se basant sur la méthode des coefficients de partage, une valeur de PNEC chronique pour les sédiments a été établie et est égale à $26 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (poids humide).

Tableau 16 : Données de toxicité du BPA (INERIS).

Matrice	Toxicité aiguë			Toxicité chronique		
	Unités (mg.l^{-1})	Eau douce	Eau marine	Unités (mg.l^{-1})	Eau douce	Eau marine
Eau	CL/EC ₅₀ algues	2,5	1	NOEC/CE ₁₀ algues	1,36	0,69
	CL/EC ₅₀ invertébrés	-	1,1	NOEC/CE ₁₀ invertébrés	>3,146	-
	CL/EC ₅₀ poissons	4,6	7,5	NOEC/CE ₁₀ poissons	0,016	-
Matrice	Unités (mg.kg^{-1})	Eau douce	Eau marine	Unités (mg.kg^{-1})	Eau douce	Eau marine
Sédiments	CL/EC ₅₀ org. benthiques	-	-	NOEC/CE ₁₀ org. benthiques	36	-

Des études menées chez le rat laissent supposer que le BPA peut avoir une action mutagène et tératogène (Nagel et al., 1997). Ces effets ont également été démontrés chez les poissons (Honkanen et al., 2004 ; Pastva et al., 2001 ; cités dans EDC, 1999) mais à des concentrations ($> \text{mg.l}^{-1}$) irréalistes d'un point de vue environnemental.

Le potentiel du BPA à former des adduits à l'ADN a été étudié. Le BPA est chimiquement et enzymatiquement oxydé en un catéchole et en suivant en l'orthoquinone correspondante, qui donne lieu à un certain nombre d'adduits à l'ADN (Atkinson et al, 1995 ; cité dans EDC, 1999).

IV.2 Le bisphénol A et la perturbation endocrinienne

C'est Krishnan et al. (1993) qui ont montré que le BPA a une capacité à engendrer une perturbation endocrinienne. Le BPA est un composé œstrogénique par sa capacité à se fixer sur le récepteur à œstrogène ER avec une affinité de l'ordre 1:2000 par rapport à celle de l'hormone naturelle : la 17- β -œstradiol. Le caractère œstrogénique du BPA a été mis en évidence au travers de tests *in vivo* et *in vitro*.

IV.2.1 Effets in vitro

Le BPA est capable d'induire la prolifération cellulaire des cellules MCF7 (Krishnan et al., 1993), de stimuler le relargage de la prolactine par les cellules GH3 de l'hypophyse (Steinmetz et al. 1997), d'induire l'activation transcriptionnelle du récepteur ER (Gaido et al., 1997 ;), d'induire la synthèse de vitellogénine (cité dans EDC, 1999). De plus, le BPA est capable d'induire l'ARNm codant pour la vitellogénine des hépatocytes primaires chez le xénope mâle (*Xenopus laevis*). Le BPA

est capable de se fixer à la fois sur les récepteurs à œstrogènes de type ER α et ER β (Kuipper et al., 1998, cité dans EDC 1999) agissant comme un agoniste de l'hormone naturelle, il s'avère cependant qu'il possède une plus grande affinité pour les récepteurs ER β que pour les récepteurs ER α (Matthews et al., 2001 cité dans EDC 1999). De plus, il a été mis en évidence que les formes métabolisées du BPA (BPA-glucuronidé) n'étaient pas capables d'activité œstrogénique *in vitro*. Il semblerait que la capacité du BPA à induire des effets néfastes sur un organisme (notamment les réponses utérines) soit clairement dépendante des conditions d'exposition (voie trophique ou voie directe) (Matthews et al., 2001) (cités dans EDC, 1999).

IV.2.2 Effets in vivo

Tableau 17 : Les principaux effets d'une exposition au BPA en milieu contrôlé sur les poissons (Mills and Chichester, 2005).

Effets observés	Espèce	Nombre de références
Réduction de la production d'œufs	<i>Medaka</i>	1
	<i>Pimephales promelas</i>	1
	<i>Danio rerio</i>	1
Réduction de l'indice gonado-somatique (♂)	<i>Pimephales promelas</i>	1
Diminution du comportement sexuel	<i>Danio rerio</i>	1
Intersexe gonadique	<i>Medaka</i>	1
Diminution de la fertilité des œufs	<i>Danio rerio</i>	1
Délai dans la maturation sexuelle	<i>Danio rerio</i>	1
Altérations dans la structure des gonades	<i>Medaka</i>	1
	<i>Danio rerio</i>	1
Diminution de la ponte et de la viabilité des œufs	<i>Pimephales promelas</i>	1
	<i>Medaka</i>	1
Réduction de l'indice gonado-somatique (♀)	<i>Pimephales promelas</i>	1

Lors d'exposition en laboratoire, sur différentes espèces de poissons, il a été montré que le BPA était capable d'induire des phénomènes d'ovotestis et des changements morphologiques dans les testicules de Medaka exposés (Metcalf et al., 2001), de réduire la production d'œufs (Shioda and Wakabayashi, 2000), d'altérer les gonades, de réduire la production d'œufs et d'engendrer des troubles de la fertilité (Segner et al., 2003) ainsi que de réduire l'indice gonado-somatique (GSI) et la production d'œufs (poissons-tête-de-boules femelles exposés) (Sohoni et al., 2001b). Des expositions au BPA ont également mis en évidence sa capacité à induire la synthèse de vitellogénine (Sohoni et al., 2001b ; Lindholm et al., 2001 ; Christiansen et al., 1998). Les principaux effets observés suite à des expositions au BPA sont résumés dans le Tableau 17 et la Figure 16.

Les effets du BPA ne se cantonnent pas à de la reprotoxicité, cette molécule est également susceptible d'induire :

- une «down regulation» de l'axe somatotropique chez des poissons exposés (daurade) en agissant sur le niveau d'expression et la transduction du récepteur à l'hormone de croissance (GRH) et par conséquent d'affecter le développement et la croissance de poissons exposés,
- une activité immunotoxique (poisson rouge exposé) en conséquence de changements fonctionnels, concentrations dépendants, des lymphocytes et des macrophages.

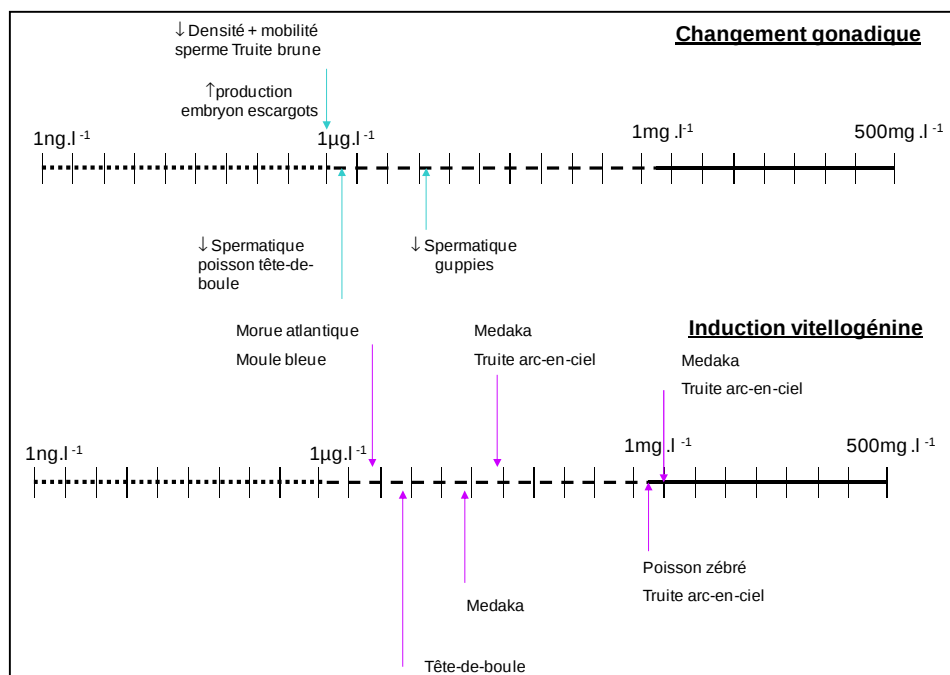


Figure 16 : Figure récapitulative des concentrations en BPA aqueux ayant entraîné : A) des changements gonadiques et B) des synthèses de vitellogénine chez différentes espèces de poissons et mollusques (d'après Crain et al., 2007).

V Quelques aspects législatifs et réglementaires

La Directive Européenne 90/128/EEC sur les matières plastiques de la Commission européenne et la Directive 67/548/EEC concernant les matières constitutives des emballages fixent une limite spécifique de migration égale à 3 mg.kg^{-1} de nourriture pour la protection du consommateur. A la suite d'un avis de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) publié en 2002, la LMS (Limite de Migration Spécifique) a été abaissée à $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Directive 2004/19/CE, premier amendement de la Directive n°2002/72/CE). Le BPA et certains de ses produits dérivés (Tetrabromobisphénol A) sont à l'heure actuelle en cours d'évaluation comme substances dangereuses prioritaires par la commission européenne pour une éventuelle entrée lors de la prochaine révision de la liste des 33 substances prioritaires (Annexe 10) de la Directive Loi Cadre sur l'Eau (texte adopté par le parlement le 22 mai 2007, document A6-0125/2007).

CHAPITRE B

LES SUBSTANCES PHARMACEUTIQUES

I Les produits de soins corporels et médicamenteux PCPPs (Personal Care Products and Pharmaceuticals)

Les PCPPs sont un vaste groupe de composés chimiques comprenant (PCPP, Daughton, 2001) :

- les médicaments (prescrits et non prescrits),
- les agents de diagnostics (agents de contrastes rayons X),
- les "aliments" (bioactifs, huperzine A),
- d'autres classes de composés tels que les fragrances (muscs), les agents de protection solaire, les agents "anti-âge" (rétinoïdes).

L'émergence de certains pays, les progrès médicaux, l'augmentation de l'espérance de vie sont autant de facteurs qui laissent à penser que leur consommation suivra une croissance exponentielle et par voie de conséquence qu'ils joueront un rôle de plus en plus important dans la contamination de l'environnement en général et des systèmes aquatiques en particulier.

I.1 PCPP : le cas des substances pharmaceutiques

L'Union Européenne (UE, 2004) définit un produit médicamenteux comme étant :

- toute substance ou combinaison de substances présentées comme ayant des propriétés pour traiter ou prévenir les maladies de l'homme ;
- toute substance ou groupe de substances qui peuvent être utilisés ou administrés à l'homme soit pour restaurer, corriger ou modifier les fonctions physiologiques de l'individu par une action pharmacologique, immunologique ou métabolique soit pour le diagnostic médical.

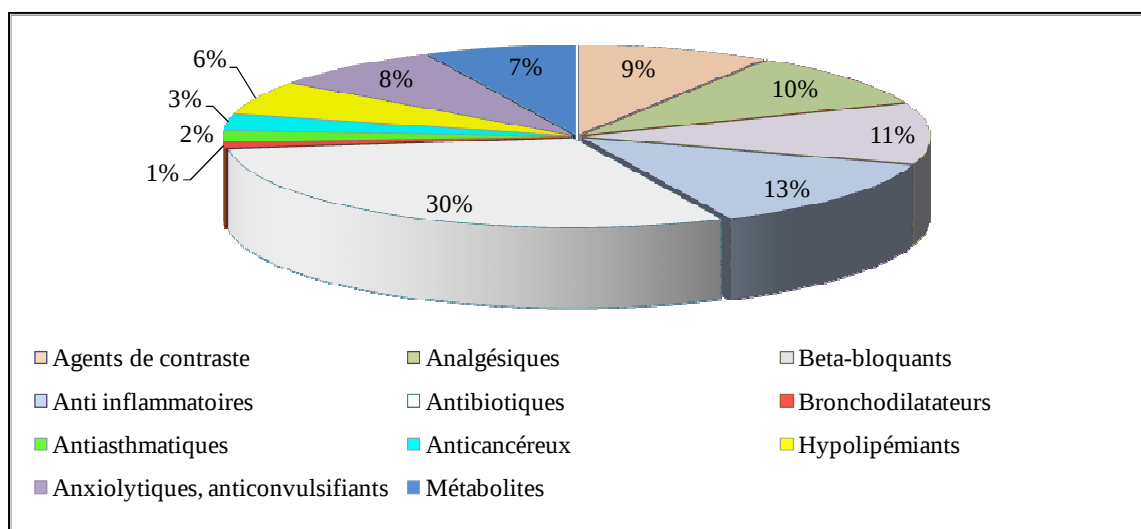


Figure 17 : Principales classes de molécules quantifiées dans l'environnement (d'après D-1-1 KNAPE).

En Europe, près de 3000 substances pharmaceutiques sont référencées. Parmi ces substances, les efforts de recherche (identification et quantification des sources, devenir et présence de la source à l'environnement) se sont principalement portés sur les antibiotiques suivis par les anti-inflammatoires non stéroïdiens, pour l'instant (Figure 17).

I.1.1 Les grandes classes thérapeutiques de substances pharmaceutiques à usages humains

Une liste non exhaustive des principales classes médicamenteuses sera énoncée ci-dessous ; les principaux modes d'actions et molécules pharmaceutiques représentatives de chacune des classes seront spécifiés.

a) Les antibiotiques

Il existe un nombre très important de substances à action antibiotique. Les familles thérapeutiques sont déterminées en fonction de leur mode d'action (Figure 18) :

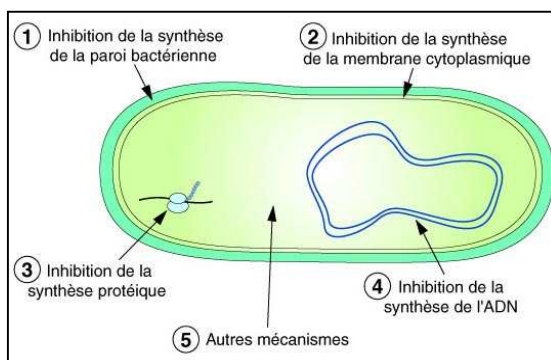


Figure 18 : Principaux modes d'action des antibiotiques.

- ① Les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne (D-cyclosérine, fosfomycine, bacitracine, β -lactamines, glycopeptides, ...),
- ② Les antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique (polymyxines, thyrothrycine),
- ③ Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique (macrolides, tétracyclines),
- ④ Les antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques (quinolones, fluoroquinolones, sulfamides),
- ⑤ Les antibiotiques agissant par inhibition compétitive (sulfamides).

b) Les analgésiques et antalgiques

Ces molécules, très nombreuses, sont aussi très utilisées aussi bien sans ordonnance pour les composés les plus courants, comme l'ibuprofène, que sur prescription, pour les composés les plus actifs (diclofénac, naproxène, dextropropoxyphène,...). Il peut-être distingué :

- Les antalgiques de niveau 1 également appelés antalgiques périphériques, sont indiqués dans les douleurs légères à modérées. Leur action se fait principalement au niveau des nocicepteurs (récepteurs de la douleur) périphériques. Ce sont essentiellement les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), l'aspirine, le paracétamol. Ils agissent en inhibant de manière réversible ou irréversible une ou les deux isoformes de la cyclo-oxygénase (COX 1 et 2), qui catalysent la synthèse de différentes prostaglandines à partir de l'acide arachidonique.
- Les antalgiques de niveau 2 indiqués en cas de douleurs modérées à intenses. Les antalgiques de niveau 2 sont essentiellement représentés par des associations d'antalgiques de niveau 1 avec des dérivés opioïdes mineurs comme la codéine et le dextropropoxyphène. L'association permet ainsi de potentialiser l'effet analgésique de chacun des constituants. Le paracétamol est l'antalgique périphérique de choix pour ces associations.
- Les antalgiques de niveau 3 indiqués en cas de douleurs sévères et dans les douleurs d'origine cancéreuse : morphine, fentanyl.

c) Les psychotropes

Le terme de médicaments psychotropes désigne les médicaments qui améliorent l'activité mentale quand elle est perturbée. Il s'agit globalement des médicaments utilisés en psychiatrie pour traiter des troubles mentaux banals ou graves.

✓ Les antidépresseurs

La classe pharmacologique des antidépresseurs reste très hétérogène tant au niveau des mécanismes d'action qu'au niveau des effets indésirables, la différenciation entre les produits d'une même famille reste toujours difficile. Peuvent être considérés :

- Les antidépresseurs tricycliques (TCA) avec l'amitriptyline et l'imipramine. Les TCA interviennent en : évitant la recapture synaptique des mono-amines (Noradrénaline (NA) et Sérotonine (5-HT)), par "Down regulation" des récepteurs bêta-adrénergiques et des récepteurs sérotoninergiques et par la désensibilisation de l'adénylate cyclase à la stimulation par la NA au niveau post-synaptique.
- Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) avec la phénelzine, la toloxatone. Les IMAO agissent par inhibition des enzymes de dégradation des mono-amines (la mono-amine oxydase (MAO) et la catéchol-O-méthyltransférase (COMT)) ou par "Down regulation" des récepteurs bêta-adrénergiques et des récepteurs sérotoninergiques et par la désensibilisation de l'adénylate cyclase à la stimulation par la NA au niveau post-synaptique.
- Les inhibiteurs spécifiques de la recapture de la noradrénaline ou de la sérotonine avec la fluoxétine. Ils interviennent en évitant la recapture synaptique des mono-amines.

✓ Les anticonvulsifiants

Les anticonvulsifiants sont les médicaments indiqués principalement dans le traitement pharmacologique de l'épilepsie. Quatre mécanismes d'action principaux sous-tendent l'effet

pharmacologique bénéfique des anticonvulsifiants ; plus particulièrement le blocage des canaux sodiques voltage-dépendants par la carbamazépine.

✓ Les anxiolytiques

Parmi ces molécules, peuvent-être citées les benzodiazépines qui sont des agonistes qui favorisent l'ouverture du canal Cl^- par le GABA (Acide Gamma-Amino Butyrique) et ont donc un effet inhibiteur. Elles agissent en augmentant la fréquence d'ouverture du canal avec le diazépam, l'alprazolam.

d) Les β - bloquants

Les β -bloquants ou β -bloqueurs sont des médicaments qui inhibent les récepteurs adrénergiques β . Ils sont utilisés pour le traitement des troubles cardiaques (hypertension artérielle, infarctus du myocarde), le traitement du glaucome, des actions diurétiques. Les β -bloquants s'opposent aux effets bêta-adrénergiques des catécholamines par antagonisme compétitif au sein des récepteurs avec la propanolol, l'aténolol.

e) Les hypolipémiants

Deux grandes classes thérapeutiques sont prédominantes : les fibrates (diminuent les glycérides et le cholestérol) et les statines (diminuent le cholestérol). Les fibrates agissent par inhibition de l'enzyme HMG-CoA (3-hydroxyméthylglutaril coenzyme A réductase) qui contrôle la synthèse du cholestérol avec le gemfibrozil. Les statines agissent en inhibant l'action de l'enzyme HMG-CoA intervenant dans la synthèse du cholestérol avec l'atorvastatine, la pravastatine.

f) Les antiasthmatiques

Parmi les antiasthmatiques, la classe des agonistes bêta₂-adrénergiques peut-être citée. Ces molécules agissent par liaison et stimulation des récepteurs β_2 qui provoquent la stimulation d'AMPcyclique (Adénosine MonoPhosphate cyclique). L'augmentation d'AMPc va induire l'activation de protéines kinases qui vont déclencher une cascade de réactions de phosphorylation des protéines régulatrices du tonus musculaire lisse avec le salbutamol, la terbutaline.

g) Les médicaments de l'endocrinologie et du métabolisme

✓ Les contraceptifs

La contraception est définie comme l'utilisation de procédés temporaires et réversibles destinés à empêcher la conception. Le nombre d'utilisatrices est estimé à environ 100 millions dans le monde, dont un peu plus de 3 millions de Françaises, soit 36 % des femmes de 15 à 49 ans. Sous le terme de contraception, peuvent se distinguer :

- La contraception œstro-progestative : c'est la méthode la plus utilisée (41 % des femmes de vingt à quarante-quatre ans). Elle associe un estrogène de synthèse (l'éthinylœstradiol) à un progestatif de

synthèse dérivé des 19-norstéroïdes, à titre d'exemple association de drospirénone et d'éthinylœstradiol.

- La contraception progestative : les progestatifs exercent leur effet antigonadotrope en utilisant le phénomène de rétrocontrôle négatif de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien, qui se trouve ainsi mis au repos, sans ovulation possible. Elle est basée sur de faibles doses de lévonorgestrel ou de médroxyprogestérone.

- La contraception d'urgence ou abortive : La contraception d'urgence se définit comme tout moyen, physique ou par l'intermédiaire de molécules biologiquement actives, utilisé pour prévenir une grossesse avec le lévonorgestrel et le RU-486 qui sont des analogues structuraux de la progestérone capables de se fixer sur le récepteur de la progestérone et ont une action progestative (lévonorgestrel) ou anti-progestative (mifépristone)

✓ Les traitements hormonaux substitutifs (THS)

- Les traitements de la ménopause qui reposent sur la correction de la carence œstrogénique induite lors de la ménopause, à titre d'exemple l'association de l'œstradiol à la noréthistérone, l'œstradiol, la tibolone.

- Les traitements de l'andropause qui reposent sur la correction de la carence en testostérone induite par l'âge, avec la prise de testostérone.

✓ Les médicaments de l'obésité

La problématique des traitements de l'obésité est récente. Diverses approches médicamenteuses ont été initiées : les anorexigènes avec l'amfépramone, les inhibiteurs de la lipase intestinale avec l'orlistat, les inhibiteurs de la recapture des mono-amines (noradrénaline et sérotonine) avec la sibutramine.

✓ Les médicaments de la thyroïde:

Sur le plan hormonal, le traitement consiste soit à corriger une déficience, hypothyroïdie, par l'apport d'hormones thyroïdiennes avec la lévothyroxine, la liothyronine L-T3, soit à réduire un excès de sécrétion, hyperthyroïdie, par la prise d'antithyroïdiens de synthèse avec la carbimazole.

h) Les antitumoraux et antinéoplasiques

Ces composés cytostatiques ont été synthétisés pour interagir contre la prolifération cellulaire. Là encore, il existe un grand nombre de molécules qui diffèrent selon leurs modes d'action, les principales sont résumées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Principaux modes d'action des agents anticancéreux et antitumoraux.

Classes	Type d'action	Molécules actives
Anticancéreux anti métaboliques	Inhibition de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques	5-fluorouracile, méthotrexate
Agents alkylants	Altération ADN	Les Nitroso-urées (carmustine), les moutardes azotées (méchlorethamine)
Agents intercalants	Agents antibiotiques s'intercalant dans la double hélice ADN	Les anthracyclines (amsacrine)
Agents altérant le fuseau mitotique	Cytosquelette Mitotique	Alcaloïdes de la pervenche
Cytokines	Synthèse protéique (ARN m)	Interféron alpha
Hormones et anti-hormones	Inhibition modulation des récepteurs œstrogéniques	Tamoxifène, clomifène

i) Les produits de contraste

Les produits de contraste sont utilisés pour majorer le contraste naturel des compartiments dans lesquels ces produits sont distribués ou éliminés. Se distinguent : les agents de contraste Rayons X et principalement les produits de contraste iodés (PCI) qui majorent l'atténuation des rayons X par effets photo-électriques (iopromide, iopamidol,...) et les agents de contraste IRM qui agissent de manière indirecte en accélérant la vitesse de relaxation des noyaux d'hydrogène les environnant (nanoparticules superparamagnétiques, association de ion gadolinium Gd^{3+} + chélates).

ii) Les drogues illicites et les traitements substitutifs

Les drogues augmentent la quantité de dopamine disponible dans une zone du cerveau, le circuit de la récompense. Il est désormais établi que tous les produits qui déclenchent la dépendance chez l'homme augmentent la libération d'un neuromédiateur, la dopamine, dans une zone précise du cerveau, le noyau *accumbens*. Il peut-être distingué :

- Les amphétamines et leurs dérivés, comme l'ecstasy, provoquent des augmentations immédiates et importantes de sérotonine synaptique et de dopamine, suivies d'un épuisement des stocks de ces neuromédiateurs.
- Le cannabis entraîne une faible libération de dopamine selon un mécanisme encore étudié et discuté. Les récepteurs cannabinoïdes sont présents en forte densité dans le système limbique.
- La cocaïne agit en empêchant la recapture de la dopamine au niveau des synapses. Ce faisant, elle augmente la présence et donc l'effet de la dopamine dans les synapses au niveau du cerveau des émotions (système limbique).
- L'héroïne est transformée dans le cerveau en morphine. Celle-ci se lie aux récepteurs opioïdes naturels (récepteurs des endorphines). Elle stimule également le système de la dopamine, mais par un

mécanisme indirect (en diminuant le contrôle des neurones GABA (Acide Gamma-Amino Butyrique) sur les neurones à dopamine).

I.1.2 Les données de consommation en France

a) Les substances pharmaceutiques à usages humains

Il est très difficile d'avoir accès aux données concernant l'utilisation de substances pharmaceutiques, en France. Seule l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) publie chaque année la liste des 50 substances les plus vendues en officines et en officines hospitalières (Tableau 19). Dans leur travail de priorisation des substances pharmaceutiques préoccupantes pour l'environnement en France, Besse et Garric (2008) ont publié les premières données quantitatives d'usage de substances pharmaceutiques en France. La Figure 19 présente les quantités annuelles (kg) de substances pharmaceutiques d'usages courants (hors hormones et anticancéreux) : plus de 3300 tonnes de paracétamol (la molécule active la plus utilisée en France), 33 tonnes de carbamazépine et près 4 tonnes de fluoxétine vendues chaque année.

De plus, étant donnée la cyclicité des phénomènes épidémiques, les usages de substances pharmaceutiques sont par conséquent extrêmement variables. A titre d'exemple, Castiglioni et al. (2006) ont mis en évidence que les apports hivernaux en composés d'usages courants (anti-inflammatoires, antibiotiques) étaient plus importants que les apports estivaux.

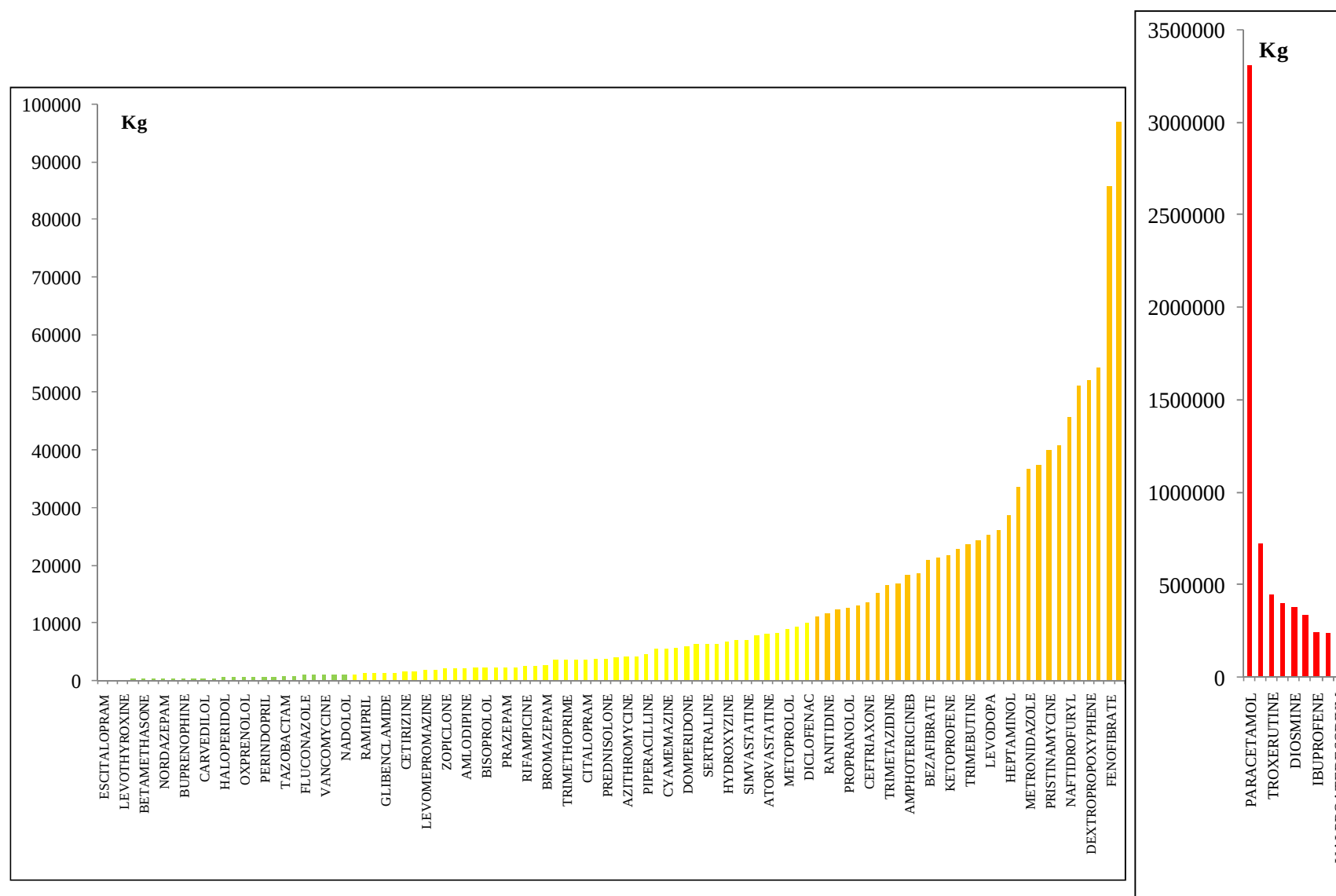


Figure 19 : Consommation annuelle (quantité, en kg) d'une liste non exhaustive de substances pharmaceutiques en France (d'après Besse et Garric, 2008).

Tableau 19 : Les médicaments les plus vendus en officines (en quantité, nombre de boîtes) en France en 2006 (Source AFSSAPS).

Rang	Produit	Classe thérapeutique	Molécules actives
1(1)	DOLIPRANE®	Antalgique antipyrétique non salicylé	Paracétamol
2 (2)	EFFERALGAN®	Antalgique antipyrétique non salicylé	Paracétamol
3 (3)	DAFALGAN®	Antalgique	Paracétamol
4 (4)	LEVOTHYROX®	Hormone thyroïdienne	Lévothyroxine
5 (5)	KARDEGIC®	Antiagrégant plaquettaire préventif	Acétylsalicylate de lysine
6 (6)	SPASFON®	Antispasmodique musculotrope	Phloroglucinol,
7 (11)	TAHOR®	Hypolipémiant de la famille des statines	Atorvastatine
8 (12)	VOLTARENE®	Anti-inflammatoire non stéroïdien	Diclofénac
9 (11)	ELUDRIL®	Antiseptique local	Chlorhexidine
10 (8)	DI-ANTALVIC®	Antalgique opiacé en association	Dextropropoxyphène,
11 (8)	DAFLON®	Vasculoprotecteur, veinotonique	Fraction flavonoïque purifiée
13 (14)	ADVIL®	Antalgique antipyrétique anti-inflammatoire non stéroïdien	Ibuprofène
16 (15)	ASPEGIC®	Antalgique antipyrétique	Aspirine
17 (29)	METHADONE®	Dépendance aux opiacés : substitution	Méthadone
18 (23)	LAMALINE®	Antalgique opiacé en association	Caféine, Paracétamol, Opium
19 (21)	ORELOX®	Antibiotique de la famille des céphalosporines de III ^{ème} génération	Cefpodoxime
21 (43)	IXPRIM®	Antalgique opiacé en association	Paracétamol, Tramadol
22 (17)	TEMESTA®	Anxiolytique de la famille des benzodiazépines	Lorazépam
24 (28)	SUBUTEX®	Dépendance aux opiacés : substitution	Buprénorphine
26 (31)	VASTAREL®	Antiangoreux	Trimétazidine
27 (34)	AMLOR®	Antihypertenseur inhibiteur calcique	Amlopidine
29 (38)	AERIUS®	Antiallergique oral antihistaminique H1	Desloratadine
30 (70)	HELICIDINE®	Antitussif	Helicidine
31 (7)	PROPOFAN®	Antalgique opiacé faible	Caféine, Dextropropoxyphène, Paracétamol
32 (57)	PNEUMOREL®	Antitussif	Fenspiride
33 (35)	METEOSPASMYL®	Antispasmodique musculotrope	Siméthicone, Alvérine
34 (18)	GINKOR®	Veinotonique	Ginkgo biloba, Heptaminol,
36 (51)	SOLUPRED®	Corticoïde général	Acide benzoïque, Prednisolone
37 (33)	TOPLEXIL®	Antitussif antihistaminique	Guaifénésine, Oxomémazine
38	THIOVALONE®	ORL	Tixocortol, Chlorhexidine
40 (78)	INEXIUM®	Antiulcéreux	Esomeprazole
41 (45)	BETADINE®	Antifongique gynécologique	Povidone iodée
42 (24)	STILNOX®	Hypnotique de la famille des imidazopyridines	Zolpidem
43 (45)	VENTOLINE®	Antiasthmatique bronchodilatateur bêta-2	Salbutamol
44 (37)	MEDIATOR®	Hypolipémiants	Benfluorex
45 (49)	PIVALONE®	Corticoïde nasal, anti-inflammatoire et	Tixocortol
46 (55)	PREVISCAN®	Antithrombotique	Fluindione
47 (53)	DIALGIREX®	Antalgique	Dextropropoxyphène
48 (41)	EFFEXOR®	Antidépresseur (IRS)	Venlafaxine
49 (52)	NUROFEN®	Antalgique	Ibuprofène
50 (72)	EMLAPATCH®	Anesthésique local	Lidocaïne, Prilocaine

() Classement de l'année 2005

b) Le cas des composés d'usages courants

Des composés tels que la caféine et la théophylline, bien que très largement employés par la pharmacopée : association à des antalgiques, des antiasthéniques, des produits de régime, des bronchodilatateurs ont pour sources principales la consommation de boissons. En moyenne, une personne de 60 kg consomme chaque jour 239 mg de caféine (Tableau 20).

Tableau 20 : Consommation de caféine dans les produits d'usages courants (www.peidruginfo.ca).

Type de produit		Caféine (mg. portion)
Thé (1 tasse)	Tous les types	10-110
Café (1 tasse)	Tous les types	40-180
Boissons à base de Cola (33cl)	Tous types	30-60
Chocolat noir	50 g	40-50

c) Le cas particulier des produits illicites et de substitution

D'après l'Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies (OFDT), en 2005, un tiers des 15-64 ans (32,4 %) déclare avoir déjà consommé au moins une drogue illicite au cours de sa vie. Trois individus sur dix (30,6 %) signalent avoir déjà consommé du cannabis au cours de leur vie et 43 % déclarent s'en être déjà vu proposer. C'est la drogue illicite la plus disponible et la plus expérimentée. En 2005, en France, on comptait 160000 héroïnomanes dont la moitié suit un traitement de substitution aux opiacés (TSO). Ces chiffres sont en constante évolution et augmentation (Figure 20).

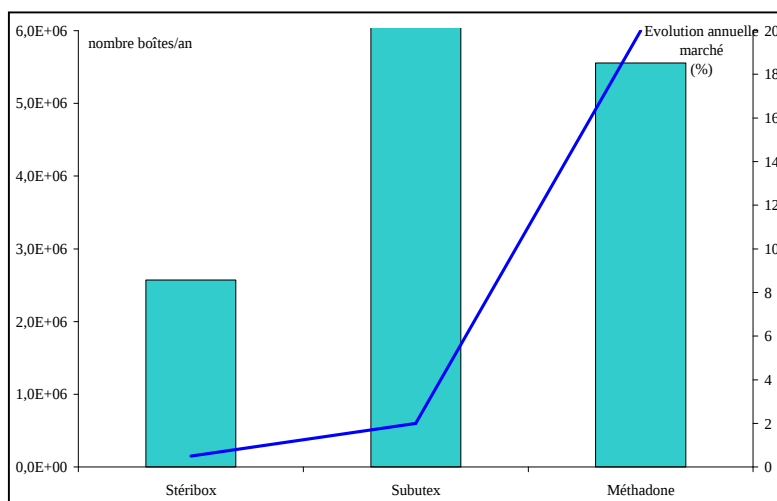


Figure 20 : Consommation des principaux médicaments de substitution et kits d'usages en France en 2005 (nombre de boîtes), évolution des consommations (par comparaison à l'année n-1).

I.1.3 Pharmacocinétique: Devenir des substances pharmaceutiques dans

l'organisme

La pharmacocinétique révèle une implication majeure dans le devenir des résidus de substances pharmaceutiques. Dans l'organisme, un composé actif va subir différentes opérations qui peuvent être schématiquement distinguées en 4 étapes :

- ❶ **L'absorption** qui se définit par le transfert du principe actif du site d'administration vers la circulation générale.
- ❷ **La distribution** dans l'organisme qui se définit comme le transfert réversible des substances entre les différents organes de l'organisme. Elle s'effectue selon 4 facteurs : fixation protéique, propriétés physico-chimiques, irrigation des organes et affinité particulière des tissus.
- ❸ **La métabolisation** ou biotransformation qui est l'ensemble des modifications chimiques que subit un médicament dans l'organisme et qui conduit à la formation de métabolites. Deux phases de métabolisme peuvent être distinguées selon les processus de transformation induits par ces enzymes : les réactions de phase I et celles de phase II.

Les Réactions de phase I qui comportent les biotransformations dont le mécanisme réactionnel implique une oxydation sans que celle-ci soit nécessairement apparente dans le produit final obtenu. Le composé est modifié dans sa structure de manière à l'inactiver et à le rendre plus polaire. Les réactions de phase I comportent des réactions d'hydroxylation, de N-, de S-oxydation pour lesquelles l'oxydation est évidente car il y a eu addition d'un atome d'oxygène, et des réactions de N- et O-déalkylation, où la fixation d'un atome d'oxygène n'a été qu'une étape intermédiaire et n'apparaît pas dans le produit final. La plupart des réactions d'oxydation sont catalysées par des enzymes de la famille du cytochrome P450.

Les Réactions de phase II qui consistent à greffer un groupement à la molécule parente ou à son métabolite de manière à le rendre hydrosoluble et à accélérer son élimination. Les réactions de la phase II sont des réactions de conjugaison et conduisent très majoritairement à la perte des propriétés pharmacologiques du composé. La phase II comporte les réactions de conjugaison, soit par l'acide glucuronique (glucuroconjugaison), la glycine (glycoconjugaison), le sulfate (sulfoconjugaison catalysée par des sulfotransférases) ou encore l'acétate (acétylation catalysée par des N-acétyl transférases) et le glutathion.

- ❹ **L'élimination de l'organisme** qui définit l'étape et la voie par laquelle les médicaments (substances actives) et leurs métabolites sont éliminés. Ils s'éliminent préférentiellement par voie urinaire et voie biliaire. L'ensemble de ces 4 points (absorption, distribution, métabolisation et élimination) conditionne la fraction excrétée de la substance et permet la détermination de la fraction de substance active excrétée par l'organisme.

I.1.4 La notion de fraction excrétée par l'organisme de la substance active

(F_{excreta})

La F_{excreta} est un paramètre important qui correspond à la fraction excrétée d'une molécule pharmaceutique active. Il permet de prendre en compte le taux de métabolisation du composé (paramètre important dans la détermination des PEC (Concentration prédite dans l'environnement) selon la méthode EMEA (European Medicine Agency). Le Tableau 21 présente les valeurs de F_{excreta} de certaines molécules appartenant à différentes classes thérapeutiques. Selon les molécules, cette valeur peut être comprise entre 1 % (l'alprazolam, le diazépam) et près de 100 % (l'aténolol).

Tableau 21 : Valeurs de F_{excreta} pour plusieurs substances actives de différentes classes thérapeutiques (Besse et Garric, 2008).

Classe thérapeutique	Substance active	F_{excreta} (%)
Anxiolytiques	Alprazolam	1
	Bromazépam	3
	Diazépam	1
Anti-inflammatoires non stéroïdiens	Diclofénac	15
	Ibuprofène	25
	Kétoprofène	85
Hypolipémiant	Gemfibrozil	72
Antidépresseurs	Fluoxétine	10
Antibiotiques	Amoxiciline	90
	Fluméquine	10
	Clarythromycine	40
β -bloquants	Atenolol	100
	Propanolol	24
Agents de contraste	Iopromide	100

II Les sources de produits pharmaceutiques dans l'environnement

II.1 Les différentes sources de substances pharmaceutiques pour l'environnement (Kummerer, 2004)

Les sources de substances pharmaceutiques (à l'exception d'épisodes catastrophiques ponctuels : renversements lors du transport, etc. ...) incluent théoriquement :

- Les rejets des industries durant les processus de fabrication. Extrêmement contrôlés, ces rejets sont minoritaires.
- Les apports via les filières de récupération des substances pharmaceutiques avant la vente. Extrêmement contrôlés, ces apports sont minoritaires.
- Les destructions non conventionnelles par les usagers (poubelles, toilettes). Dans une étude récente, Kummerer (2004) relatait des données annonçant que près de 33% des médicaments vendus en

Allemagne, et près de 25% de ceux vendus en Autriche étaient jetés à la poubelle ou dans les eaux domestiques. En conséquence, il apparaît que ce mode de rejets est loin d'être négligeable et qu'une sensibilisation est nécessaire.

- Les rejets via les stations d'épuration après absorption sont la porte d'entrée principale des substances pharmaceutiques dans l'environnement ; seul cet aspect sera ici développé.

II.2 Les stations d'épuration : Principales sources des substances pharmaceutiques dans l'environnement

Il a été établi que la présence d'un certain nombre de substances pharmaceutiques dans l'environnement était préoccupante. Leurs principales voies d'entrée vers les systèmes aquatiques sont les rejets des stations d'épuration. Ainsi, la maîtrise de leur présence dans l'environnement repose sur le contrôle de leurs rejets et par voie de conséquence sur l'amélioration des technologies mises en place au sein des usines de traitements des eaux usées. Afin de faciliter la lecture de cette partie consacrée aux stations d'épuration, les processus et traitements discutés dans ce paragraphe seront exposés et détaillés dans l'Annexe II qui leur est dédiée.

II.2.1 Les technologies courantes

Les traitements traditionnels consistent en un traitement en 3 étapes. Il est important de préciser que les taux d'abattement mesurés dans les STEP sont dépendants des paramètres d'exploitation propres à chaque unité de traitements (Tauxe-Wuersch et al., 2005). Dès lors l'évaluation de l'efficacité des différents processus mis en jeu au sein des STEP est très délicate. Certaines études (Clara et al., 2005b ; Vieno et al., 2005) mettent en évidence que les performances des STEP en terme de paramètres d'usines (Demande Biologique en Oxygène (DBO), Carbone Organique Dissout (COD), abattement de l'azote) peuvent être de bons indicateurs quant à leur capacité à éliminer des substances pharmaceutiques.

a) Les traitements préliminaires

Cette première étape est très faiblement performante au regard de l'élimination des matières organiques et des substances pharmaceutiques en particulier (Carballa et al., 2005).

b) Les traitements primaires

Durant cette étape, une partie significative de la charge en substances pharmaceutiques peut être abattue, essentiellement par des phénomènes de sorption. Des mesures montrent des taux d'abattement de l'ordre de 40-50 % pour le diazépam, 20-45 % pour le diclofénac, 10-25 % pour l'ibuprofène et 10-30 % pour le naproxène (Carballa et al., 2005). Ce taux étant d'autant plus élevé que la teneur en graisses (non caractérisées) dans l'échantillon est importante.

c) Les traitements secondaires

Les systèmes de traitements secondaires peuvent être divisés en 2 classes (les cultures fixes et les cultures libres (Metcalf et al., 2003)), qui diffèrent essentiellement au regard des temps de rétention hydrauliques (HRT). En effet on considère généralement que les processus de lits fluidisés (boues activées, lagunage) ont des temps de séjour hydrauliques supérieurs à 12 heures au contraire des systèmes à cultures fixées (lits bactériens, biofiltres, disques biologiques) qui ont des temps de séjour hydrauliques inférieurs à quelques heures (1 à 5 heures). En conséquence, il apparaît que les processus de type boues activées ont plus de capacités à éliminer les pollutions organiques et plus particulièrement les substances pharmaceutiques. Ces traitements qui reposent sur la dégradation microbienne sont extrêmement sensibles aux variations saisonnières. Clara et al. (2005b) ont mis en évidence une diminution des taux de dégradation d'un facteur 2 pour une diminution de la température de 10°C. De même, Vieno et al. (2005) ont montré que la capacité des stations d'épuration finlandaises à éliminer les substances pharmaceutiques diminuait de 25 % en hiver.

Les phénomènes qui régissent la distribution et l'abattement des molécules dans les STEP seront détaillés ci après.

II.2.2 Les paramètres d'abattement des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration

a) La volatilisation

Comme les substances pharmaceutiques présentent en règle générale de faibles valeurs de constante de Henry, les phénomènes de volatilisation ne sont pas considérés comme significatifs.

b) Les phénomènes de photolyse

Bien qu'ils aient plus particulièrement été étudiés dans des systèmes naturels, les phénomènes de photolyse sont susceptibles de se dérouler dans les STEP présentant des configurations de type bassins d'aération ouverts et lagunages (Metcalf et al., 2003). Ils pourraient conduire à des abattements qui resteraient négligeables.

c) Les phénomènes de sorption

Tolls (2001) a mis en évidence que pour les molécules dont les valeurs de K_{ow} sont inférieures à 3, la prédiction des phénomènes de sorption ne peut être conduite uniquement sur la base de la valeur de K_{ow} . Une meilleure prédiction est obtenue par l'utilisation du K_d coefficient de distribution. Une approche plus précise a été récemment mise en œuvre par Carballa et al. (2008). Les résultats mettent en évidence que contrairement aux muscs et aux œstrogènes, les valeurs de K_d obtenues pour les substances pharmaceutiques sont faibles, comprises entre 0,7-1,9 et semblent montrer que les phénomènes de sorption avec les boues digérées sont de faible importance.

Tableau 22 : Valeurs de K_d mesurées dans les boues au cours des processus de traitement.

	Log K_d (l.kg ⁻¹ SS) (boue primaire)	Log K_d (l.kg ⁻¹ SS) (boue secondaire)	Références
Caféine	-	2,6	Urase et Kikuta, 2005
Carbamazépine	-	0,09	Ternes et al., 2004a
	-	1,8	Urase and Kikuta, 2005
Diazépam	1,6	1,3	Ternes et al., 2004a
Diclofénac	2,7	1,2	Ternes et al., 2004a
Ibuprofène	-	0,85	Ternes et al., 2004a
Naproxène	-	1,4	Urase et Kikuta, 2005

Comme le Tableau 22 le suggère, les valeurs de K_d pour une même molécule diffèrent significativement selon la matrice considérée (boues entrées/boues sorties) au sein d'une même station mais également entre les stations. En effet, certains auteurs avancent que des paramètres tels que la teneur en graisses (non caractérisées) (Carballa et al., 2006), les concentrations en polysaccharides et protéines colloïdales (Kreuzinger et al., 2004) pourraient affecter les phénomènes de sorption.

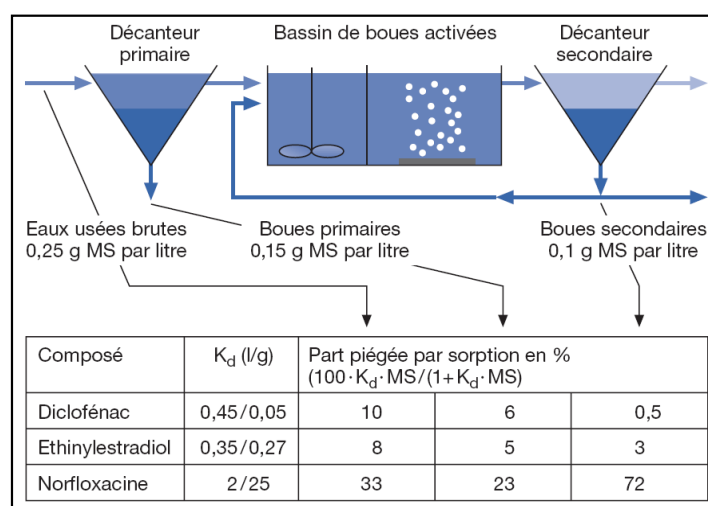


Figure 21 : Constante de sorption et part des composés piégés par sorption par les MES des eaux brutes, des boues primaires et boues secondaires (EAWAG, publications)
(K_d : 1^{ère} valeur pour les boues primaires et 2^{ème} valeur pour les boues secondaires).

Dans une publication interne, l'EAWAG rapporte l'étude des phénomènes de sorption pour 3 molécules pharmaceutiques (la norfloxacin, le diclofénac et l'éthinylestradiol) au cours d'un traitement secondaire. Leurs observations mettent en évidence les différences de comportement durant les processus. La part de norfloxacin sorbée augmente au fur et à mesure de l'avancement dans le processus de traitement de l'eau : 33% dans les eaux brutes pour atteindre 72% dans les boues secondaires. La sorption de la norfloxacin est liée à des interactions électrostatiques qui sont d'autant plus favorisées par la teneur en micro-organismes (dont la paroi est chargée négativement). Au contraire pour le diclofénac et l'éthinylestradiol, la composante sorbée diminue (10% à 0,5% pour le diclofénac) ou reste stable (8 à 3% pour l'éthinylestradiol) tout au long du processus de traitement. Les

relations mises en jeu sont des interactions hydrophobes qui sont favorisées par la teneur en fraction lipidique des eaux d'entrée (dont la concentration diminue au cours des processus de traitements).

d) Les phénomènes d'hydrolyse

Les composés pharmaceutiques qui sont excrétés sous forme glucuronide peuvent être reconvertis en molécules bioactives. Une très grande proportion des substances pharmaceutiques est excrétée sous forme conjuguée. Même si certains auteurs suggèrent que les mécanismes de clivages se déroulent en amont des stations d'épuration, il apparaît évident que ces processus s'accroissent dans les usines d'assainissement. En effet, elles concentrent d'importantes densités de micro-organismes (genre *Escherichia coli*) qui possèdent une activité glucuronidase et sulfatase qui peuvent cliver les molécules conjuguées. Ceci se traduit par la libération de formes libres ou de métabolites oxydés. Il est couramment admis qu'aucune forme conjuguée ne résiste aux processus mis en œuvre dans les STEP (Johnson et Sumpter, 2001). Ceci est confirmé par certains travaux (Ternes et al., 2001 ; Heberer, 2002 ; Heberer et al., 2001 ; Beausse, 2004) qui montrent des concentrations en formes glucuronidées de molécules pharmaceutiques inférieures aux limites de détection dans les effluents alors qu'elles étaient quantifiables dans les intrants. Ces processus peuvent induire une augmentation des concentrations en certaines molécules au cours des processus de traitement des eaux.

e) Les phénomènes de biodégradation

La biodégradation qui conduit à la formation de molécules de plus petit poids moléculaire est, dans le cas des substances pharmaceutiques, très variable. La dégradation biologique suit une cinétique de premier ordre (Joss et al., 2006). Une minorité de molécules pharmaceutiques apparaît biodégradable à plus de 90 % (l'ibuprofène, le paracétamol,...), la grande majorité des molécules subit une biodégradation partielle (le gemfibrozil, le diclofénac) enfin une part significative des molécules ne subit aucune biodégradation (le diazépam, la carbamazépine). Les phénomènes de biodégradation peuvent être influencés par un certain nombre de facteurs.

II.2.3 Paramètres affectant l'abattement des substances pharmaceutiques au sein des stations d'épuration

Etat donné que les phénomènes d'abattement des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration semblent être principalement la conséquence des phénomènes de biodégradation, ainsi la grande majorité des travaux se sont focalisées sur l'étude de ces phénomènes. La biodégradation peut être influencée par un certain nombre de facteurs : la diversité de la biomasse microbienne (Ternes et al., 2004b), la fraction de biomasse active associée aux matières en suspension (Joss et al., 2005).

a) Les paramètres physico-chimiques

Certains paramètres physico-chimiques tels que le pH peuvent avoir une incidence sur les taux d'abattement de certaines substances pharmaceutiques. Urase et al. (2005) ont montré que les taux d'abattement de certaines substances pharmaceutiques acides (l'ibuprofène, le kétoprofène, le gemfibrozil, etc...) étaient supérieurs à pH acide.

b) L'âge des boues

Clara et al. (2005a) ont mis en évidence un âge critique des boues égal à 10 jours, au dessous duquel pas ou peu de dégradation est observée, pour un certain nombre de molécules (les stéroïdes). Ce temps critique semble être spécifique à la substance considérée : 1 jour pour l'ibuprofène et 8 jours pour l'estrone (Ternes et al., 2004b). Cependant ce paramètre ne semble pas être suffisant pour expliquer les phénomènes d'abattement qui peuvent se dérouler au sein des STEP (Federle et al., 2002).

c) Les saisons

Un certain nombre de travaux ont mis en évidence que les taux d'abattement des substances pharmaceutiques étaient meilleurs en été qu'en hiver (Vieno et al., 2005 ; Castiglioni et al., 2006). Ces variations peuvent être reliées à plusieurs paramètres. Ils peuvent inclure :

- La température : une plus faible température en hiver conduit à une faible biodégradation.
- Les conditions hydriques : les plus fortes pluies qui se déroulent durant les périodes hivernales peuvent induire une diminution des temps de résidence hydrauliques (HRT) qui peut conduire à un plus faible abattement ainsi qu'à une plus faible production de boues (Kreuzinger et al., 2004).
- Les phénomènes de photodégradation : ils sont *a priori* non inclus dans les processus de traitements des eaux dits classiques, la question demeure ouverte dans les systèmes de lagunage. Ainsi, Matamoros et al. (2008) rapportent des tendances saisonnières pour l'abattement de 2 substances : le diclofénac et le kétoprofène qui sont connus pour présenter un taux de photodégradation modéré.

Ces tendances saisonnières ne sont pas observées pour l'ensemble des composés et ne semblent affecter que les composés sujets à biodégradation et non les composés soumis à des phénomènes de sorption (qui ne sont pas thermo-dépendants) (Castiglioni et al., 2006).

II.2.4 Les traitements tertiaires

Une alternative pour améliorer les taux d'abattement des substances pharmaceutiques est l'ajout de traitements dits tertiaires. Confrontés à des réglementations de plus en plus draconiennes, les épurateurs ont été contraints à développer de nouvelles techniques d'épuration qui prennent place à divers étapes du cycle de l'eau à usage domestique : en sortie de STEP dans les traitements dits tertiaires et dans les usines de captage (eaux souterraines et eaux courantes) des eaux de boisson. Ces techniques comme le traitement sur charbon actif, l'oxydation par chloration et ozonation, la filtration sur membranes (Zwiener et Frimmel, 2000 ; Sedlak et al., 2003 ; Ternes et al., 2003 ; Ternes et al.,

2004b ; Boyd et al., 2005 ; Huber et al., 2005a ; Huber et al., 2005b ; Snyder et al., 2006 ; Canonica et al., 2008) commencent à peine à être évaluées (Kim et al., 2008). Bien qu'elles semblent pouvoir augmenter les taux d'abattement de manière significative (près de 95 % pour certaines molécules), leur efficacité demeure limitée pour les molécules les plus persistantes (la carbamazépine, le diazépam). Une considération prudente doit être conduite quant aux réels coûts / bénéfices de ces procédés pour l'abattement des contaminants traces. Au regard, d'une part, des surcoûts (prix de l'eau) qu'ils peuvent engendrer et d'autre part du potentiel toxique des molécules formées lors de ces processus. Ces produits de dégradation nécessiteront une investigation d'un point de vue écotoxicologique (renseignement du cycle biogéochimique, données de toxicité pour les organismes vivants dans les milieux...) et toxicologique (données sanitaires) (Jones et al., 2007).

Tableau 23 : Efficacité des processus quant à l'élimination des substances pharmaceutiques (d'après Rapport final Poseidon, 2004).

	Traitement I ^{aire}	Traitement II ^{aire}				Traitement III ^{aire}				
		Abattement COD (SRT<2 jours)	Nitrification (10<SRT<5 jours)	Bioréacteurs membranaires (SRT >25 jours)	Biofiltres	Ozonation	Filtration sur banc	Chlorination	Ultrafiltration / PAC	Nanofiltration
Ibuprofène										
Diclofénac										
Bézafibrate										
Carbamazépine										
Diazépam										
Sulfaméthoxazole										
17-a-Ethinylestradiol										

Taux d'abattement	
R<10%	50<R<90%
10<R<50%	R>90%

Okuda et al. (2008), dans une étude portant sur 66 molécules, mettent en évidence que l'association d'un traitement par ozonation suivi d'un traitement biologique activé du carbone serait le plus efficace pour abattre le plus large spectre de molécules.

II.3 Synthèse de données de présence des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration

Le Tableau 24 présente une synthèse des taux d'abattement calculés (dans la bibliographie) pour différentes classes thérapeutiques. Pour chacune des classes thérapeutiques, les rendements d'abattement (méthodes de calcul des rendements d'abattement non spécifiées, seules les phases dissoutes sont considérées) de plusieurs molécules sont rapportées afin d'obtenir une meilleure représentativité.

Tableau 24 : Taux d'abattement de certaines substances pharmaceutiques dans les STEP (phases dissoutes uniquement).

	Composés	Abattement STEP (%)	Référence
β-bloquants	Aténolol	10-55	Castiglioni et al., 2006
	Propranolol	50	Sedlak et al., 2003
		95	Ternes, 2001
Bronchodilatateurs	Salbutamol	0	Castiglioni et al., 2006
Anti inflammatoires non stéroïdiens	Kétoprofène	18	Lee et al., 2003
		78	Lindqvist et al., 2005
	Ibuprofène	87	Lee et al., 2003
		99	Sedlak et al., 2003
		90	Ternes, 2001
		60-70	Carballa et al., 2004
		92	Lindqvist et al., 2005
		38-93	Castiglioni et al., 2006
		78	Han et al., 2006
	Naproxène	70	Lee et al., 2003
		66	Ternes, 2001
		40-55	Carballa et al., 2004
		0	Hua et al., 2003
		80	Lindqvist et al., 2005
Analgésiques	Paracétamol	98	Ternes, 2001
		8,7	Han et al., 2006
		75 - 100	Castiglioni et al., 2006
	Diclofénac	69	Ternes, 2001
		17	Heberer, 2002
		21	Hua et al., 2003
		26	Lindqvist et al., 2005
		24	Han et al., 2006
Normothymique	Carbamazépine	7	Ternes, 1998
		8	Heberer, 2002
		< 40	Heberer et Feldmann, 2005
		0	Heberer, 2002
		30	Castiglioni et al., 2006
		80	Han et al., 2006
Antidépresseurs	Diazépam	0	Lee et al., 2003
Hypolipémiants	Gemfibrozil	5	Lee et al., 2003
		50	Sedlak et al., 2003
		69	Ternes, 2001
Antibiotiques	Ciprofloxacine	88	Golet et al., 2002
		96	Lindberg et al., 2006
		60-63	Castiglioni et al., 2006
	Oflaxacine	43-57	Castiglioni et al., 2006
Drogues	Cocaïne + Benzoylecgonine	>90	Fanelli et al., 2006 (EMCO)
Taux d'abattement			
R < 25 %	50 < R < 75 %		
25 < R < 50 %	75 < R < 100 %		

II.3.1 Données de présence dans les phases dissoutes des effluents de stations d'épuration

Le Tableau 25 présente une synthèse des données de présence de molécules représentatives des classes thérapeutiques d'intérêt dans les effluents des stations d'épuration, de par le monde, au cours des 10 dernières années.

Tableau 25 : Concentrations maximales et moyennes (ng.l⁻¹) en substances pharmaceutiques mesurées dans les phases dissoutes des eaux de sortie de stations d'épuration de par le monde.

	Composé	Lieu	C _{max} (ng.l ⁻¹)	C _{moyenne} (ng.l ⁻¹)	Références
β- bloquants	Propanolol	France	1 111	416	Miege et al., 2006
	Metoprolol	France	1 774	509	Miege et al., 2006
Stimulants	Caféine	Etats-Unis	23	13	Spongberg et al., 2008
		France	2213		Togola et al., 2007
		Etats-Unis	9 900		Batt et al., 2006
		Canada	2 263		Verenitch et al., 2006
		Espagne	4 520		Santos et al., 2005
		Suède	220		Bendz et al., 2005
AINS	Aspirine	Allemagne	1 500	220	Ternes, 1998
		Brésil	3 100	50	Stumpf et al., 1999
		France	524		Togola et al., 2007
	Ibuprofène	Brésil	3 000	600	Stumpf et al., 1999
		Allemagne	3 400	370	Ternes, 1998
		Canada	6 718		Verenitch et al., 2006
		Espagne	151 000		Gomez et al., 2006
		Royaume Uni	4 239		Roberts et Thomas, 2006
		Autriche	2 400		Clara et al., 2005b
		Espagne	8 800		Santos et al., 2005
		Finlande	3 900		Lindqvist et al., 2005
		Suède	150		Bendz et al., 2005
		Taiwan	30		Lin et al., 2005
		Espagne	2 100		Rodriguez et al., 2003
		Australie	220		Khan et Ongerth, 2004
		France	219		Togola et al. 2007
	Kétoprofène	Allemagne	380	200	Ternes, 1998
		Canada	268		Verenitch et al., 2006
		Espagne	1 760		Santos et al., 2005
		Finlande	1 200		Lindqvist et al., 2005
		Suède	330		Bendz et al., 2005
		Australie	590		Khan et Ongerth, 2004
	Naproxène	France	1080		Togola et al., 2007
		Allemagne	520	300	Ternes, 1998
		Etats-Unis	106		Boyd et al., 2003
		Canada	7 098		Verenitch et al., 2006
		Espagne	2 440		Santos et al., 2005
		Finlande	1 900		Lindqvist et al., 2005
		Suède	250		Bendz et al., 2005
		Taiwan	170		Lin et al., 2005
	Paracétamol	Espagne	232		Macia et al., 2004
		France	289		Togola et al., 2007
		Allemagne	6 000		Ternes, 1998
	Diclofénac	Australie	390		Khan et Ongerth, 2004
		France	11308		Togola et al., 2007
		Allemagne	2 100	810	Ternes, 1998
		USA	177	72	Spongberg et Witter, 2008
		Brésil	930	130	Stumpf et al., 1999
		Canada	448		Verenitch et al., 2006
		Espagne	1 900		Gomez et al., 2006
		Royaume Uni	598		Roberts et Thomas, 2006
		Autriche	1 680		Clara et al., 2005b
		Finlande	300		Lindqvist et al., 2005
		Suède	120		Bendz et al., 2005
		Suisse	570		Soulet et al., 2002
		France	487		Togola et al., 2007
Normothymique	Carbamazépine	Allemagne	6 300	2100	Ternes, 1998
		USA	111	74	Spongberg et al., 2008
		Espagne	70		Gomez et al., 2006

		Autriche	1 594		Clara et al., 2005b
		Suède	1 180		Bendz et al., 2005
		Taiwan	420		Lin et al., 2005
		France	293		Togola et al., 2007
Antidépresseurs	Diazépam	Allemagne	40		Ternes, 1998
		Belgique	660		Van Der Ven et al., 2004
Hypolipémifiants	Atorvastatine	Canada	22		Miao et al., 2002
	Gemfibrozil	Allemagne	1 500	400	Ternes, 1998
		Canada	403		Verenitch et al., 2006
		Suède	180		Bendz et al., 2005
		France	17		Togola et al., 2007
Broncho dilateurs	Salbutamol	Allemagne	170		Ternes, 1998
	Terbutaline	Allemagne	120		Ternes, 1998
		France	4		Togola et al., 2007
Antibiotiques	Ciprofloxacine	France	94		Algros, 2007
	Spiramycine	France	4 000		Algros, 2007
Drogues	Cocaïne	Italie	11		Castiglioni et al., 2005
	Méthadone	Italie	36		Castiglioni et al., 2005
Anticancéreux	Tamoxifène	Angleterre		199	Roberts et Thomas, 2006

II.3.2 *Données de présence dans les boues de stations d'épuration*

Les substances pharmaceutiques présentant les degrés de lipophilie les plus élevés sont susceptibles de se retrouver dans les boues primaires à des concentrations aussi élevées que dans les eaux brutes de stations d'épuration. Ces composés, selon leurs propriétés de biodégradation, présentent un potentiel certain à se concentrer dans les boues et seraient donc susceptibles de ne pas être dégradés au cours des processus de digestion ou autres processus de traitement des boues (Beausse, 2004). Selon les molécules, des concentrations comprises entre la dizaine de $\mu\text{g.g}^{-1}$ et la dizaine de ng.g^{-1} ont été mesurées (Barron et al., 2008 ; Nieto et al., 2007 ; Beausse, 2004 ; Sponberg 2008, Togola et al. 2008). Les classes thérapeutiques de tout premier intérêt apparaissant être les stéroïdes hormonaux, les antibiotiques, les analgésiques et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (Beausse, 2004). Dans un document récent exposant les substances prioritaires à étudier dans les boues, Eriksson et al. (2008) présentent une réflexion quant aux risques liés à la présence de 192 substances organiques dans les boues et concluent que la présence de pharmaceutiques dans les boues doit être évaluée au regard de potentiels impacts sur la percolation et la contamination d'eaux souterraines.

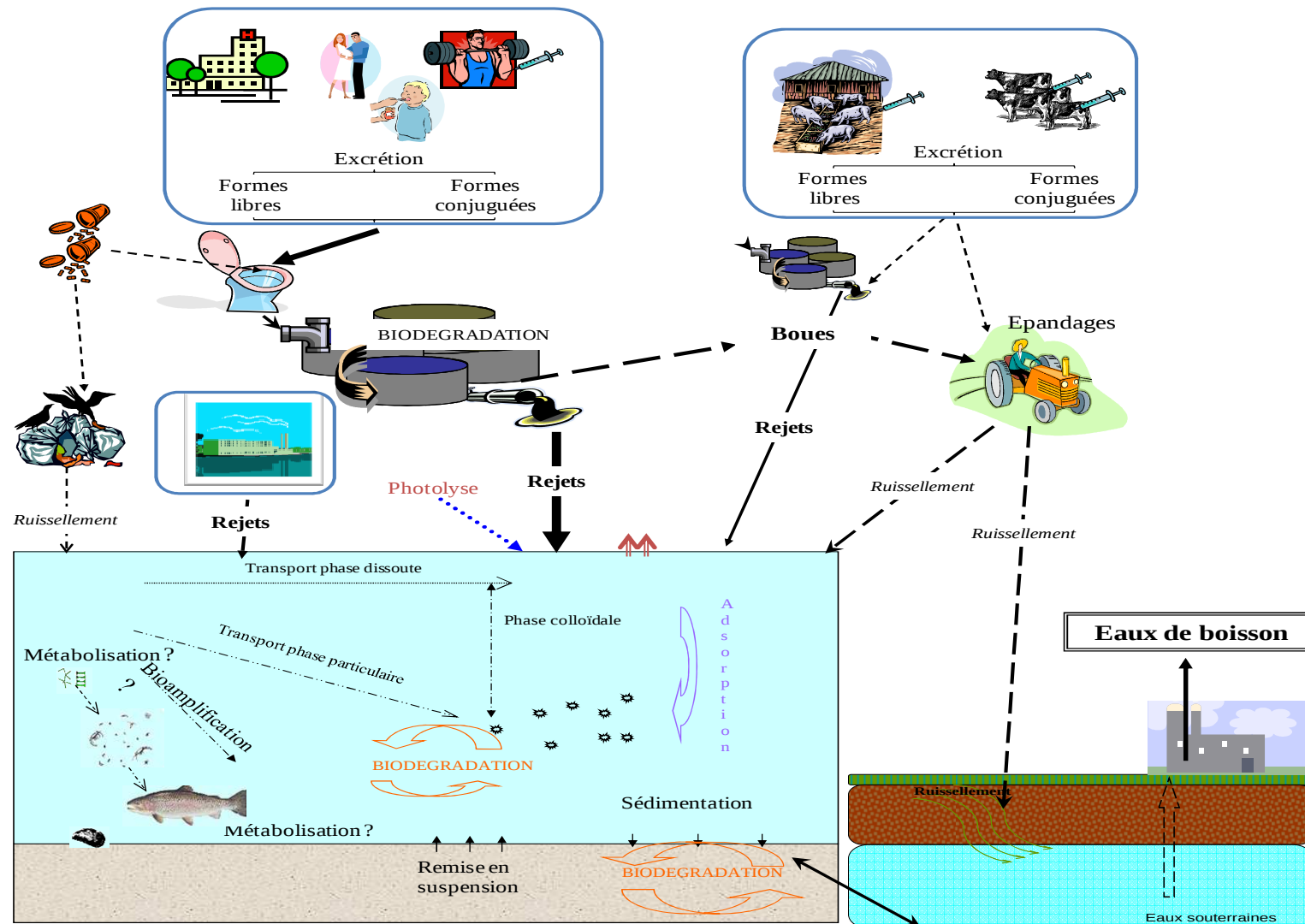


Figure 22 : Cycle biogéochimique des substances pharmaceutiques.

III Le devenir des substances pharmaceutiques dans les systèmes aquatiques

Le devenir des substances pharmaceutiques et de leurs métabolites dans l'environnement demeure encore mal renseigné. La faible volatilité des substances pharmaceutiques ainsi que leur polarité indiquent que la distribution dans l'environnement va se faire essentiellement par transport au sein de la voie aqueuse et également au travers des chaînes alimentaires (Figure 22).

III.1 Les phénomènes de dégradation en milieux naturels

III.1.1 La photodégradation

Les études concernant la photodégradation des substances pharmaceutiques se sont largement généralisées (Boreen et al., 2003 ; le diclofénac par Buser et al.(1998) ; le naproxène, le diclofénac, l'acide clofibrique et l'ibuprofène par Packer et al. (2003), Poiger et al. (2001), Lin et Reinhard (2005)) et mettent en évidence des comportements très différents. Le carbone organique dissous semble jouer un rôle important dans l'efficacité de ces mécanismes : il peut agir comme un accélérateur, mais également comme un retardateur en agissant comme un photofiltre.

➤ Cas de la Carbamazépine

Lam et Mabury (2005) ont mis en évidence, dans une étude en microcosme (avec étude de photodégradation par exposition dans un simulateur) que ce composé est extrêmement résistant à la photodégradation ; ce composé pouvait être dégradé en 10-11-époxyde. Andreozzi et al. (2003) rapportent que la présence d'acides humiques dissous entraîne une augmentation du temps de demi-vie de la carbamazépine ; au contraire la présence de nitrates induit une diminution du temps de demi-vie. Dans une autre étude, Andreozzi et al. (2003) ont pu estimer un temps de demi-vie face à la photodégradation (hiver, 50° latitude nord) de l'ordre de 100 jours pour la carbamazépine (5 jours pour le diclofénac). Plus récemment, Chiron et al. (2006) ont mis en évidence la complexité des chemins de photodégradation de la carbamazépine en milieu contrôlé (Figure 23).

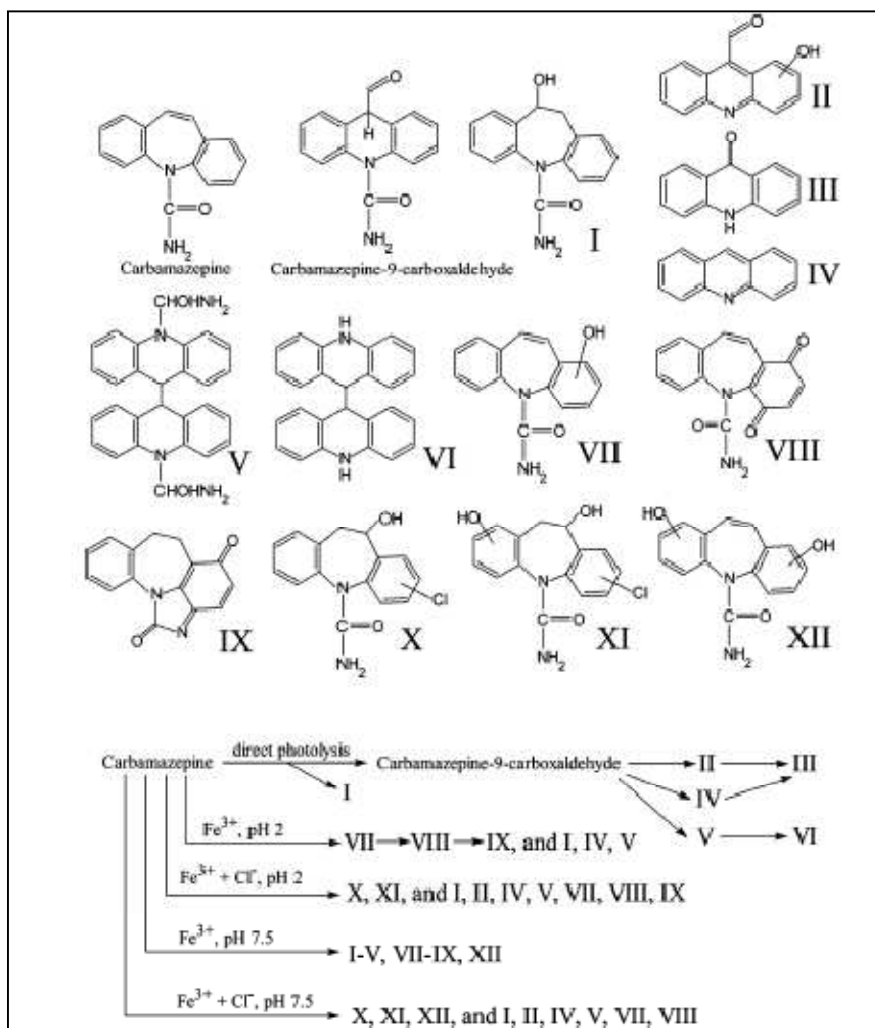


Figure 23 : Schéma de photodégradation de la carbamazépine sous différentes conditions de photolyse (d'après Chiron et al., 2006).

III.1.2 La biodégradation

Les phénomènes de biodégradation qui ont été initiés au sein des STEP vont se poursuivre dans le milieu naturel mais dans une moindre mesure. Ces mécanismes ne semblent pas prévalents (ou demeurent encore non élucidés) pour les substances pharmaceutiques à l'exception des œstrogènes. Lin et Reinhard (2005) ont mis en évidence que la biodégradation de l'estradiol en estrone ($R > 80\%$) s'effectuait en 20 min et que ce processus était sous contrôle bactérien, ce taux atteint 100% en 2 jours. Carrara et al. (2008), au travers d'une étude sur les anti-inflammatoires non stéroïdiens (l'ibuprofène, le naproxène), outre la mise en évidence d'une contamination des eaux souterraines à des concentrations aussi élevées que pour les eaux usées, établissent une corrélation entre la persistance des molécules et les conditions redox du milieu, ils concluent que les conditions oxygènes sont favorables à la dégradation des molécules.

Les phénomènes de biodégradation peuvent également se dérouler dans les sédiments. Ainsi Bradley (2007) a étudié les capacités de biodégradation des populations bactériennes naturelles

présentes dans les sédiments de différentes rivières envers la caféine, la nicotine et la cotinine. Les résultats montrent qu'au sein des sédiments les populations bactériennes sont capables d'activité de biotransformation. De même, il est apparu que la capacité à convertir le diclofénac était largement répandue dans les sédiments (Allemagne), et ne nécessitait aucune acclimatation des organismes du milieu. De plus, aucune corrélation avec l'activité microbienne totale n'a été mise en évidence.

III.2 Distribution dans la phase aqueuse

La question de la distribution des substances pharmaceutiques entre les phases dissoutes et colloïdales a récemment été étudiée (Maskaoui et al., 2007). Les résultats mettent en évidence qu'une période courte de 5 min est suffisante pour que les interactions entre les substances pharmaceutiques et les colloïdes atteignent un plateau. Les valeurs de K_{oc} (coefficient de partition normalisé par la teneur en carbone organique colloïdal) varient entre $5,45 \cdot 10^4$ et $7,54 \cdot 10^4$ pour les substances pharmaceutiques étudiées (le propanolol, le sulfaméthoxazole, la mébervérine, la carbamazépine, l'indométhacine, le diclofénac et l'acide meclofénamique), plus élevées que celles des perturbateurs endocriniens (les estrogènes, le bisphénol A). Les interactions entre les substances pharmaceutiques et les colloïdes, sous contrôle du caractère hydrophobe des molécules, apparaissent comme prépondérantes pour la compréhension du devenir de ces molécules dans les systèmes aquatiques.

III.3 Phénomènes de sorption

De par leurs propriétés physico-chimiques (valeurs de K_{ow} faibles, solubilité élevée), les études sur les substances pharmaceutiques se sont essentiellement cantonnées à des études en phase dissoute de telle sorte que très peu de données de présence dans les phases solides sont recensées. Ra et al. (2008) ont mis en évidence la faible affinité de l'ibuprofène et du gemfibrozil pour les matières en suspension, seul le diclofénac présente 11 % de sorption (expérience simulée). La présence de substances pharmaceutiques a été rapportée dans les sédiments, principalement celle des anti-inflammatoires non stéroïdiens et du gemfibrozil (Bradley et al., 2007 ; Hernando et al., 2006). Un effort de recherche doit être porté sur ces compartiments de l'environnement qui peuvent participer à la dissipation des molécules dans l'environnement (vecteurs ou réservoirs).

Un certain nombre de travaux se sont également attachés à l'étude des substances pharmaceutiques à usages vétérinaires notamment les antibiotiques, dans les sols : ils mettent en évidence des concentrations qui peuvent atteindre la dizaine $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sols (revue par Kemper, 2008).

III.4 Données de présence dans l'environnement

Les substances pharmaceutiques de par leurs sources, leurs propriétés physicochimiques sont largement distribuées dans les systèmes aquatiques, de telle sorte que l'on peut les qualifier d'ubiquistes. De nombreuses études ont documenté leur présence dans les eaux de surface (eaux courantes, eaux estuariennes et eaux marines, Figure 24) et dans les eaux souterraines (Scheytt et al.,

1998; Heberer et al., 1998 ; Clara et al., 2004a ; Rabiet et al., 2006 ; Schulte-Oehlmann et al., 2007 ; Barnes et al., 2008). La présence de substances pharmaceutiques a également été mise en évidence dans les eaux de boisson (Zwiener, 2007) comme le souligne Kuehn (2008) dans le Journal de l'Association Américaine de Médecine «**Traces of drugs found in drinking water: Health effects unknown, safer disposal urged**».

La présence de classes thérapeutiques (les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les œstrogènes de synthèse, les stimulants, les antibiotiques) est très largement documentée. Les efforts de recherche se portent maintenant sur de nouvelles molécules : les drogues illicites qui ont, à titre d'exemple, été mesurées à des concentrations de l'ordre de 1 ng.l^{-1} dans les eaux de la Tamise et du Pô (Zuccato et al., 2008), plus de 100 ng.l^{-1} pour la benzoylecgonine en Ecosse (Kasprzyk-Hordern et al., 2008b) ; les anticancéreux et les antinéoplasiques (Zuccato et al., 2005 ; Roberts et Bersuder, 2006) à titre d'exemple l'ifosfamide a été détecté et quantifié à une concentration maximale de 20 ng.l^{-1} dans les eaux de surface (Ternes, 1998), le cyclophosphamide a été détecté et quantifié à une concentration maximale de 65 ng.l^{-1} dans les eaux de surface (Moldovan, 2006).

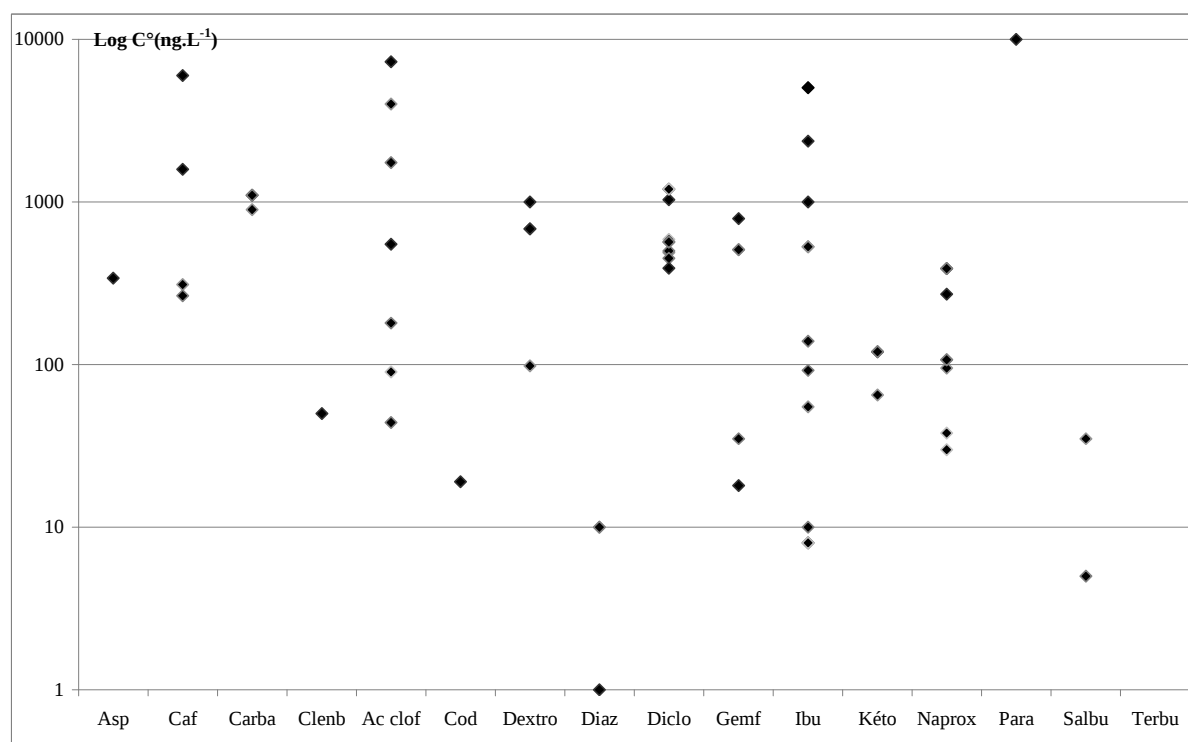


Figure 24 : Concentrations moyennes, exprimées en ng.l^{-1} , en composés pharmaceutiques dans les eaux de surface (phases dissoutes uniquement) (d'après thèse Nora, 2006 ; Rabiet et al., 2006 ; Kasprzyk-Hordern et al., 2008a,b ; Togola et al., 2008).

III.5 Transferts aux organismes aquatiques

Pour l'heure le devenir des substances pharmaceutiques (bioconcentration, bioaccumulation et biotransformation) dans les organismes aquatiques est peu renseigné, exception faite du contexte

réglementaire lié à l'usage des antibiotiques en aquaculture. Ainsi un certain nombre d'études ont été réalisées dans ce contexte et ont pu mettre en évidence la persistance de certaines molécules antibiotiques après administration : plus de 76 jours pour l'azithromycine chez le juvénile d'*Oncorhynchus tshawytscha* (moins de 21 jours pour le composé parent : l'érythromycine) (Fairgrieve et al., 2006).

Certaines études rapportent des mesures de fluoxétine, norfluoxétine, paroxétine supérieures au $\mu\text{g.g}^{-1}$ dans les muscles de poissons exposés dans l'environnement (Chu et Metcalfe, 2007). Hoeger et al. (2007) ont étudié le devenir du diclofénac chez la truite. Ils ont observé que le diclofénac n'était pas complètement excrété et qu'une part significative entrainait dans la circulation enterohépatique prolongeant ainsi la biodisponibilité du composé dans l'organisme et en favorisant l'accumulation. Les auteurs concluent que cette étude apporte des éléments d'explication quant au devenir de micropolluants dans l'environnement et leur bioaccumulation dans les organismes exposés en dépit de leurs propriétés physicochimiques.

Les capacités de dépuraction du crabe (*Scylla serrata*) exposé à une dose orale d'enrofloxacin ont été évaluées par Fang et al. (2008). Les résultats mettent en évidence que ces cinétiques de dépuraction sont conditionnées par les conditions du milieu : efficacité d'élimination de la molécule supérieure lors d'exposition à une salinité de 4‰ par comparaison à une exposition à une salinité de 33‰.

IV La toxicité des substances pharmaceutiques au sein des systèmes aquatiques

Bien que ces composés fassent l'objet de tests de toxicité pour leurs usages vétérinaires et humains, ils s'avèrent que ces données ne sont pas suffisantes pour juger de leur toxicité quant aux organismes des systèmes aquatiques (; Huschek et al., 2004 ; Bound et al., 2006). Les interactions de ces composés et de leurs métabolites avec les organismes du milieu sont encore mal renseignées (Sumpter et Johnson, 2005).

IV.1 La toxicité aigüe

Les substances pharmaceutiques à usage humain ne semblent pas présenter, en général, de toxicité aigüe (Figure 25). En effet, la très grande majorité de ces composés présente des valeurs de toxicité aigüe supérieures à 1 mg.l^{-1} . Si ces valeurs sont comparées à des concentrations maximales mesurées dans l'environnement (dans les effluents de stations d'épuration aussi bien que des eaux naturelles), les valeurs de toxicité sont très largement supérieures.

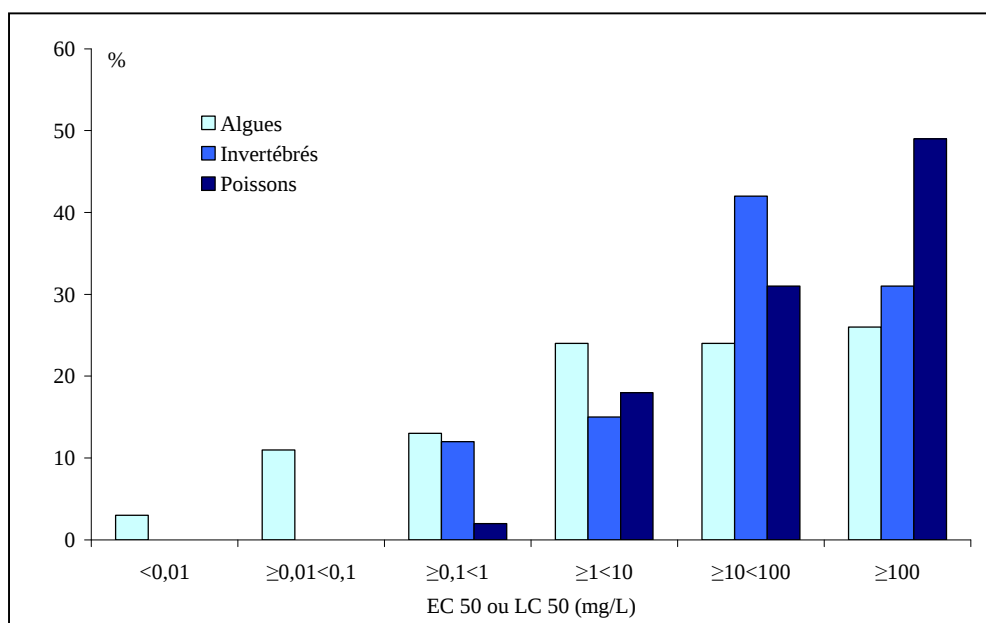


Figure 25 : Distribution des plus faibles valeurs de toxicité aigüe pour 3 taxons (algues n=38, invertébrés n=67, poissons n=51) suite à des expositions à des substances pharmaceutiques (d'après Cunningham et al., 2006).

IV.2 La toxicité chronique

Les études de toxicité chronique confirment que les antidépresseurs de type inhibiteurs de la recapture de la sérotonine sont à surveiller plus particulièrement au regard de la toxicité exprimée sur les invertébrés et de l'implication du système sérotoninergique dans la locomotion. Ainsi, un intérêt tout particulier devrait être porté sur la fluoxétine, molécule qui présente une très forte toxicité chez les algues vertes (Besse et Garric, 2008). Les comparaisons des valeurs de toxicité chronique mettent également en évidence que les antibiotiques sont des molécules très préoccupantes. Les études menées par Isidori et al. (2005, 2006) montrent que leur toxicité est fonction de la molécule et de l'organisme considérés ; il apparaît que les cyanophytes sont les organismes les plus sensibles. Les fibrates apparaissent également comme une classe de molécule susceptible de présenter un risque (Tableau 26).

Canesi et al. (2007a) ont mis en évidence qu'exposées (*in vivo* et *in vitro*) à des concentrations environnementales de bézafibrate, des moules *Mytilus spp* présentaient des affections du système immunitaire et de la glycolyse, entre autres.

Richards et al. (2008) rapportent qu'à des concentrations aussi faibles que 0,1 µg.l⁻¹, la fluoxétine est susceptible d'affecter l'activité chitobiase (enzyme en charge de la dégradation de la chitine) chez la daphnie exposée pendant 24 à 72 heures.

Quinn et al. (2008) ont mis en évidence, chez l'hydre, qu'à des concentrations susceptibles d'être rencontrées dans l'environnement : le gemfibrozil, l'ibuprofène, le naproxène et le bézafibrate

apparaissaient comme de potentiels tératogènes de même que la carbamazépine (dans une moins grande propension).

Kostich et Lazorchak (2008) rapportent une réflexion quant aux risques liés à la présence de substances pharmaceutiques à usage humain pour les organismes aquatiques. Ils concluent qu'aux Etats-Unis certaines molécules sont mesurées à des concentrations suffisantes pour affecter les organismes qui présentent des capacités de dépuración insuffisantes. Certains phénomènes d'antibiorésistance ainsi que des effets toxiques sur certains vertébrés, procaryotes et eucaryotes seraient également susceptibles de se dérouler.

IV.3 Effets des mélanges

Au contraire de l'ensemble des autres classes de micropolluants, les phénomènes d'interactions médicamenteuses sont assez bien renseignés (chez les mammifères) puisqu'ils sont indispensables à l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché de toute nouvelle molécule. A titre d'exemple, l'action activatrice de la caféine sur certains antalgiques peut-être citée (exemple du Propofan[®] qui associe le dextropropoxyphène, le paracétamol et la caféine) ; qu'en est-il dans les milieux aquatiques où ces molécules sont également concomitantes ?

Les effets d'exposition à des mélanges de substances pharmaceutiques sur les organismes aquatiques sont encore mal connus et évalués (Cleuvers, 2003 ; Cleuvers, 2004 ; Brain et al., 2004 ; Fraysse et Garric, 2005 ; Pomati et al., 2006 ; Pomati et al., 2007 ; Borgmann et al., 2007) et ceux portant sur des interactions possibles entre les molécules pharmaceutiques et les autres polluants environnementaux sont peu renseignés. Thibaut et al. (2006) ont étudié, *in vitro*, les interactions des fibrates, des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des antidépresseurs avec les voies du cytochrome et les activités de phase II impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques et des molécules endogènes chez les poissons. Les résultats montrent une inhibition de l'activité de glucuronidation du naphthol et de la testostérone par les anti-inflammatoires non stéroïdiens et à un moindre degré par les fibrates, une inhibition (mineure) de l'activité de sulfatation de l'estradiol exercée par le clofibrate, le gemfibrozil et la fluoxétine. De façon générale, le gemfibrozil, le diclofénac et les antidépresseurs semblent être les molécules présentant les capacités à interférer avec les voies métaboliques les plus significatives de certains poissons.

Pomati et al. (2007) suggèrent que des études complètes sur les effets des mélanges pourraient faire émerger une liste de molécules pharmaceutiques préoccupantes à des concentrations environnementales. Ils rapportent également que les scénarii environnementaux mis en œuvre lors des expositions (réactions antagonistes et/ou synergiques, concentrations dépendances des effets) pourraient considérablement affecter la prédiction des effets toxiques des mélanges et ainsi sous estimer les risques liés à la présence des substances pharmaceutiques dans les milieux naturels.

IV.4 Toxicité des produits de dégradation et des métabolites

Contrairement aux composés parents dont le potentiel toxique est pour une part bien renseigné, la toxicité des produits de dégradation, notamment des sous produits formés au cours de certains traitements du cycle de l'eau et dans l'environnement est mal connue.

Isidori et al. (2007b) ont étudié le potentiel toxique, notamment génotoxique, de certains fibrates et de leurs produits de photodégradation. Ils mettent en évidence que les produits issus de la photodégradation du gemfibrozil présentent un caractère génotoxique et mutagène. Le caractère mutagène des photoproduits du furosémide a également été révélé au cours d'une étude similaire (Isidori et al., 2006). Li et al. (2008c) ont étudié la toxicité des produits issus du traitement par ozonation de l'oxytétracycline chez *Vibrio fischeri* (bactérie). Les résultats mettent en évidence que le premier intermédiaire d'ozonation présente un potentiel toxique plus important que la molécule parente.

Force est de constater que la considération de ces produits de dégradation, pour une évaluation complète du risque associé à la présence de substances pharmaceutiques dans les systèmes aquatiques, est nécessaire.

Tableau 26 : Données de toxicité chronique pour certains taxons exposés à des substances pharmaceutiques (d'après Crane et al., 2006).

	REGNE ANIMAL						REGNE VEGETAL	
	Algues		Invertébrés		Poissons			
	Espèce	NOEC (mg.l ⁻¹)	Espèce	NOEC (mg.l ⁻¹)	Espèce	NOEC (mg.l ⁻¹)	Espèce	NOEC (mg.l ⁻¹)
Fluoxétine			<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0,056			<i>Lemna gibba</i>	>1,0 (EC10)
			<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0,089				
Carbamazépine	<i>Synechococcus leopoldensis</i>	17	<i>Lin calyciflorus</i>	0,377	<i>Danio rerio</i>	25	<i>Lemna gibba</i>	>1,0 (EC10)
	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	10	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0,025				
	<i>Desmodemus subspitacus</i>	74,0 (EC50)						
Diazépam			<i>Hydra vulgaris</i>	<0,01				
Paracétamol			<i>Hydra vulgaris</i>	>0,01			<i>Lemna gibba</i>	>1,0 (EC10)
Aspirine			<i>Hydra vulgaris</i>	>0,01				
Diclofénac	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	10	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	1	<i>Danio rerio</i>	4	<i>Lemna minor</i>	7,5 (EC50)
	<i>Desmodemus subspitacus</i>	72,0 (EC50)	<i>Lin calyciflorus</i>	12,5				
Ibuprofène	<i>Desmodemus subspitacus</i>	315,0 (EC50)	<i>Hydra vulgaris</i>	>0,01			<i>Lemna gibba</i>	>1,0 (EC10)
Naproxène	<i>Desmodemus subspitacus</i>	320,0 (EC50)					<i>Lemna gibba</i>	24,2 (EC50)
Ethinylestradiol	<i>non spécifié</i>	0,054 (EC10)	<i>Hyalella azteca</i>	0,0001	<i>Oryzias latipes</i>	0,00001		
			<i>Lymnea stagnalis</i>	<0,00000125	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<0,0000001		
					<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<0,0000003		

IV.5 Substances pharmaceutiques en tant que perturbateurs endocriniens

Le cytochrome P-450 (P-450) est une enzyme impliquée dans les réactions de métabolisme des xénobiotiques de phase I. Le P-450 est également impliqué dans des réactions de synthèse et de dégradation de molécules endogènes comme les stéroïdes et les prostaglandines. Un nombre important de médicaments peut agir comme inducteur ou inhibiteur enzymatique, notamment au niveau des différentes isoformes du P-450. Théoriquement, une inhibition ou une induction du P-450 peut entraîner des perturbations dans l'homéostasie des organismes voire dans les fonctions de reproduction. Cependant à l'heure actuelle, aucun effet toxique sur un organisme aquatique n'a pu être clairement relié à une induction ou une inhibition du P-450. Le P-450 est par contre communément proposé comme marqueur d'exposition des organismes aquatiques et notamment des poissons à des polluants environnementaux. Il existe un nombre important de molécules pharmaceutiques douées de ces propriétés (Tableau 27) et donc susceptibles d'engendrer des effets de perturbation endocrinienne.

Parce que les études sont encore trop peu nombreuses, il serait délicat d'affirmer que les substances pharmaceutiques exercent des activités de perturbation endocrinienne dans l'environnement, de plus amples travaux sont nécessaires. Dans une étude récente chez le rat, l'ibuprofène a montré une efficacité à bloquer les effets du tamoxifène (agent de traitement des cancers du sein hormono-dépendants qui agit en bloquant l'action de la 17- β -estradiol), en conséquence ce composé peut être classé comme un potentiel perturbateur endocrinien. De plus, il a été montré que l'ibuprofène était capable d'engendrer un retard dans la ponte (ou une diminution de la fréquence des pontes) chez des Medaka adultes exposés, ce qui peut avoir des effets délétères pour les populations naturelles (Flippin et al., 2007). Van der Ven et al. (2006) ont récemment mis en évidence que la miansérine (un antidépresseur tricyclique) était capable d'induire la synthèse de vitellogénine 1 et la synthèse de protéines de la *zona pellucida* chez des poissons (*Danio rerio*) exposés (14 jours, $C^0=250 \mu\text{g.l}^{-1}$). De même, au cours d'une exposition de *Carassius auratus* (Poisson rouge), à des concentrations de $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ et 10 mg.l^{-1} de gemfibrozil (hypolipémiant), Mimeault et al. (2005) ont constaté une diminution de 50 % du taux de testostérone plasmatique.

Tableau 27 : Revue des substances pharmaceutiques inductrices et inhibitrices des isoformes du cytochrome P450 (d'après Besse et Garric, 2008).

Isoformes du Cytochrome P-450	Inducteurs	Inhibiteurs
<i>CYP 3A4</i>	Carbamazépine, Phénobarbital, Oxcarbamazépine, Primidone, Phénytoïne, Fosphénytoïne, Topiramate, Rifampicine, Rifabutine, Griseofulvine, Efavirenz, Nevirapine, Bosentan, Méprobramate, Déxaméthasone, Ethosuximide, Glitazones, Modafinil ...	Acide valproïque, Amiodarone, Fluoxétine, Fluvoxamine, Acide fusidique, Doxycycline, Isoniazide, Synergistines, Vérapamil, Macrolides, Fluconazole, Antiprotéases, Ciclosporine, Cimétidine, Cisapride, Danazol, Dihydralazine, Diltiazem, Erlotinib, Felodipine, Imatinib, Nicardipine, Olanzapine, Proguanil, Quinidine, Silymarine, Telithromycine
<i>CYP 2D6</i>	Déxaméthasone, Ritonavir, Efavirenz, Nevirapine, Rifampicine	Ritonavir, Efavirenz, Nelfinavir, Delavirdine, Amiodarone, Flécaïdine, Propafénone, Quinidine, Doxorubicine, Imatinib, Citalopram, Clomipramine, Fluoxétine, Fluvoxamine, Moclobémide, Paroxétine, Bupropion, Célécoxib, Chloroquine, Cimétidine, Dextropropoxyphène, Diphenhydramine, Halofantrine, Halopéridol, Phénothiazines, Luméfántrine, Méfantine, Métoclopramide, Risperidone, Telithromycine, Terbinafine
<i>CYP 2C9 et CYP 2C19</i>	Carbamazépine, Phénobarbital, Phénytoïne, Primidone, Bosentan, Efavirenz, Ritonavir, Rifabutine, Rifampicine, Lumefantrine	Acide valproïque, Amiodarone, Fluconazole, Voriconazole
<i>CYP 1A2</i>	Phénobarbital, Carbamazépine, Phénytoïne, Fosphénytoïne, Ritonavir, Oméprazole, Lansoprazole	Clarithromycine, Erythromycine, Fluoroquinolones, Fluvoxamine, Paroxétine, Itraconazole, Kétoconazole, Amiodarone, Cimétidine, Peginterféron, Ticlopidine
<i>CYP 2A6</i>	Phénobarbital	Dithiocarbe, Methoxypsoralène
<i>CYP 2B6</i>	Phénytoïne	Mémantine, Nelfinavir, Orphénadrine, Ritonavir, Sorafénib, Thiotepa
<i>CYP 2C8</i>	Phénobarbital	Amiodarone, Cimétidine, Erlotinib, Imatinib, Kétoconazole, Paclitaxel, Sorafénib
<i>CYP 2E1</i>		Dithiocarb, Disulfirame

En **gras**, composés présentant un risque majeur d'interactions avec d'autres molécules pharmaceutiques

IV.6 Evaluation des risques liés à la présence de substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques

IV.6.1 Présentation du modèle d'évaluation des risques proposé par l'Agence Européenne du Médicament (EMA)

L'Agence Européenne du Médicament (EMA) a publié en 2006 une procédure révisée pour l'évaluation du risque des composés pharmaceutiques. L'approche se décompose en plusieurs phases

(Figure 26). Au premier niveau de l'évaluation du risque, la principale variable concerne la quantité de médicaments consommés sur une année : un premier calcul de concentration prédite dans l'environnement (PEC) est réalisé selon un mode hyperconservatif (selon un scénario de pire cas). Ce calcul est destiné à effectuer un premier criblage des molécules en fonction des concentrations estimées dans l'environnement. La première étape du processus repose donc sur la comparaison avec une limite maximale considérée admissible dans le milieu. Les molécules pour lesquelles les PEC calculés sont inférieures à ce seuil sont considérées comme ne représentant pas un risque significatif pour l'environnement et sont exclues de la démarche d'évaluation du risque proprement dite. Pour les autres, un raffinement des valeurs de concentration prédite dans l'environnement (PEC) est proposé à partir de l'équation 2 (PEC de phase 2) qui tient compte de la métabolisation des médicaments dans l'organisme, de la dégradation dans les stations d'épuration (STEP) et de l'adsorption sur les matières en suspension (MES). Des concentrations prédites sans effets (PNEC) et des quotients de risque (de type PEC/PNEC) sont finalement calculés. Dans un premier temps (phase 2A de la procédure EMEA), la PEC est calculée en tenant compte uniquement du facteur de pénétration sur le marché (F_{pen}). Dans une deuxième étape (phase 2B de la procédure), les autres paramètres : la fraction excrétée de la substance active ($F_{excreta}$), la fraction du composé rejetée par les STEP dans le milieu naturel (F_{step}), le facteur d'adsorption à la matière en suspension (F_{factor}) et le facteur de dilution sont utilisés pour déterminer des valeurs de concentrations prédites dans l'environnement (PEC) plus précises. Des valeurs de $PNEC_{aquatique}$ sont ensuite dérivées à partir des données écotoxicologiques chroniques disponibles. Ces données sont assorties d'un facteur de sécurité tenant compte des incertitudes existant dans l'extrapolation de données de laboratoire à la réalité environnementale. Ce facteur est fixé à 10 et s'applique à la plus faible valeur de NOEC (concentration sans effet observé) relevée. L'évaluation du risque repose sur l'établissement du rapport PEC/PNEC. Si ce rapport est supérieur à 1, la substance évaluée est considérée comme présentant un risque pour le milieu considéré (Tableau 28).

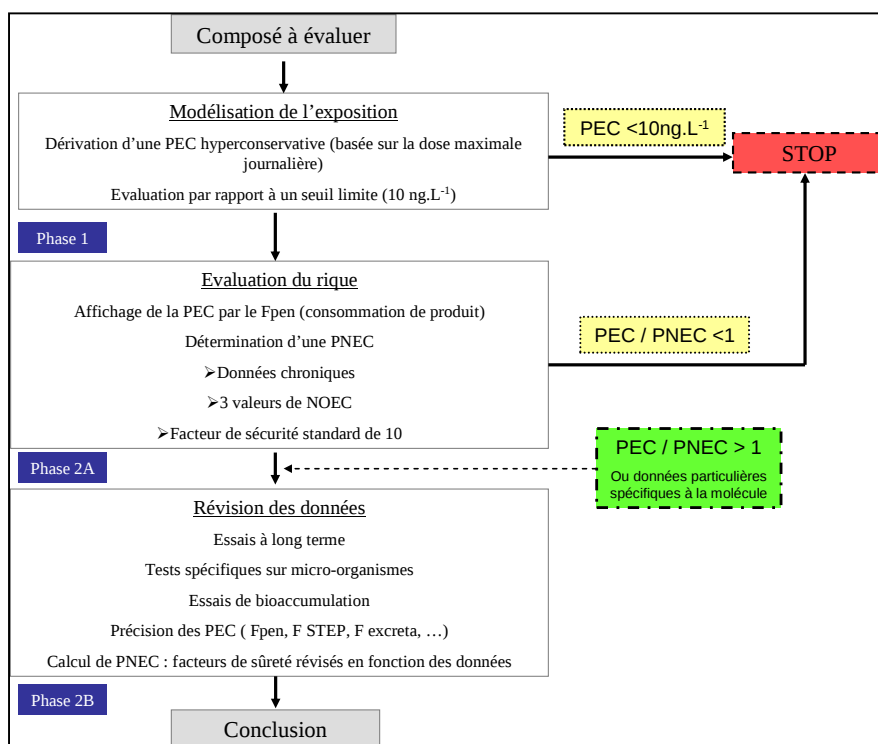


Figure 26: Schéma d'évaluation des risques selon la méthodologie EMEA (Besse et Garric, 2008).

IV.6.2 Valeurs de PNEC pour certaines molécules pharmaceutiques

Le Tableau 28 présente des valeurs de PNEC établies pour un certain nombre de molécules pharmaceutiques. On remarquera la grande hétérogénéité des valeurs (10 ng.l⁻¹ pour la tétracycline et plus de 1 mg.l⁻¹ pour l'acébutolol). Comme exposé par Besse et Garric (2008), lorsque ces valeurs sont comparées à des valeurs de PEC ou à des valeurs mesurées dans l'environnement (lorsque cela est possible, l'insuffisance de données limitant dramatiquement ces calculs). Les rapports PEC/PNEC sont dans une grande majorité des cas inférieurs à 1 ; ce qui laisse supposer que les risques pour l'environnement sont faibles. Seuls les antibiotiques (l'amoxicilline, la clarithromycine) et certains β -bloquants (le propranolol) présentent des rapports supérieurs à 1.

Cependant, ces résultats ne signifient pas que la présence des substances pharmaceutiques dans l'environnement est sans risque. En effet cette approche est limitée par :

- le nombre de données écotoxicologiques fiables,
- la non prise en compte des métabolites des substances considérées,
- la non prise en compte des effets des interactions entre ces molécules mais également entre ces molécules et les autres composantes du milieu.

Tableau 28 : Valeurs de PNEC établies selon la méthode EMEA pour certaines molécules pharmaceutiques (d'après Besse et Garric, 2008).

Classe Thérapeutique	Composé	Espèce la plus sensible	Donnée retenue	Valeur de toxicité ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Référence	Facteur de sureté	Valeur de PNEC finale ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
IRS	Paroxétine	<i>Cladocera dubia</i>	NOEC _{repro}	30	Garric et al., 2005	50	0,6
	Sertraline	<i>Cladocera dubia</i>	NOEC _{repro}	9	Henry et al., 2003	100	0,09
Benzodiazépine	Diazépam	<i>Daphnia magna</i>	CL ₅₀ survie	4 300	Lilius et al., 1994	1 000	4,3
Antipyrétique	Paracétamol	<i>Hydra vulgaris</i>	CL ₅₀ survie	1 000	Pascoe et al., 2003	1 000	1
AINS	Naproxène	<i>Daphnia magna</i>	CL ₅₀ survie	140 000	Rodriguez et al., 1992	1 000	140
	Aspirine	<i>Daphnia magna</i>	NOEC _{repro}	1 000	Marques et al., 2004	100	10
	Ibuprofène	<i>Daphnia magna</i>	NOEC _{repro}	20 000	Han et al., 2006	100	200
Cycline	Tétracycline	<i>Synechocystis sp.</i>	NOEC _{croissance}	1	Pomati et al., 2004	100	0,01
Macrolide	Clarithromycine	<i>Daphnia magna</i>	NOEC _{repro}	3,1	Yamashita et al., 2006	50	0,062
Fibrate	Fénofibrate	<i>Daphnia magna</i>	NOEC _{repro}	7	Garric et al., 2005	50	0,14
β - bloquants	Métoprolol	<i>Daphnia subspicatus</i>	CE ₅₀ croissance	7 300	Cleuvers et al. 2003	1 000	7,3
	Acébutolol	<i>Cladocera dubia</i>	NOEC _{repro}	62 500	Garric et al., 2005	50	1 250

NOEC repro : NOEC reproduction

IV.1 .Contexte réglementaire

Exception faite des Etats-Unis qui ont fixé un contexte réglementaire aux industriels dès 1998 ; il n'existe, pour l'instant, aucune norme en Europe concernant les rejets de substances pharmaceutiques à usage humain. Néanmoins les études entreprises mettent en évidence l'ubiquité de ces molécules dans les systèmes aquatiques à des concentrations susceptibles d'engendrer des effets toxiques, une prise en considération de la nécessité d'établir un contexte réglementaire est requise. Ainsi, par la décision du parlement européen (texte adopté le 22 mai 2007, document A6-0125/2007) visant à la réévaluation de la liste des substances dangereuses prioritaires pour une éventuelle entrée lors de la prochaine révision de la liste des 33 (Annexe 10) de la directive loi cadre sur l'eau, le diclofénac et la carbamazépine font l'objet d'une évaluation pour une entrée dans la directive fille DCE.

De même une liste de 19 substances pharmaceutiques et de 7 hormones sont entrées dans la liste OSPAR des substances préoccupantes (Tableau 29) et sont en cours d'évaluation.

Tableau 29 : Liste des substances pharmaceutiques et hormones de la liste OSPAR.

Liste des substances pharmaceutiques et hormones	
Chlorpromazine	Estradiol
Chloroquine bis(phosphate)	Estrone
Chloroquine	Diéthylstilbéstrol
Prochlorpérazine	17-éthynylestradiol
Fluphénazine	Mestranol
Fluphénazine dihydrochloride	Diosgénine
Thioridazine	Hydroxyprogestérone
Triflupéridol	
Phénothiazine	
Acridan	
Acide Niflumique	
Dimétacrine	
Noclofolan	
Miconazole nitrate	
Clotrimazole	
Timipérone	
Closantel	
Midazolam	
Diammonium N-éthylheptadécafluoro-N-[2-(phosphonatooxy)éthyl]octanesulphonamide	

CHAPITRE C

METHODOLOGIES ANALYTIQUES

Cette partie se propose de présenter, de manière générale, les méthodologies analytiques employées pour l'étude des APEO, Bisphénol A et des substances pharmaceutiques dans les matrices environnementales. Elle ne se veut en aucun cas exhaustive mais essaie de mettre en avant la complexité et les limites posées par l'étude de ces analytes dans les matrices environnementales complexes.

I Description conceptuelle d'une méthode analytique

I.1 Introduction

Une analyse chimique repose sur un nombre d'étapes qui peuvent être divisées en 4 groupes. Elle repose sur la connaissance et la maîtrise du devenir des substances à chacune des étapes. En effet, il est important de prendre en considération qu'une erreur réalisée à l'une des étapes pourra avoir des conséquences sur l'ensemble du protocole. Le Tableau 30 présente chacune des étapes et leurs limites.

Tableau 30 : Description conceptuelle des étapes clés d'une méthode analytique.

Echantillonnage	- Homogénéité de l'échantillon - Problèmes liés à l'équipement d'échantillonnage (pertes par sorption, pertes par dégradation)
Conservation	- Dégradation de l'échantillon (oxydation, photolyse, biodégradation) - Instabilité de l'échantillon
Préparation de l'échantillon	- Extraction de l'analyte ciblée - Enlèvement des interférents (purification) - Pré-concentration
Analyse/détection	- Sensibilité - Sélectivité - Rapport coût/efficacité

I.2 Les nouvelles approches liées à la mise en œuvre de la Directive Cadre-Eau (DCE)

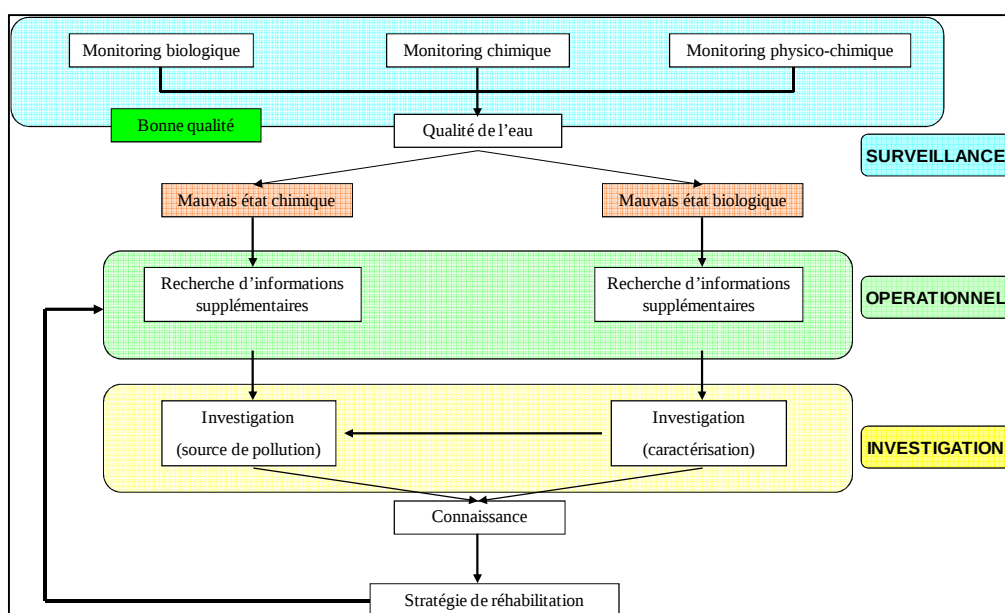


Figure 27 : Approche DCE pour atteindre le bon état écologique et chimique des milieux.

Les fondements de la DCE reposent sur la mise en œuvre de programmes conventionnels de surveillance de paramètres qualitatifs et quantitatifs. L'évaluation, sans ambiguïté, de la qualité chimique des eaux repose sur la capacité à assurer la comparabilité des données (comparabilité des données générées au sein d'un même laboratoire, comparabilité des données générées par les différents laboratoires mandatés dans les pays membres de l'Union Européenne, comparabilité des données générées dans le temps). Ainsi, l'efficacité des programmes de surveillance dépendra de la capacité des laboratoires à mesurer l'état chimique des masses d'eau et leur évolution. Les données analytiques vont donc constituer les fondements du système européen d'évaluation (Figure 27).

II Les techniques d'échantillonnages pour la mesure de la qualité chimique. Cas des matrices aqueuses

II.1 Les techniques d'échantillonnages in situ. Echantillonnages ponctuels

Les techniques d'échantillonnages ponctuels pour les composés organiques sont pour l'instant les techniques d'échantillonnages conventionnelles pour les analyses environnementales. Les exigences sont celles communes aux composés organiques en général : contenant ayant subi un processus de nettoyage poussé (calcination si le contenant est en verre, rinçage aux solvants, rinçage avec la matrice à échantillonner). Ils sont limités en termes de représentativité et ne donnent un état des lieux du site échantillonné que sur une courte échelle de temps (durée du prélèvement).

Sur certains sites contrôlés (stations d'épuration, usine d'assainissement), des échantillonneurs automatiques peuvent être installés, couplés à des débitmètres ou des chronomètres. Ils permettent d'obtenir des échantillons moyennés (1 échantillon par heure, 1 échantillon par jour). Cette approche est intéressante mais limitée à une courte période de temps dès lors que l'on s'intéresse à des composés organiques dégradables tels que les alkylphénol-polyéthoxylés (respect de l'intégrité de l'échantillon).

II.2 Les techniques de biomonitoring

L'intérêt des "organismes sentinelles" ou "indicateurs" pour la surveillance des contaminants dans le milieu marin est reconnu au niveau international. Le phénomène de bioaccumulation fonctionnant à l'échelle de quelques mois permet de s'affranchir des fluctuations rapides des masses d'eaux et facilite l'analyse des teneurs plus élevées rencontrées dans les organismes. Les espèces d'huîtres comme de moules sont considérées comme d'efficaces bioaccumulateurs d'éléments traces et de différents micropolluants, avec une capacité limitée de régulation pour limiter l'accumulation de contaminants dans leurs tissus. Ceci justifie leur utilisation dans les réseaux nationaux de biosurveillance ("Mussel Watch" aux Etats-Unis, Réseau National d'Observation (RNO), Réseau INtégrateurs BIOlogiques (RINBIO), le projet Mytilos (réseau interrégional de surveillance de la qualité des eaux côtières par des bio-intégrateurs (moules) pour la protection durable de la Méditerranée Occidentale) en France ; Figure 28). En milieu côtier, l'utilisation de la moule, essentiellement du genre

Mytilus, pour l'étude des niveaux et des tendances de la contamination chimique a été proposée au début des années soixante-dix. En milieu d'eau douce, l'espèce la plus utilisée est la Dreissène (*Dreissena polymorpha*). Le biomonitoring utilisant la moule repose sur l'hypothèse que le contenu en contaminant chez cet animal reflète la concentration en contaminants biodisponibles dans l'eau sous forme particulaire et/ou dissoute, selon un processus de bioaccumulation. Les stratégies développées sont de deux types : celles qui utilisent les populations indigènes de moules sauvages ou cultivées (biomonitoring passif, cas du Réseau National d'Observation du Milieu Marin (RNO) de l'IFREMER) et celles qui ont recours aux transplants d'individus provenant d'un site de référence (biomonitoring actif, cas du Réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO) de l'IFREMER en Méditerranée). Elles ont fait leurs preuves pour de nombreux contaminants tels que les métaux, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), les Polychlorobiphényles (PCB), les Pesticides, mais elles apparaissent limitées dès lors que l'on s'intéresse à des composés présentant une plus forte polarité. De plus, bien que les mollusques bivalves présentent de faibles activités métaboliques ils n'en sont néanmoins pas dépourvus. Enfin, bien que ces espèces présentent une certaine plasticité, elles possèdent des optimums écologiques (température, salinité, etc. ...), des rythmes de vie (ponte, taux de filtration, etc. ...) de telle sorte que certaines comparaisons sont délicates.

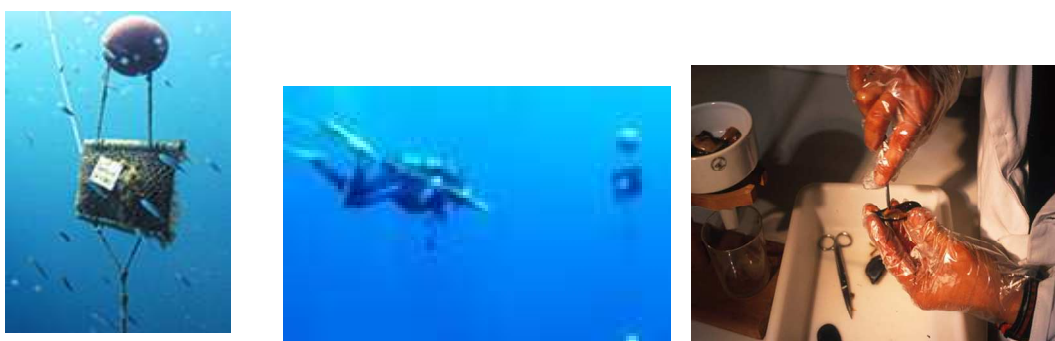


Figure 28 : Mise en œuvre du réseau de surveillance RINBIO (Réseau INTégrateurs BIOlogiques) (IFREMER).

II.3 Les nouvelles techniques d'échantillonnages : l'échantillonnage intégratif

Les techniques d'échantillonnages traditionnelles et de biomonitoring sont limitées pour fournir des approches par des évaluations holistiques pour les raisons suivantes :

- le manque de capacité à échantillonner de manière intégrative dans le temps,
- les techniques de biomonitoring sont dépendantes des conditions physico-chimiques du milieu (notamment en terme de survie des espèces exposées),
- les résultats fournis sont toujours spécifiques (capacités de bioaccumulation, de biotransformation, phénomènes de résistance).

A ces considérations s'ajoutent également les limites analytiques autant en termes de spécificité que de sensibilité. Afin de satisfaire aux nouvelles exigences de surveillance du milieu et de l'évaluation des risques, il est apparu nécessaire de développer des outils d'échantillonnages puissants

et plus représentatifs de l'exposition réelle dans le milieu. De ce constat est née l'idée de développer des outils d'échantillonnage passifs.

II.3.1 Principes de l'échantillonnage passif

L'échantillonnage passif peut être défini comme un mode d'échantillonnage où le flux de molécules du milieu échantillonné vers la phase stationnaire accumulatrice est libre et gouverné par une différence de potentiel chimique entre ces deux phases. Le temps nécessaire à l'atteinte de cet équilibre est dépendant de l'affinité de la phase collectrice pour le contaminant d'intérêt. Ceci a pour conséquence que la distinction entre échantillonnage à l'équilibre et échantillonnage non à l'équilibre n'est pas toujours très clair. Ce flux est maintenu jusqu'à l'apparition d'un équilibre (égalité des potentiels) entre l'échantillon et l'outil ou bien jusqu'à l'arrêt de la période d'échantillonnage par l'utilisateur. Ces échantillonneurs sont la plupart du temps utilisés dans la zone linéaire (déploiement de quelques jours à plusieurs mois) de la fonction mathématique décrivant l'accumulation :

$C_{\text{eau}} = \frac{[C_{\text{adsorbant}} * \text{Masse}_{\text{adsorbant}}]}{[R_{\text{s adsorbant}} * t]}$	C_{eau} en $\mu\text{g composé.l}^{-1}$ $C_{\text{adsorbant}}$ en $\mu\text{g composé. g}^{-1}$ d'adsorbant Masse adsorbant en g $R_{\text{s adsorbant}}$ en l. j^{-1} t en jours
--	---

Un certain nombre d'outils ont été récemment développés et couvrent une large gamme de polarité (Figure 29). Les plus pertinents pour l'analyse des composés polaires (les APEO, le bisphénol A et les substances pharmaceutiques) sont brièvement présentés dans les paragraphes suivants.

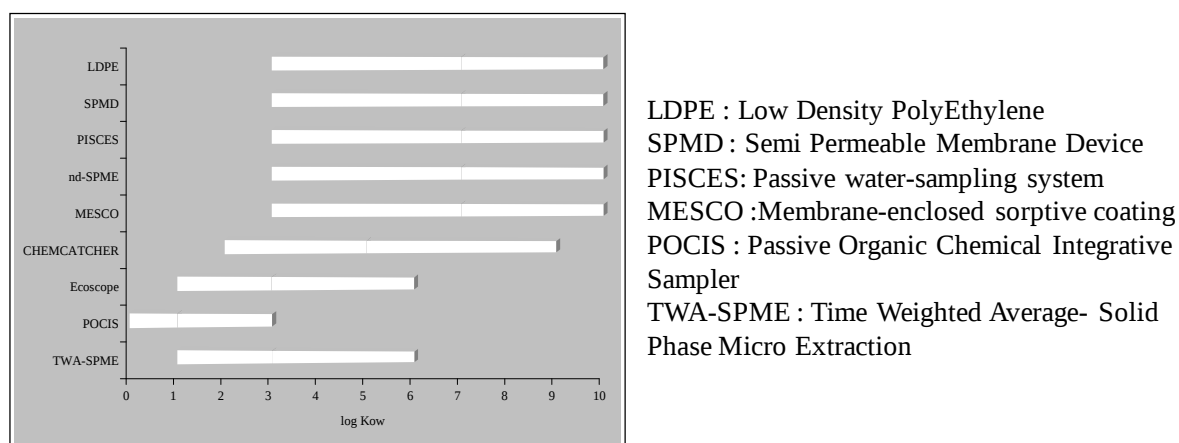


Figure 29 : Domaines d'application des échantillonneurs intégratifs pour les composés organiques (Vrana et al., 2005).

II.3.2 Outils d'échantillonnages intégratifs et composés polaires

a) SPMD (Semi Permeable Membrane Device)

Cet outil consiste en une membrane tubulaire en polyéthylène (LDPE), caractérisée par une longueur de 94 cm, une largeur de 2,54 cm et un diamètre de pores inférieur à 10 Å, remplie par un lipide de haut poids moléculaire : la trioléine. La membrane (LDPE) mime la membrane biologique, la trioléine est quant à elle le principal lipide retrouvé chez les organismes aquatiques. Cette technique a été employée avec succès pour la détermination des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), des Polychlorobiphényles (PCB) et des alkylphénols dans différents systèmes aquatiques (Vrana et al., 2005 ; Harman et al., 2008).

b) Chemcatcher®

Le système utilise une membrane diffusion-limitation et une phase solide comme phase réceptrice. Deux types de configurations ont pu être utilisées. Pour l'échantillonnage des composés apolaires l'outil est constituée d'une membrane en polyethersulfone et d'une phase de type Empore Disk® C18, pour l'échantillonnage des composés organiques polaires l'outil est constitué d'une phase de type Empore Disk® SDB-XC (Revue par Vrana et al., 2005).

c) POCIS (Polar Organic Compound Integrative Sampler)

La POCIS consiste en un milieu de séquestration, phase solide, contenue entre 2 membranes microporeuses (diamètre de pore égal à 0,1 µm) en polyethersulfone caractérisées par une surface efficace totale de 41 cm². Les membranes agissent comme des membranes semi-perméables, qui laissent passer au travers les composés chimiques d'intérêt et ne laissent pas passer le matériel particulaire ni le matériel biogénique. La POCIS a été conçue pour mimer l'exposition directe (respiratoire) des organismes aquatiques aux contaminants chimiques présents en phase dissoute (Alvarez et al., 2004 ; Petty et al., 2004). Cette technique a été employée pour la détermination de pesticides (Mazzella et al., 2007), de stéroïdes (Vermeirssen et al., 2005 ; Matthiessen et al., 2006 ; Arditoglou et Voutsas, 2008 ; Zhang et al., 2008b), d'alkylphénol-polyéthoxylés, du bisphénol A et des substances pharmaceutiques (Jones-Lepp et al., 2004 ; Alvarez et al., 2005 ; revue par Robinson et al., 2006 ; Togola et Budzinski, 2007 ; MacLeod et al., 2007 ; Mills et al., 2007 ; Arditoglou et Voutsas, 2008 ; Zhang et al., 2008b).

Tableau 31 : Discussion autour des techniques d'échantillonnages.

	Avantages	Inconvénients
Prélèvement ponctuel	- rapidité à mettre en œuvre	- non intégratif - nécessite de nombreuses étapes de préparation de l'échantillon (filtration, problème de conservation) - onéreux
Biomonitoring	- intégration à moyen terme - bioaccumulation des composés organiques	- pertes en milieu naturel - métabolisation possible selon les classes de composés - problèmes pour les composés polaires - ne permet pas de connaître la concentration en analytes d'intérêt dans le milieu - nécessite de nombreuses étapes de préparation de l'échantillon (lyophilisation, broyage) - onéreux
Echantillonnage intégratif	- intégratif - peu onéreux - outil de screening - concentration des composés organiques - large gamme de polarité couverte	- pertes en milieu naturel - nécessite de nombreux développements en laboratoire - dépendant des conditions du milieu

III Les techniques d'extraction

L'analyse quantitative repose d'une part sur une instrumentation sensible et sélective et d'autre part sur une technique de préparation de l'échantillon puissante en termes de sélectivité et robustesse.

III.1 Les techniques d'extraction des matrices liquides

Dans le passé, l'extraction liquide-liquide (ELL) était la technique d'extraction des matrices liquides. Bien qu'elle demeure une technique de référence (dans un certain nombre de protocoles normalisés) elle a été supplantée par de nouvelles techniques d'extraction plus en adéquation avec les nouvelles exigences de techniques de laboratoire : facilité de mise en œuvre, économies de solvants et de temps, possibilité d'automatisation. L'extraction sur phase solide (SPE) est évidemment très largement employée. Le besoin important de données documentant la présence de molécules émergentes dans l'environnement a induit une généralisation des méthodologies d'analyse multi-résidus conduisant à l'extraction simultanée de plusieurs dizaines de molécules appartenant à des groupes de micropolluants organiques diversifiés. Ainsi des méthodologies mettant en œuvre des phases C_{18} et de type polymérique (HLB, MCX, etc....) se sont généralisées (Castiglioni et al., 2005 ; revue par Petrovic et al., 2005). Cependant, force est de constater que ces approches ont conduit à la

génération d'un certain nombre de données erronées. Il est intéressant de noter l'essor des techniques d'extraction par MIP (Molecularly Imprinted Polymer) qui ont été appliquées avec succès pour l'extraction de micropolluants organiques dans des matrices aqueuses (Bisphénol A (Jiang et al., 2007 ; Pavlovic et al., 2007), nonylphénol (Guerreiro et al., 2008), certaines molécules pharmaceutiques: β -bloquants (Gros et al., 2008), diéthylstilbéstrol (Jiang et al., 2008), sulfonamides, triméthoprim et tétracyclines (Revue par Pavlovic et al., 2007)) et dont le principal avantage réside dans leur très grande spécificité.

D'autres techniques ont récemment émergé : Micro-extraction en phase solide (SPME Solid Phase MicroExtraction), la technique SBSE (Stir Bar Sorptive extraction), la micro-extraction en phase liquide (LPME : Liquid Phase MicroExtraction). Bien qu'employées de manière "confidentielle", elles présentent néanmoins des atouts (automatisation, chimie verte, économique, Tableau 32) qui peuvent, dans des actions précises, s'avérer extrêmement intéressants, l'ensemble de ces techniques est résumé dans le Tableau 32.

Tableau 32 : Principales méthodologies d'extraction pour l'analyse des matrices liquides.

	Extraction Liquide-Liquide (ELL)	Extraction en phase solide (SPE)	Micro-Extraction en phase solide (SPME)	Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)
Principe	Séparation d'un ou plusieurs constituants par l'utilisation de leur distribution inégale dans deux solvants pratiquement non-miscibles.	Technique la plus largement utilisée aujourd'hui. Capture certaines familles de molécules sur un adsorbant et élution grâce à un solvant spécifique.	Plonger une fibre de silice recouverte d'un adsorbant polymérique (Polydiméthylsiloxane (PDMS), Polyméthylsiloxane/divinylbenzène (PDMS/DVB), Polyacrylate (PA)) ou d'un gel de silice greffée C18 (le plus souvent) dans l'échantillon à analyser, ainsi exposée elle se charge des composés extractibles de la matrice.	Même principe que la SPME. Barreau rotatif recouvert de phase polymérique de type Polydiméthylsiloxane (PDMS). Placé dans l'échantillon à analyser, ainsi exposé il se charge des composés extractibles de la matrice.
Avantages	- Méthode simple	- Très large choix de phase silice greffée C ₁₈ pour les APEO et le BPA phase polymérique de type HLB, MCX pour les substances pharmaceutiques, - Technique rapide, robuste, économique. - Technique d'extraction et de purification	- Technique rapide - Economique en solvant - Nécessite de faibles volumes d'échantillons - Technique d'extraction et de purification - Couplage avec GC, HPLC	- Technique d'échantillonnage et extraction <i>in situ</i> . - Couplage avec GC, HPLC - Economique en solvant - Nécessite de faibles volumes d'échantillons - Technique d'extraction et de purification
Inconvénients	- Solvants non miscibles - Beaucoup de manutention - Formation d'émulsions - Larges volumes solvants, souvent toxiques	- Problèmes de colmatage - Problèmes d'adsorption liés à l'emprunt de chemins préférentiels par les molécules ciblées. - Problèmes de reproductibilité	- Nécessite un appareillage de thermo-désorption - Problèmes de reproductibilité - Problème de sensibilité dans certains cas	- Nécessite un appareillage de thermo-désorption - Problèmes de reproductibilité
Références	Kot-Wasik et al. (2007)	Petrovic et Barcelo (2001); Fatta et al. (2007) ; Pavlovic et al. (2007)	Kumazawa et al. (2003) ; Basheer et Lee (2004) ; Basheer et al. (2005) ; Hu et al. (2006) ; Petrovic et Barcelo (2001) ; Fatta et al. (2007); Pavlovic et al. (2007)	Kawaguchi et al. (2004b) ; Kawaguchi et al. (2006b) ; Serôdio et al. (2005) ; Petrovic et Barcelo (2001) ; Fatta et al. (2007); Pavlovic et al. (2007)

III.2 Les méthodes d'extraction des matrices solides ou semi-solides : particules, sédiments, boues, matrices biologiques

Les méthodes d'extraction des matrices solides sont celles plus classiquement employées pour l'extraction des composés organiques. La méthode classique, l'extraction Soxhlet qui est longue et coûteuse (en temps et en solvant), s'est vue supplantée par des méthodes d'extraction accélérées par des micro-ondes (Microwave Assisted Extraction), par la température et la pression (Supercritical Fluid Extraction, Pressurized Liquid Extraction). Ces nouvelles techniques sont économiques en solvant, rapides mais représentent tout de même un investissement non négligeable (Tableau 33).

Tableau 33 : Principales méthodologies pour l'analyse des matrices solides.

	Sonication	Soxhlet	M.A.E.Microwave Assisted Extraction	P.L.E. Pressurized Liquid Extraction
Principe	L'échantillon est immergé dans un solvant et irradié par des ultrasons	L'échantillon est placé dans un dé en fibre de verre ou cellulose, en utilisant un extracteur Soxhlet, l'échantillon est percolé par les vapeurs de solvants condensées, de manière répétitive	L'échantillon est immergé dans un solvant absorbant les micro-ondes dans un matra et irradié avec une énergie micro-ondes.	L'échantillon et le solvant sont chauffés et mis sous pression dans une cellule en métal. Quand l'échantillon est extrait il est automatiquement transféré dans un flacon de récupération (petit volume de solvant).
Avantages	- Méthode simple, - Echantillonnage multiple, - Rapide, -Economique en solvant.	- Pas de filtration.	- Extraction rapide, applicable à plusieurs échantillons simultanément. - Peu de solvant. - Températures élevées.	- Extraction rapide, - Peu de solvant, - Températures élevées, - Pas de filtration, - Système automatisé.
Inconvénients	- Nécessite un solvant capable de conduire les ultra-sons, - Nécessite une étape de filtration et de purification supplémentaire.	- Méthode n'est plus en accord des nouvelles exigences (temps, solvant),	- Usage de solvant capable d'absorber les micro-ondes - Nécessite une ou plusieurs étapes de filtration	- Haute température et haute pression
Références	Ternes et al. (2005) ; Aparicio et al. (2007) ; Fatta et al. (2007) ; Pavlovic et al. (2007)	Song et al. (2007) ; Jonkers et al. (2005b); Morales-Munoz et al. (2005); Fatta et al. (2007); Pavlovic et al. (2007); Jones-Lepp et Stevens (2007)	Togola et al. (2006); Liu et al. (2004); Pedersen et al. (2004) ; Fatta et al. (2007) ; Pavlovic et al. (2007) ; Jones-Lepp et Stevens (2007)	Petrovic et al. (2002) ; Heemken et al. (2001) ; Fatta et al. (2007) ; Pavlovic et al. (2007) ; Jones-Lepp et Stevens (2007)

IV Les techniques chromatographiques

IV.1 L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG)

Les composés sont tout d'abord volatilisés dans l'injecteur et entraînés dans le chromatographe le long de la colonne chromatographique par un gaz vecteur le plus souvent de l'hélium. Après avoir été séparés, les composés arrivent au niveau du détecteur.

IV.1.1 Les principaux couplages

Concernant l'analyse des APEO, certains couplages avec un Détecteur à Ionisation de Flamme ou un Détecteur à Capture d'Electron (Lee, 1999) peuvent être rapportés. Pour les substances pharmaceutiques, quelques études se référant à des couplages avec un Détecteur à Capture d'Electron (Levasseur et al., 1985) peuvent être notées.

Face à la complexité analytique posée par l'étude de ces composés dans l'environnement, ces méthodes de couplages se sont vues très rapidement limitées et ont été supplantées par les associations à des spectromètres de masse (CG-SM).

IV.1.2 Les couplages de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

a) L'étape de dérivation

De manière à améliorer la stabilité des composés, la sensibilité et la précision de l'analyse par CG-SM et CG-SM-SM, l'utilisation d'agents de dérivation est courante. Cette étape est indispensable à l'analyse des composés pharmaceutiques acides (anti-inflammatoires non stéroïdiens, β -bloquants, analgésiques, etc....) et alkylphénol-polyéthoxylés dès lors qu'ils possèdent plus de 2 groupements «éthoxy». Pour ces derniers, l'analyse par CG-SM est limitée aux APEO possédant moins de 6 groupements éthoxy. Les réactions de dérivation les plus courantes sont des réactions de silylation.

IV.2 L'analyse par chromatographie en phase liquide (CL)

La chromatographie en phase liquide (CL) est dite en phase normale lorsque que l'on oppose à une phase stationnaire polaire (type diol, amine) une phase mobile peu ou pas polaire. Cette approche a été très utilisée pour l'étude des APEO. Elle conduit à la séparation des composés selon leur caractère polaire (chaîne éthoxy) et permet ainsi la séparation de chaque éthoxymère d'un mélange donné (Lee, 1999). A cette chromatographie en phase normale est opposée une chromatographie dite en phase inverse (colonne stationnaire apolaire et phase mobile polaire). Dans le cas des APEO, cette technique conduit à la séparation des composés d'un mélange donné selon leur caractère apolaire (radical alkyl). Cette technique s'est généralisée et est désormais la plus répandue dans les études environnementales. Les phases stationnaires les plus répandues sont classiquement de type C₁₈. Les composés sont généralement entraînés le long de la colonne par un mélange d'eau et de

solvant organique (méthanol, acétonitrile) afin de permettre leur séparation en phase liquide. Très souvent, ces phases mobiles se voient ajouter des tampons (ammoniums quaternaires, triéthylamine, acide acétique, acide formique, etc...) qui participent d'une part à l'analyse chromatographique (séparation de molécules présentant une faible affinité avec la colonne) et d'autre part à l'analyse en masse (augmentation de la sensibilité liée à une augmentation du rendement d'ionisation (ces sels augmentent la volatilité de molécules faiblement volatiles)). Les récentes évolutions des colonnes chromatographiques par la diminution de la longueur des colonnes, la diminution des diamètres internes, la diminution de la taille des particules, l'augmentation des températures de travail (chauffage des colonnes par effet Peltier, chauffage des solvants) ont permis de gagner en temps d'analyse et en résolution. Ces améliorations ont conduit à l'émergence de nouvelles technologies de chromatographie : UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) Waters™, RRLC (Rapid Resolution Liquid Chromatography) Agilent™. Leur application à des matrices environnementales est en plein essor. Les travaux de Petrovic et al. (2006) et l'application de l'UPLC™ pour la séparation de 27 composés pharmaceutiques dans des eaux de stations d'épuration peuvent être notés, à ces travaux s'ajoutent d'autres travaux plus récents (Boleda et al., 2007 ; Chang et al., 2008 ; Farre et al., 2008a ; Huerta-Fontela et al., 2008).

IV.2.1 Les principaux couplages

Bien que la bibliographie rapporte certaines analyses par chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur UVs, chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur à barrettes de diode (Lee, 1999 ; revue par Fatta et al., 2007), ces techniques ont été supplantées par les techniques de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (revue par Fatta et al., 2007).

IV.2.2 Les couplages de chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse (CL-SM)

Les progrès des techniques d'électrospray associées à la haute sensibilité et sélectivité de la spectrométrie de masse ont fait des techniques de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) et de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM-SM) les techniques de choix pour l'analyse des composés polaires dans les matrices environnementales. Les analyses en mode MRM (qui détectent un ion précurseur et un ion fragment de l'analyte) sont la voie la plus sélective et la plus sensible pour mesurer les composés d'intérêt. Cependant, malgré leur grande spécificité, des mauvaises interprétations (faux positifs ou faux négatifs) peuvent toujours se dérouler en raison d'interférences de la matrice. La Commission européenne par la décision 2002/657/EC exige que deux transitions ou plus soient employées pour l'identification de n'importe quelle analyte dans le mode MRM. En outre, les rapports des réponses des différentes transitions doivent être calculés et comparés à ceux d'un échantillon référence. Pour confirmer des résultats positifs, les déviations des rapports d'ions et les déviations de temps de

rétenion doivent être conformes à ceux fixés par la décision 2002/657/EC. Puisqu'il peut être difficile d'obtenir des réponses satisfaisantes pour des transitions moins sensibles, ceci peut poser des problèmes potentiels pour des échantillons de basse concentration. En raison probablement de la pénurie d'isotopes marqués, la décision 2002/657/EC n'a pas mentionné l'utilisation systématique d'isotopes marqués (étalons internes) du composé cible pour l'analyse qualitative et quantitative précise.

L'utilisation de techniques de spectrométrie de masse haute résolution, ou trappes à ions peuvent être des outils intéressants pour lever les faux positifs (Revue par Hao et al., 2007). Les technologies de spectrométrie de masse à temps de vol ont récemment été appliquées avec succès pour la confirmation de la présence de substances pharmaceutiques dans des matrices environnementales complexes (Revue par Hao et al., 2007).

IV.3 **Le problème des effets matriciels**

Les effets matriciels existent aussi bien dans les couplages de chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse que dans les couplages de chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse et peuvent affecter la qualité des données générées. Ce phénomène est quasi incontournable dans les couplages CL-SM et CL-SM-SM, plus rare dans les couplages de CG-SM et CG-SM-SM. Il peut conduire à une suppression du signal partielle ou totale (faux négatif) ou à une amélioration du signal (faux positif). Il peut être généré par les composés interférents, présents dans les extraits, et qui possèdent des ions similaires (à la fois en SM simple ou en SM tandem). Dans cette configuration, le problème peut être résolu par le choix d'un autre ion non interféré, par l'amélioration de la procédure de préparation de l'échantillon (purification plus poussée, changement des conditions de préparation) ou par l'amélioration du processus de séparation (en CG comme en CL). L'effet matriciel engendré par une interaction/compétition entre l'analyte et les composantes de la matrice est propre aux couplages mettant en jeu la CL-SM (SM-SM, etc...). En effet, ces couplages reposent sur la mise en œuvre d'un processus d'ionisation dit à pression atmosphérique qui est considéré comme un processus d'ionisation doux par comparaison à l'impact électronique (processus qui entraîne une fragmentation de la molécule visée et également de la matrice) couramment employé dans les couplages de chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse). En chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse, ce phénomène a été mis en évidence dans les 2 modes d'ionisation les plus répandus (electrospray (ESI) et ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)), bien qu'il y ait une prévalence des effets en mode electrospray. Pour contrer ce phénomène, plusieurs stratégies sont classiquement mises en œuvre (Kloepfer et al., 2005 ; Antignac et al., 2005) : purification de l'échantillon (complexe à mettre en œuvre dans les analyses multi-résidus, problème de pertes des composés d'intérêt), amélioration de la technique de séparation (Van De Steene et al., 2006 ; UPLC™ Van De Steene and Lambert, 2008), dilution des extraits, division (split) avant l'entrée dans le spectromètre de masse. Plus généralement, la mise en œuvre de

différentes méthodes de calibration peuvent être envisagées pour générer des données plus fiables (méthode des ajouts dosés (Baugros et al., 2008), double étalonnage (étalon interne et étalon d'injection)).

IV.4 Réflexion d'harmonisation à l'échelle européenne

Comme se sont attachés à le montrer les chapitres précédents, il existe une grande hétérogénéité des données produites aussi bien en terme de présence que de devenir dans l'environnement pour les 3 classes de molécules : les alkylphénol-polyéthoxylés, le bisphénol A et les substances pharmaceutiques. Bien qu'elles puissent être inhérentes aux systèmes étudiés, une part de cette variabilité peut être expliquée par les méthodologies analytiques. En effet, la comparabilité et la fiabilité des données de surveillance sont essentielles pour toute étude de surveillance du milieu et pour la gestion des risques environnementaux. Pour les polluants émergents, des problèmes concernant la comparabilité des données au niveau européen et international existent. Les méthodes employées pour la surveillance des polluants émergents sont donc loin de l'harmonisation ou de la normalisation ; en conséquence elles peuvent souffrir de manque de validation.

La garantie de la qualité signifie développer un système d'activités pour s'assurer que les mesures répondent à des normes de qualité définies avec un niveau de confiance suffisant. Le développement d'un plan pour la garantie de la qualité inclut de définir des objectifs de surveillance, de définir les procédures de contrôle de la qualité et d'évaluer cette qualité.

Ces entreprises, dès lors que l'intérêt se porte à des composés émergents, sont difficiles à mettre en œuvre. En effet elles se confrontent à divers obstacles parmi lesquels : l'absence d'étalons analytiques, l'absence d'étalons analytiques marqués, l'absence d'échantillons de référence certifiés (CRM).

En Europe, un effort tout particulier est porté pour améliorer la validité des données générées. Divers programmes de recherche ont ainsi intégré des essais inter laboratoires :

- COST (coopération européenne dans le domaine de la recherche scientifique et technique) avec l'axe COST action 636 (xénobiotiques dans le cycle urbain de l'eau), dans le cadre de programme un essai inter laboratoires a été conduit sur le dosage des estrogènes dans les eaux de station d'épuration et les eaux naturelles ;
- le projet NORMAN (Network of reference laboratories and related organisations for monitoring and bio-monitoring of emerging environmental pollutants) qui vise à créer un réseau de laboratoires de référence afin, d'une part, d'améliorer les échanges d'information et de données sur les contaminants émergents entre les différents acteurs mis en jeu et, d'autre part, d'encourager l'harmonisation et la validation des méthodes de mesure et des outils d'études afin de répondre aux demandes des autorités publiques. Dans ce contexte, plusieurs essais inter-laboratoires ont été conduits. Le premier pour la validation et l'harmonisation d'une méthodologie analytique pour le dosage, par les laboratoires de recherche, des estrogènes dans les eaux de sortie de stations d'épuration, le deuxième pour la

validation et l'harmonisation d'une méthodologie analytique pour le dosage, par les laboratoires de référence, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Farre et al., 2008b) ;

- Récemment, le centre commun de recherche (JRC) de la commission européenne a organisé un exercice d'inter comparaison pour le dosage des nonylphénols et octylphénols dans les eaux. Sept laboratoires ont participé à cette étude, les méthodologies utilisées ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 30. Comme le souligne Loos et al. (2008), une grande hétérogénéité demeure dans les méthodologies sélectionnées par les laboratoires et engendre une grande hétérogénéité dans les résultats obtenus, parmi lesquels la difficulté ou l'incapacité de quantifier les NP dans les matrices les moins chargées. Ils concluent que des efforts doivent être entrepris afin d'améliorer les méthodologies en bannissant l'usage des matières plastiques dans l'ensemble des protocoles (extraction SPE) et en effectuant des contrôles des blancs.

		Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5	Lab 6	Lab 6	Lab 7
Volume d'échantillon		0,4	0,2	0,5	4150	2,3	1	11,82	1
Filtration		non	oui	non	na	non	oui	oui	non
Extraction		SPE	SPE	SPE	centrifugation	ELL	SPE	Extraction Randall	SPE
		OASIS HLB (200)	OASIS HLB (60)	C18	Soxhlet	Dichlorométhane	C18		Envichrom P
Solvant d'élution		Acétate d'éthyle	Acétate d'éthyle/ Dichlorométhane	Méthanol/ méthyl- tertiobutyl éther	MES 1		Acétone	MES 2	Dichlorométhane
Méthode d'analyse	colonne	CL-SM (tg) C18	CG-SM DB-5	CL-SM (tg) C18	CG-SM (it) ZB-5	CG-SM DB-5	CL-Fluo Phénylhéxyl	CL-Fluo Phénylhéxyl	CG-SM DB-1
		2,1*150mm	30m	2,1*100mm	30m	30m	4,6*250mm	4,6*250mm	60m
		219>133	149	219>133	207>119	135	230nm excitation	230nm excitation	135
		227>112	135	219>106	221>119		302nm émission	302nm émission	107
		205>106	121	225>112	235>119				57
		205>133	107	205>133	278>119				220
					292>119				77
Eralons internes		4-n-NPd8	4-n-NPd8	4-n-NPd6	4-bromophénol	4-n-NPd8	non	non	Atrazine-d5

MES 1 : lyophilisation, extraction avec un mélange acétone/héxane(2:1), purification sur gel de silice
MES 2 : extraction Randall avec du méthanol chaud, purification sur gel de silice

		Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5	Lab 6	Lab 7
NP/OP dans les solutions de standards (ng.ml-1)								
	4-NP	200	176	50	110	178	250	
	4-n-OP	200	181		150	122	120	
NP/OP dans les extraits d'eaux de rivière (ng.ml-1)								
	4-NP	683	957	74	510	495	600	
	4-t-OP	17		6,6	33	9	150	
	4-n-OP		<0,44		<10			
NP/OP dans les eaux e la rivière P6 (ng.L-1)								
	4-NP	70	110	<22	5,1*	<10	80*	<10
	4-t-OP	<5			1,5*	<5	<50	
	4-n-OP		<1		<0,5*			

* données des phases solides en suspension

Figure 30 : Exercice d'inter comparaison mis en œuvre par le JRC pour le dosage des AKP dans les eaux en Europe.

- méthodologies mises en œuvre par les laboratoires participants
- résultats quantitatifs

Les Tableaux 34, 35 et 36 se proposent d'illustrer les faits exposés dans ce chapitre pour les alkylphénol-polyéthoxylés, le bisphénol A et les substances pharmaceutiques, respectivement. Pour chaque classe de molécules, une évolution des méthodologies analytiques mises en œuvre pour le traitement des échantillons environnementaux liquides (eaux) et solides (sédiments, boues et matières en suspension) est exposée.

Tableau 34 : Méthodologies analytiques pour l'analyse des APEO et leurs métabolites dans les matrices environnementales (liquides et solides).

	Analyse multi résidus	Type de matrice	Extraction / purification	Méthode d'analyse	
NPEO+métabolites (CAPEC)	Non	Eaux	SPE (Carbograph4)	CL-ESI-SM	Di Corcia et al., 1998
NPEO + métabolites	Non	Eaux	SPE (C18)	CL-ESI-SM-SM	Jonkers et al., 2001
NPEO	Non	Eaux	ELL	CL-ESI-SM	Ferguson et al., 2001
NPEO, OPEO, AP-X	Non	Eaux	SPE (C18)	CL-ESI-SM	Ferguson et al., 2001
NPEO+métabolites	Non	Eaux	SPE (Envicarb)	CL-ESI-SM-SM	Houde et al., 2002
NPEO + métabolites	Non	Eaux	SPE (Isolute ENV+)	CL-ESI-SM-SM	Loyo-Rosales et al., 2003
AP	Non	Eaux	SBSE	(TD)-CG-SM	Kawaguchi et al., 2004a
AP	Non	Eaux	SPE (MAX)	CG-SM (PFBC)	Boitsov et al., 2004
NPEO+métabolites, OP	Non	Eaux	SPE (HLB)	CL-ESI-SM-SM	Jahnke et al., 2004
NPEO+métabolites	Non	Eaux	SPE (Envicarb)	CL-ESI-SM	Berryman et al., 2004
NPEO métabolites (CAPEC)	Non	Eaux	SPE (Envi-Carb)	CG-SM (n-propanol-acetyl/chloride)	Cheng et al., 2007
NPEO+métabolites OPEO+métabolites BPA	Oui	Eaux	SPE (HLB)	CL-ESI-SM-SM	Loos et al., 2007
	Analyse multi résidus	Type de matrice	Extraction / purification	Méthode d'analyse	
NPEO+métabolites	Oui (BPA)	Boues	Sonication/ SPE (C18)	CL-ESI-SM	Petrovic et al., 2002
NPEO + métabolites	Non	Sédiments	ASE/ SPE (CN)	CL-ESI-SM-SM	Loyo-Rosales et al., 2003
NP	Non	Sédiments	Sonication	CG-SM	Vitali et al., 2004
NPEO	Non	Matrices biologiques	ASE	CL-ESI-SM-SM ; CL-Fluo	Shmitz et al., 2005
NP	Non	Sols/ Boues	Soxhlet/ SPE (CN)	CG-SM	Gibson et al., 2005
AP	Non	Sédiments	ASE	CG-SM (BSTFA)	Fiedler et al., 2007

Tableau 35 : Méthodologies analytiques pour l'analyse du bisphénol A dans les matrices environnementales (liquides et solides).

	Analyse multi résidus	Type de matrice	Extraction / purification	Méthode d'analyse	
BPA	Non	Eaux	MELL	CG-SM (Trimethylchlorosilane, hexamethyldisilazane)	Gonzalez-Casado et al., 1998
BPA	Oui	Eaux	ELL	CG-SM (BSTFA+TMCS)	Rudel et al., 1998
BPA	Non	Lixiviats	SPE (HLB)	CL-ESI-SM-SM	Sajiki, 2001
BPA	Non	Eaux	ELL	CG-SM (BSTFA+TMCS)	Kuch et Ballschmiter, 2001
BPA	Non	Eaux (STP)	SPE (C18)/ gel silice	CG-SM (MSTFA)	Spengler et al., 2001
BPA	Non	Matrices biologiques	SPE (HLB)	CL-ESI-SM-SM	Tominaga et al., 2006
BPA	Non	Eaux	BPA-imprinted silica SPE (MIP-SPE)	CL-UV	Jiang et al., 2007
BPA	Oui (24 composés à usages domestiques)	Eaux	SPE (HLB)	CL-ESI-SM-SM	Trenholm et al., 2008
BPA	Oui (33 substances prioritaires)	Eaux	SPE Strata C-18	CG-SM	Baugros et al., 2008
	Analyse multi résidus	Type de matrice	Extraction / purification	Méthode d'analyse	
BPA	Oui (œstrogènes, NP, OP)	Sédiments	MAE/ Silice	CG-SM	Liu et al., 2004
BPA	Oui (œstrogènes, NP)	Sédiments	Ultrasonication/ Silice	CG-SM	Peng et al., 2006a
BPA	Oui (AP)	Tissus biologiques	ASE / SPE (CN)	CL-ESI-SM-SM	Shao et al., 2007
BPA	Oui (œstrogènes, NP, NP1EC)	Sédiments	Ultrasonication	CL-ESI-SM	Pojana et al., 2007
BPA	Oui (pesticides)	Sédiments	Ultrasonication / SPE (HLB)	CL-ESI-SM-SM	Kitada et al., 2008

Tableau 36 : Méthodologies analytiques pour l'analyse des substances pharmaceutiques dans les matrices environnementales (liquides et solides).

Molécules /classes thérapeutiques	Type de matrice	Extraction / purification	Méthode d'analyse	
AINS	Eaux	SPME	CG-SM	Carpinteiro et al., 2004
AINS, perturbateurs endocriniens	Eaux	SPE (MAX)	CG-SM	Lee et al., 2005
30 molécules (stéroïdes, Antibiotiques, Anti cancéreux, β -bloquants, ...)	Eaux	SPE (MCX) SPE (Lichrolut EN)	CL-ESI-SM-SM	Castiglioni et al., 2005
46 molécules (perturbateurs endocriniens, AINS, herbicides, antiépileptique, ...)	Eaux	SBSE (PDMS)	CG-TI-SM (MTBSTFA)	Quintana et al., 2007
21 molécules (β bloquants, corticostéroïdes)	Eaux	SPE (MCX)	CL-ESI-SM-SM	Piram et al., 2008
Carbamazépine, diclofénac, acide clofibrique, diazépam	Eaux	SPE (C18)	CL-LTQ orbitrap	Gebhardt et Schroder, 2007
20 molécules (antibiotiques, hypolipémiants, β bloquants, antiépileptique, NSAID, ...)	Eaux	SPE (STRATA X))	CL-ESI-SM-SM	Lacey et al., 2008
28 molécules (antidépresseurs, antibactériens, drogues,	Eaux	SPE (MCX)	CL-ESI-SM-SM	Kasprzyk-Hordern et al., 2008a
AINS	Eaux	SPME	CG-SM	Araujo et al., 2008
Diclofénac, 4-Hydroxydiclofénac	Eaux	MISPE	CL-DAD	Sun et al., 2008
Molécules /classes thérapeutiques	Type de matrice	Extraction / purification	Méthode d'analyse	
AINS, Ivermectine	Sédiments	Ultra sonication	CL-ESI-SM-SM	Loffler and Ternes, 2003
24 molécules (NSAID, antibiotiques, PCPP...)	Boues	Ultra sonication / (SPE MCX, SPE C18)	CL-ESI-SM-SM	Ternes et al., 2005
9 molécules (désinfectants, AINS, estrogènes, ...)	Sédiments	MAE / silice, cuivre activé	CG-SM (pyridine/ BSTFA ; 2/1)	Rice and Mitra, 2007
AINS	Sédiments	MAME-SPE (HLB)	CL-UV	Cueva-Mestanza et al., 2008

ELL : Extraction Liquide Liquide ; AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens ; SPE : Extraction en Phase Solide ; SBSE : Stir Bar Sorptive Extraction ; SPME MicroExtraction en Phase Solide ; LPME MicroExtraction en Phase Liquide ; CG-SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse ; CG-SM-SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem ; CL-SM : Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse ; CL-SM-SM : Chromatographie en Phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem ; CL-UV : Chromatographie en Phase Liquide couplée à un détecteur Ultra-Violet ; LC-DAD : Chromatographie en Phase Liquide couplée à un détecteur à barrettes de diode ; CN : Cyanopropyle ; HLB : Hydrophilic Lipophilic Balanced ; ASE : Extraction Accélérée par Solvant ; MAE Extraction Assistée par Micro-ondes ; MISPE Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction ; BSTFA : [N, O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacétamide ; BSTFA+ TMCS : [N, O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacétamide +Trimethylchlorosilane ;MSTFA : [N-Methyltriméthylsilyl]trifluoroacétamide]

Bilan

Ce premier chapitre a permis de situer la thèse dans le contexte actuel de la problématique liée à l'étude des contaminants émergents : alkylphénol-polyéthoxylés, bisphénol A et substances pharmaceutiques dans les systèmes naturels. L'état de l'art ici exposé s'est attaché à mettre en évidence la difficulté de l'étude de ces contaminants dans l'environnement au regard de :

❧ la complexité et la grande hétérogénéité des structures et des propriétés physicochimiques des molécules évoquées,

❧ la diversité et la complexité de l'étude de leurs sources (grande hétérogénéité des données publiées dans la littérature aussi bien en termes de présence que de devenir). Notamment au travers de la compréhension de leur devenir au sein des stations d'épuration: point d'entrée vers les écosystèmes aquatiques de ces contaminants,

❧ la complexité de l'étude de leur devenir dans les systèmes aquatiques (grande hétérogénéité des données environnementales publiées dans la littérature),

❧ la complexité analytique que représente l'étude de ces molécules dans des matrices environnementales complexes,

❧ leurs potentiels toxiques considérés individuellement et du besoin d'évaluation de leurs effets en mélanges (dans des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental).

Objectifs de thèse

Les travaux de recherche conduits dans le cadre de cette thèse se sont organisés selon deux axes principaux : un axe méthodologique et un axe applicatif.

Dans un premier temps, cette étude s'est attachée à développer, optimiser et valider des méthodologies et des procédures analytiques pour l'analyse de substances émergentes dans les matrices environnementales (dissoutes, solides, biologiques) notamment les matrices complexes. Dans le même temps, de nouvelles approches pour le monitoring des molécules organiques par le développement d'un nouvel outil d'échantillonnage, les POCIS (Polar Organic Compounds Integrative Sampler), a été entrepris, d'une part par des expérimentations en laboratoire et d'autre part par des validations *in situ*.

Dans un deuxième temps, cette étude s'est attachée à renseigner le cycle biogéochimique des alkylphénol-polyéthoxylés, principalement, et des substances pharmaceutiques, secondairement.

Un important effort de recherche a été accordé à l'étude de la présence et du devenir de ces deux classes de molécules dans les stations d'épuration, permettant ainsi l'acquisition du premier jeu de données nationales représentatif pour ces deux classes de molécules. Le deuxième axe fort de ce travail reposant sur la considération de l'ensemble des phases rejetées dans l'environnement : les phases dissoutes, les phases solides en suspension et les boues. Des échantillonnages répétés dans le temps et dans l'espace ont permis l'observation des dynamiques propres à ces systèmes ainsi que leur impact sur le milieu récepteur, notamment au travers de l'étude de l'impact de la station d'épuration de Marseille sur la calanque de Cortiou et la rade de Marseille.

Une évaluation de la qualité des milieux aquatiques français : dulçaquicoles, estuariens et littoraux a également été conduite.

La Seine et plus spécialement l'estuaire de Seine, de part la très forte pression anthropique exercée sur son bassin versant a fait l'objet d'un monitoring de 5 années (2002-2006). Ainsi de multiples campagnes d'échantillonnage ont été menées et ont permis d'identifier et de caractériser les sources de la contamination ainsi que leurs dynamiques, d'étudier le devenir des contaminants dans l'estuaire ainsi que les dynamiques intrinsèques aux systèmes, d'étudier les phénomènes de transferts vers d'une part le milieu marin et d'autre part vers les organismes biologiques. Un effort de recherche particulier a été porté sur le rôle des phases solides en suspension dans le cycle biogéochimique des APEO.

Afin d'acquérir une meilleure représentativité de l'état de contamination des systèmes français, 4 autres grands estuaires français ont été étudiés : la baie de l'Authie, la baie de la Vilaine, l'estuaire de la Gironde et l'estuaire de l'Adour.

MATERIEL ET METHODES

Une analyse chimique repose sur un nombre d'étapes qui peuvent être divisées en 4 groupes. La justesse et la représentativité des données générées reposent sur la connaissance et la maîtrise du devenir des substances à chacune de ces étapes : échantillonnage, conservation, préparation de l'échantillon et analyse/détection.

Dans une première partie, les différentes études, en milieu naturel et en laboratoire, réalisées dans ce travail sont décrites. Dans une seconde partie, les différentes techniques analytiques utilisées pour le dosage des molécules d'intérêt, dont le choix est brièvement exposé, dans les matrices environnementales complexes au cours de ces études sont décrites.

Sommaire

I	Sites d'études et expérimentations.....	113
I.1	Etude du devenir dans les stations d'épuration.....	113
I.2	Etude du devenir dans les écosystèmes aquatiques.....	113
I.2.1	<i>L'estuaire de la Seine et ses affluents.....</i>	113
I.2.2	<i>Le continuum Garonne -Estuaire de la Gironde (France).....</i>	116
I.2.3	<i>Le continuum Adour -Estuaire de l'Adour (France).....</i>	118
I.2.4	<i>L'Estuaire de la Vilaine.....</i>	119
I.2.5	<i>La baie d'Authie.....</i>	121
I.2.6	<i>La méditerranée orientale : la rade de Marseille et la calanque de Cortiou (France) ..</i>	121
I.3	Développement des nouveaux outils d'échantillonnage intégratifs.....	124
I.3.1	<i>Expérimentation en laboratoire.....</i>	124
I.3.2	<i>Expérimentations sur le terrain.....</i>	126
II	Les méthodologies analytiques mises en œuvre.....	129
II.1	Remarques générales.....	129
II.2	Dosage des alkylphénol-polyéthoxylés.....	129
II.2.1	<i>Préparation des échantillons.....</i>	130
II.2.2	<i>Protocole d'extraction des matrices liquides.....</i>	131
II.2.3	<i>Protocole d'extraction des matrices solides.....</i>	132
II.2.4	<i>Protocole d'extraction des biles.....</i>	132
II.2.5	<i>Quantification des APEO et de leurs métabolites : Analyse par CL-SM.....</i>	132
II.2.6	<i>Méthode de quantification des APEO et de leurs métabolites.....</i>	133
II.3	Dosage des substances pharmaceutiques.....	134
II.3.1	<i>Préparation des échantillons.....</i>	135
II.3.2	<i>Protocole d'extraction des matrices liquides.....</i>	136
II.3.3	<i>Protocole d'extraction des matrices solides.....</i>	137
II.3.4	<i>Protocole de purification des matrices solides.....</i>	137
II.3.5	<i>Quantification des substances pharmaceutiques : Analyse par CPG-SM.....</i>	138
II.3.6	<i>Quantification des substances pharmaceutiques : Analyse par CL-SM-SM.....</i>	139
II.3.7	<i>Méthode de quantification des substances pharmaceutiques.....</i>	140
II.4	Méthodologies d'analyse des POCIS.....	141
II.4.1	<i>Protocole d'extraction de la phase HLB.....</i>	141
II.4.2	<i>Protocole d'extraction de membranes.....</i>	141

I Sites d'études et expérimentations

I.1 Etude du devenir dans les stations d'épuration

Seize stations d'épuration représentatives des principaux processus d'épuration des eaux usées présents à l'échelle nationale ont été étudiées. De plus, certaines usines d'assainissement possédant des traitements avancés dits tertiaires ont été sélectionnées en France et en Espagne, et ont été évaluées spécifiquement par rapport à ces traitements qui pourront se généraliser à l'avenir. En raison d'un contexte national délicat en matière d'assainissement des eaux usées et pour garantir un contrôle des données et de leurs interprétations, les informations concernant les caractéristiques des stations d'épuration (nom de l'usine de traitement des eaux usées, localisation, milieu récepteur, processus mis en œuvre pour le traitement des eaux usées) ainsi que les plans d'échantillonnage seront présentés dans une annexe confidentielle (Annexe III) attachée à ce document afin d'assurer la confidentialité des données.

I.2 Etude du devenir dans les écosystèmes aquatiques

Un certain nombre de sites ont fait l'objet d'investigations plus ou moins poussées et par différentes approches:

- Les principaux estuaires français avec un intérêt plus particulier porté à l'estuaire de la Seine,
- les milieux dulçaquicoles (la Jalle d'Eysines, l'Adour, la Garonne,...)
- les milieux marins côtiers : plus particulièrement la rade de Marseille,

Ils seront présentés dans les paragraphes suivants.

I.2.1 L'estuaire de la Seine et ses affluents

a) Généralités sur l'estuaire

L'estuaire de la Seine, exutoire naturel de la Seine, concerne le territoire compris entre le barrage de Poses en amont - premier barrage sur la Seine, et limite d'influence de la marée dynamique, situé à 160 km en amont du Havre - jusqu'à la partie orientale de la baie de Seine. Trois zones sont distinguées (Figure 32) : l'estuaire amont ou estuaire fluvial, l'estuaire moyen (zone de variation de la salinité) et l'estuaire aval ou estuaire marin (de Honfleur à la partie orientale de la baie de Seine limitée au nord par le parallèle du Cap d'Antifer et à l'ouest par le méridien de l'Orne). Le débit du fleuve à Poses est relativement faible ($480 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, moyenne des 30 dernières années) avec des crues automnales ou hivernales qui dépassent $2200 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ et des étiages avec des débits inférieurs à $100 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Situé en Manche, l'estuaire de la Seine est un estuaire dont le fonctionnement hydrodynamique est fortement influencé par la marée. Ce régime macrotidal induit dans la zone de mélange des eaux marines et des eaux douces (estuaire moyen) la formation d'un bouchon vaseux ou zone de turbidité maximale qui joue le rôle de piège de matières en suspension, de régulateur physico-chimique pour

bon nombre d'éléments naturels (oligoéléments) ou polluants notamment les métaux par des phénomènes de désorption, adsorption... et qui entraîne une décroissance de la teneur en oxygène liée à l'oxydation de la matière organique piégée dans cette zone. Les principales caractéristiques et pressions sont résumées dans l'Annexe IV).

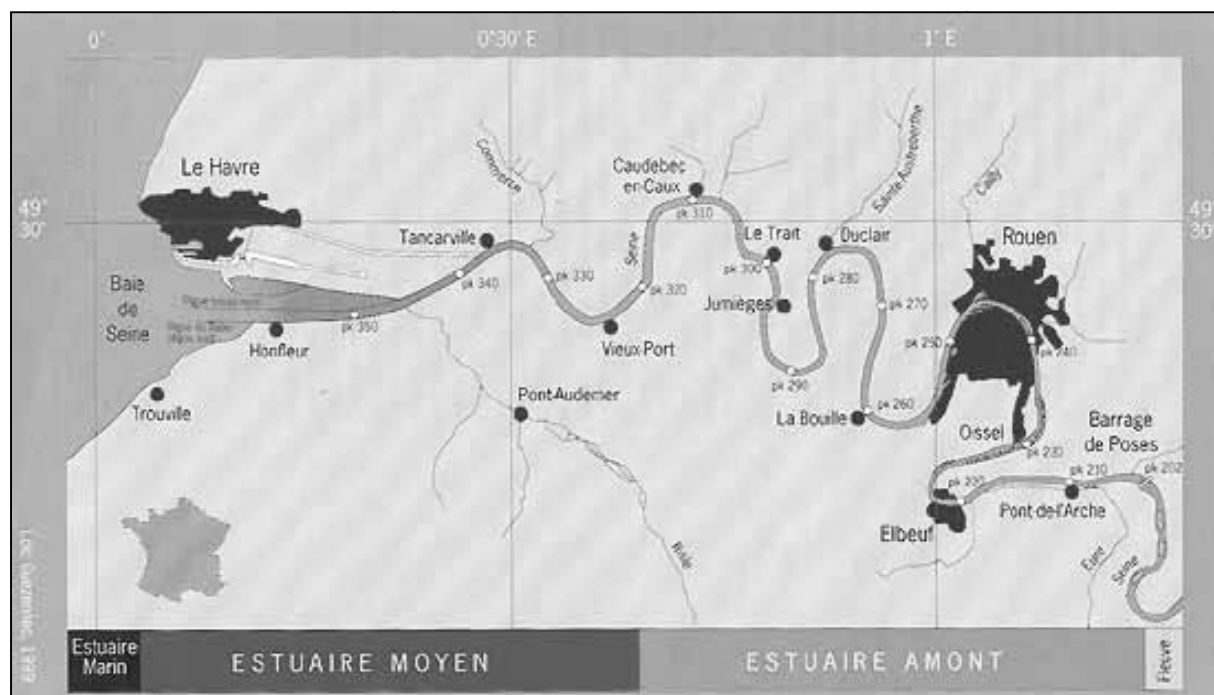


Figure 31 : Présentation de l'estuaire de Seine

b) Les principaux affluents

Les 9 principaux affluents de l'estuaire de Seine ainsi que leurs principales caractéristiques sont présentés dans l'Annexe IV.

c) Campagnes d'échantillonnage

➤ **Campagnes 2004**

Quatre campagnes ont été réalisées en 2004 : le 16 mai (SA ZOOTOX1), le 15 juin (SA ZOOTOX 2), du 20 au 23 septembre (MEDOC1) et le 30 novembre (RNO). Les prélèvements ont concerné des eaux de l'estuaire et de la baie de Seine (phase dissoute et phase particulaire). Des sédiments ont également été prélevés. Les différentes campagnes de prélèvements ont concerné des points fixes (Pont de Normandie) avec des suivis de cycles de marées et des transects du milieu dulçaquicole vers le milieu marin. Les prélèvements ont été réalisés depuis des navires.

➤ **Campagnes 2005**

Une campagne a été réalisée du 7 au 12 mai 2005. Des prélèvements d'eaux ont été effectués, manuellement depuis les berges et les ponts, au niveau des principaux affluents de l'estuaire aval, au niveau de 3 stations d'épuration de la Seine ainsi qu'à Poses (Barrage) considéré comme la

limite amont de l'estuaire. Des prélèvements ont été simultanément réalisés tout au long de l'estuaire de manière à obtenir un état global à un instant donné de l'état de contamination de l'estuaire de la Seine.

➤ Campagnes 2006

Deux campagnes ont été réalisées en 2006 : une première du 26 au 27 février 2006 (SA AFFLUENTS 2) et la deuxième du 4 au 5 juillet 2006 (SA AFFLUENTS 3). Ces 2 campagnes de prélèvements ont fait suite à une première campagne qui avait eu lieu en mai 2005. La première campagne s'est déroulée dans des conditions hivernales : température basse, fort débit de la Seine (la campagne succède à un épisode de crue). Au contraire cette deuxième campagne s'est déroulée dans des conditions estivales : température élevée, débit d'étiage. L'ensemble des campagnes est résumé dans le Tableau 37.

Tableau 37 : Tableau récapitulatif des campagnes réalisées en Estuaire et Baie de Seine.

	Année 2004				Année 2005		Année 2006	
	16-mai	15-juin	20 / 23-septembre	30- novembre	7 / 12 -mai		26 / 27- février	4/5- juillet
Affluents (10)					✓		✓	✓
Transect dans l'estuaire (Poses					✓		✓	✓
Point fixe (Honfleur)	✓	✓	✓					
Transect en estuaire marin		✓		✓				

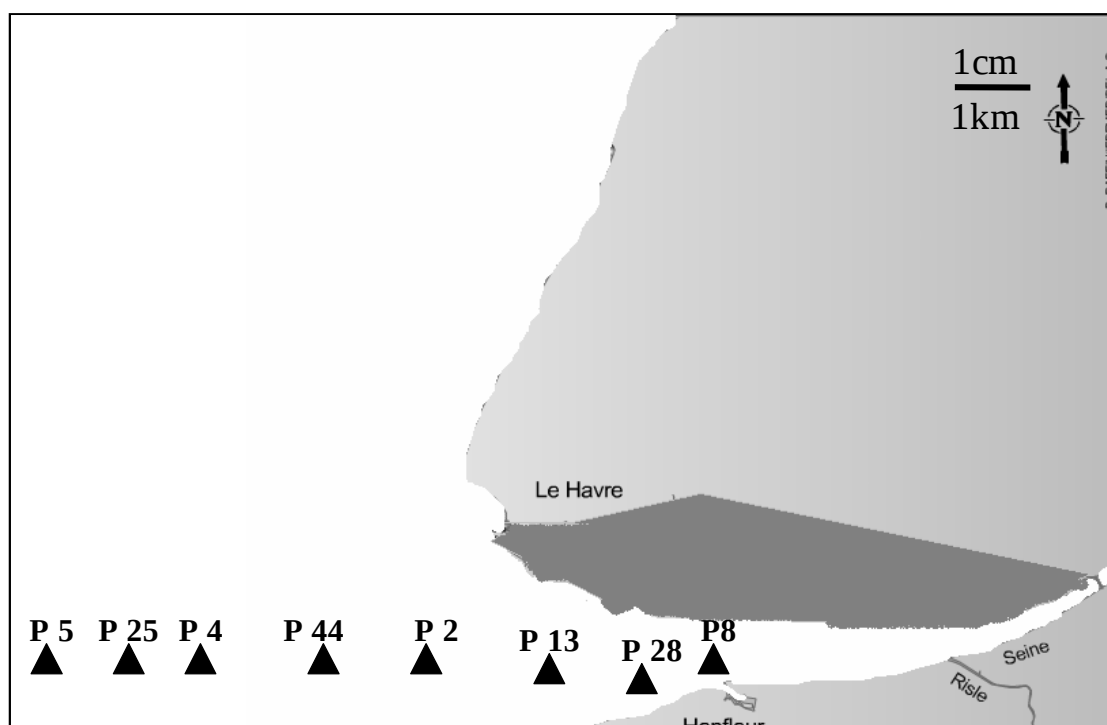


Figure 32 : Localisation des points d'échantillonnages en baie de Seine dans le cadre du programme de surveillance RNO (IFREMER).

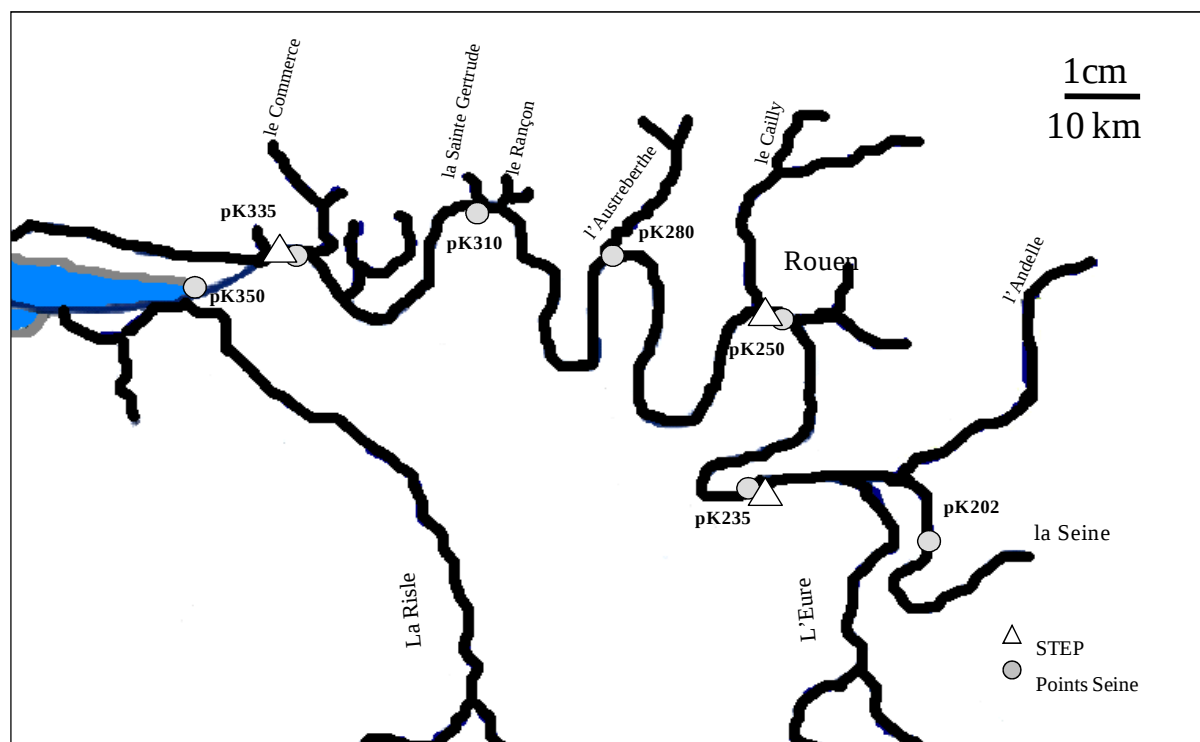


Figure 33 : Localisation des points d'échantillonnages dans le cadre du suivi de l'estuaire de Seine et des 9 principaux affluents (Seine aval).

1.2.2 Le continuum Garonne -Estuaire de la Gironde (France)

a) Généralités sur le système

Exutoire des vastes bassins de la Garonne et de la Dordogne, le système fluvio-estuarien de la Gironde est le plus vaste estuaire macrotidal européen avec ses 635 km² de superficie à marée haute et une influence s'exerçant à plus de 150 km de la mer (Figure 34). Il est formé de la confluence de la Dordogne et de la Garonne qui drainent un bassin versant de 71 000 km². L'embouchure se situe à une distance de 76 km du point de rencontre des deux rivières et de l'estuaire. Situé dans le Golfe de Gascogne, l'estuaire de la Gironde se caractérise par un fonctionnement hydrodynamique fortement influencé par la marée avec un marnage pouvant atteindre 5 m au niveau de l'embouchure. Le temps moyen de résidence des eaux varie entre 20 et 90 jours et les vitesses de courant, très variables, peuvent atteindre 3 m.s⁻¹. Les concentrations en matières en suspension (MES) responsables de la turbidité dépassent fréquemment 400 mg.l⁻¹ en surface ; 10 g.l⁻¹ est une valeur courante à proximité du fond. Ce système est caractérisé par une forte production biologique et une biodiversité considérée comme proche de l'état naturel qui se traduisent par le maintien de l'intégralité du cortège de poissons migrateurs fréquentant l'estuaire et une exploitation de la ressource biologique importante (pêcheries). Les principales caractéristiques et pressions du système sont résumées dans l'Annexe V.

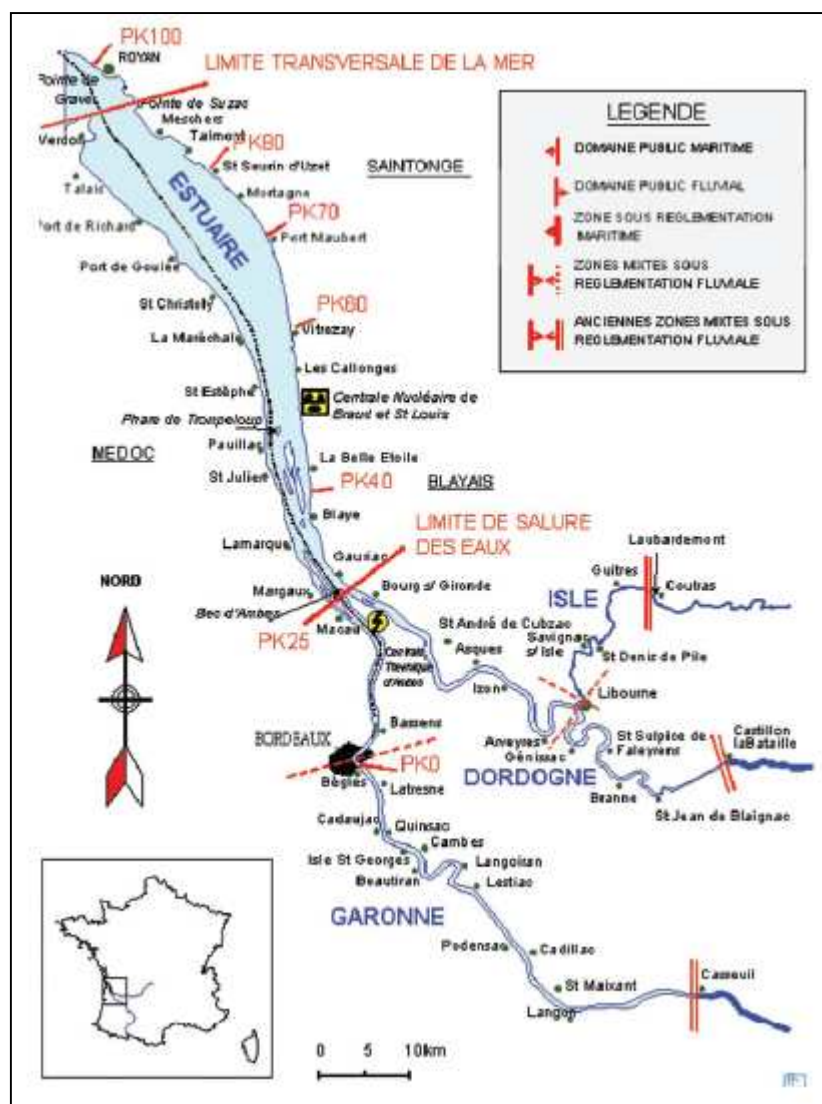


Figure 34 : Présentation de l'estuaire de la Gironde.

b) Campagnes d'échantillonnage

Une campagne d'échantillonnage s'est déroulée en novembre 2005 et a couvert l'ensemble du système depuis l'aval de Toulouse jusqu'à l'embouchure au Verdon. Afin de pouvoir effectuer des comparaisons ; les prélèvements des points sous influence de la marée ont été réalisés à marée basse. Les prélèvements d'eaux ont été effectués manuellement depuis les berges et les ponts (Figure 35).

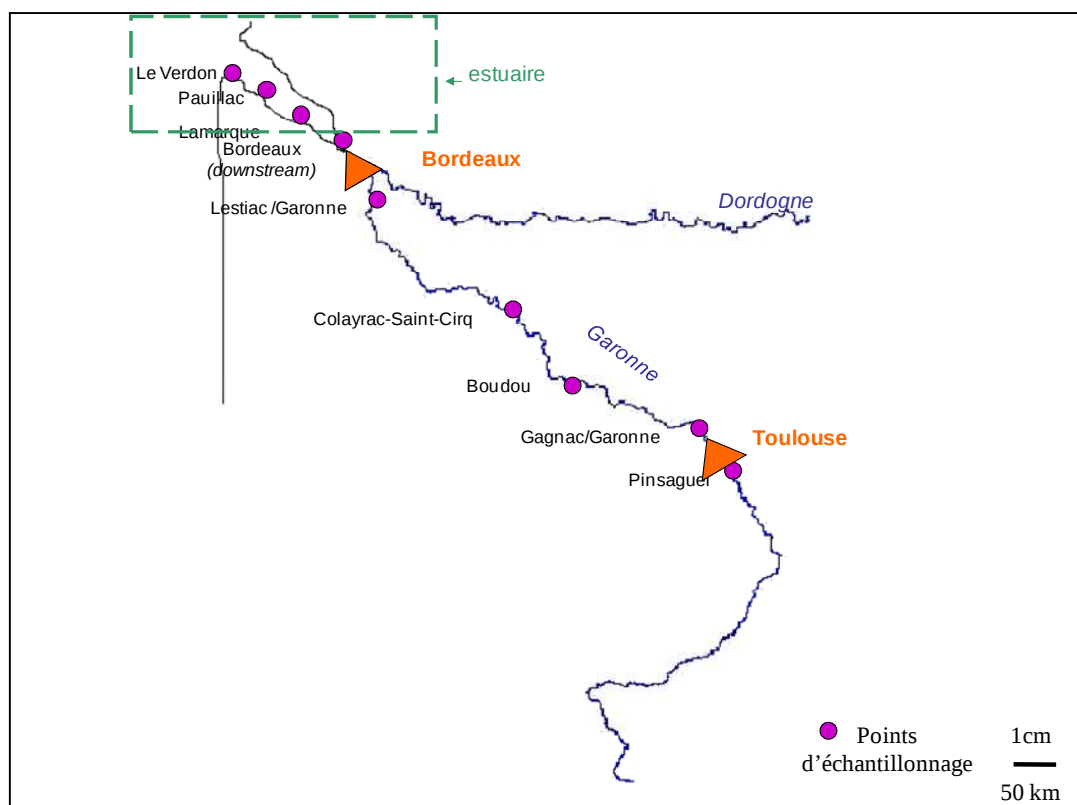


Figure 35 : Localisation des points d'échantillonnage suivis sur la Garonne.

I.2.3 Le continuum Adour-Estuaire de l'Adour (France)

a) Généralités sur le système

L'Adour, rivière d'une longueur de 309 km draine un bassin versant de près de 16 880 km² divisé en 4 sous bassins hydrographiques (Figure 36). Les caractéristiques remarquables du système sont présentées dans l'Annexe VI.

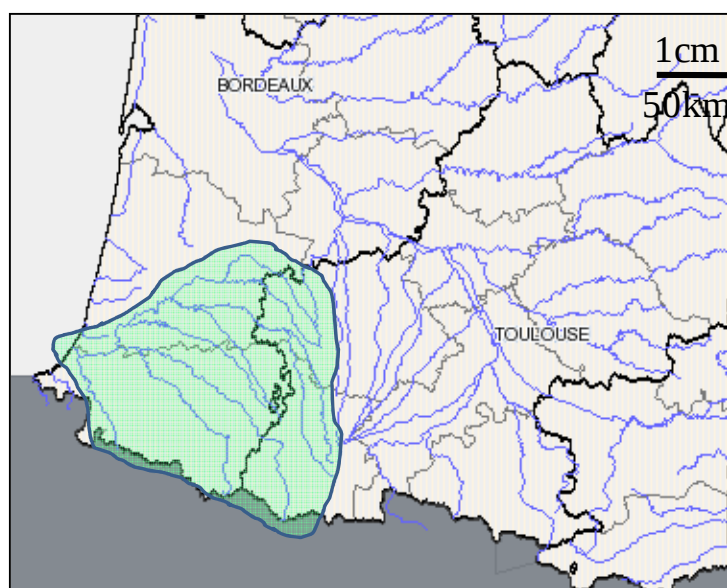


Figure 36 : Bassin hydrographique de l'Adour.

b) Campagnes d'échantillonnage

Une campagne d'échantillonnage s'est déroulée en novembre 2005 et a couvert l'ensemble du système depuis Saint-Mont jusqu'à l'embouchure à Bayonne. Afin de pouvoir effectuer des comparaisons les prélèvements des points sous influence de la marée ont été réalisés à marée basse. Les prélèvements d'eaux ont été effectués manuellement depuis les berges et les ponts (Figure 37).

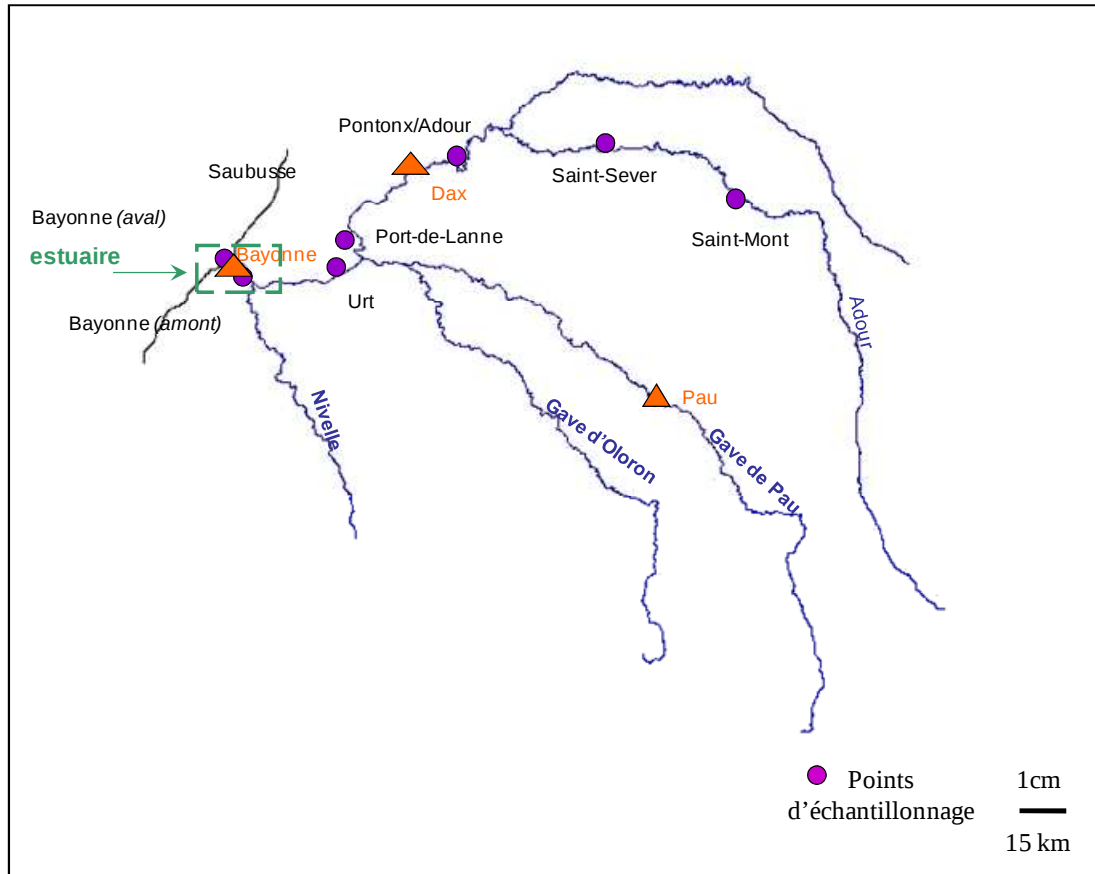


Figure 37 : Localisation des points d'échantillonnage suivis sur l'Adour.

I.2.4 L'Estuaire de la Vilaine

a) Généralités

La Vilaine est le fleuve le plus important du Nord-Ouest de la France (225 km de long). Son estuaire est l'exutoire naturel des eaux d'un vaste bassin versant essentiellement agricole (environ 10 400 km², soit le tiers de la surface de la Bretagne). La Baie de Vilaine est un écosystème abrité, les courants de marée y sont faibles et le temps de résidence des eaux supérieur à 50 jours (Figure 38).

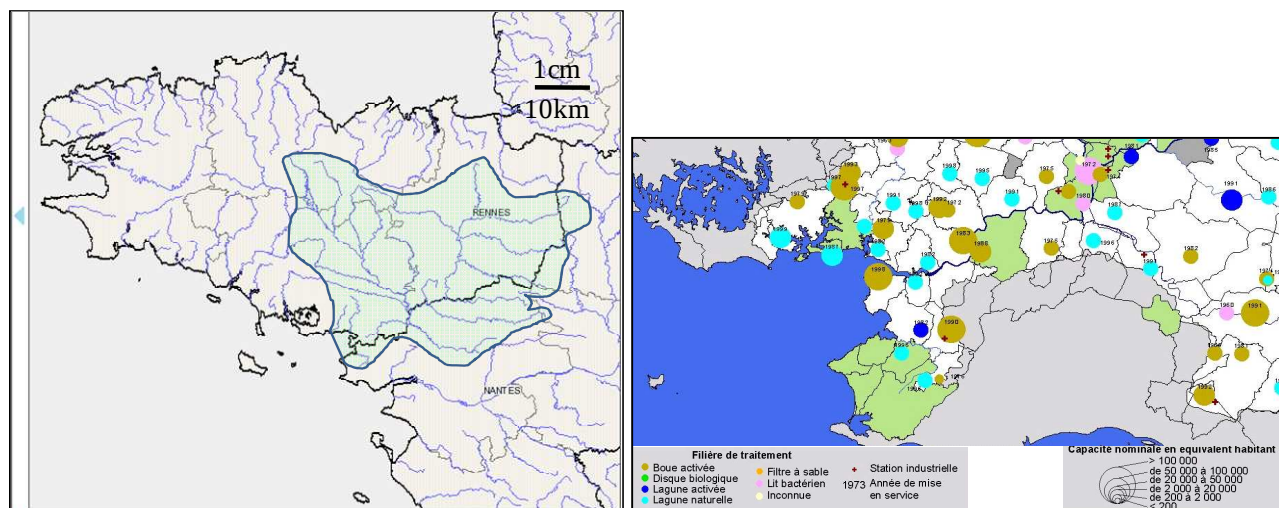


Figure 38 : Présentation du bassin versant de la Vilaine et des principales pressions anthropiques.

b) Campagnes d'échantillonnages

Des campagnes d'échantillonnages ont été réalisées en 3 points (Figure 39):

- le site du barrage d'Arzal, point d'entrée de l'estuaire de la Vilaine, a fait l'objet d'échantillonnages moyennés hebdomadaires asservis au débit durant la période du 18/04/06 au 24/07/06 (12 semaines).
- les sites du Halguen (47°30.05 N 2°29.63 W) et du Maresclé (47°27.83 N 2°29.75 W) situés dans la zone d'influence du panache de la Vilaine ont fait l'objet d'échantillonnages ponctuels bimensuels durant la période du 18/04/06 au 24/07/06.



Figure 39 : Localisation des points d'échantillonnage dans le cadre du suivi de l'estuaire de la Vilaine.

I.2.5 La baie d'Authie

a) Présentation générale

L'Authie est un petit fleuve côtier de 103 km qui draine un bassin versant de 1 305 km² à dominante agricole (80% des surfaces à usages agricoles). Son bassin versant présente une faible anthropisation : 75 000 habitants soit une densité de population de 57 habitants au km². Elle se jette en Manche (Figure 40).

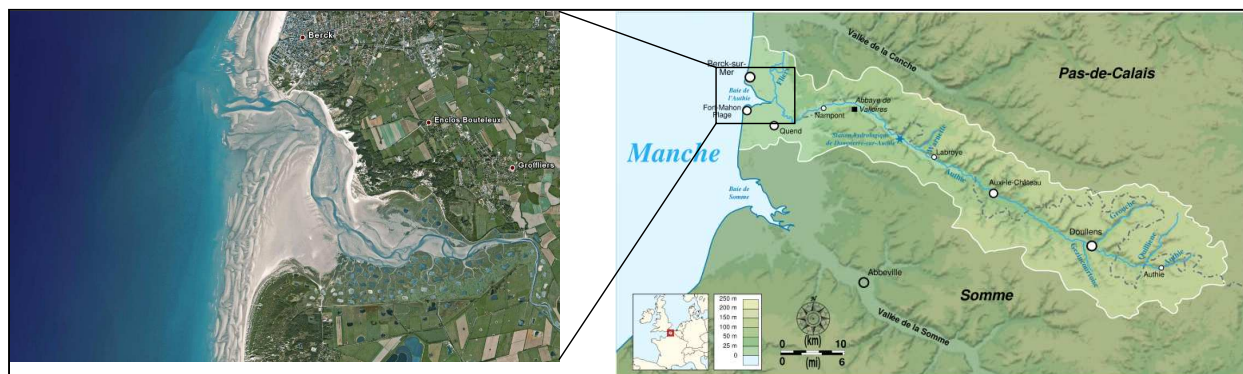


Figure 40 : Présentation de l'estuaire de l'Authie.

b) Campagnes d'échantillonnages

Des campagnes d'échantillonnages se sont déroulées dans la zone intertidale au niveau de la vasière nord (50-22.2170 N ; 1-36.4840 E) en février, mai, septembre et novembre 2004. Afin de pouvoir assurer la comparaison des données, les prélèvements d'eaux ont été réalisés, manuellement, à l'étal de basse mer.

I.2.6 La méditerranée orientale : la rade de Marseille et la calanque de Cortiou (France)

a) Généralités

Le littoral marseillais est fortement urbanisé et industrialisé, diverses sources de contaminations chimiques ont été identifiées et sont représentées dans la Figure 41. La rade de Marseille est concernée par les rejets de plusieurs réseaux d'assainissement : Marseille, Iles du Frioul, le Rove, Ensues la Rodonne, Sausset les Pins, Cassis (hors zone mais à proximité). Avec 17 000 hectares desservis concernant 16 communes et près d'un million d'habitants, le réseau d'assainissement de l'agglomération marseillaise est l'un des plus importants de France. Le réseau d'assainissement collecte les eaux usées des particuliers mais aussi celles des centres hospitaliers, laboratoires, établissements scolaires et autres établissements industriels.

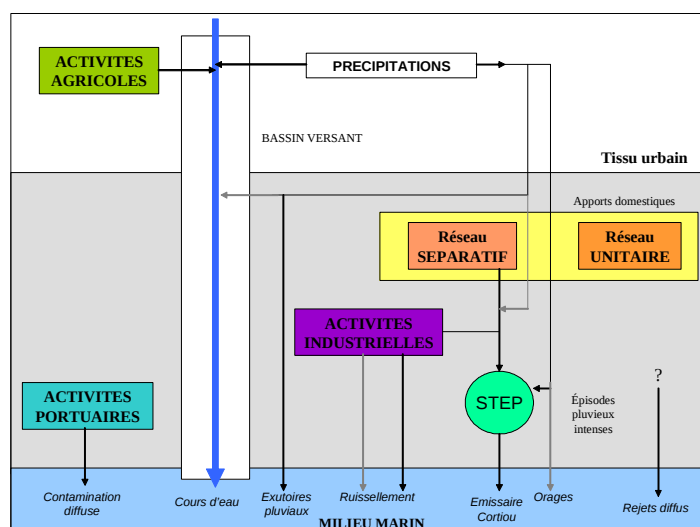


Figure 41 : Schéma de principe des différents apports en contaminants chimiques au milieu marin de l'agglomération marseillaise.

La station dispose d'un procédé de traitement physico-chimique d'une capacité de 1 600 000 équivalents-habitants. Cet ouvrage possède une filière de traitement qui permet de retenir les éléments grossiers et d'éliminer une grande partie des particules en suspension, répondant ainsi aux normes réglementaires en vigueur. Les eaux traitées sont rejetées vers l'Anse de Cortiou.

b) Campagnes d'échantillonnage

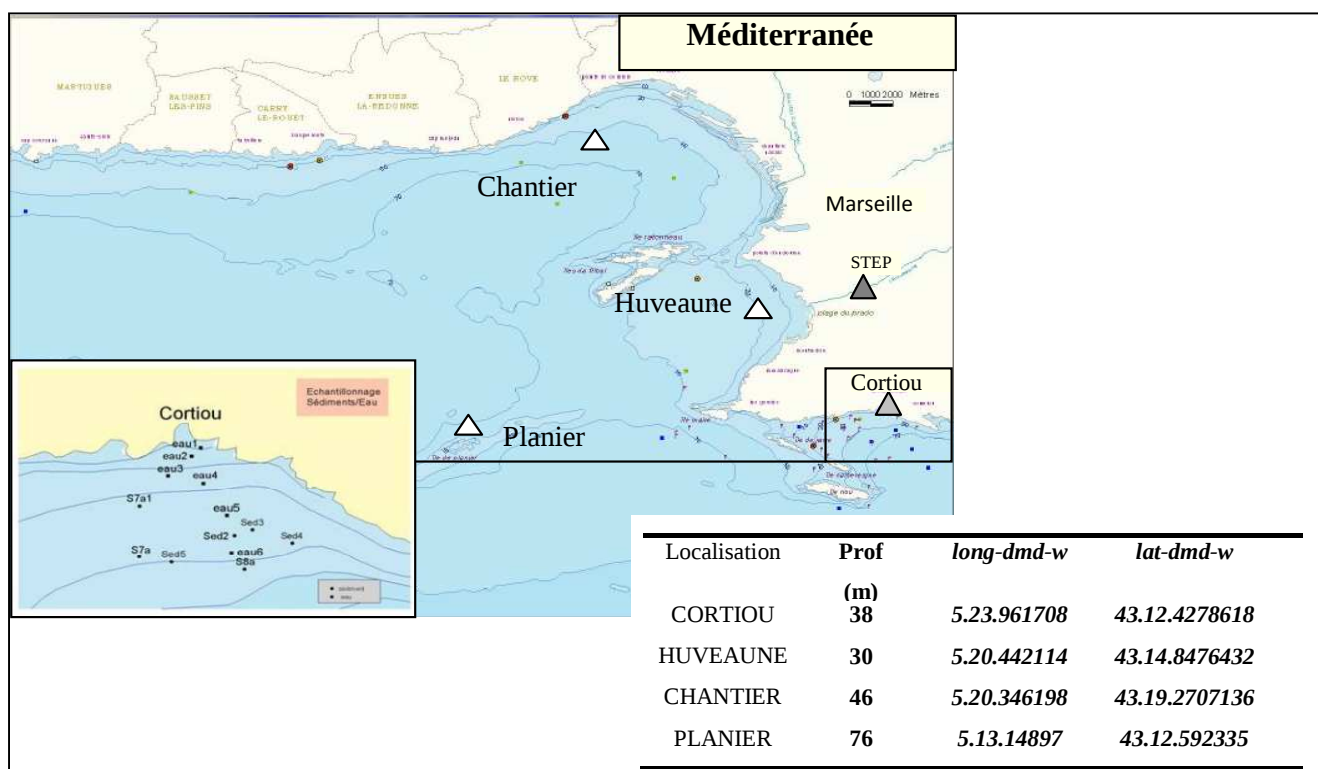


Figure 42 : Localisation des points d'échantillonnage suivis au niveau du littoral marseillais.

Deux campagnes de prélèvements embarquées (navire océanique côtier Europe, IFREMER) ont été réalisées. La première campagne s'est déroulée en novembre 2004. Son but était d'étudier l'influence locale du rejet de la station d'épuration de Marseille dans un milieu semi fermé : la calanque de Cortiou. Des prélèvements d'eaux ont été réalisés en sub-surface (profondeur 0.1m) dans le panache de dilution du rejet, parallèlement des prélèvements de sédiments de surface ont été réalisés à l'aide d'une benne Reineck. La seconde campagne s'est déroulée en novembre 2006 et visait d'une part à compléter les résultats et tendances obtenus lors de la première campagne dans la calanque de Cortiou et d'autre part à caractériser le profil de contamination de la rade marseillaise en 3 points : le Planier (site marin sans influences anthropiques directes), les sites d'Huveaune et du Chantier (sites sous impacts anthropiques directs). Des prélèvements d'eaux ont été réalisés en sub-surface (profondeur 0,1m) dans le panache de dilution du rejet ainsi qu'en chacun des points de la rade marseillaise, parallèlement des prélèvements de sédiments de surface ont été réalisés à l'aide d'une benne Reineck sur chacun des sites (Figure 42).

c) Campagnes d'échantillonnage biologique

✓ Espèce ciblée : Le merlu *Merluccius merluccius*



Figure 43 : Le merlu *Merluccius merluccius*.

Appelé merlan en Méditerranée, le merlu du golfe du Lion est présent sur l'ensemble du bassin méditerranéen (mais plus abondant dans l'ouest et en Adriatique) (Figure 43). Espèce démersale à très large répartition dans le golfe du Lion depuis le secteur côtier (30 m) jusqu'à 800 mètres, elle est très fréquente entre 80 et 150 mètres de profondeur et commune sur les bords du talus continental. Si pendant la vie larvaire, l'alimentation est constituée de crustacés copépodes planctoniques, à son arrivée sur le fond, le merlu mange des crustacés (euphausiacés et mysidacés) ainsi que des poissons benthiques (gobies). Les adultes se nourrissent surtout de poissons (plus de 90% des proies), jeunes merluccidés, chinchards, gobies, maquereaux, argentines, anchois, sardines, sprats, cépoles. Le merlu se nourrit beaucoup plus au printemps qu'en été et en automne. La croissance présente une très grande variabilité individuelle fortement liée à la durée de la période de reproduction qui peut s'étaler sur toute l'année. Le merlu se reproduit toute l'année mais surtout d'octobre à janvier, sur les fonds de 100 à 300 mètres. Dans le golfe du Lion, la première maturité sexuelle est atteinte vers 3-4 ans (IFREMER).

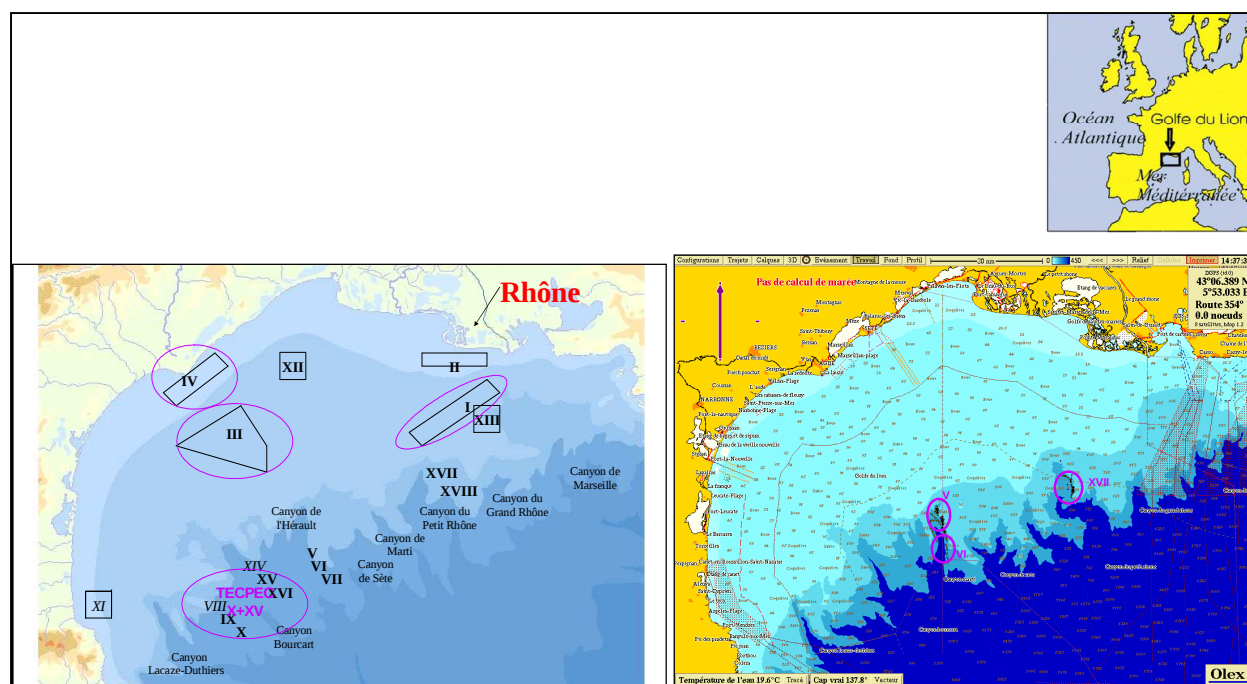


Figure 44 : Localisation des campagnes d'échantillonnages biologiques dans le Golf du Lion. (a) Campagne mai 2005, (b) Campagne octobre 2006.

La première campagne d'échantillonnages s'est déroulée en mai 2005 au niveau de 4 sites du Golf du Lion (Figure 44a) : site TECPEC, site I, site III et site IV, situés sur la marge continentale (profondeur de 30 à 100m). La deuxième campagne d'échantillonnage s'est déroulée en octobre 2006 au niveau de 3 sites du golfe du Lion : site V, site VI et site XVII (Figure 44b), situés dans la partie centrale du Golf du Lion (profondeur de 200 à 400 m).

I.3 Développement des nouveaux outils d'échantillonnage intégratifs

Le développement et la validation des outils d'échantillonneurs intégratifs Polar Organic Compound Integrative sampler POCIS reposent sur 2 étapes. La première étape consiste à déterminer expérimentalement les taux d'échantillonnages (Rs) pour chacune des molécules d'intérêt. La deuxième étape consiste en une validation des résultats expérimentaux par des déploiements *in situ* des POCIS.

I.3.1 Expérimentation en laboratoire

Deux expérimentations en laboratoire, complémentaires, ont été conduites. Leur principe est exposé ci-dessous.

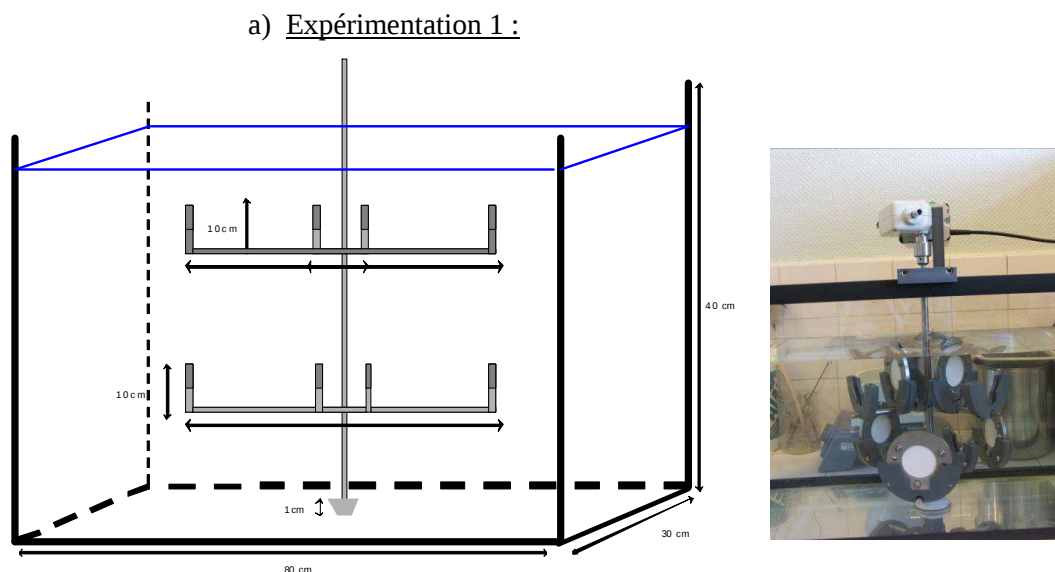


Figure 45: Schéma du dispositif d'expérimentation en aquarium.

Afin de réaliser des expérimentations en milieu dynamique un dispositif expérimental a été réalisé (Figure 45). Son intérêt est de permettre l'accès à des répliqués exposés dans des conditions identiques (l'exposition par béccher ne permet pas l'exposition simultanée de plusieurs POCIS dans une même unité expérimentale). Il permet également de tester les effets cinétiques (vitesse) sur les taux d'échantillonnage des POCIS, avec ses 2 niveaux d'exposition (intérieur/extérieur).

L'unité expérimentale est un aquarium en verre de dimension 80x40x30cm contenant 70 litres d'eau du robinet (dont le bruit de fond en molécules d'intérêt a été vérifié auparavant). Deux systèmes d'exposition ont été placés en son sein. Durant l'ensemble de l'expérimentation les systèmes sont placés dans une pièce thermostatée, à l'abri de la lumière naturelle. Pour prévenir les phénomènes de dégradation induits par la lumière artificielle qui peut être présente dans la pièce, les aquariums sont recouverts de carton. Durant l'ensemble de l'expérimentation la température et le pH sont suivis quotidiennement. Pour déterminer les Rs le plan expérimental présenté dans la Figure 46 a été mis en œuvre.

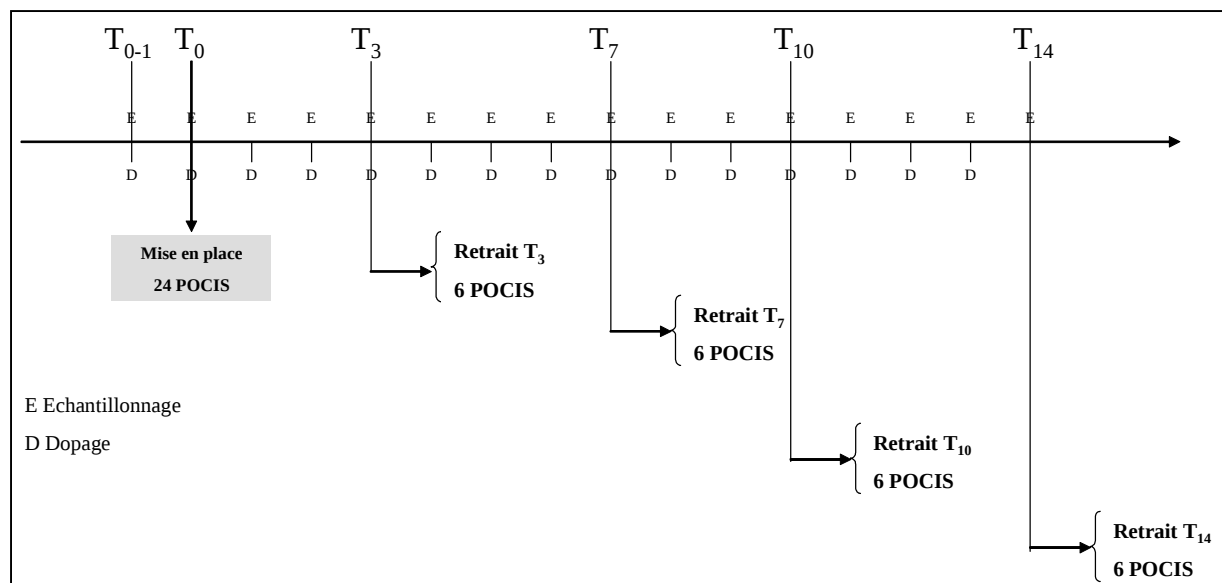


Figure 46 : Plan expérimental de l'expérience cinétique.

b) Expérimentation 2:

Afin de compléter les résultats de l'expérience sur les APEO et le BPA, une seconde expérience en béccher a été réalisée. Les POCIS ont été exposées, individuellement dans des bécchers de 2 litres, à un milieu supplémenté en analytes d'intérêt, agité par agitation magnétique avec un renouvellement du milieu quotidien (changements d'eaux, concentration nominale de $1 \mu\text{g.l}^{-1}$). Le plan d'expérimentation est présenté dans la Figure 47.

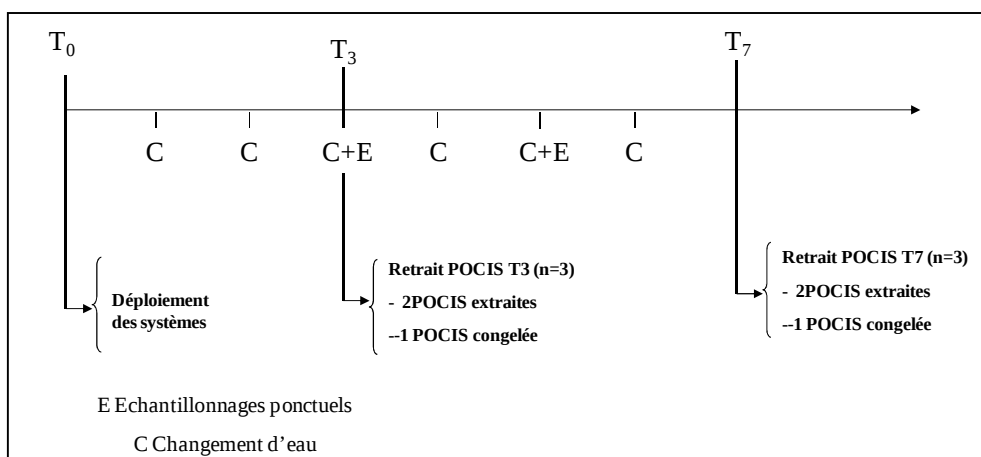


Figure 47 : Plan expérimental de l'expérience cinétique 2.

1.3.2 Expérimentations sur le terrain

Afin de valider les outils, plusieurs sites ont fait l'objet de déploiements et d'investigation, plus ou moins poussée. Un site d'étude principal, la Jalle d'Eysines, et des sites d'études secondaires sont présentés ci-dessous.

a) La Jalle d'Eysines

De par sa proximité du laboratoire et sa faible complexité, le site d'étude de la Jalle d'Eysines a été choisi comme site principal de validation *in situ* des outils d'échantillonnages. Une approche combinant des échantillonnages intégratifs et des échantillonnages ponctuels a été mise en œuvre selon le protocole exposé dans la Figure 48. Trois points d'études ont été sélectionnés au niveau de la Jalle : un point Amont et un point Aval par rapport au rejet de la station d'épuration de Cantinolles et le rejet de la station d'épuration (Figure 49).

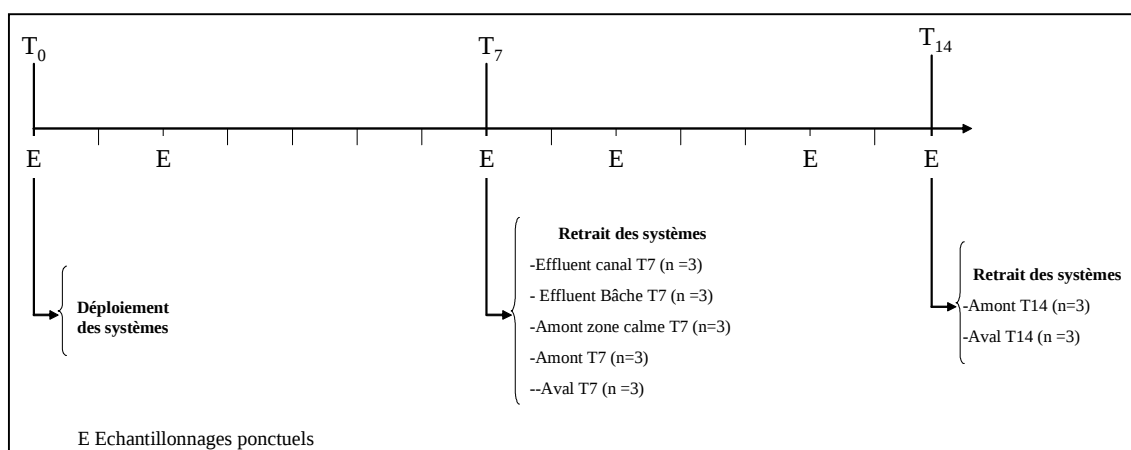


Figure 48 : Plan d'échantillonnage de la manipulation de validation *in situ* des POCIS au niveau du site de la Jalle d'Eysines.

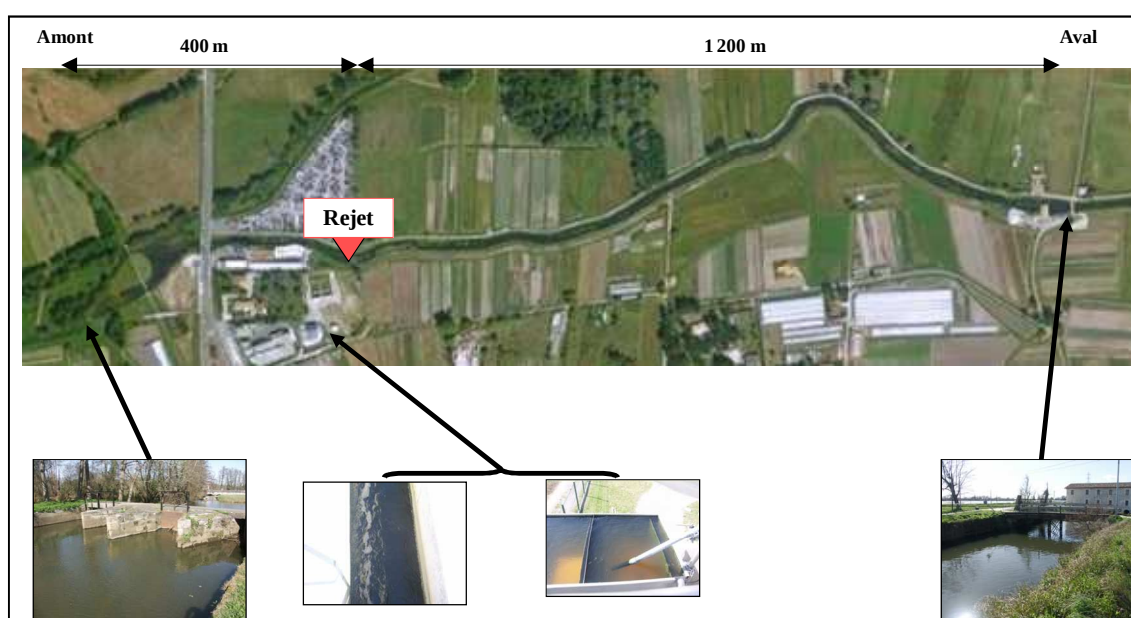


Figure 49 : Localisation des points de suivi au niveau du site de la Jalle d'Eysines.

b) L'Alsace : le système de la rivière Lauch

La rivière Lauch est une petite rivière alsacienne qui appartient au bassin collecteur du Rhin, d'une longueur de 50 km et dont le bassin versant, à dominante agricole (forte activité viticole), a une superficie de 390 km². Une campagne de déploiement s'est déroulée de mai à juin 2006 sur 4 sites : un piézomètre d'eaux souterraines servant à satisfaire une offre d'eau potable (ESO7), la rivière Lauch en amont de l'usine de traitement des eaux résiduaires (ESU 3), la rivière Lauch en aval de l'usine de traitement des eaux résiduaires (ESU 4), l'effluent de la station d'épuration de Merxheim (RESO7) (Figure 50, Figure 51).

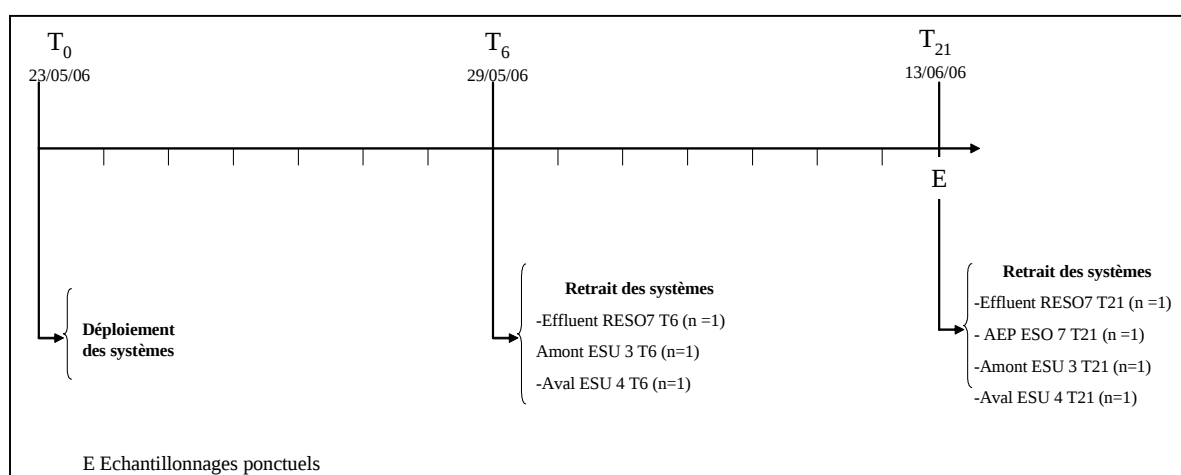


Figure 50 : Plan d'échantillonnage conduit lors du déploiement au niveau du système de la Lauch.



Figure 51 : Localisation des points d'échantillonnages au niveau du système de la Lauch (SWIFT).

II Les méthodologies analytiques mises en œuvre

II.1 Remarques générales

Toute la verrerie utilisée au cours de l'analyse est préalablement lavée à l'eau et au détergent puis chauffée à 450°C pendant 6 heures afin d'éliminer toute trace organique. Pour éviter les contaminations croisées, il existe différents jeux de verrerie dédiés selon le niveau de contamination des matrices (matrices naturelles, matrices de station d'épuration). Afin d'assurer la validité des analyses effectuées, les solvants et réactifs sont de haute qualité et testés pour leur bruit de fond en composés d'intérêt, notamment en ce qui concerne le nonylphénol et le bisphénol A :

- l'acétone et l'acétate éthylique (Multisolvent, HPLC grade, Sharlau),
- l'acétonitrile (Ultra Gradient HLPC grade, JT Baker),
- le méthanol (Gradient grade for Liquid Chromatography, Merck),
- l'acide chlorhydrique (37-38 %, Baker analyzed, JT Baker),
- l'eau ultrapure (JT Baker),
- l'hydroxyde d'ammonium (ACS Reagent, Sigma aldrich),
- l'eau d'Evian® en bouteille de verre.

II.2 Dosage des alkylphénol-polyéthoxylés

Les alkylphénol-polyéthoxylés (APEO) et le bisphénol A (BPA) dosés dans cette étude sont représentés dans le Tableau 38. La méthodologie mise en œuvre au cours de cette étude est résumée dans la Figure 52 .

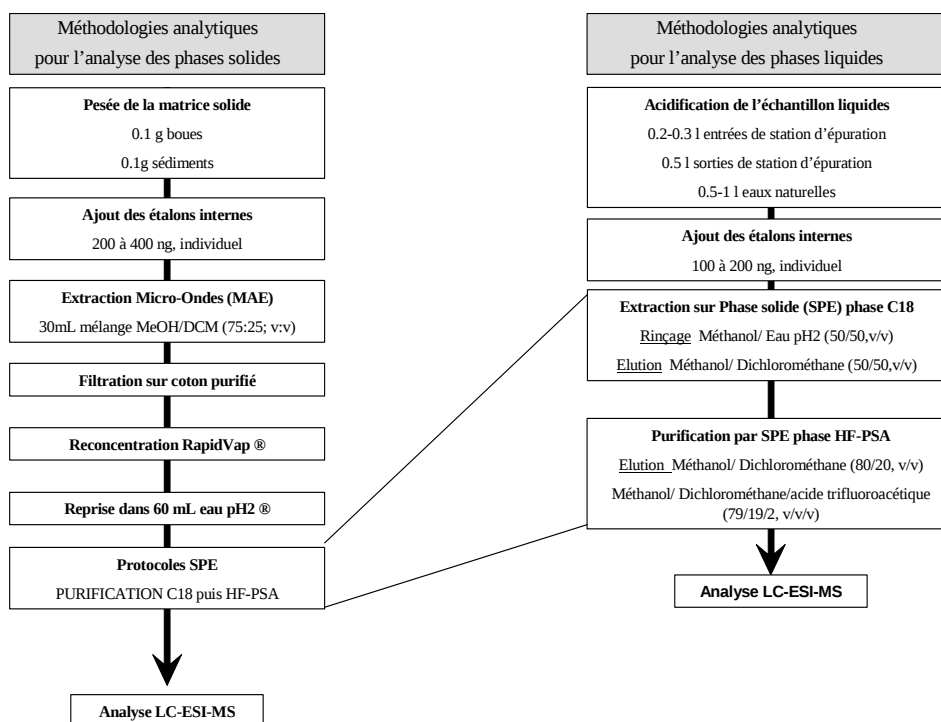
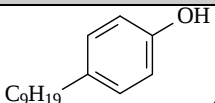
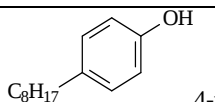
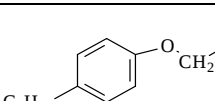
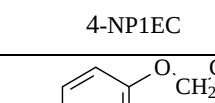
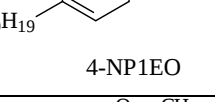
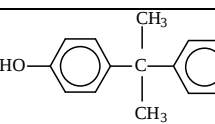


Figure 52 : Méthodologies pour l'analyse des APEO et BPA dans les matrices environnementales.

Tableau 38 : Récapitulatif des agents industriels suivis dans cette étude.

Nom de la molécule	Abréviations	CAS	Pureté	Nature du produit
4-nonylphénol technique	 4-NP	84852-15-3		Liquide visqueux
4-tert-octylphénol	 4-t-OP	140-66-9	99.1%	Solide
Acide nonylphénoxyacétique	 4-NP1EC	3115-49-9 *	> 98%	Liquide visqueux
Nonylphénol monoéthoxylé	 4-NP1EO	26027-38-3	99%	Liquide visqueux
Nonylphénol diéthoxylé	 4-NP2EO	26027-38-2	99%	Liquide visqueux
p-n-nonylphénol	p-n-NP	104-40-5*	>98 %	Solution dans le nonane (100µg.ml ⁻¹)
p-n-Nonylphénol monoéthoxylé	p-n-NP1EO	104-35-8*	>95 %	Solution dans le nonane (100µg.ml ⁻¹)
Bisphénol A	 BPA	80-05-7		Solide
Bisphénol A-d16	BPA-d16			Solide

II.2.1 Préparation des échantillons

a) Préparation des échantillons d'eaux

Afin de subir le protocole d'extraction, les différentes phases doivent être séparées. Les eaux, conservées dans des bouteilles en verre ambré (préalablement chauffées à 450°C pendant 6 heures) à 4°C, sont filtrées par passage au travers d'un filtre en fibre de verre GF/F Whatman (préalablement chauffé à 450°C, pendant 6 heures) de diamètre de pores 0,7 µm (VWR, Strasbourg, France). Lorsque la matrice aqueuse présente une charge particulaire importante (entrée de station d'épuration) une étape de pré-filtration est réalisée par passage sur un filtre en fibre de verre GF/A Whatman (préalablement chauffés à 450°C, pendant 6 heures) de diamètre de pores 1,2 µm (VWR, Strasbourg, France). Cette étape permet un dosage indépendant des APEO dissous et particulaires.

b) Préparation des échantillons de boues

Les échantillons de boues solides (volume total supérieur à 500 ml) sont homogénéisés à l'aide de spatules, un sous échantillon d'environ 50 g est prélevé et congelé (-20°C) dans une barquette en aluminium jusqu'à l'étape de lyophilisation.

Les échantillons de boues liquides sont homogénéisés par agitation manuelle et répartis dans des falcons de 50 ml pour subir une étape de centrifugation (2 étapes de 10 min, 3000 g). Le surnageant est ôté à l'aide d'une pipette pasteur, les culots sont récupérés à l'aide d'une spatule, rassemblés dans une barquette en aluminium et stockés à -20°C jusqu'à l'étape de lyophilisation.

c) Lyophilisation

Les phases solides : matières en suspension, sédiments, boues, tissus biologiques subissent une première étape de lyophilisation qui conduit à leur déshydratation par sublimation (Lyophilisateur RP2V, CIRP, Argenteuil, France). Les sédiments sont ensuite tamisés à 2 mm puis homogénéisés. Après lyophilisation, les matrices sont pesées afin d'obtenir leur masse sèche puis stockées à l'abri de la lumière et de l'humidité (afin d'éviter une reprise en eau) jusqu'à l'analyse.

II.2.2 Protocole d'extraction des matrices liquides

a) Extraction (Publication n°2)

Les matrices liquides, stockées en chambre froide 4°C (24-48 heures), sont mises à température et acidifiées à pH 2 ($1,9 < \text{pH} < 2,0$) à l'aide d'une solution diluée d'acide chlorhydrique (solution 3,5 mM). Le volume d'échantillon est mesuré à l'aide d'une éprouvette : 0,2 à 0,3 litre pour les eaux d'entrées de stations d'épuration, 0,5 litre pour les eaux de sorties de station d'épuration, 0,5 à 1 litre pour les eaux naturelles. Entre 50 et 200 µl de la solution contenant les étalons internes (solution mélange à 1-2 µg.g⁻¹ pour chaque composé, méthanol) sont pesés dans des flacons en verre et ajoutés aux échantillons.

Les cartouches octadécyle (BondElut[®] C₁₈, 200 mg, 3 cc, Varian) sont conditionnées avec du méthanol (5 ml) puis de l'eau pH2 (5 ml). Les échantillons sont déposés sur la cartouche à un débit de 100 ml.10min⁻¹. La cartouche est alors rincée par de l'eau (3 ml) puis par un mélange méthanol/eau pH 2 (50/50 ; v/v ; 3 ml). Les cartouches sont ensuite séchées sous vide (10 mm Hg) pendant 60 minutes. Enfin, les composés sont élués par un mélange méthanol/dichlorométhane (50/50 ; v/v ; 5 ml).

b) Purification (Publication n°3)

Les extraits précédemment obtenus sont reconcentrés sous flux d'azote jusqu'à un volume final de 100 µl. Des cartouches SPE de type HF-PSA (BondElut[®], 500 mg, 3 cc, Varian) sont conditionnées par du méthanol (3 ml) puis par un mélange méthanol/dichlorométhane (80/20 ; v/v ; 3 ml). Les extraits sont déposés sur les cartouches dans 2 ml mélange méthanol/dichlorométhane (80/20 ; v/v) et les flacons sont rincés avec 2 fois 500 µl du mélange. Les cartouches sont ensuite rincées par

6 ml du mélange méthanol/dichlorométhane (80/20 ; v/v) puis par 6 ml mélange méthanol/dichlorométhane/acide trifluoroacétique (79/19/2 ; v/v/v). Les extraits obtenus sont reconcentrés sous flux d'azote jusqu'à un volume final compris entre 100-200 μ l.

II.2.3 Protocole d'extraction des matrices solides

a) Extraction (Publication n°3)

Les APEO et les métabolites contenus dans les matrices solides sont extraits par application d'un champ micro-ondes en présence du mélange méthanol/dichlorométhane (75/25 ; v/v ; 30 ml). Une rotation des molécules de solvants va alors se produire afin de s'aligner suivant le champ micro-ondes provoquant une agitation et un chauffage de l'extrait. L'extracteur micro-ondes (Prolabo, Fontenay sous bois, France) est programmé pour produire un champ d'une intensité de 30 W pendant 10 min. Les APEO sont alors transférés de la matrice vers l'extrait organique. Les extraits sont alors filtrés sur coton de verre (préalablement lavé par 3 rinçages successifs au dichlorométhane). Les extraits filtrés sont ensuite reconcentrés à l'aide d'un reconcentrateur automatique, sous vide par chauffage (Rapidvap, 80°C, 15 min) (Bioblock, Fontenay-sous-Bois, France).

b) Purification (Publication n°3)

Les extraits précédemment obtenus sont repris dans 60 ml d'eau pH 2 et vont subir les mêmes étapes de préparation/extraction que les échantillons aqueux : une première étape de purification sur cartouche C₁₈ puis une seconde étape de purification sur cartouche HF-PSA. Les extraits finaux obtenus sont alors conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse chromatographique.

II.2.4 Protocole d'extraction des biles

L'analyse des métabolites d'APEO dans les matrices biologiques de type bile nécessite une étape de déconjugaison enzymatique. 1 ml de tampon acétate (acétate de sodium trihydrate 99%) et d'acide acétique (100% Normapur) à pH 5 est ajouté à 100 μ l de bile. 20 μ l d'un mélange composé de β -glucuronidase et d'aryl-sulfatase (100000 et 7500 unités.ml⁻¹ respectivement, extraits de l'organisme *Haelix pomatia*, Sigma Aldrich) sont également ajoutés. Le mélange est ensuite placé dans un incubateur à une température de 40°C pendant 2 heures. Après incubation, l'extrait est acidifié à pH 2 afin subir le protocole d'extraction (C₁₈)/purification (HF-PSA) précédemment exposé.

II.2.5 Quantification des APEO et de leurs métabolites : Analyse par CL-SM (Publication n°2)

La caractérisation et la quantification des APEO et de leurs métabolites s'effectuent par chromatographie en phase liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse CL-SM. Les caractéristiques de cette technique sont présentées en Annexe VII. L'analyse des APEO s'effectue en 2 temps. En effet, la caractérisation d'un échantillon nécessite deux injections : une en mode

d'ionisation négatif et l'autre en mode d'ionisation positif. Les conditions de séparation et les paramètres de détection de ces analyses sont présentés en Annexe VII. La Figure 53 présente les chromatogrammes obtenus dans chacun des modes d'ionisation.

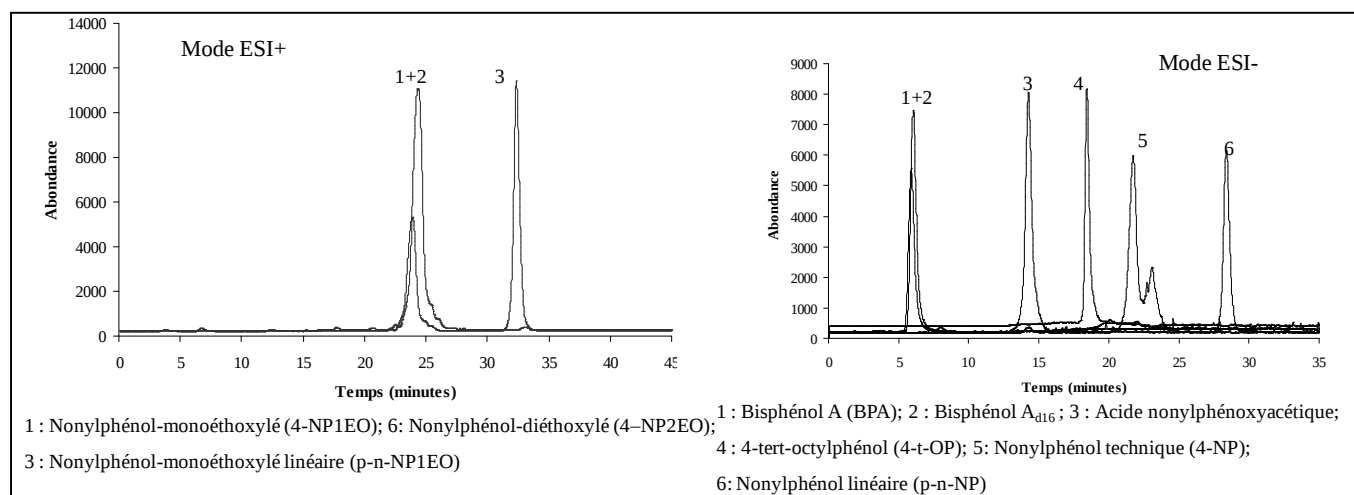


Figure 53 : Chromatogrammes des APEO et BPA en CL-ESI-SM.

II.2.6 Méthode de quantification des APEO et de leurs métabolites

La méthode de quantification retenue ici est celle de l'étalonnage interne. Elle procède par comparaison de l'aire du pic du composé étudié avec celle du pic de l'étalon interne rajouté au début de la manipulation en quantité connue. Les composés choisis doivent répondre à plusieurs conditions pour être utilisés comme étalons internes. Ils doivent présenter des propriétés physico-chimiques proches des composés à doser afin de compenser au mieux les pertes absolues intervenant lors des différentes étapes de traitement des échantillons. De plus, ces composés doivent être chimiquement stables, avoir sensiblement les mêmes temps de rétention que les composés à doser et ne pas être présents naturellement dans les échantillons à analyser. Le composé à doser et l'étalon interne servant à le quantifier ne répondant pas de la même façon lors de la détection par spectrométrie de masse, il est nécessaire de déterminer un coefficient de réponse (coefficient correctif) entre ces deux composés. Cette détermination est réalisée par l'injection, avant et après chaque série d'analyse d'environ 10 échantillons, d'un mélange constitué d'une solution de composés non deutérés en concentrations connues et de la solution d'étalons internes utilisée (de concentrations connues).

II.3 Dosage des substances pharmaceutiques

Vingt et une substances pharmaceutiques appartenant à 6 classes thérapeutiques ont été retenues pour leurs usages en France (usages avec ou sans prescriptions), leurs représentativités en terme de modes d'actions, de persistance et de potentiels toxiques pour l'environnement. Leur liste et leur structure sont présentées dans le Tableau 39 et la Figure 54.

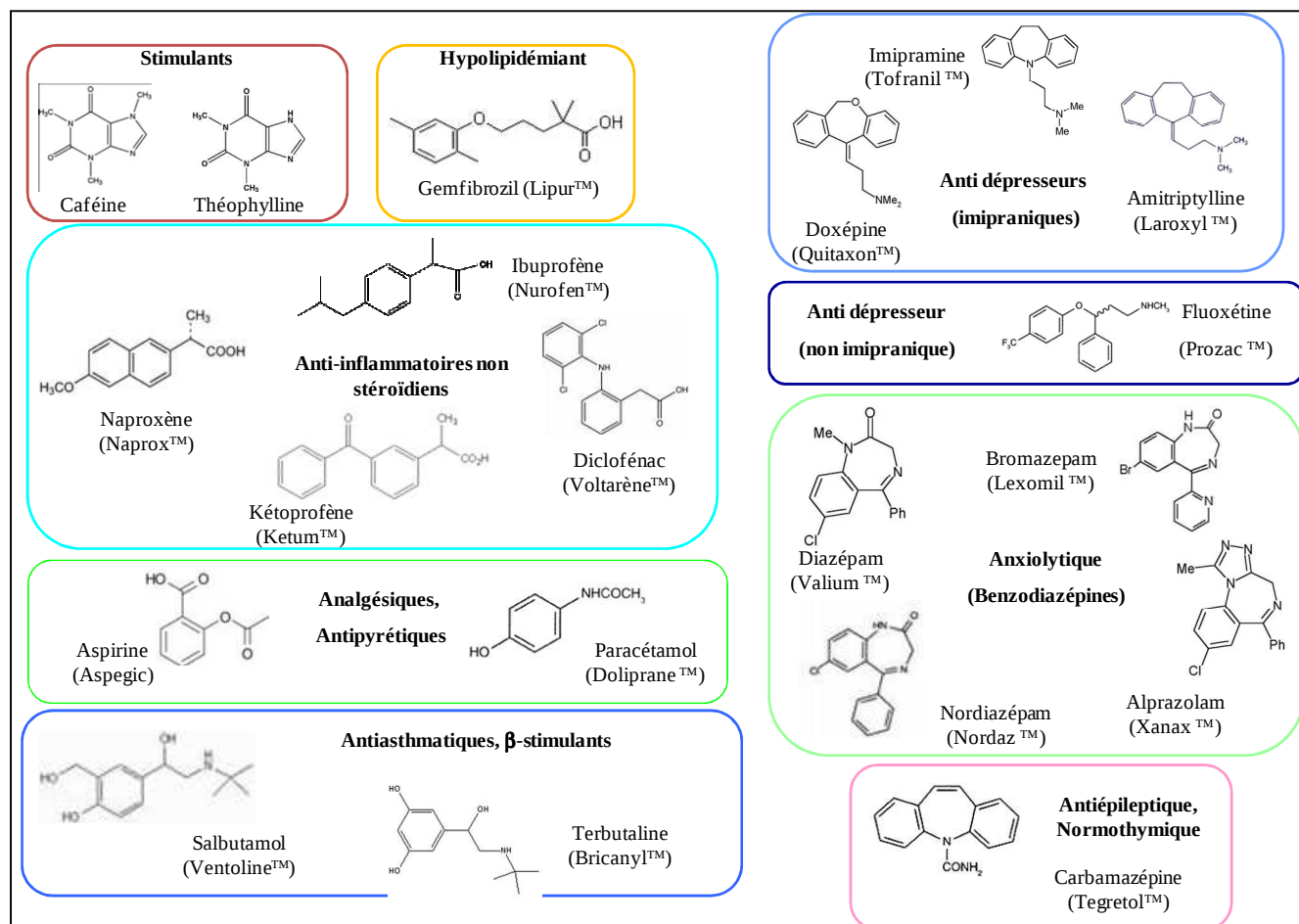


Figure 54 : Structure des molécules pharmaceutiques sélectionnées dans cette étude.

Tableau 39 : Substances pharmaceutiques sélectionnées dans cette étude.

Classe thérapeutique		Nom de la molécule	Abréviations	CAS	Pureté	Nature du produit
Stimulants		Caféine	Caf	58-08-2	-	Solide
		Théophylline	Théo	58-55-9	≥ 99%	Solide
Bronchodilatateurs	β-stimulants	Salbutamol	Salbu	18559-94-9	-	Solide
	β-stimulants	Clenbutérol	Clenbu	21898-19-1	≥ 95%	Solide
	β-stimulants	Terbutaline	Terbu	23031-32-5	-	Solide
Anti-inflammatoires Non Stéroïdien		Ibuprofène	Ibu	15687-27-1	-	Solide
		Naproxène	Naprox	22204-53-1	-	Solide
		Kétoprofène	Kéto	22071-15-4	-	Solide
		Diclofénac	Diclo	15307-79-6	-	Solide
Analgésiques		Aspirine	Asp	50-78-2	≥ 99,5%	Solide
		Paracétamol	Para	103-90-2	-	Solide
Hypolipémifiants		Gemfibrozil	Gemf	25812-30-0	-	Solide
Antidépresseurs/ Anxiolytiques	Normothymique	Carbamazépine	Cbz	298-46-4	-	Solide
	Antidépresseurs imipraminiques	Imipramine	Imi	113-52-1	-	Solide
		Amitriptyline	Ami	549-18-8	-	Solide
		Doxépine	Dox	1229-29-4	-	Solide
	Antidépresseurs	Fluoxétine	Fluox	59333-67-4	-	Solide
	Anxiolytiques (Benzodiazépines)	Diazépam	Dzp	439-14-5	-	Solide
		Nordiazépam	Ndzp	1088-11-5	-	Solide
		Alprazolam	Alpra	28981-97-7	-	Solide
		Bromazépam	Broma	1812-30-2	-	Solide
Etalons internes		Diazépam- _{d5}	Dzp-d5	65854-76-5	99,0%	Solution dans le méthanol (100µg.ml ⁻¹)
		Nordiazépam- _{d5}	Ndzp-d5	65891-80-7	99%	Solution dans le méthanol (100µg.ml ⁻¹)
		Amytriptyline- _{d6}	Ami-d6	549-18-8	98,0%	Solution dans le méthanol (100µg.ml ⁻¹)
		Paracétamol- _{d4}	Para-d4		98,0%	Solution dans le méthanol (100µg.ml ⁻¹)
		Caféine- _{c13}	Caf-C13		99%	Solution dans le méthanol (100µg.ml ⁻¹)
		Imipramine- _{d4}	Imi-d4	113-52-0	≥98%	Solution dans le méthanol (100µg.ml ⁻¹)
		Salbutamol- _{d3}	Salbu-d3		99,0%	Solution dans le méthanol (100µg.ml ⁻¹)
		Gemfibrozil- _{d6}	Gemf-d6			Solide
		Ibuprofène- _{d3}	Ibu-d3	121662-14-4	99,0%	Solide

II.3.1 Préparation des échantillons

a) Préparation des échantillons d'eaux

Afin de subir le protocole d'extraction, les différentes phases doivent être séparées. Les eaux, conservées dans des bouteilles en verre ambré (préalablement chauffées à 450°C pendant 6 heures) à 4°C, sont filtrées par passage au travers d'un filtre en fibre de verre GF/F Whatman (préalablement chauffé à 450°C, pendant 6 heures) de diamètre de pores 0,7 µm (VWR, Strasbourg, France). Lorsque la matrice aqueuse présente une charge particulaire importante (entrée de station d'épuration) une étape de pré-filtration est réalisée par passage sur un filtre en fibre de verre GF/A Whatman (préalablement chauffés à 450°C, pendant 6 heures) de diamètre de pores 1,2 µm (VWR, Strasbourg, France). Cette étape permet un dosage indépendant des substances pharmaceutiques dissoutes et particulaires.

b) Préparation des échantillons de boues

Les échantillons de boues solides (volume total supérieur à 500 ml) sont homogénéisés à l'aide de spatules, un sous échantillon d'environ 50 g est prélevé et congelé (-20°C) dans une barquette en aluminium jusqu'à l'étape de lyophilisation.

Les échantillons de boues liquides sont homogénéisés par agitation manuelle et répartis dans des falcons de 50 ml pour subir une étape de centrifugation (2 séries de 10 min, 3000 g). Le surnageant est ôté à l'aide d'une pipette pasteur, les culots sont récupérés à l'aide d'une spatule, rassemblés dans une barquette en aluminium et stockés à -20°C jusqu'à l'étape de lyophilisation.

c) Lyophilisation

Les phases solides : matières en suspension, sédiments, boues, tissus biologiques subissent une première étape de lyophilisation qui conduit à leur déshydratation par sublimation (Lyophilisateur RP2V, CIRP, Argenteuil, France). Les sédiments sont ensuite tamisés à 2 mm puis homogénéisés. Après lyophilisation, les matrices sont pesées afin d'obtenir leur masse sèche puis stockées à l'abri de la lumière et de l'humidité (afin d'éviter une reprise en eau) jusqu'à l'analyse.

II.3.2 Protocole d'extraction des matrices liquides

a) Protocole d'extraction pour l'analyse CPG-SM (Togola et Budzinski, 2008)

Les matrices liquides, stockées en chambre froide 4°C, sont mises à température et acidifiées à pH 2 ($2,0 < \text{pH} < 2,1$) à l'aide d'une solution diluée d'acide chlorhydrique (solution 3,5 mM). Le volume d'échantillon est mesuré à l'aide d'une éprouvette : 0,5 litre pour les eaux d'entrées de stations d'épuration, 0,5 litre pour les eaux de sorties de stations d'épuration, 0,5-1 litre pour les eaux naturelles. Entre 50 et 200 µl de la solution contenant les étalons internes (solution à 1-2 µg.g⁻¹ pour chaque composé, méthanol) sont pesés dans des flacons en verre et ajoutés aux échantillons.

Les cartouches MCX (mode mixte échangeurs de cation-phase inverse) (OASIS[®] MCX, 60 mg, 3 cc, Waters) sont rincées et conditionnées avec de l'acétate d'éthyle (3 ml) puis de l'eau pH 2 (3

ml). Les échantillons sont déposés sur la cartouche à un débit de $100 \text{ ml} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$. La cartouche est ensuite rincée par de l'eau pH 2 (3 ml). Les cartouches sont alors séchées sous vide (10 mm Hg), pendant 60 minutes. Enfin, les composés sont élués successivement par 3 ml d'acétate d'éthyle puis 3 ml de mélange acétate d'éthyle/acétone (50/50 ; v/v) et enfin 3 ml de mélange acétate d'éthyle/acétone/hydroxyde d'ammonium (49/49/2 ; v/v/v).

b) Protocole d'extraction pour l'analyse CL-SM-SM

Les cartouches MCX (mode mixte échangeurs de cation-phase inverse) (OASIS[®] MCX, 60 mg, 3 cc) sont conditionnées avec de l'acétate d'éthyle (3 ml) puis de l'eau pH2 (3 ml). Les échantillons, 100 ml d'échantillon quelque soit la matrice sont déposés sur la cartouche à un débit de $100 \text{ ml} \cdot 10 \text{ min}^{-1}$. La cartouche est ensuite rincée par de l'eau pH 2 (3 ml). Les cartouches sont alors séchées sous vide (10 mm Hg) pendant 60 minutes. Les composés sont ensuite élués successivement par 3 ml d'acétate d'éthyle puis 3 ml de mélange acétate d'éthyle/acétone (50/50 ; v/v) et enfin 3 ml de mélange méthanol/dichlorométhane/hydroxyde d'ammonium (47,5/47,5/5 ; v/v/v).

II.3.3 Protocole d'extraction des matrices solides

a) Extraction (Togola et Budzinski, soumis)

Les substances pharmaceutiques contenues dans les matrices solides sont extraites par application d'un champ micro-ondes en présence du mélange acétonitrile/eau pH2 (70/30 ; v/v ; 30 ml). Une rotation des molécules de solvants va alors se produire afin de s'aligner suivant le champ micro-ondes provoquant une agitation et un chauffage de l'extrait. L'extracteur micro-ondes (Prolabo, Fontenay sous bois, France) est programmé pour produire un champ d'une intensité de 30 W pendant 10 min. Les substances pharmaceutiques sont alors transférées de la matrice vers l'extrait organique. Les extraits sont alors filtrés sur coton de verre (préalablement lavé par 3 rinçages successifs au dichlorométhane). Les extraits filtrés sont ensuite reconcentrés à l'aide d'un reconcentrateur automatique, sous vide par chauffage (Rapidvap[®], 80°C, 20 min) (Bioblock, Fontenay-sous-Bois, France).

II.3.4 Protocole de purification des matrices solides

Les extraits précédemment obtenus sont alors repris dans 30 ml d'eau pH2 et vont subir les mêmes étapes de préparation/extraction que les échantillons aqueux : étape de purification sur cartouche MCX. Les extraits finaux obtenus sont alors conservés à -20°C jusqu'à l'analyse chromatographique.

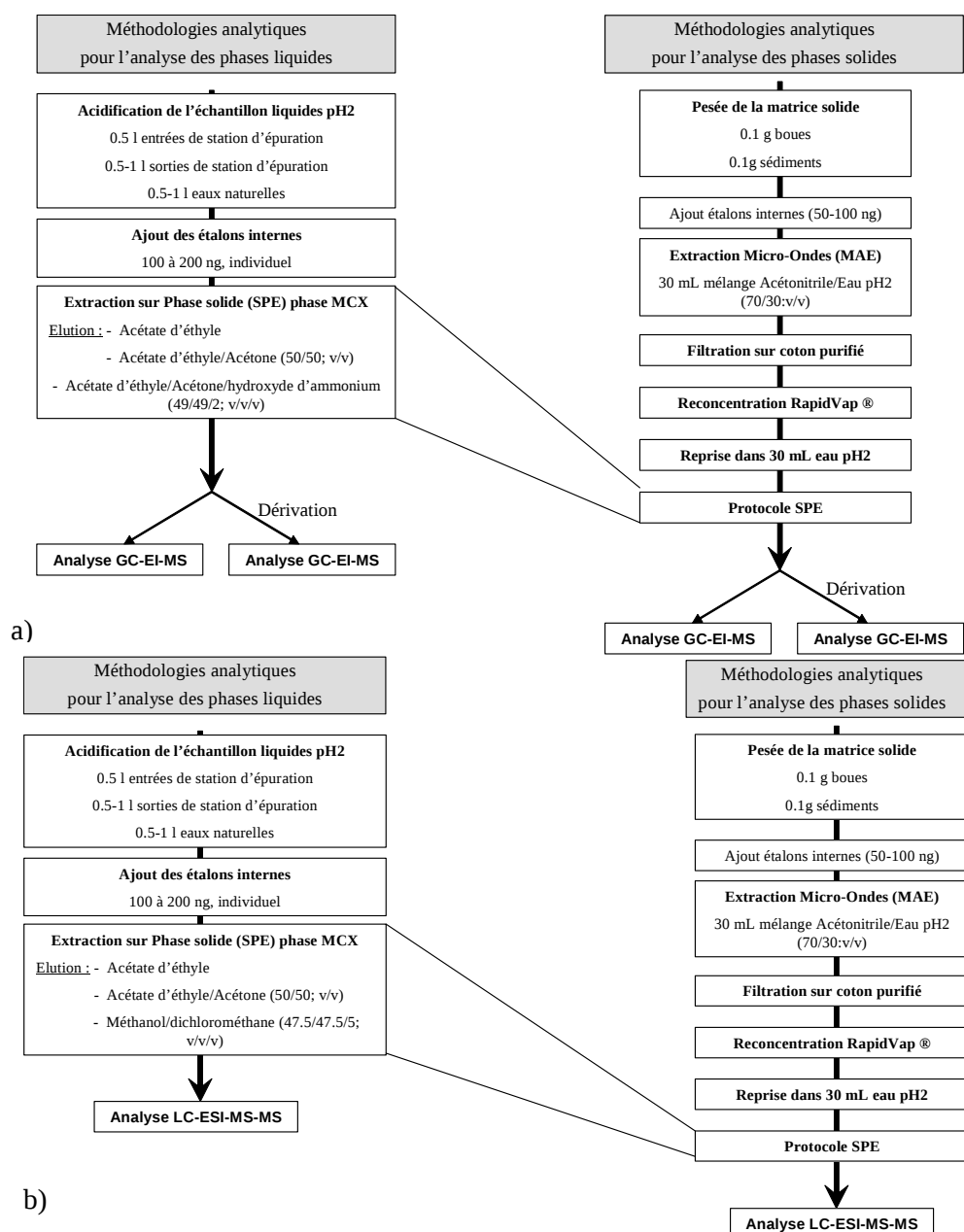


Figure 55 : Méthodologies générales pour l'analyse des substances pharmaceutiques.

II.3.5 Quantification des substances pharmaceutiques : Analyse par CPG-SM

L'analyse s'effectue en 2 étapes. Une première étape permet l'analyse des composés dits neutres et une seconde permet l'analyse des composés dits acides et nécessite une étape de préparation supplémentaire. Préalablement à leur injection, les extraits subissent une étape de dérivation afin d'améliorer la séparation et la détection des composés. Pour cela, 30 µl de N-Méthyl-N-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide, est ajouté à l'extrait. La réaction de dérivation est accélérée en plaçant les échantillons dans une étape à 65°C pendant 35 minutes. Les conditions d'analyse ainsi que les paramètres de détection sont présentées en Annexe VIII. La Figure 56 présente les chromatogrammes obtenus pour chacun des modes d'analyse.

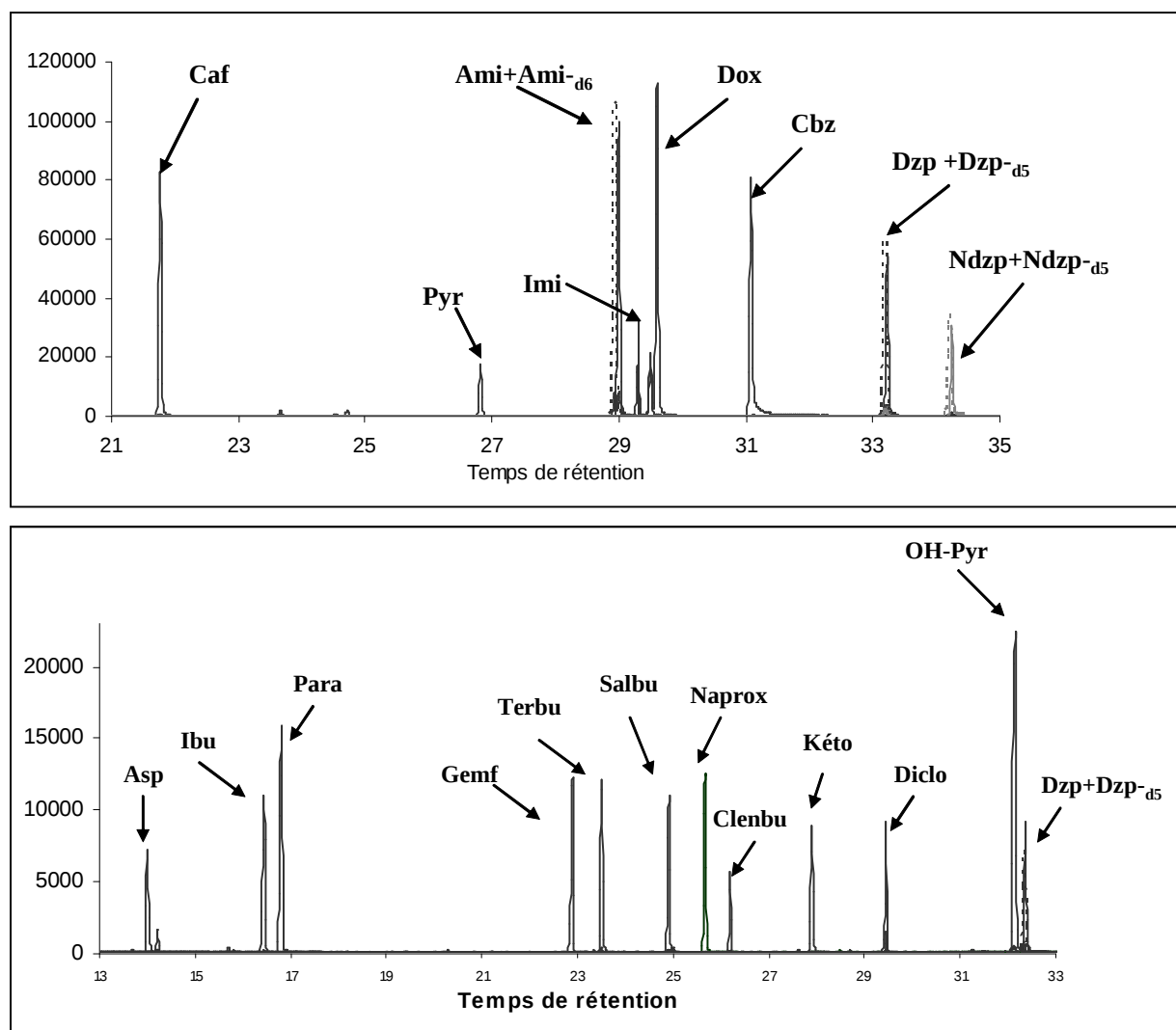


Figure 56: Chromatogrammes présentant la séparation des substances pharmaceutiques par CG-SM.

Comme se sont attachés à le montrer les paragraphes précédents, la technique de choix pour l'analyse des substances pharmaceutiques est le couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse. Il est apparu, au cours de ces travaux, que les méthodologies reposant sur l'utilisation de techniques de chromatographie en phase gazeuse pouvaient souffrir d'un manque de robustesse, dès lors que l'analyse portait sur des matrices environnementales complexes : les eaux d'entrée et de sortie de stations d'épuration, les boues de stations d'épuration. En conséquence, un transfert de méthodologies vers des techniques plus adaptées comme la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem s'est avéré indispensable à la conduite de ces travaux.

II.3.6 Quantification des substances pharmaceutiques : Analyse par CL-SM-SM

L'analyse des substances pharmaceutiques s'effectue par chromatographie en phase liquide ultrarapide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (RRLC®-SM-SM). Elle nécessite deux

séries d'injection : une en mode d'ionisation négative et l'autre en mode d'ionisation positive. Les conditions de séparation et les paramètres de détection de ces analyses sont présentés en Annexe IX. La Figure 57 présente les chromatogrammes obtenus pour chacun des modes d'analyse.

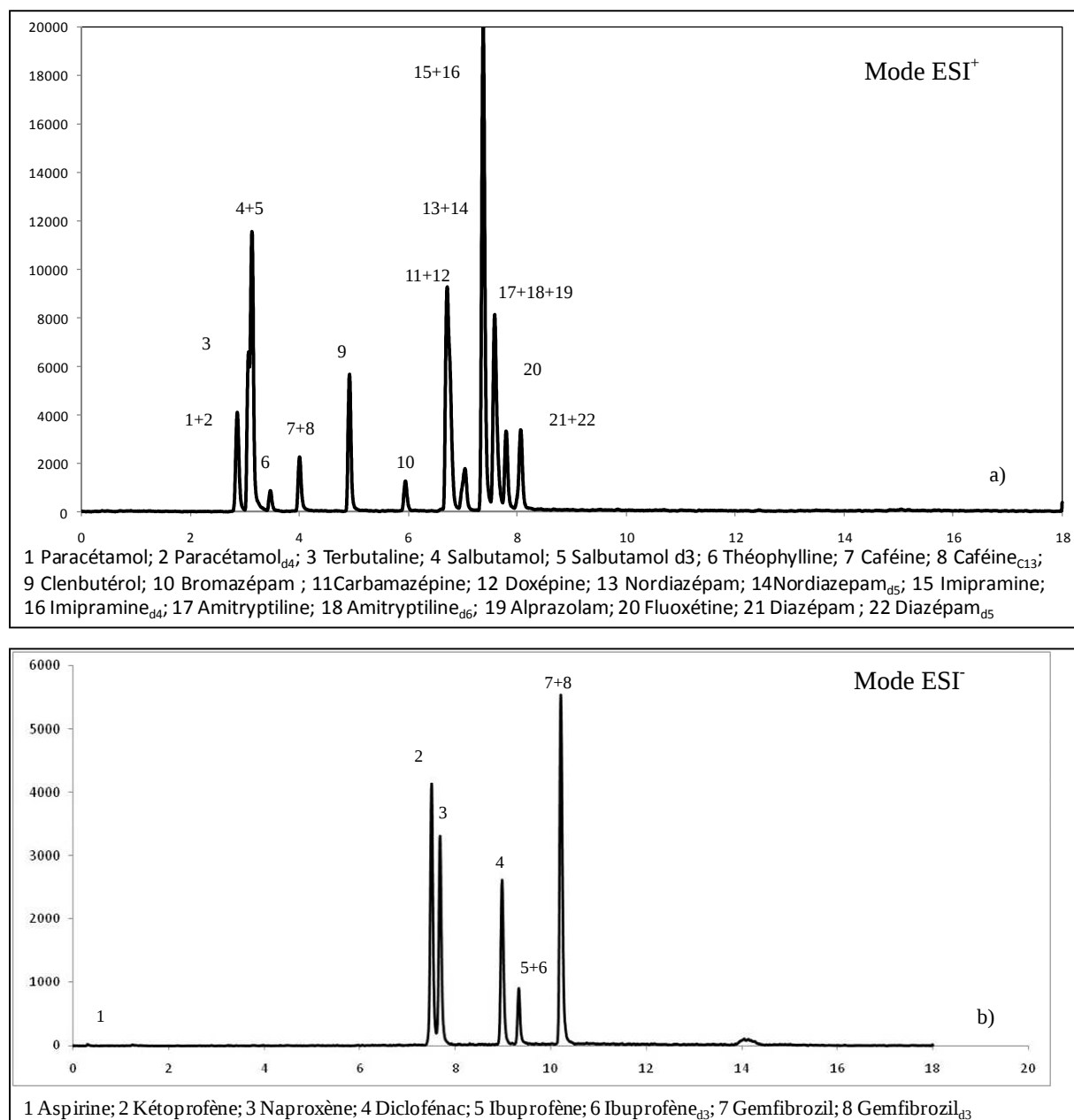


Figure 57 : Chromatogrammes présentant la séparation des substances pharmaceutiques par CL-SM-SM. a) séparation en mode ESI⁺ ; b) séparation en mode ESI⁻.

II.3.7 Méthode de quantification des substances pharmaceutiques

La méthode de quantification retenue ici est celle de l'étalonnage interne. Elle procède par comparaison de l'aire du pic du composé étudié avec celle du pic de l'étalon interne rajouté au début de la manipulation en quantité connue. Les composés choisis doivent répondre à plusieurs conditions pour être utilisés comme étalons internes. Ils doivent présenter des propriétés physico-chimiques

proches des composés à doser afin de compenser au mieux les pertes absolues intervenant lors des différentes étapes de traitement des échantillons. De plus, ces composés doivent être chimiquement stables, avoir sensiblement les mêmes temps de rétention que les composés à doser et ne pas être présents naturellement dans les échantillons à analyser. Le composé à doser et l'étalon interne servant à le quantifier ne répondant pas de la même façon lors de la détection par spectrométrie de masse, il est nécessaire de déterminer un coefficient de réponse (coefficient correctif) entre ces deux composés. Cette détermination est réalisée par l'injection, avant et après chaque série d'analyse d'environ 10 échantillons, d'un mélange constitué d'une solution de composés non deutérés en concentrations connues et de la solution d'étalons internes utilisée (de concentrations connues).

II.4 **Méthodologies d'analyse des POCIS**

II.4.1 Protocole d'extraction de la phase HLB

Afin d'extraire l'ensemble des molécules ciblées ($n= 27$), un protocole d'extraction multi-résidus a été développé et mis en œuvre. Après retrait du milieu, la POCIS est désassemblée: les anneaux en inox sont retirés, les membranes sont séparées, la phase HLB est récupérée à l'aide d'eau Evian® et collectée dans un bécher en verre. La phase est ensuite déposée dans une pipette pasteur dont l'extrémité est obstruée à l'aide de coton de verre purifié. Après dépôt, la phase est séchée pendant 60 à 90 minutes, sous vide. L'élution est conduite par dépôts successifs de 10 ml de méthanol puis 10 ml d'un mélange méthanol/dichlorométhane (50/50 ; v/v). Les extraits obtenus sont ensuite aliquotés et évaporés pour un transfert dans un solvant d'injection approprié.

II.4.2 Protocole d'extraction de membranes

Après désassemblage, les membranes (2 membranes pour une POCIS) sont collectées dans un flacon en verre pour subir une extraction par ultrasonication, en 2 étapes : 2 fois 10 min dans 10 ml d'hexane puis 2 fois 10 min dans 10 ml de méthanol. Les extraits sont ensuite évaporés, sous flux d'azote, puis répartis en différents sous échantillons et transférés dans un solvant d'injection approprié.

SYNTHESE

Sommaire

I	Méthodologies analytiques pour l'étude des alkylphénol-polyéthoxylés dans les matrices environnementales.....	145
I.1	Méthodologies analytiques pour l'analyse des APEO dans les matrices environnementales.....	145
I.2	Démarches de validation des méthodes	146
I.2.1	Capacité du laboratoire à conduire des analyses traces.....	146
I.2.2	Validation des méthodologies de préparation de l'échantillon.....	147
	La problématique de la validation et de la comparabilité des données concernant la présence des substances émergentes dans l'environnement est au cœur des préoccupations de notre communauté depuis la mise en œuvre de la DCE à l'échelle européenne.	147
I.2.2.1	Validation du protocole de traitement des échantillons d'eaux.....	147
I.2.2.2	Validation du protocole de traitement des échantillons solides.....	148
I.2.3	Validation de l'analyse par couplage CL-ESI-SM.....	148
II	Nouvelles méthodologies d'échantillonnages : développements et applications pour l'étude des écosystèmes aquatiques	150
II.1	Problématique- Contexte	150
II.2	Validation d'un protocole d'extraction combinée	152
II.3	Détermination des taux d'échantillonnage des POCIS.....	152
II.3.1	Distribution des métabolites au niveau des POCIS.....	152
II.4	Détermination des taux d'échantillonnage.....	153
II.5	Validation in situ	155
II.5.1	Les POCIS comme outils intégratifs	155
II.5.2	Les POCIS comme outils quantitatifs.....	156
II.5.3	Les POCIS comme outils quantitatifs, les limitations	157
III	Présence et devenir des alkylphénol-polyéthoxylés et des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration	159
III.1	Caractérisation des eaux brutes.....	159
III.1.1	Remarques générales.....	159
III.1.2	Tendances concernant la présence des métabolites d'APEO dans les eaux brutes	160
III.1.3	Tendances concernant la présence des substances pharmaceutiques dans les eaux brutes	161
III.2	Caractérisation des eaux traitées de station d'épuration.....	162
III.3	Devenir des APEO et des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration.....	163
III.3.1	Bilan d'abattement global	163
III.3.2	Description du devenir des métabolites d'APEO et des substances pharmaceutiques au cours des processus.....	167
III.3.2.1	Efficacité des traitements primaires et secondaires	167
III.3.2.2	Efficacité des traitements tertiaires	167
III.4	Rôle des phases solides en suspension.....	169
III.5	Données de présence des métabolites d'APEO et des substances pharmaceutiques dans les boues issues des processus de traitement des eaux usées.....	170
IV	L'estuaire de Seine : un écosystème sous pression, le bilan de 6 années d'étude	172
IV.1	Programme de recherche : le Programme SEINE AVAL.....	172

IV.2	Les Sources d'APEO en estuaire de Seine.....	172
IV.2.1	<i>Les Stations d'épuration.....</i>	172
IV.2.1.1	Données de présence dans les effluents.....	172
IV.2.1.2	Tendances dans la présence des métabolites d'APEO dans les effluents.....	173
IV.2.2	<i>Les principaux tributaires</i>	174
IV.2.2.1	Données de présence dans les phases dissoutes	174
IV.2.2.2	Flux en métabolites d'APEO amenés par les tributaires	175
IV.2.3	<i>L'influence de la zone amont : la région parisienne</i>	177
IV.2.4	<i>Bilan des apports en Seine</i>	177
IV.3	Le devenir des métabolites d'APEO en estuaire de Seine	178
IV.3.1	<i>Le devenir des métabolites d'APEO dans l'estuaire fluvial.....</i>	178
IV.3.2	<i>Risque chimique lié à la présence de métabolites d'APEO dans l'estuaire fluvial.....</i>	180
IV.4	Présence et devenir des métabolites d'APEO dans l'estuaire de Seine marin.....	181
V	Les APEO et les substances pharmaceutiques : contaminants ubiquistes du littoral français	182
V.1	Les sources de métabolites d'APEO et de substances pharmaceutiques en milieu marin	182
V.1.1	<i>Etude de cas : La calanque de Cortiou, Impact d'un rejet en milieu marin</i>	182
V.1.1.1	Données de présence dans la calanque de Cortiou.....	182
V.1.1.2	Devenir dans la calanque de Cortiou.....	183
V.1.2	<i>Les systèmes dulçaquicoles</i>	185
V.2	Présence et devenir des métabolites d'APEO dans les estuaires macrotidaux	186
V.2.1	<i>Données de présence dans la phase dissoute</i>	186
V.2.2	<i>Rôle des phases particulières dans la contamination des estuaires.....</i>	187
V.3	Présence et devenir des métabolites d'APEO et des substances pharmaceutiques dans les écosystèmes marins côtiers.....	188
V.4	Transferts aux organismes biologiques	192

I Méthodologies analytiques pour l'étude des alkylphénol-polyéthoxylés dans les matrices environnementales

Ce paragraphe est consacré à la présentation des méthodologies analytiques développées et optimisées dans le cadre de ces travaux de recherche visant à étudier les alkylphénol-polyéthoxylés dans les systèmes aquatiques. Elle s'articule autour de 4 publications. La première a permis, au travers d'une revue des méthodologies analytiques couramment employées pour l'analyse des APEO et de leurs métabolites dans des matrices environnementales, de présenter le contexte général dans lequel s'insèrent ces travaux de recherche d'un point de vue méthodologique et de mettre en avant les carences. Les 2 publications suivantes ont pour objectifs de présenter les méthodologies analytiques développées au sein du laboratoire pour l'analyse des métabolites d'APEO dans les matrices aqueuses (Publication 2) et les matrices solides (Publication 3). Enfin une 4^{ème} publication rapporte les démarches de validation qui ont été mises en œuvre afin d'assurer la validité des données générées, notamment dans un contexte réglementaire.

La plupart des études réalisées sur les métabolites d'APEO (AP, APEO, APEC) souffrent de manque de validation et de manque de robustesse. Les développements et les optimisations conduits au cours de ces travaux de thèse ont permis d'améliorer la fiabilité et la robustesse des méthodologies analytiques pour l'étude des matrices environnementales.

I.1 Méthodologies analytiques pour l'analyse des APEO dans les matrices environnementales

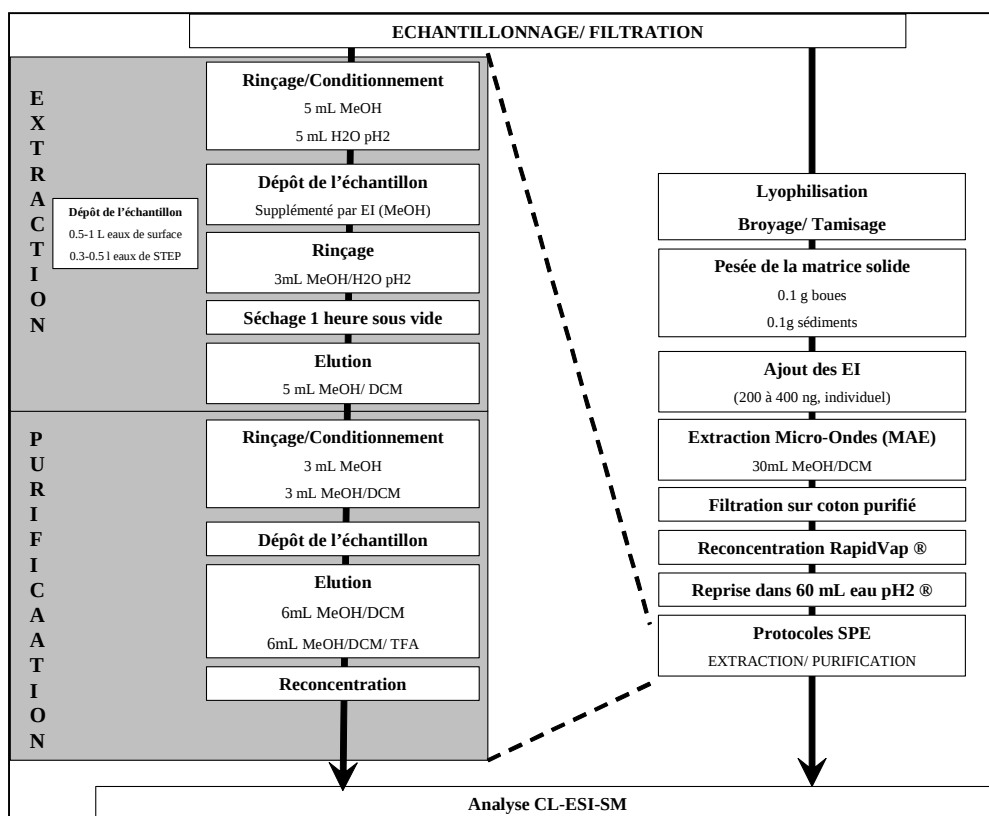


Figure 58 : Méthodologies globales pour l'analyse des APEO dans les matrices environnementales.

La Figure 58 présente la méthodologie globale mise en œuvre dans cette étude. Elle repose sur la mise en œuvre de méthodologies adaptées aux nouvelles exigences de l'analyse. Ces méthodes d'analyse : extraction en phase solide, extraction assistée par micro-ondes sont économiques en solvants et permettent l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons (n=24 échantillons) en un temps compatible avec le respect de l'intégrité de l'échantillon.

I.2 Démarches de validation des méthodes (Publication n°4)

I.2.1 Capacité du laboratoire à conduire des analyses traces

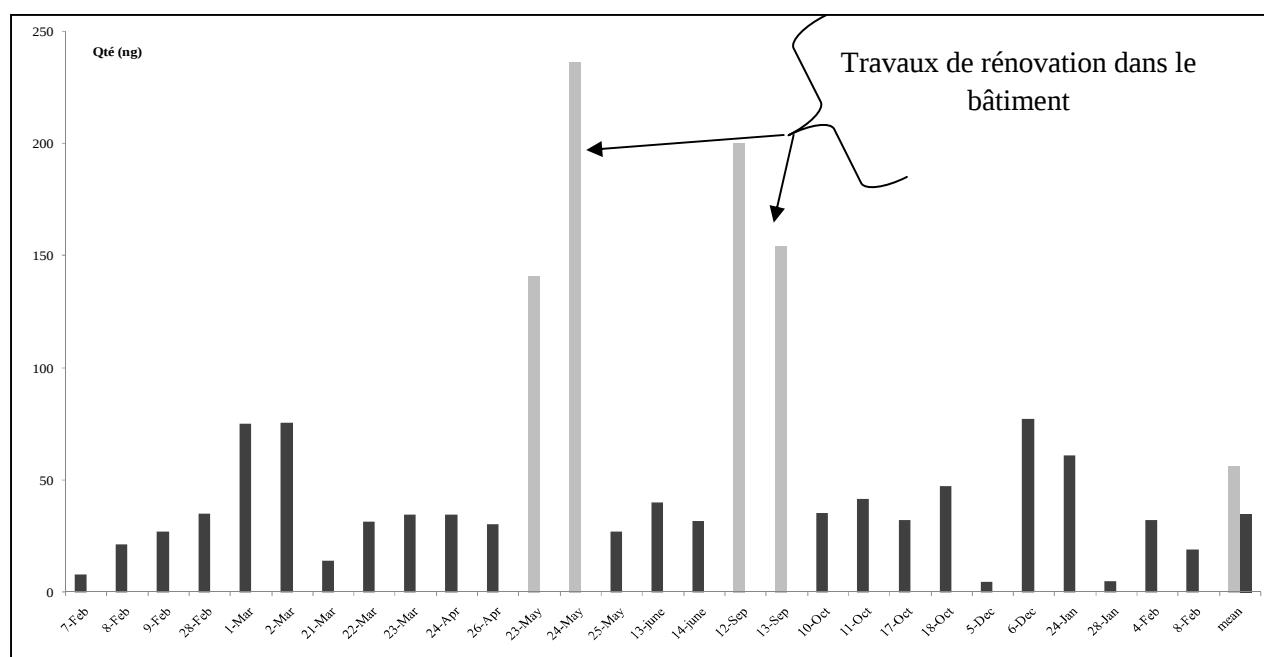


Figure 59 : Une année de suivi des blancs de protocole en 4-NP (ng) (n=28, 2 opérateurs).

Les alkylphénols sont des contaminants ubiquistes de l'environnement et par conséquent de nos laboratoires. Comme cela a été mis en évidence précédemment, les alkylphénols entrent dans la composition de nombreux produits (détergents, plastiques, peintures etc....) qui peuvent entrer en contact du matériel analytique et des échantillons et qui sont susceptibles d'en altérer l'intégrité. Une année de suivi des blancs manipulation en 4-NP a permis de mettre en évidence et de confirmer que le bruit de fond du laboratoire était compatible avec l'analyse de traces de métabolites d'APEO dans des matrices environnementales (concentrations moyennes inférieures à 30 ng dans la pièce dédiée à l'analyse des matrices les plus contaminées, Figure 59). Néanmoins, des contaminations ponctuelles de l'environnement, indépendantes de la filière de contrôle de nos échantillons, ont pu être mises en évidence. Outre le fait qu'elles confirment l'hypothèse d'une imprégnation des environnements intérieurs par le 4-NP, elles soutiennent la nécessité d'accompagner chaque série d'analyse par des blancs méthodologiques. L'absence de validation peut conduire à une surestimation des niveaux de contamination environnementaux (Loos et al., 2008).

I.2.2 Validation des méthodologies de préparation de l'échantillon

La problématique de la validation et de la comparabilité des données concernant la présence des substances émergentes dans l'environnement est au cœur des préoccupations de notre communauté depuis la mise en œuvre de la DCE à l'échelle européenne.

I.2.2.1 Validation du protocole de traitement des échantillons d'eaux (Publications n°2 et 4)

La Figure 60 présente les taux de récupération obtenus par la méthodologie d'analyse des échantillons d'eaux appliquée aux 4 types de matrices testées. Afin de progresser dans la validation de la méthode, des eaux «complexes» ont été fabriquées et supplémentées en analytes d'intérêt. Le viandox est couramment utilisé par les épurateurs et certaines équipes de recherche afin de mimer les charges organiques des eaux de stations d'épuration (Tusseau et al., 2002 ; Gourlay et al., 2005). Les substances humiques Aldrich sont quant à elles couramment utilisées pour mimer les charges des eaux naturelles (Lowe et Hissain, 2008). A l'exception du 4-NP1EC qui présente un taux de récupération de 50% dans la matrice simulant les eaux du milieu naturel, l'ensemble des autres molécules étudiées présente des taux de récupération compris entre 80% et 130% selon la molécule considérée. Les écarts-type mesurés sont inférieurs à 20% et mettent en évidence que la méthodologie répond à des critères de répétabilité et de reproductibilité (Figure 60).

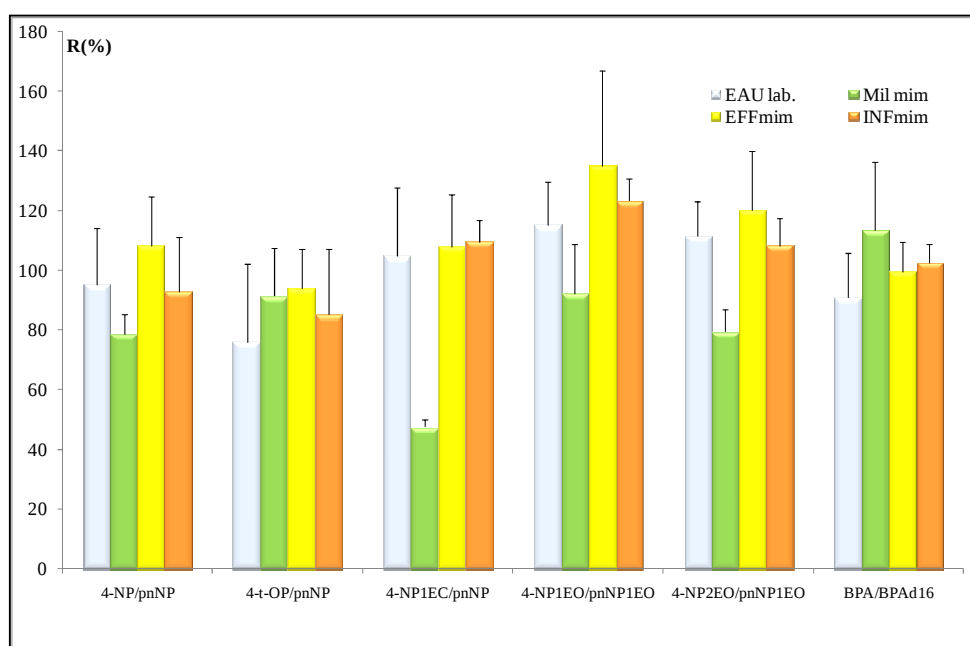


Figure 60 : Résultats de la démarche de validation des matrices aqueuses.

Eau lab. : rendements moyens du protocole complet (extraction + purification) (n=28, 7 mois) pour des eaux Evian supplémentées,

Mil mim : eau supplémentée par 10 mg.l⁻¹ d'acides humiques (extraction + purification) (n=3),

Eff mim : eau supplémentée par 2 mg.l⁻¹ de Viandox® (extraction + purification) (n=3),

Inf mim : eau supplémentée par 10 mg.l⁻¹ de Viandox® (extraction + purification) (n=3).

I.2.2.2 Validation du protocole de traitement des échantillons solides

(Publications n°3 et 4)

La Figure 61 présente les rendements globaux obtenus avec la méthodologie d'analyse des échantillons solides appliquée aux 3 types de matrices testés. Des sédiments du bassin d'Arcachon ont été utilisés pour d'une part leur faible niveau de contamination en APEO et d'autre part par leurs caractéristiques (granulométrie, taux de carbone organique). A l'exception du 4-NP1EC qui présente un taux de récupération de 50 % dans le sédiment supplémenté à $1 \mu\text{g.g}^{-1}$, l'ensemble des autres molécules étudiées présente des taux de récupération compris entre 60 % et 130 % selon la molécule considérée. Les écarts-type mesurés sont inférieurs à 20 % et mettent en évidence que la méthodologie répond à des critères de répétabilité et de reproductibilité.

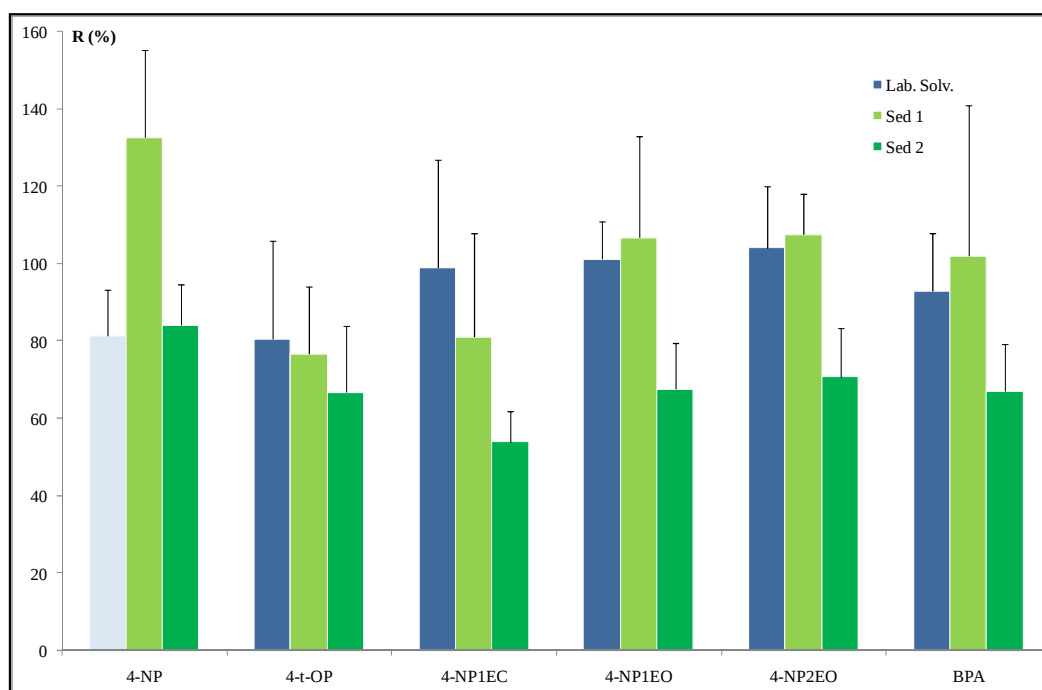


Figure 61 : Résultats de la démarche de validation pour les matrices solides.

Lab solv : solvant supplémenté (n=4, indépendants),

Sed 1 : sédiment supplémenté à 100 ng.g^{-1} (n=3),

Sed 2 : sédiment supplémenté à $1 \mu\text{g.g}^{-1}$ (n=3),

I.2.3 Validation de l'analyse par couplage CL-ESI-SM (Publications n°2 et 4)

Le Tableau 40 présente les effets matriciels mesurés pour les 3 matrices étudiées (une eau de surface, une eau de sortie de station d'épuration et une eau d'entrée de station d'épuration) et pour les 2 conditions testées (avec ou sans étape de purification). Les observations mettent en évidence l'effet positif de la mise en œuvre de l'étape de purification sur HF-PSA. Ceci est illustré par la Figure 62. En effet, elle conduit à une amélioration de la sélectivité, notamment dans les matrices complexes de type entrée de station d'épuration, par la diminution des interférences matricielles (la Figure 5 a-b présente le profil chromatographique d'une entrée de STEP avec et sans l'étape de purification). De plus, elle

conduit également à une diminution des phénomènes de suppression de signal et à une augmentation de la sensibilité. La figure 62c présente les profils chromatographiques d'une eau de surface avec et sans la mise en œuvre de l'étape de purification, elle met en évidence un gain d'abondance de près de 50 % pour l'ensemble des molécules.

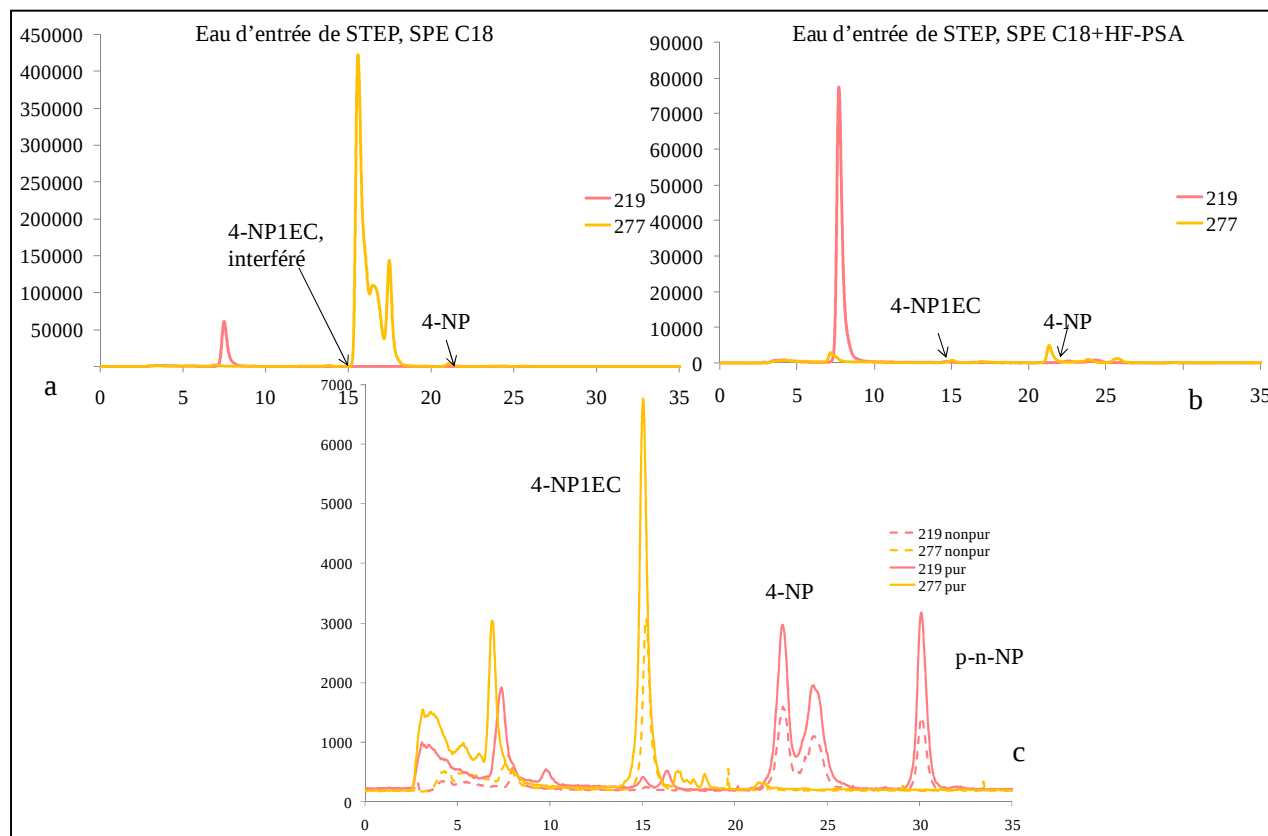


Figure 62 : Mise en évidence de l'effet positif de la mise en œuvre d'une étape de purification pour l'analyse des APEO dans les matrices complexes.

Les phénomènes matriciels apparaissent comme corrélés à la charge matricielle de l'échantillon (Tableau 44 : sortie de STEP> entrée de STEP> milieu naturel) (Jahnke et al., 2004 ; Koh et al., 2008). En mode d'ionisation négative, le phénomène semble affecter l'ensemble des composés de manière homogène (les étalons de quantification comme les composés à quantifier). La quantification par étalonnage interne apparaît comme efficace pour contrôler l'effet matriciel et ainsi permettre la génération de données quantitatives fiables. En mode d'ionisation positive, les phénomènes affectent de manière homogène les étalons de quantification et les composés à quantifier dans les milieux naturels et les eaux de sortie de STEP. En revanche un important phénomène d'extinction de signal est observé pour le 4-NP1EO et le 4-NP2EO dans les eaux d'entrée de stations d'épuration. L'hypothèse d'une compétition pour l'ionisation entre l'ensemble des NPEO qui sont présents en grandes concentrations dans les eaux non traitées, puisque ce sont les formes utilisées dans les mélanges commerciaux, peut être avancée. En effet, en chromatographie liquide en phase inverse, les molécules sont séparées par leur caractère hydrophobe ce qui a pour conséquence la non séparation des NPEO. La forte dégradation que subissent ces molécules au cours des processus de traitement mis

en œuvre dans les stations d'épuration pourrait expliquer que ces phénomènes d'extinction de signal soient prépondérants dans les eaux brutes par comparaison aux eaux traitées. L'hypothèse d'une interaction entre les NPEO et des matières organiques ayant le potentiel d'être fortement dégradées au cours du processus de traitement des eaux usées ne peut cependant pas être écartée.

Tableau 40 : Effets matriciels en LC-ESI-MS.

	Eaux de surface		Sortie de STEP		Entrée de STEP	
	SPE C18+HF-PSA	SPE C18	SPE C18+HF-PSA	SPE C18	SPE C18+HF-PSA	SPE C18
4-NP	-18%	38%	29%	39%	36%	54%
4-t-OP	7%	39%	-8%	17%	20%	46%
4-NP1EC	9%	69%	39%	22%	42%	I
p-n-NP	6%	55%	45%	42%	56%	62%
4-NP1EO	4%	9%	24%	16%	96%	78%
4-NP2EO	21%	23%	38%	32%	79%	78%
p-n-NP1EO	7%	10%	12%	12%	34%	29%
BPA	-13%	39%	30%	-40%	18%	46%
BPA-d16	-2%	35%	24%	-39%	-28%	I

I : interféré

Les méthodologies analytiques développées pour l'analyse quantitative des APEO et de leurs métabolites ainsi que le bisphénol A dans les matrices aqueuses et les matrices solides répondent à des critères de validation de manière satisfaisante et sont applicables à la conduite d'études environnementales.

II Nouvelles méthodologies d'échantillonnages : développements et applications pour l'étude des écosystèmes aquatiques

II.1 **Problématique- Contexte (Publication n°5)**

Le précédent paragraphe a posé le problème de la justesse et de la fiabilité des données générées dans les études de monitoring environnemental. Cette section pose le problème de la représentativité des données générées par les approches classiques dans le cadre d'études environnementales descriptives ou dans un cadre réglementaire, ce qui revient à poser le problème de la variabilité dans l'environnement.

La Figure 63 présente ce que peut être la variabilité dans l'environnement, au travers de mesures de métabolites d'APEO dans 2 écosystèmes aquatiques (la baie de Vilaine et le site d'Honfleur en estuaire de Seine). Quelque soit l'échelle de temps considérée, les variations sont importantes et peuvent atteindre un facteur 10 pour certaines molécules (notamment le 4-NP1EC). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces tendances tels que la variabilité des usages, l'efficacité des processus de traitements mis en œuvre dans les stations d'épuration, la variabilité des conditions hydriques, la variabilité des conditions climatiques, l'existence d'apports ponctuels, ... Au regard de

ces tendances, il apparaît plus que jamais évident que l'acquisition de données environnementales représentatives repose sur l'obtention d'un nombre suffisant de données. Ce qui en raison de contraintes logistiques, techniques et financières apparaît comme un véritable obstacle. La nécessité de développer de nouveaux outils capables de générer des données environnementales intégratives est plus que jamais primordiale.

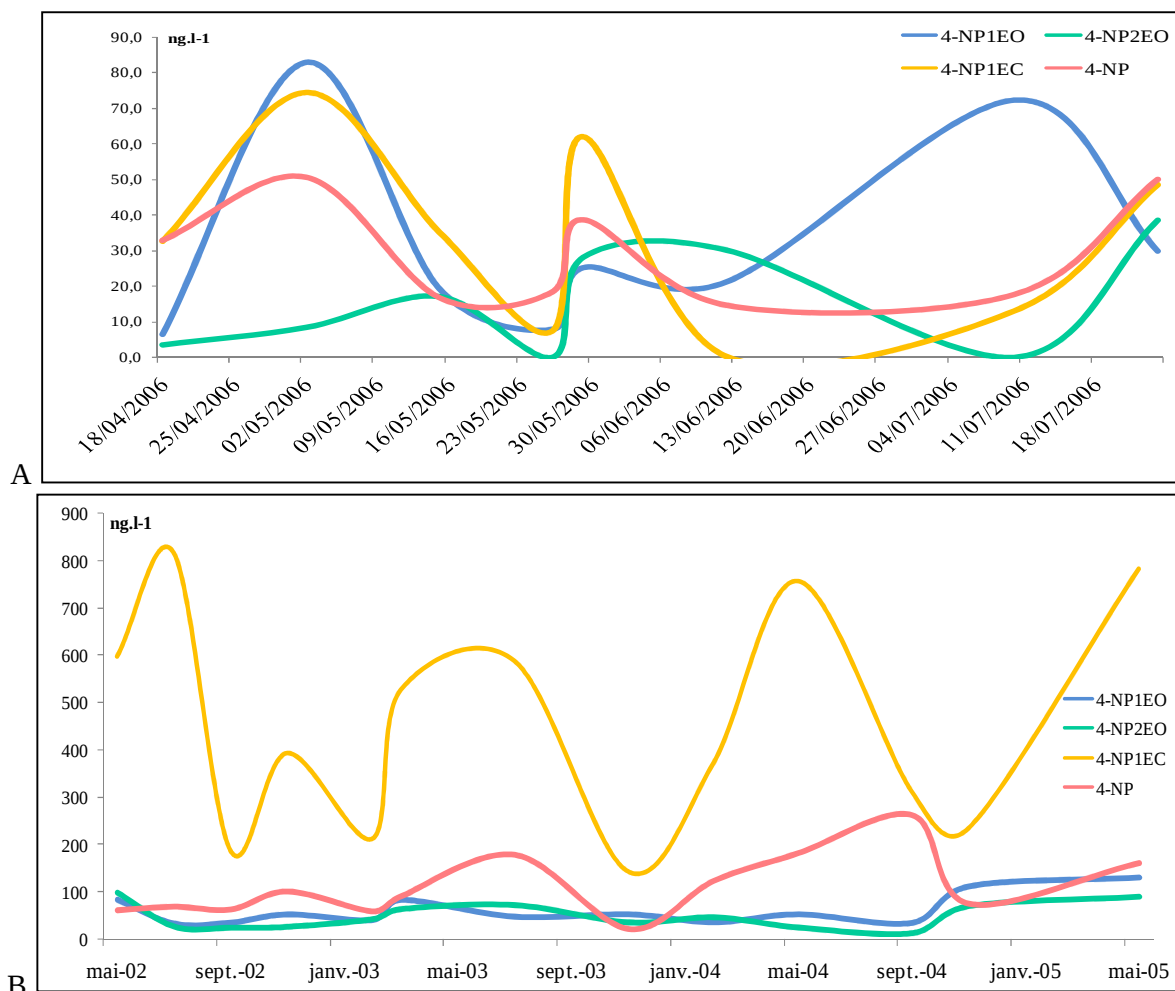


Figure 63 : La variabilité dans l'environnement.

A) Variabilité observée dans la distribution et les concentrations de métabolites d'APEO au niveau de la Baie de Vilaine (prélèvements ponctuels, bimensuelles, avril-juillet 2006), B) Variabilité observée dans la distribution et les concentrations de métabolites d'APEO au niveau d'Honfleur, estuaire de Seine (prélèvements ponctuels, mai-02 à mai-05).

La démarche globale de développement des outils d'échantillonnage sélectionnés Polar Organic Compound Integrative Sampler (POCIS) repose sur la mise en œuvre d'étapes successives : la validation d'une méthode de récupération des molécules ciblées, la détermination des taux d'échantillonnage pour chacune des molécules ciblées et la validation *in situ*.

II.2 Validation d'un protocole d'extraction combinée

La Figure 64 présente les rendements moyens obtenus ($n=3$) pour le protocole d'extraction combinée développé et validé pour l'extraction des métabolites d'APEO, du bisphénol A (BPA) et des substances pharmaceutiques ($n=28$ molécules). Il repose sur une élution successive avec 10 ml de méthanol puis 10 ml d'un mélange méthanol/dichlorométhane (50/50 ; v/v). Les taux de récupération pour la majorité des molécules sont supérieurs à 60 % à l'exception de la terbutaline (20 %) et de l'aspirine (35 %). Les écarts-types sont inférieurs à 20 %. Ce protocole, considéré comme satisfaisant et validé, a été appliqué à l'analyse des phases de POCIS.

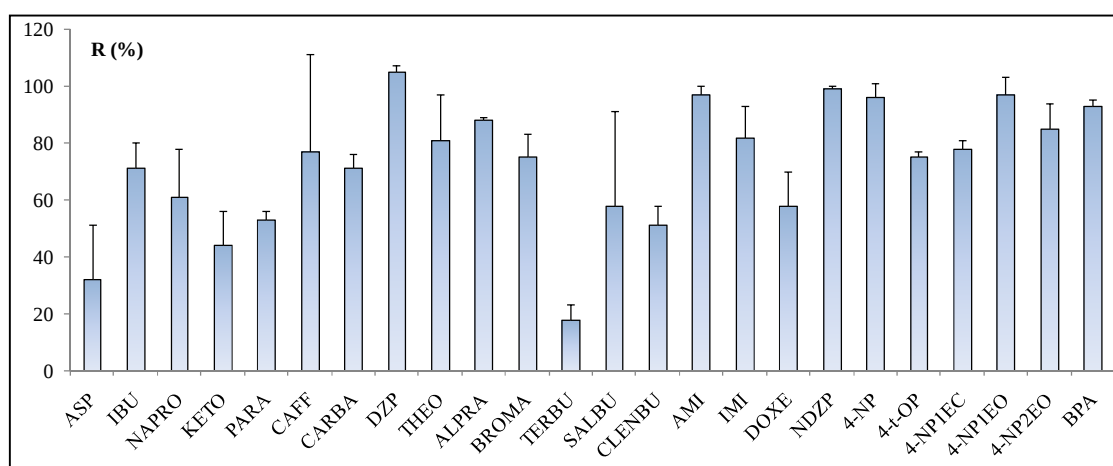


Figure 64 : Rendements d'extraction du protocole d'extraction combinée pour l'analyse des 28 molécules sélectionnées dans les phases HLB des POCIS (moyenne $\pm$ RSD ($n=3$)).

II.3 Détermination des taux d'échantillonnage des POCIS

Les POCIS sont des outils destinés à l'échantillonnage de composés polaires, dont le log Kow est inférieur à 3, dans les systèmes aquatiques. Les métabolites d'APEO considérés dans cette étude, à l'exception du 4-NP1EC, sont considérés comme des molécules semi-polaires. En effet, elles présentent des valeurs de log Kow comprises entre 4,2 et 4,5. La question de leur distribution dans l'échantillonneur (partition entre la phase et la membrane) est donc particulièrement intéressante.

II.3.1 Distribution des métabolites au niveau des POCIS

Concernant la répartition des métabolites d'APEO au cours de l'expérience cinétique (T14), il peut-être remarqué qu'à T3, à l'exception du 4-NP1EC, la majorité des métabolites est associée à la membrane et qu'une minorité a réussi à franchir la membrane. Au cours du temps, cette proportion augmente mais reste néanmoins faible (inférieure à 50 %). Il apparaît donc que la sorption des métabolites d'APEO les plus hydrophobes se fait en deux étapes. Une première étape au cours de laquelle les métabolites sont sorbés sur la membrane en polyethersulfone et une deuxième étape au cours de laquelle, par un phénomène de désorption/sorption, les molécules parviennent à se fixer à la

phase réceptrice. Cela aura pour conséquence un faible taux d'échantillonnage puisque la membrane n'est pas considérée pour la détermination de cette valeur. En effet, la membrane après exposition dans le milieu naturel est recouverte de dépôts (biofilm, algues, matières en suspension) qui, d'une part, rendent l'analyse complexe, et d'autre part, entraîne un biais par la considération de substances non dissoutes mais sorbées sur les composantes piégées (matières en suspension, algues, etc. ...).

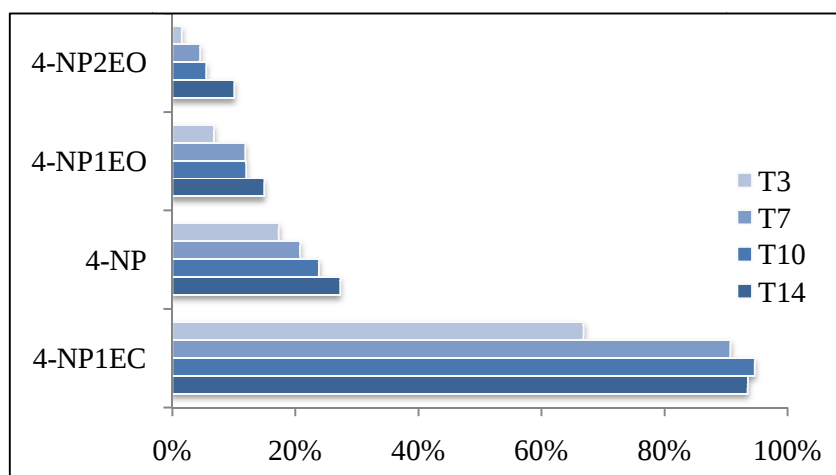


Figure 65 : Distribution des métabolites d'APEO dans les POCIS. Part des métabolites d'APEO fixée dans la phase réceptrice (%).

II.4 Détermination des taux d'échantillonnage

Les études cinétiques conduites lors des expérimentations en laboratoire ont permis la détermination des taux d'échantillonnage pour l'ensemble des molécules sélectionnées. Une importante hétérogénéité des valeurs de R_s est observée. Concernant les APEO, à l'exception du 4-NP1EC qui présente une valeur de R_s élevée $0,28 \text{ l.j}^{-1}$, les autres molécules présentent des valeurs extrêmement peu élevées de l'ordre de $0,01 \text{ l.j}^{-1}$, ce que laissait présager l'étude de la distribution des molécules entre la phase et la membrane. Concernant les substances pharmaceutiques, la carbamazépine et les antidépresseurs présentent les valeurs de R_s les plus importantes, supérieures à $0,3 \text{ l.j}^{-1}$ en dépit de $\log K_{ow} > 3$. Au contraire, des molécules polaires telles que la théophylline ou le paracétamol présentent des valeurs de R_s extrêmement faibles $0,01 \text{ l.j}^{-1}$. Ainsi, il apparaît que les valeurs de R_s ne sont pas uniquement contrôlées par le caractère hydrophobe des molécules. Si les valeurs de R_s obtenues pour les substances pharmaceutiques sont comparées plus précisément à celles de MacLeod et al. (2007) et Togola et Budzinski (2008), une bonne adéquation est observée: $0,325 \text{ l.j}^{-1}$, $0,3 \text{ l.j}^{-1}$, $0,398 \text{ l.j}^{-1}$ pour la carbamazépine, $0,136 \text{ l.j}^{-1}$, $0,1 \text{ l.j}^{-1}$ et $0,149 \text{ l.j}^{-1}$ pour le diclofénac, $0,165 \text{ l.j}^{-1}$, $0,1 \text{ l.j}^{-1}$, $0,144 \text{ l.j}^{-1}$ pour le naproxène, respectivement. Cependant, pour certaines molécules une importante variabilité peut être observée notamment pour la fluoxétine dont le R_s a été déterminé dans 4 expériences: $0,247 \text{ l.j}^{-1}$, $1,4 \text{ l.j}^{-1}$, $0,56 \text{ l.j}^{-1}$, $0,086 \text{ l.j}^{-1}$. Ces disparités peuvent être expliquées par les conditions expérimentales: la turbulence, la température et le pH peuvent affecter le taux

d'échantillonnage dans des proportions importantes (selon que le R_s est plus ou moins contrôlé par la couche limite).

Concernant les APEO, Harman et al. (2008) n'ont pas réussi à déterminer de R_s pour le nonylphénol (isomère linéaire), 0,058 l.j^{-1} pour l'octylphénol. Ardistoglou et Voutsas (2008) rapportent des valeurs de R_s : 0,12 l.j^{-1} pour le 4-t-OP, 0,11 l.j^{-1} pour le 4-NP, 0,09 l.j^{-1} pour le 4-NP1EO.

Des taux d'échantillonnages ont été déterminés pour une poignée de molécules, les comparaisons sont difficiles. Alvarez (2007) rapporte des valeurs de R_s de 0,112 l.j^{-1} pour l'ioxynil, 0,22 l.j^{-1} pour le déisopropylatrazine (DIA), 0,26 l.j^{-1} pour la dééthylatrazine. Mazzella et al. (2007) rapportent des valeurs de R_s de 0,176 l.j^{-1} pour l'ioxynil, 0,063 l.j^{-1} pour la déisopropylatrazine, 0,121 l.j^{-1} pour la dééthylatrazine. De même Zhang et al. (2008) et Arditsoglou et Voutsas (2008) ont étudié les taux d'échantillonnages pour différentes hormones stéroïdiennes, ils obtiennent des valeurs de R_s égales à 0,1 l.j^{-1} et 0,119 l.j^{-1} pour l'estrone et 0,045 l.j^{-1} 0,115 l.j^{-1} pour l'estradiol, respectivement.

Bien que les conditions expérimentales puissent expliquer une partie de cette variabilité, ce facteur n'apparaît pas comme suffisant pour expliquer les variations observées. Il est intéressant de noter qu'excepté Mazzella et al. (2007) et Togola et Budzinski (2007) qui mentionnent l'usage de l'eau comme solvant de récupération, toutes les autres publications indiquent l'usage du méthanol comme solvant de récupération de la phase adsorbante. Le méthanol est un solvant possédant un fort pouvoir éluant. Comme cela a pu être mis en évidence, une part significative des composés peut être adsorbée sur la membrane. Par conséquent, l'hypothèse d'une élution des composés adsorbés sur la membrane conduisant à une augmentation de la valeur de R_s peut être avancée.

Si dans le cadre de cette étude, l'ensemble de la POCIS (membrane+ phase) est considéré pour la détermination du R_s des APEO, une bonne concordance (60 % pour le 4-NP, 85 % pour le BPA, 145 % pour le 4-NP2EO) peut alors être observée avec les données de Arditsoglou et Voutsas (2008).

Comme le met en évidence le Tableau 41, cette expérience en laboratoire n'a pas permis de mettre en évidence un effet de la vitesse sur les taux d'échantillonnage, ce qui ne signifie pas que ce paramètre ne puisse pas avoir un effet dans les milieux naturels (Publication n°5, Togola et Budzinski, 2007). En effet, les conditions de l'expérimentation n'ont permis de tester qu'une différence de vitesse égale à un facteur 2.

Tableau 41 : Valeurs de R_s (L.j^{-1}) obtenues expérimentalement pour les 28 molécules sélectionnées.

R_s (L.j^{-1})	POCIS int	POCIS ext
Cbz	$0,32 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,05$
Dzp	$0,35 \pm 0,05$	$0,36 \pm 0,05$
Alpra	$0,44 \pm 0,04$	$0,44 \pm 0,05$
Broma	$0,16 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,04$
Ndzp	$0,38 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,04$
Fluox	$0,24 \pm 0,09$	$0,25 \pm 0,05$
Ami	$0,40 \pm 0,08$	$0,39 \pm 0,09$
Imi	$0,43 \pm 0,08$	$0,41 \pm 0,08$
Doxé	$0,41 \pm 0,09$	$0,38 \pm 0,08$
Terbu	$0,25 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,07$
Salbu	$0,05 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,02$
Clenbu	$0,48 \pm 0,07$	$0,50 \pm 0,08$
Caf	$0,16 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,04$
Théo	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$
Para	$0,01 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$
Ibu	$0,23 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,03$
Naprox	$0,16 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,01$
Diclo	$0,14 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,02$
Kéto	$0,16 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,01$
Gemf	$0,33 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,02$
4-NP1EC	$0,28 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,05$
4-NP	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,00$
4-t-OP	$0,09 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$
NP1EO	$0,01 \pm 0,002$	$0,01 \pm 0,002$
NP2EO	$0,01 \pm 0,002$	$0,01 \pm 0,002$
4-BPA	$0,02 \pm 0,002$	$0,02 \pm 0,002$

II.5 Validation in situ

II.5.1 Les POCIS comme outils intégratifs (Publication n°5)

Les POCIS ont été exposées dans un réseau de piézomètre en Alsace (21 jours). En parallèle une caractérisation de l'eau par une approche classique (prélèvement ponctuel) a été réalisée. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 66. Bien qu'une contamination de la phase dissoute ait pu être mise en évidence par le prélèvement ponctuel (Figure 66), certaines classes de molécules telles que les antidépresseurs et les hypolipémiants n'ont pas pu être détectées en dépit de limites de détection inférieures au ng.l^{-1} . Au contraire, certaines de ces molécules (l'amitryptiline, le gemfibrozil, le diclofénac) ont pu être détectées et quantifiées dans la phase des POCIS (révélant ainsi leur présence dans les eaux de captage). Ainsi, les POCIS apparaissent comme de très bons outils de pré-diagnostic pour les études de monitoring, d'une part, par leur capacité à concentrer les substances dissoutes et d'autre part par leur capacité à discriminer les zones fortement impactées des zones «pristines».

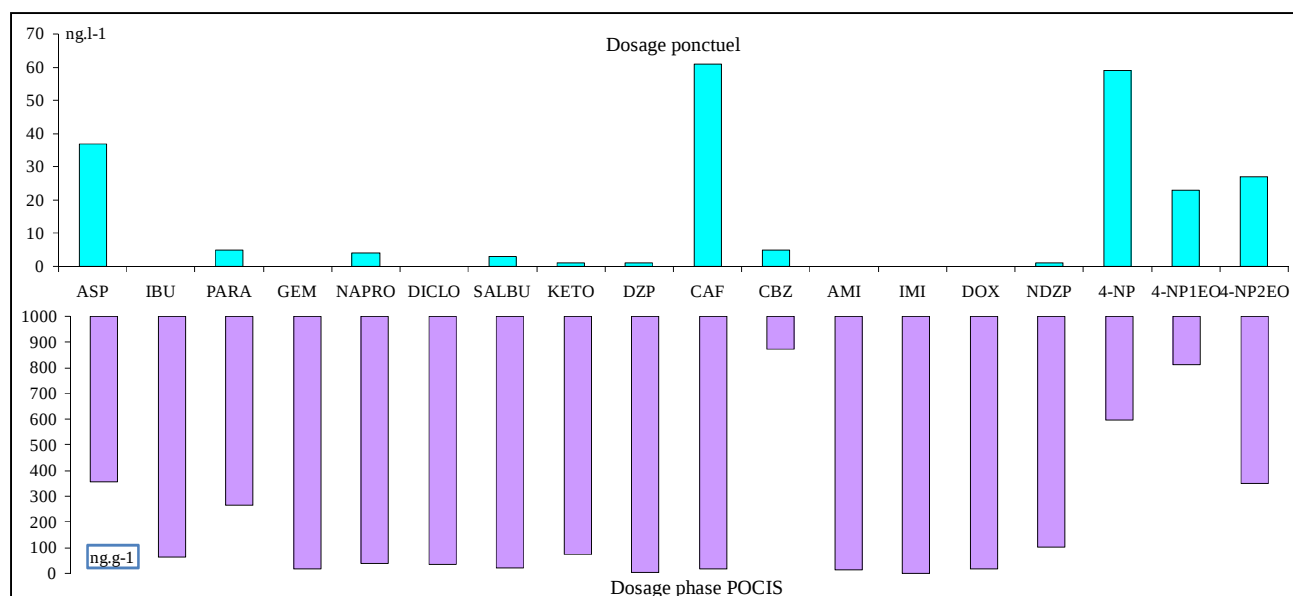


Figure 66 : Données de présence en substances pharmaceutiques et en métabolites d'APEO dans l'environnement. Cas d'un piézomètre dans la région de Merxheim.

- A) Données de présence dans la phase dissoute, exprimées en ng.l⁻¹
 B) Données de présence dans la phase de POCIS exposées pendant 21 jours, exprimées en ng.g⁻¹

II.5.2 Les POCIS comme outils quantitatifs

Les POCIS ont été exposées dans la jalles d'Eysines (durée de 14 jours). En parallèle, une caractérisation de l'eau par une approche classique (prélèvements ponctuels à T0, T2, T7, T9, T12, T14) a été réalisée. Les taux d'échantillonnage déterminés en laboratoire ont été appliqués aux POCIS exposés dans le milieu afin d'estimer une concentration intégrée dans le milieu.

Que ce soit pour les métabolites d'APEO (le 4-NP, le 4-NP1EC) ou pour les substances pharmaceutiques (la carbamazépine, la fluoxétine), une bonne adéquation est notable entre la concentration moyenne estimée à partir des 6 prélèvements ponctuels et celle déterminée par les POCIS exposées dans le milieu, indépendamment de la concentration dans le milieu (fluoxétine : 1-2 ng.l⁻¹, 4-NP1EC : 79-740 ng.l⁻¹) (Figure 67). Les observations confirment que la POCIS est un outil intégratif, ayant la capacité d'intégrer les variations du milieu, et un outil quantitatif.



Figure 67 : Comparaison des données obtenues par prélèvements ponctuels et échantillonnages intégratifs lors d'une étude de 14 jours au niveau de la Jalles d'Eysines.

La figure présente les valeurs obtenues lors des 6 échantillonnages ponctuels (histogrammes) ; la concentration moyenne estimée dans le milieu en se basant sur ces 6 mesures ponctuelles (e.g. CBZ moy.) ; la concentration moyenne estimée à partir de la POCIS exposée pendant les 14 jours de l'expérimentation (e.g. CBZ POCIS.)

II.5.3 Les POCIS comme outils quantitatifs, les limitations (Publication n°5)

Les études ont montré certaines limites comme se propose de le mettre en évidence la Figure 68 qui présente les valeurs obtenues par les 2 approches : classique (3 prélèvements moyennés 24 heures) et intégrative (POCIS exposée dans le milieu pendant 7 jours) au niveau d'un effluent de station d'épuration. Si les concentrations moyennes obtenues par les 2 mesures présentent une bonne adéquation dans le cas de la carbamazépine, il n'en est pas de même pour le 4-NP1EC pour lequel on observe une sous-estimation des concentrations estimées par la POCIS ou bien alors pour la fluoxétine et le 4-NP pour lesquels on observe une surestimation des concentrations estimées par la POCIS. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées, la première étant celle d'une altération de l'intégrité de la membrane de la POCIS qui pourrait d'une part affecter les taux d'échantillonnage et d'autre part permettre que certains phénomènes de dégradation se produisent (conduisant ainsi à une sous-estimation des concentrations dans le milieu). L'autre hypothèse réside dans la mauvaise détermination des taux d'échantillonnage lors des expérimentations en laboratoire. En effet, les mésocosmes d'expérimentation sont des systèmes peu complexes et stabilisés durant l'expérience: peu de turbulences, pas de matières en suspension, absence de composantes biologiques. Ces composantes, présentes dans les systèmes naturels, sont autant de facteurs qui peuvent affecter les taux d'échantillonnage.

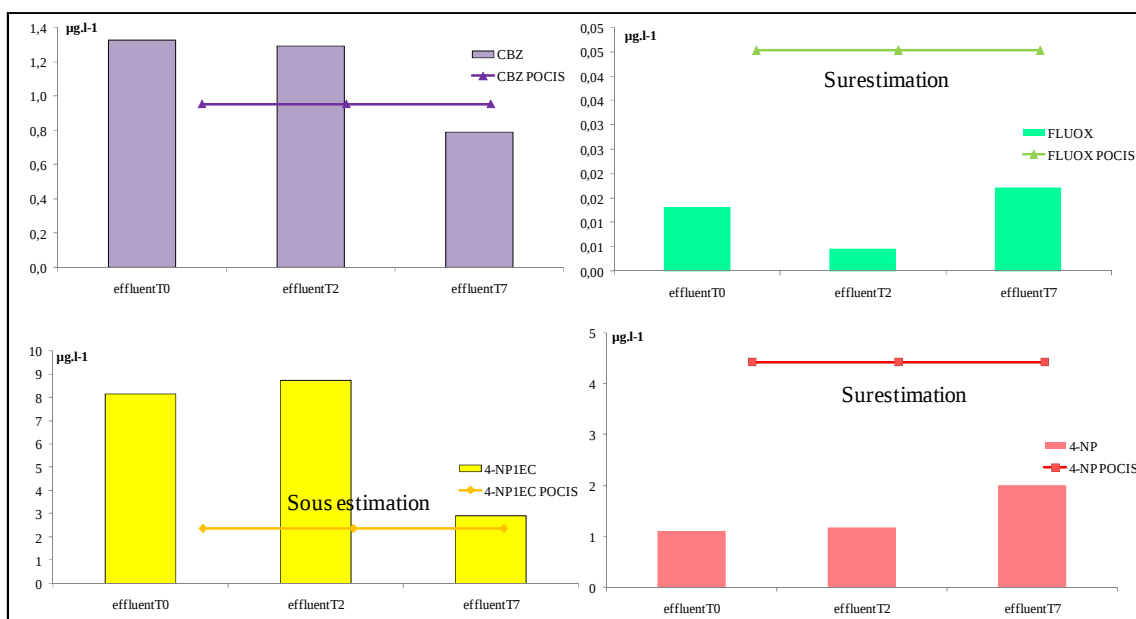


Figure 68 : Comparaison des données obtenues par prélèvements ponctuels et échantillonnages intégratifs lors d'une étude de 7 jours au niveau de la station d'épuration de Cantinolle (jalle d'Eysines). La figure présente les valeurs obtenues lors des 6 échantillonnages ponctuels (histogrammes); la concentration moyenne estimée à partir de la POCIS exposée pendant les 14 jours de l'expérimentation (e.g. CBZ POCIS.)

A titre d'exemple, la Figure 69 illustre l'effet de l'un de ces paramètres sur l'échantillonnage. Cette figure présente les concentrations en métabolites d'APEO et en substances pharmaceutiques mesurées, après 7 jours d'exposition à une eau traitée de station d'épuration, dans des POCIS exposées d'une part dans une zone sans turbulence (bâche) et d'autre part dans une zone de forte turbulence (canal). Bien que les POCIS aient été exposées au même milieu (même concentration de substances dans la phase aqueuse), il apparaît que les concentrations en composés d'intérêt diffèrent significativement d'un facteur 2 à 3 entre les 2 sites d'exposition, avec des concentrations plus fortes pour le site le plus turbulent. Ainsi, les taux d'échantillonnage de chaque molécule apparaissent affectés par les facteurs de turbulence de l'eau (vitesse, agitation) (Togola et Budzinski, 2007, Mac Leod et al, 2006 ; Arditoglou et Vousta, 2008).

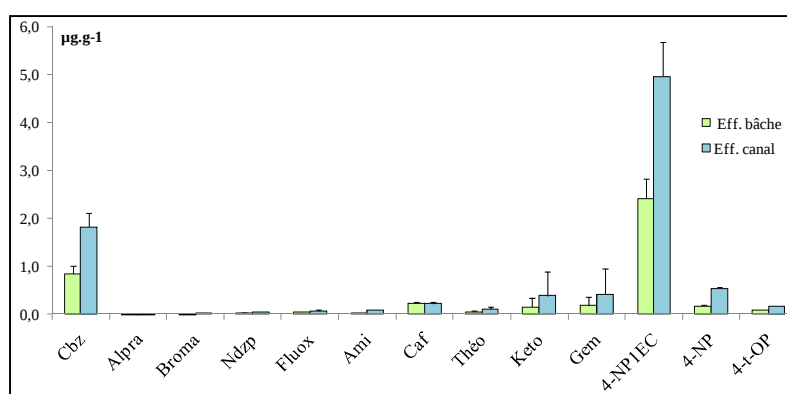


Figure 69 : Concentrations en métabolites d'APEO et en substances pharmaceutiques dans les POCIS exposées à une eau traitée (pendant une période de 7 jours, n=3).

A ce stade, les POCIS, par leur capacité à fournir des données intégratives et à discriminer les écosystèmes selon les pressions qu'ils subissent, apparaissent comme d'excellents outils de pré-monitoring capables d'évaluer l'évolution de l'état de contamination chimique d'un milieu. Même si certaines limites demeurent quant à leur capacité à donner des mesures quantitatives, il est à noter que l'amplitude des variations n'excède pas un facteur 5 et que les ordres de grandeurs de contamination sont respectés. Leur facilité de déploiement, d'extraction et d'analyse en font un outil de choix pour les organismes de surveillance.

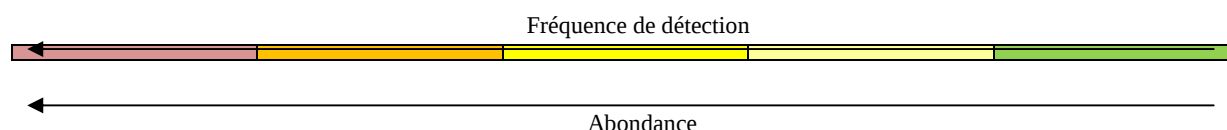
III Présence et devenir des alkylphénol-polyéthoxylés et des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration (Publication n°4)

III.1 Caractérisation des eaux brutes

III.1.1 Remarques générales

Tableau 42 : Données de présence des 25 molécules étudiées dans la phase dissoute des eaux brutes, au niveau de 7 stations d'épuration.

		Min ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Max ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Fréquence de détection
AINS, Analgésiques	Ibu	1,68	16,6	100%
	Para	54,77	324,95	100%
	Asp	1,46	382,28	100%
	Diclo	0,062	2,59	100%
Stimulants	Caf	2,8	6,1	100%
	Théo	6,97	19,66	100%
Antidépresseurs, Anxiolytiques	Cbz	0,17	1,27	100%
	Dzp	0,001	0,07	100%
	Ndzp	0,007	0,035	100%
	Alpra	nd	0,002	6%
	Broma	0,004	0,29	100%
	Fluox	0,001	0,046	100%
	Ami	0,027	0,65	100%
	Doxe	nd	0,03	82%
	Imi	nd	0,023	88%
Hypolipémiant	Gemf	0,36	3,36	100%
Bronchodilatateurs	Clenbu	nd	0,01	41%
	Salbu	nd	0,032	88%
	Terbu	nd	0,019	82%
APEO	4-NP	0,685	15,784	100%
	4-t-OP	nd	16,057	71%
	4-NP ₁ EO	0,285	12,716	100%
	4-NP ₂ EO	0,139	2,323	100%
	4-NP ₁ EC	0	10,102	82%



De manière générale, une généralisation de la contamination des eaux d'entrées de station d'épuration a été mise en évidence (Tableau 42). A l'exception de quelques molécules qui sont présentes à des fréquences inférieures à 50 % (l'alprazolam et le clenbutérol), l'ensemble des autres

molécules étudiées sont présentes à des fréquences supérieures à 50 %. 16 d'entre elles ont été détectées et quantifiées dans l'ensemble des STEP étudiées. Selon les molécules, les données de présence sont extrêmement variables : du ng.l^{-1} pour l'alprazolam ou la fluoxétine à plusieurs centaines de $\mu\text{g.l}^{-1}$ pour l'aspirine ou le paracétamol. De même, pour une même molécule, la variabilité intersites apparaît comme significative. Ainsi, à titre d'exemple, il est notable que les concentrations mesurées varient de $1,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ à plus de $382 \mu\text{g.l}^{-1}$ pour l'aspirine, de $0,6 \mu\text{g.l}^{-1}$ à $15,8 \mu\text{g.l}^{-1}$ pour le 4-NP.

III.1.2 Tendances concernant la présence des métabolites d'APEO dans les eaux brutes

Comme cela a pu être évoqué dans le paragraphe précédent, une importante variabilité des apports entre STEP a pu être observée. Les eaux d'entrée des STEP SE-1, SE-2 et SE-3 apparaissent significativement plus contaminées que celles des eaux des STEP CA-1, CA-2, CA-3 et SE-4 (Figure 70). Bien que SE-1 soit localisée en zone périurbaine, elle traite les rejets d'une raffinerie dont les processus mettent en œuvre l'usage d'APEO. Les stations SE-2 et SE-3, pour leur part, traitent de nombreux rejets industriels qui mettent en jeu l'usage d'APEO (les industries agro-alimentaires, l'industrie chimique) et des lixiviats. Les stations CA-1 et CA-2 sont des petites stations d'épuration localisées dans des zones périurbaines qui traitent quasi exclusivement des eaux domestiques. Les stations CA-3 et SE-4, bien qu'étant localisées dans des zones fortement urbanisées auxquelles est associé un tissu industriel diffus, traitent quasi exclusivement des eaux domestiques et quelques rejets industriels (RSDE, 2007).

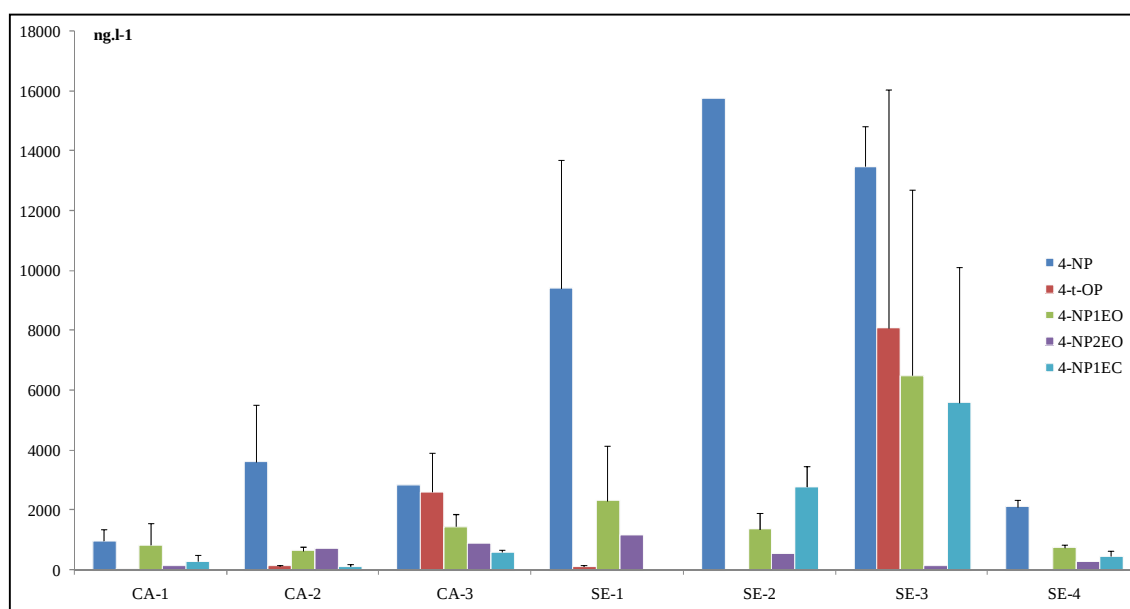


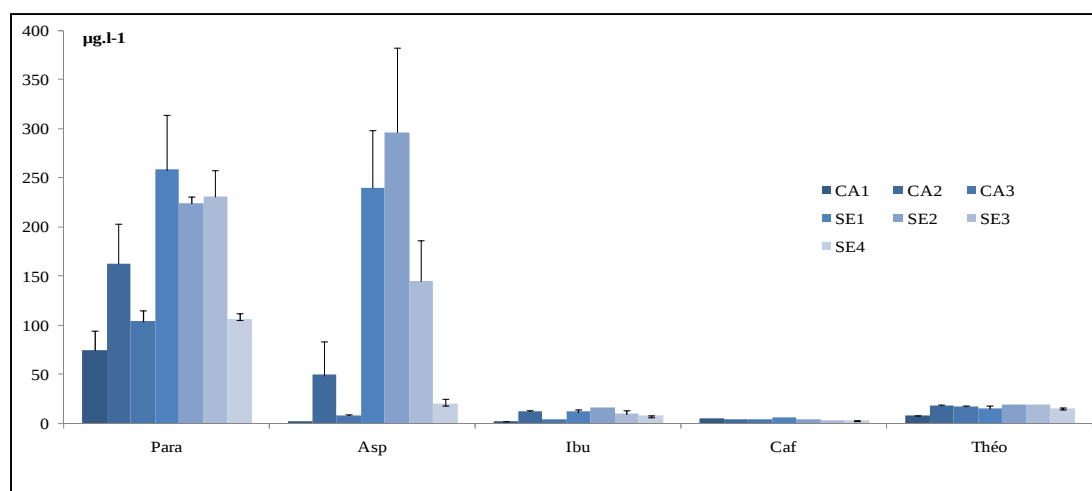
Figure 70 : Données de présence des métabolites d'APEO dans la phase dissoute des eaux brutes (phase dissoute, ng.l^{-1}).

Pour résumer, il apparaît que les usages domestiques sont responsables d'un apport chronique d'APEO aux stations d'épuration, la composante majoritaire et discriminante apparaissant

être les usages industriels. En France, les usages d'APEO dans les applications industrielles et domestiques semblent courants bien qu'une restriction d'usages et de mise sur le marché soit entrée en application depuis le 17 janvier 2005 (restriction d'usages pour un certain nombre d'applications, moins de 0,1 % en masse du produit). Les démarches de substitution de ces produits semblent être encore inachevées.

III.1.3 Tendances concernant la présence des substances pharmaceutiques dans les eaux brutes

Une importante discrimination et variabilité dans les apports de substances pharmaceutiques a pu être mise en évidence (Figure 71). Le paracétamol, l'aspirine, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (l'ibuprofène), la caféine et la théophylline sont quantifiés dans des concentrations très largement supérieures au $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figure 71a). Ces molécules sont les composantes actives de médicaments ne nécessitant pas de prescriptions médicales et qui sont parmi les plus vendus (en quantité) en France. Par opposition, les composantes actives de médicaments nécessitant des prescriptions médicales tels que les antidépresseurs (la fluoxétine, le nordiazépam, l'amitryptiline), certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (le diclofénac) et les hypolipémiants (le gemfibrozil) sont quantifiés à des concentrations inférieures à la centaine de ng.l^{-1} (Figure 71b). Les molécules suivies dans cette étude sont d'usages courants et n'ont pas permis de discriminer les STEP qui traitent des effluents hospitaliers.



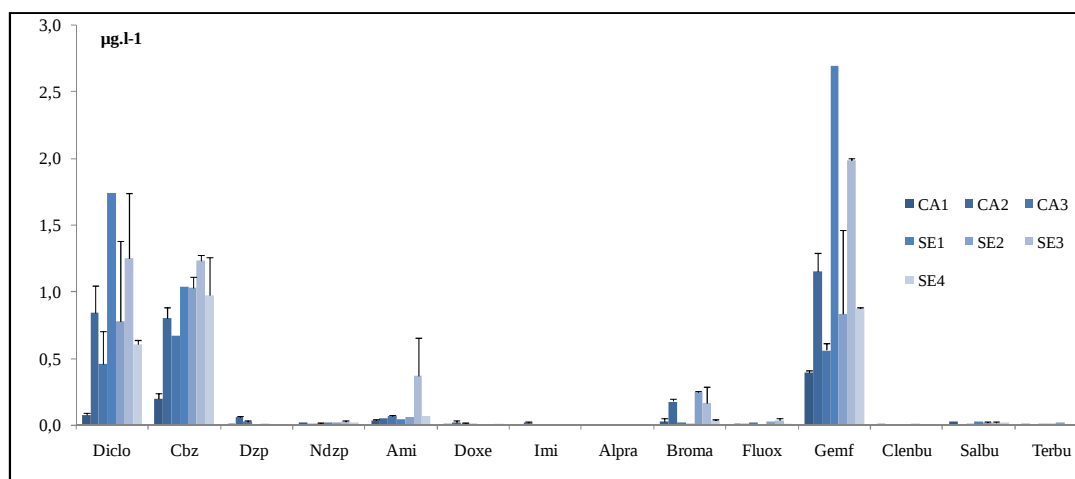


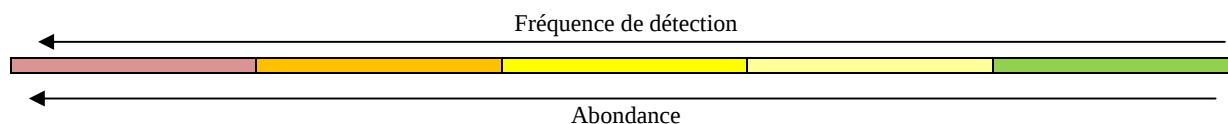
Figure 71 : Données de présence des substances pharmaceutiques dans la phase dissoute des eaux brutes (phase dissoute, $\mu\text{g.l}^{-1}$).

III.2 Caractérisation des eaux traitées de station d'épuration

Tout d'abord, il a pu être observé une contamination généralisée des eaux traitées par les 2 classes de molécules sélectionnées (Tableau 43). Que ce soit en termes de fréquence de détection ou d'abondance, les effluents sont dominés par les métabolites de NPEO qui sont quantifiés à des concentrations pouvant être supérieures au $\mu\text{g.l}^{-1}$ ainsi que par la carbamazépine, le gemfibrozil et le diclofénac qui sont également quantifiés à des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Togola et al., 2008 ; Baugros et al., 2008). Bien qu'elles soient quantifiées à des concentrations inférieures à la centaine de ng.l^{-1} , la présence généralisée de molécules de types antidépresseurs et anxiolytiques dans les eaux traitées est notable (concentration moyenne de 28 ng.l^{-1} pour l'amitryptiline, 19 ng.l^{-1} pour le nordiazépam). A la différence des eaux brutes, la variabilité des abondances mise en évidence dans les rejets de STEP, de moindre amplitude, semble conditionnée par l'efficacité des processus d'épuration des eaux mis en jeu en leur sein et non pas par la typologie des eaux traitées. Ainsi, les deux classes de molécules étudiées : les détergents et les substances pharmaceutiques apparaissent comme deux classes de contaminants prioritaires pour l'environnement au regard de leur ubiquité dans les eaux traitées, à l'échelle du territoire français.

Tableau 43 : Données de présence des 25 molécules étudiées dans la phase dissoute des eaux traitées, au niveau de 7 stations d'épuration.

		Min ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Max ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Moyenne ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Médiane ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Fréquence de détection
AINS, analgésiques	Ibu	nd	0,9	0,183	0,124	83%
	Para	0,014	2,1	0,181	0,077	100%
	Asp	nd	0,78	0,242	0,13	89%
	Diclo	0,06	1,51	0,823	0,92	100%
Stimulants	Caf	0,009	0,8	0,201	0,089	100%
	Théo	0,026	0,81	0,23	0,125	100%
Antidépresseurs, anxiolytiques	Cbz	0,16	1,73	0,857	0,9	100%
	Dzp	0,001	0,09	0,014	0,004	100%
	Ndzp	0,001	0,036	0,019	0,019	100%
	Alpra	nd	0,024	0,004	0,003	72%
	Broma	nd	0,065	0,014	0,012	94%
	Fluox	0,002	0,034	0,012	0,009	100%
	Ami	0,015	0,058	0,028	0,028	100%
	Doxe	nd	0,015	0,004	0,003	78%
	Imi	nd	0,002	0,001	0	44%
Hypolipémiant	Gemf	0,015	0,52	0,202	0,154	100%
Bronchodilatateurs	Clenbu	nd	0,002	0,001	0	39%
	Salbu	nd	0,024	0,013	0,013	94%
	Terbu	nd	0,017	0,006	0,004	89%



III.3 Devenir des APEO et des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration

III.3.1 Bilan d'abattement global

Les 7 stations d'épuration ont pour point commun de mettre en œuvre un processus de traitement biologique des eaux usées par boues activées. Deux tendances ont pu être observées dans le devenir des molécules au cours des processus de traitement des eaux usées.

Un certain nombre de molécules sont éliminées à des rendements élevés quelque soit la configuration mise en œuvre (rendements d'abattelements supérieurs à 99 % pour le paracétamol, compris entre 92 % et 99 % pour l'aspirine, entre 95 % et 99 % pour l'ibuprofène, entre 87 % et 99 % pour la caféine et la théophylline ; Figure 72). Bien qu'elles soient dégradées dans les STEP, les rendements d'abattelements pour les molécules telles que le gemfibrozil, le bromazéпам, le 4-NP ou le 4-NP1EO sont plus variables compris entre 65 % et 99 % pour le 4-NP, 65 % et 99 % pour le 4-NP1EO, 55 % et 98 % pour le gemfibrozil. Les phénomènes qui concourent à cette variabilité ne sont pas encore connus et nécessiteront de plus amples investigations, notamment par modélisation (Teske et al., 2008 ; Miège et al., 2008).

En opposition à ces molécules qui sont dégradées au cours des processus de dégradation, il est notable qu'un certain nombre d'entre elles traversent les processus sans être affectées par les traitements mettant en jeu des boues activées (Figure 73). Ainsi des molécules telles que la

carbamazépine, le nordiazépam, le diclofénac présentent des taux d'abattement inférieurs à 10 % voir même négatifs ce qui implique qu'une partie des molécules est générée au cours du processus de traitement des eaux usées. Ces molécules apparaissent comme étant réfractaires aux processus de traitement par boues activées. Elles présentent pour caractéristique d'être excrétées en partie sous formes métabolisées conjuguées. Les phénomènes de clivage initiés durant l'acheminement des eaux brutes se poursuivent au cours du processus de traitement des eaux et conduisent à la libération de formes libres des substances considérées. D'autres molécules telles que le 4-NP1EC sont générées au cours du processus de dégradation. Les APEC et donc le 4-NP1EC, sont les métabolites de la biodégradation aérobie des APEO dont le siège est les boues activées (Figure 73). Ces résultats renforcent l'idée de la nécessité de considérer les métabolites de dégradation des APEO pour comprendre et évaluer les processus de traitements des eaux usées et que la considération seule du 4-NP conduit à une sous évaluation des risques liées aux rejets de ces composés vers les milieux.

Ces tendances globales, qui sont parmi les premières à exposer le devenir de molécules émergentes dans les stations d'épuration en France, sont cohérentes avec les données de la bibliographie (Revue par Soares, 2008 ; revue par Teske et Arnold, 2008 ; revue par Miège et al., 2008) et permettent d'affirmer l'inégalité des processus de traitements des eaux usées quant à leur efficacité à abattre les molécules organiques émergentes.

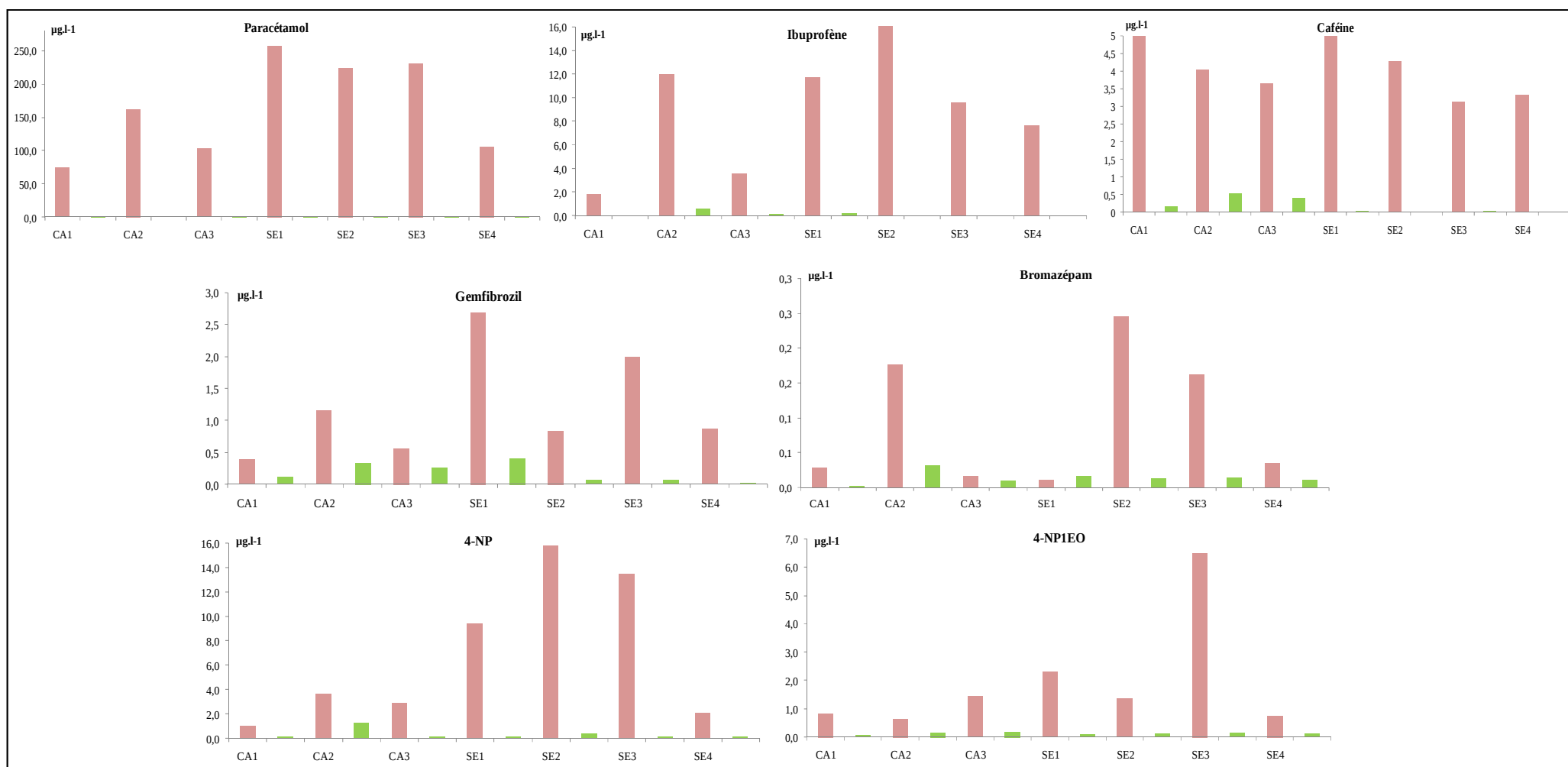


Figure 72 : Efficacité des STEP quant à l'abatement d'APEO et des substances pharmaceutiques Cas des molécules abattues.
La figure présente les concentrations entrantes () et sortantes () en molécules d'intérêt dans la phase dissoute ($\mu\text{g.l}^{-1}$)

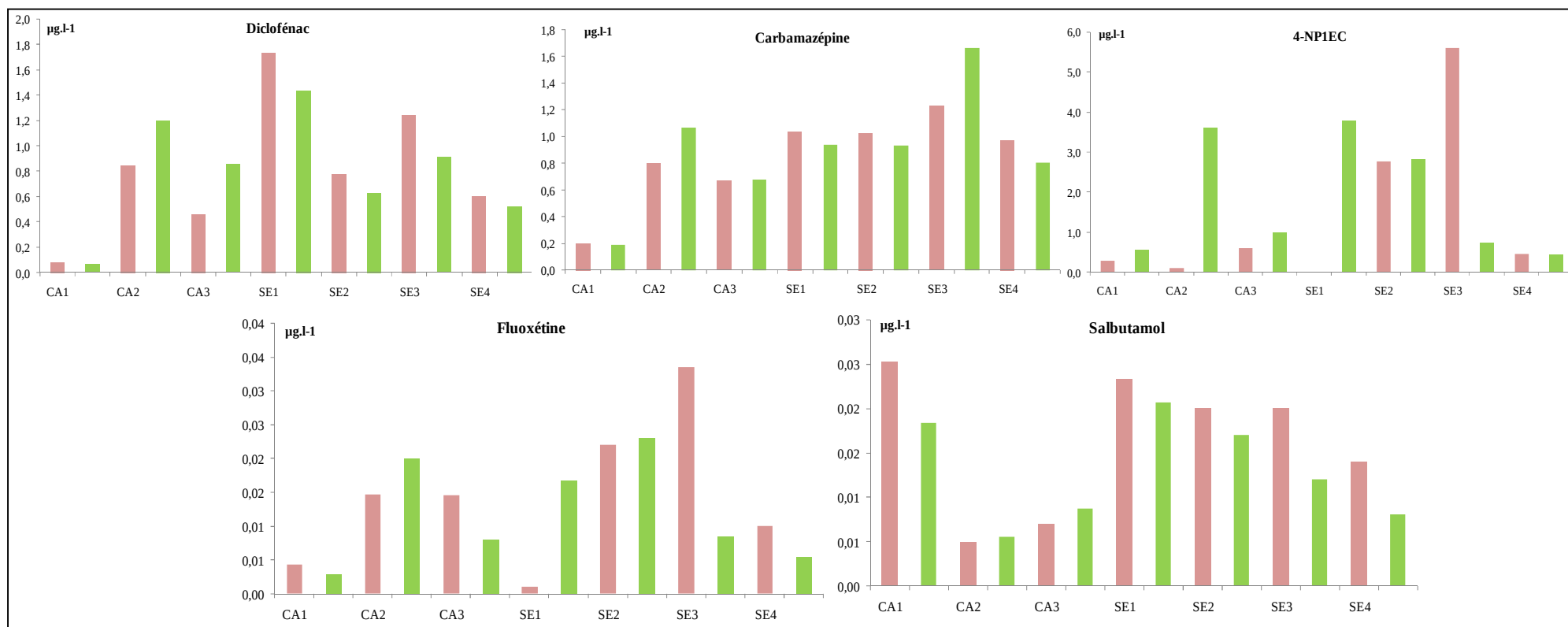


Figure 73 : Efficacité des STEP quant à l'abattement d'APEO et des substances pharmaceutiques. Cas des molécules réfractaires. La figure présente les concentrations entrantes () et sortantes () en molécules d'intérêt dans la phase dissoute ($\mu\text{g.l}^{-1}$).

III.3.2 Description du devenir des métabolites d'APEO et des substances pharmaceutiques au cours des processus

III.3.2.1 Efficacité des traitements primaires et secondaires

Les traitements primaires consistent en un abatement des matières en suspension par décantation. A l'exception de l'aspirine et du 4-NP pour lesquels un abatement respectif de 80 % et 58 % est observé, ce type de traitement apparaît comme peu efficace ($R < 30 \%$) pour abattre les substances organiques polaires ou semi-polaires (la carbamazépine, le diclofénac, le 4-NP1EO) présentes dans la phase aqueuse (Figure 74). C'est au sein de la phase de traitement biologique (secondaire) que les processus concourant à l'abatement des substances se déroulent (Figure 74). Si les taux d'abatement sont supérieurs à 90 % pour un certain nombre de molécules (l'aspirine, le paracétamol, l'ibuprofène, le 4-NP, le 4-NP1EO) (Teske et al., 2008), un certain nombre de molécules apparaissent comme réfractaires aux processus de dégradation mis en jeu au cours des traitements par boues activées (10 % pour la carbamazépine, 36 % pour le diclofénac) (Leclercq et al., 2008 ; Zhang et al., 2008).

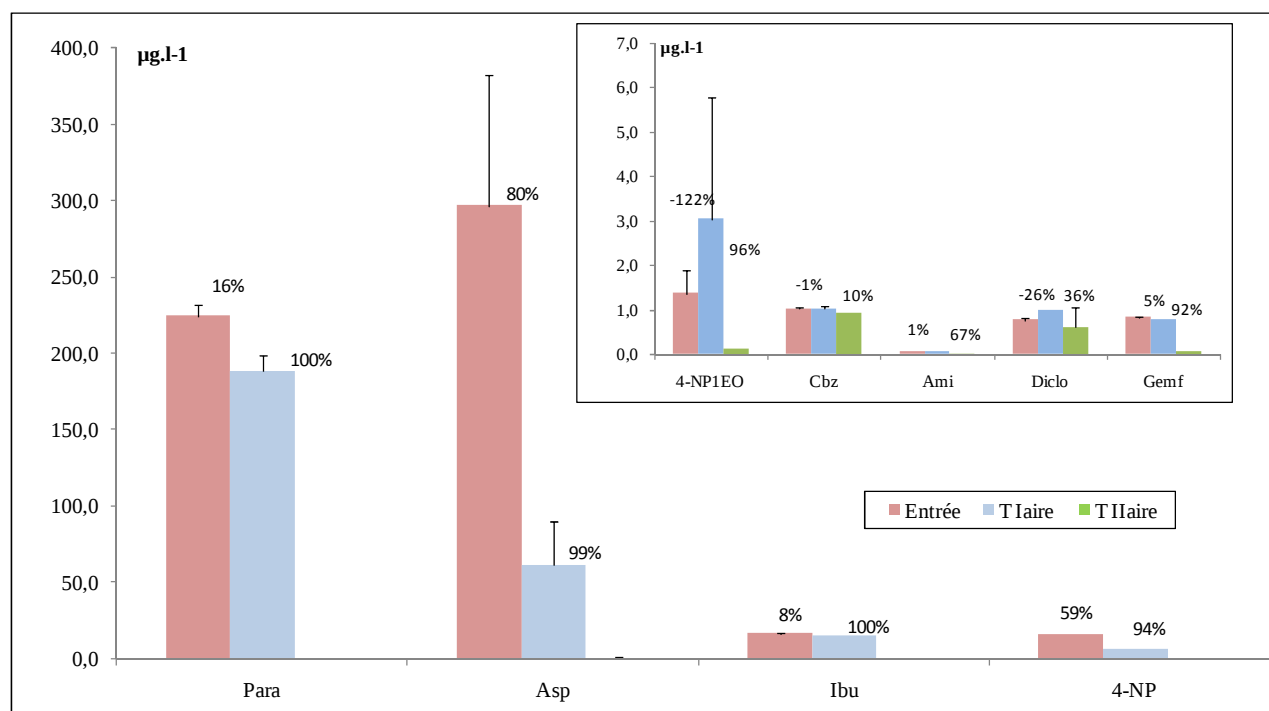


Figure 74 : Devenir de substances pharmaceutiques et des métabolites d'APEO au cours de processus de traitements I^{aire} et II^{aire}. Données de présence dans la phase dissoute (µg.l⁻¹) et rendements d'abatement pour chaque étape de la filière de traitement des eaux. (Rendement de la phase de traitement I^{aire} = $([Entrée] - [T I^{aire}]) / [Entrée]$; Rendement de la phase de traitement II^{aire} = $([T I^{aire}] - [T II^{aire}]) / [T I^{aire}]$).

III.3.2.2 Efficacité des traitements tertiaires

L'ajout de traitements tertiaires se généralise dans les processus de traitement des eaux, ce sont des traitements complémentaires qui permettent d'obtenir une qualité supérieure des eaux rejetées (diminution des matières en suspension, abatement de l'azote et du carbone) dans le milieu naturel

dans un but de protection du milieu naturel ou de réutilisation pour des applications industrielles ou agricoles. Pour les molécules les plus dégradables, l'abattement initié dans les processus de boues activées se poursuivent au cours des traitements tertiaires comme c'est le cas pour le paracétamol, la caféine ou l'ibuprofène (Figure 75). Concernant le 4-NP ou le 4-NP1EO, il n'est pas surprenant d'observer une augmentation des concentrations mesurées entre l'effluent biologique et l'effluent final (92 % pour le 4-NP). En effet, ces molécules sont les produits de biodégradation finaux des NPEO commerciaux. Le fait que leurs concentrations augmentent dans les effluents tertiaires dénote, de manière indirecte, un abattement global des APEO plus abouti. Comme le met en évidence la Figure 75, les molécules qui apparaissent comme réfractaires aux traitements biologiques par boues activées ne semblent pas significativement abattues par les traitements tertiaires étudiés (décanteur rapide) comme ceci est notable pour l'amitryptiline, le diclofénac ou la carbamazépine ($R < 30\%$).

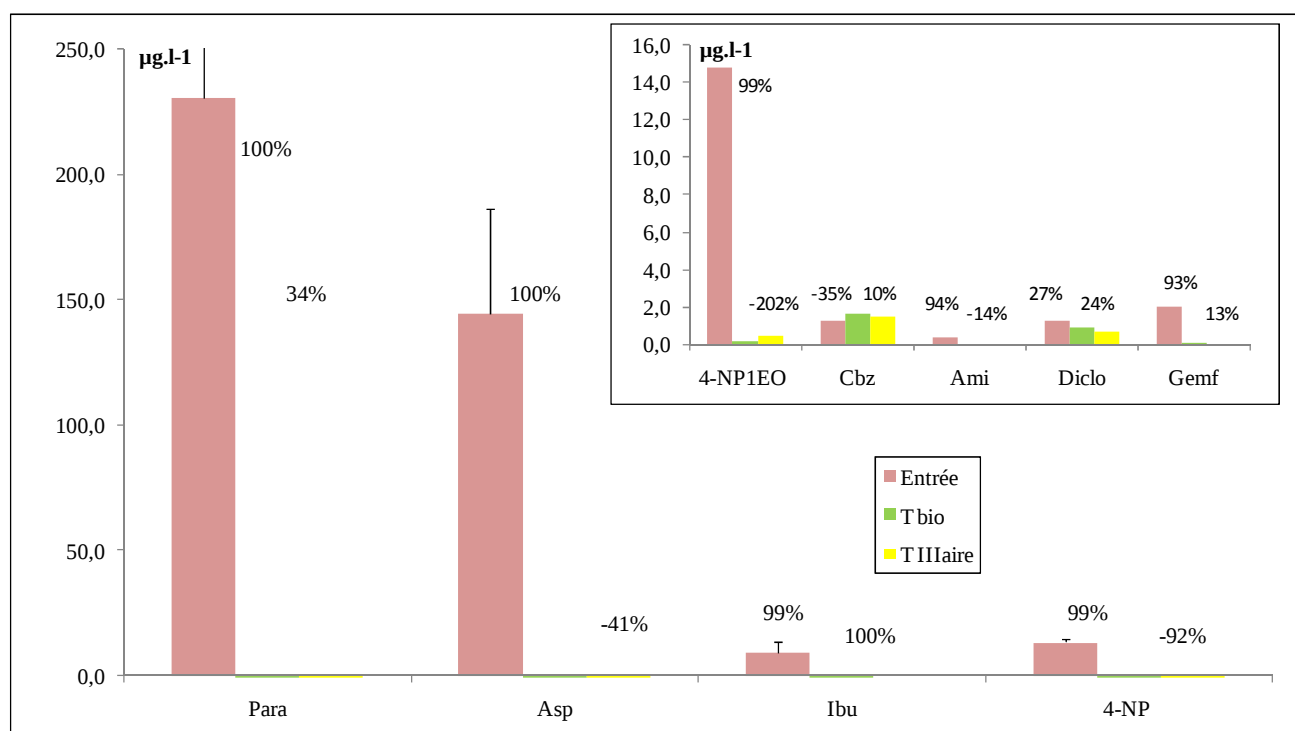


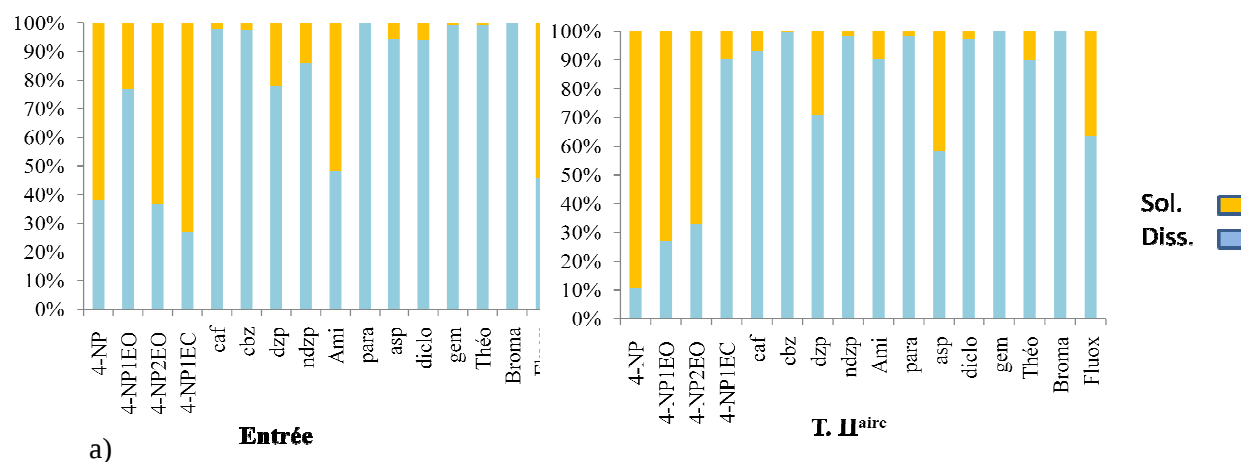
Figure 75 : Devenir de substances pharmaceutiques et des métabolites d'APEO au cours de processus de traitements des eaux usées. Données de présence dans la phase dissoute ($\mu\text{g.l}^{-1}$) et rendements d'abattement pour chaque étape de la filière de traitement des eaux. (Rendement de la phase de traitement Biologique = $([\text{entrée}] - [\text{T Bio}]) / [\text{entrée}]$) ; Rendement de la phase de traitement III^{aire} = $([\text{T Bio}] - [\text{T III}^{\text{aire}}]) / [\text{T Bio}]$).

Pour résumer, ces tendances semblent confirmer l'hypothèse les traitements tertiaires, dont le principe est d'appliquer un traitement agissant via d'autres mécanismes d'élimination, conduisent à l'amélioration de la qualité des effluents rejetés dans les milieux naturels pour les molécules d'APEO et les substances pharmaceutiques étudiées (Martin-Ruel et al., 2008 ; Teske et al., 2008 ; programme POSEIDON).

III.4 Rôle des phases solides en suspension

L'un des axes fort de ces travaux de recherche était la considération des phases solides en suspension et l'évaluation de leur rôle dans la contamination des phases aqueuses. Concernant les métabolites d'APEO, les observations ont pu mettre en évidence des valeurs de contamination comprises entre la dizaine de ng.g^{-1} et plusieurs dizaines de $\mu\text{g.g}^{-1}$ selon le métabolite considéré. En règle générale, une diminution de la contamination de la phase particulaire au fur et à mesure de l'avancement dans le processus de traitement est notable. Dans les eaux brutes, la part des phases solides dans la contamination des phases aqueuses peut atteindre de 20 à 80 % de la charge contaminante selon le métabolite considéré (Figure 76) (Koh et al., 2008). Dans les eaux traitées leur part est extrêmement variable : inférieure à 10% pour le 4-NP1EC qui est le métabolite le plus polaire, mais peut atteindre 90 % pour le 4-NP (composé hydrophobe) dans le cas de SE-1. Néanmoins, il peut-être considéré, qu'en règle générale, la charge contaminante en métabolites d'APEO portée par les phases solides est abattue au cours des processus de traitements des eaux. L'essentiel de cette dégradation semble se dérouler au cours du processus de traitement biologique des eaux (Figure 76 a), les processus de décantation primaire apparaissant comme modérément efficaces (Figure 76 b) (Koh et al., 2008).

Même si certaines molécules pharmaceutiques (la caféine, l'aspirine, le kétoprofène) peuvent être quantifiées dans des concentrations supérieures au $\mu\text{g.g}^{-1}$ dans les entrées de STEP, les concentrations mesurées sont dans la plupart des cas inférieures à la centaine de ng.g^{-1} . Certaines molécules telles que le salbutamol, le clenbutérol, la terbutaline sont systématiquement en dessous des limites de détection. A l'exception de certains antidépresseurs (l'amitryptiline, la fluoxétine, le nordiazépam) dont près de 50 % de la charge contaminante peut être amenée par les phases solides dans les eaux brutes ou les eaux traitées, il apparaît que pour la grande majorité des substances pharmaceutiques, les phases solides en suspension apparaissent comme de faibles vecteurs de contamination (<10%) par comparaison aux phases dissoutes (Figure 76).



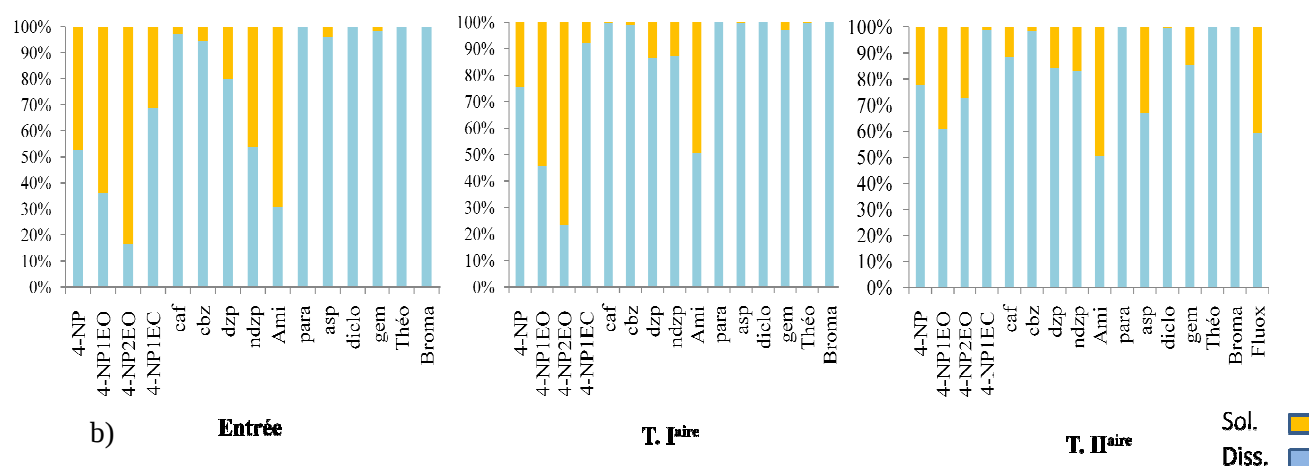


Figure 76 : Part de chacune des phases (solides et dissoutes) dans la contamination des phases aqueuses, évolution au cours des processus de traitements des eaux.

a) Part de chacune des phases dans les eaux brutes et traitées au niveau de SE-1 ; b) Part de chacune des phases dans les eaux brutes, eaux décantées et eaux traitées au niveau de SE-2.

III.5 Données de présence des métabolites d'APEO et des substances pharmaceutiques dans les boues issues des processus de traitement des eaux usées

Les dosages qui ont été conduits au niveau des filières boues ont permis de mettre en évidence une contamination chronique des boues issues des processus de traitement des eaux usées à la fois par les métabolites d'APEO et par les substances pharmaceutiques (Figure 77). Une importante discrimination entre la contamination des boues par les métabolites d'APEO et les substances pharmaceutiques est mise en évidence. Les métabolites d'APEO sont présents à des concentrations moyennes de 1 mg.l^{-1} selon le composé considéré : le 4-NP1EO apparaissant le plus abondant avec une concentration moyenne mesurée égale à $1902 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$, devant le 4-NP (concentration moyenne de $896 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$) et le 4-NP1EC (concentration moyenne de $1842 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$) (Ghanem et al., 2007 ; Ballesteros et al., 2006). Ces résultats semblent également suggérer l'existence de différents mécanismes de sorption : des interactions de type hydrophobe pour le 4-NP1EO et le 4-NP, d'autres types d'interactions pour le 4-NP1EC notamment des interactions de type électrostatique entre la molécule et la paroi bactérienne (bactéries présentes dans les boues activées). Une grande variabilité des concentrations mesurées a également été observée et semble liée au profil de contamination des eaux d'entrée. En effet, les STEP SE-1, SE-2, SE-3 qui présentaient les niveaux de contamination les plus importants dans les eaux d'entrée sont également celles qui montrent les niveaux de contamination les plus importants dans les boues finales.

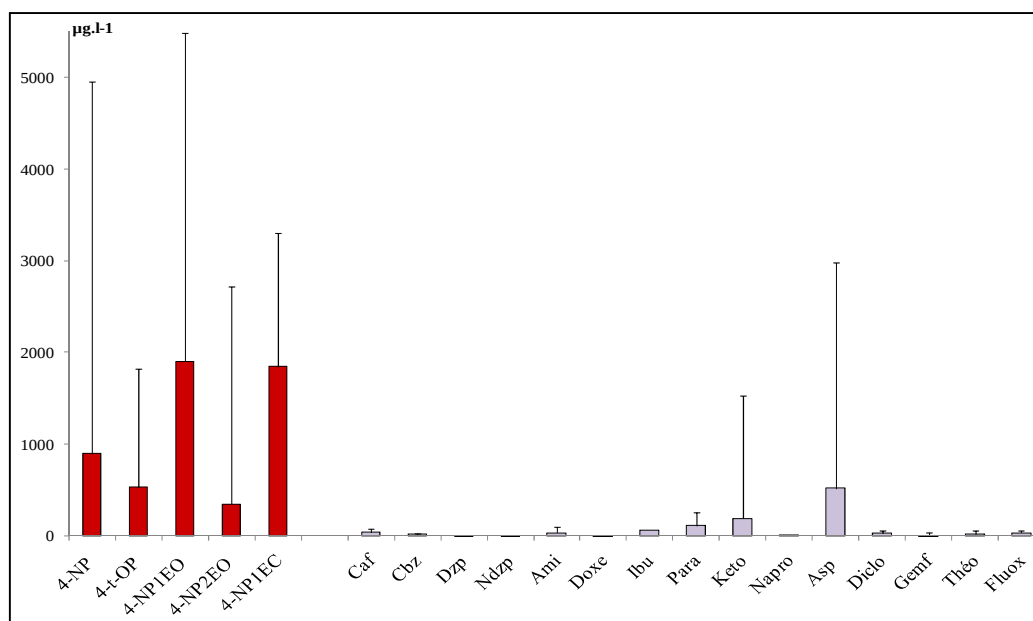


Figure 77 : Données de présence des métabolites d'APEO et des substances pharmaceutiques dans les boues de station d'épuration (7 stations d'épuration, concentrations moyennes $\pm$ RSD $\mu\text{g.l}^{-1}$).

A l'exception de l'aspirine et du kétoprofène qui sont quantifiés dans des concentrations supérieures à la centaine de $\mu\text{g.l}^{-1}$, les autres molécules pharmaceutiques sont présentes dans des concentrations nettement inférieures : de l'ordre du $\mu\text{g.l}^{-1}$ pour les antidépresseurs, de la dizaine de $\mu\text{g.l}^{-1}$ pour la caféine ou bien la carbamazépine. Ces tendances sont cohérentes avec le caractère polaire des molécules étudiées (Beausse et al., 2004). De plus, comme cela a été montré pour le 4-NP1EC, la présence de certaines molécules pharmaceutiques dans des concentrations significatives pourraient être induite par d'autres types d'interactions que les interactions hydrophobes, comme par exemple des interactions de type électrostatiques (EAWAG). De plus, on ne peut exclure que la présence des tensioactifs, notamment des APEO, dans des concentrations importantes, puissent favoriser les phénomènes de sorption via leur caractère amphiphile.

Au regard des usages des boues issues des processus de traitements des eaux en France, avec plus de 60% d'entre elles valorisées par des usages agricoles (IFEN), la contamination des boues ultimes par les métabolites d'APEO et les substances pharmaceutiques pose la question de l'impact de cette valorisation pour l'environnement, notamment au travers des apports vers les eaux de surface par les phénomènes de ruissellement et de lessivage des terres agricoles, au travers des risques associés à la contamination de la ressource en eau *via* les processus de percolation des eaux, et enfin au travers des risques liés aux transferts sols-plantes.

L'ensemble des résultats et tendances observés pour les alkylphénol-polyéthoxylés a fait l'objet d'une publication (publication n°4).

IV L'estuaire de Seine : un écosystème sous pression, le bilan de 6 années d'étude

Les principaux objectifs de ce paragraphe sont de présenter les résultats obtenus dans le cadre du programme de recherche Seine-Aval, de 2002 à 2006, au travers d'une synthèse des principaux faits et conclusions acquis durant ces 5 années de monitoring.

IV.1 Programme de recherche : le Programme SEINE AVAL

Le programme Seine aval est un programme de recherche scientifique intégrée mis en place en 1995 pour comprendre l'origine des principales problématiques de l'estuaire de Seine : l'évolution géomorphologique du système, la contamination des eaux (chimique, (micro)biologique,...), les dysfonctionnements aquatiques (conditions physico-chimiques,...) ainsi que leurs évolutions et leurs impacts écologiques et socio-économique.

Les travaux de recherche conduits dans le cadre de cette thèse portaient sur l'étude de la contamination chimique des eaux de l'estuaire de Seine par les détergents alkylphénol-polyéthoxylés et leurs métabolites de dégradation. Cinq années de monitoring de l'estuaire de Seine ont permis l'acquisition de données concernant les sources, la présence et le devenir des APEO et de leurs métabolites dans le système estuarien.

IV.2 Les Sources d'APEO en estuaire de Seine

Au niveau de l'estuaire de Seine, les efforts de recherche se sont cantonnés à 3 sources principales : les STEP au travers de l'étude des effluents de 3 stations d'épuration, les 9 principaux tributaires et la Seine à son point d'entrée dans l'estuaire.

IV.2.1 Les Stations d'épuration (Publication n°6, Publication n°7)

IV.2.1.1 Données de présence dans les effluents

Cinq années de monitoring ont permis de mettre en évidence une contamination chronique des effluents de stations d'épuration de l'estuaire de Seine par les métabolites d'APEO (Tableau 44). Les phases dissoutes présentent une distribution des métabolites caractéristique des effluents de STEP utilisant des traitements secondaires biologiques avec le NP1EC composé majoritaire devant le 4-NP et les formes éthoxylées 4-NP₁₋₂EO. Les concentrations mesurées sont comprises entre la dizaine de ng.l⁻¹ et la dizaine de µg.l⁻¹ (39-627 ng.l⁻¹ pour le 4-NP, 307-11637 ng.l⁻¹ pour le 4-NP₁EC, 16-1168 ng.l⁻¹ pour les 4-NP₁₋₂EO) quels que soient le composé et la STEP considérés. Au contraire, dans les phases solides, une distribution radicalement différente est remarquable. Les formes éthoxylées et le 4-NP sont plus abondantes que les acides NP1EC. Là encore, des concentrations importantes en métabolites sont mesurées dans les phases solides quels que soient le composé et la STEP considérés. Elles sont comprises entre la centaine de ng.g⁻¹ et plusieurs dizaines de µg.g⁻¹ (508-23047 ng.g⁻¹ pour le 4-NP, 1134-30751 ng.g⁻¹ pour le 4-NP₁₋₂EO, 570-19556 ng.g⁻¹ pour le 4-NP₁EC). Dans le cas des

métabolites d'APEO la part de la phase solide dans la contamination des effluents peut atteindre 70 % de la pollution rejetée dans le milieu. Pour une même station d'épuration, il peut être observé des variations des concentrations en métabolites, que ce soit dans la phase dissoute ou la phase particulaire, qui peuvent atteindre un facteur 10.

Tableau 44 : Données de présence en métabolites d'APEO dans les effluents de station d'épuration dans les phases dissoutes et les phases solides (2002-2006).

Phases dissoutes					
ng.l ⁻¹		C° max	C° min	C° moyenne	RSD
STP ELBEUF	4-NP ₁₋₂ EO	1168	47	364	361
	4-NP ₁ EC	11637	580	2848	3531
	4-NP	576	81	255	171
STP EMERAUDE	4-NP ₁₋₂ EO	1121	200	519	263
	4-NP ₁ EC	6138	800	3352	1840
	4-NP	627	39	301	173
STP TANCARVILLE	4-NP ₁₋₂ EO	497	16	134	165
	4-NP ₁ EC	7384	307	2078	2304
	4-NP	480	59	200	140
Phases solides					
ng.g ⁻¹		C° max	C° min	C° moyenne	RSD
STP ELBEUF	4-NP ₁₋₂ EO	30751	1134	11979	9410
	4-NP ₁ EC	19556	1370	7010	5936
	4-NP	20599	2070	8686	5850
STP EMERAUDE	4-NP ₁₋₂ EO	25745	1197	10946	7874
	4-NP ₁ EC	18014	570	7542	6078
	4-NP	15041	508	6009	4633
STP TANCARVILLE	4-NP ₁₋₂ EO	15518	1723	7456	4018
	4-NP ₁ EC	10902	3793	7172	2479
	4-NP	23047	2100	9084	5870

Concentrations minimales, maximales, moyennes mesurées dans les effluents au cours des 6 années d'étude dans les phases dissoutes (ng.l⁻¹) et solides (ng.g⁻¹)

IV.2.1.2 Tendances dans la présence des métabolites d'APEO dans les effluents

Les tendances observées au cours des 5 années de monitoring ont mis en évidence des dynamiques saisonnières de fonctionnement des STEP notamment pour le 4-NP₁EC (Tableau 44 et Figure 78) avec des concentrations maximales en été et des concentrations minimales en hiver. Deux paramètres clés semblent pouvoir expliquer ces observations : l'efficacité des phénomènes d'abattement est dépendante, d'une part, de la température (en effet les phénomènes de biodégradation sont thermo-dépendants (augmentation des concentrations en APEO à courte chaîne éthoxy et des APEC pour les mois les plus chauds)) et, d'autre part, du temps de résidence hydraulique dans les STEP qui conditionne les phénomènes de dégradation et de sorption. Cette étude permet également de mettre en évidence que, bien qu'une restriction d'usages soit entrée en application depuis le 17 janvier 2005, elle ne semble pas pour autant se traduire par une diminution des rejets en APEO dans le milieu.

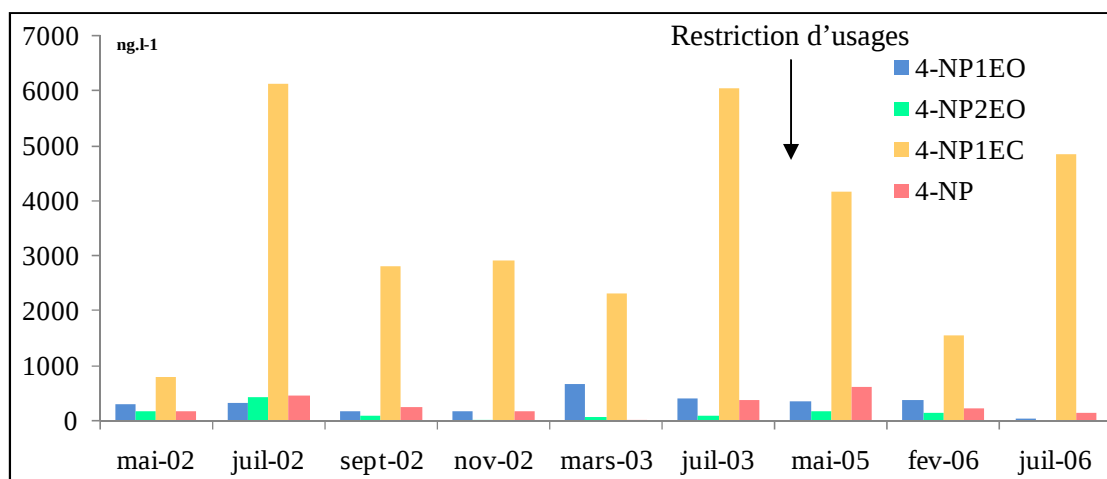


Figure 78 : Tendances saisonnières dans la distribution et la présence des principaux métabolites d'APEO au niveau de l'effluent de la station d'épuration de Rouen (2002-2006).

IV.2.2 Les principaux tributaires (Publication n°7)

IV.2.2.1 Données de présence dans les phases dissoutes

On note tout d'abord une contamination chronique et généralisée du bassin versant de l'estuaire de Seine par les alkylphénol-polyéthoxylés et leurs métabolites de biodégradation (Figure 79). Les mesures réalisées permettent de classer les tributaires en 2 classes.

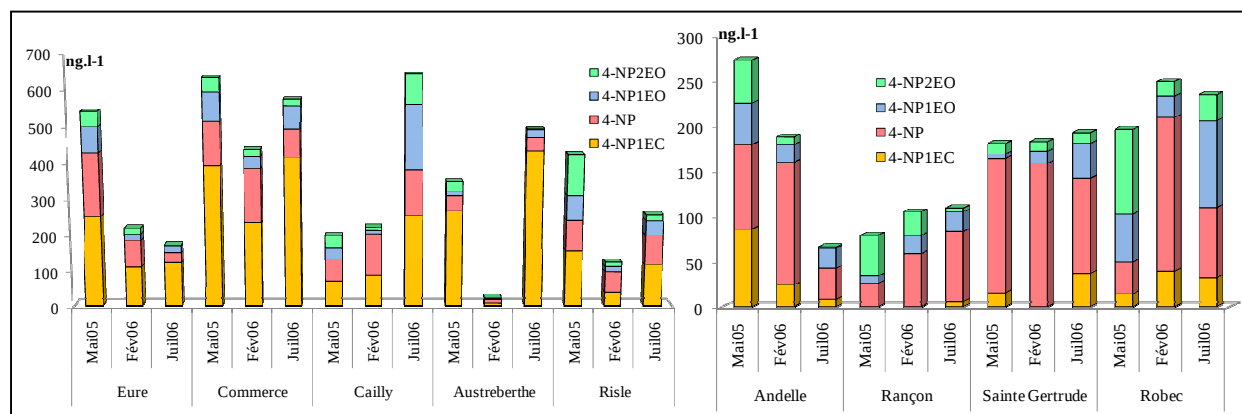


Figure 79 : Données de présence des métabolites d'APEO dans les affluents au cours des 3 campagnes.

Le Cailly, le Commerce, L'Eure, L'Austreberthe et La Risle présentent des profils de contamination élevés à modérés avec des concentrations en composés alkylphénoliques de l'ordre de la centaine de ng.l^{-1} . La distribution est caractéristique avec le 4-NP1EC composé majoritaire dans la phase dissoute quelle que soit la saison ; cette distribution est caractéristique des effluents de station d'épuration présentant des traitements secondaires biologiques qui sont généralisés sur les bassins versants des tributaires susnommés. Une importante variabilité des concentrations mesurées est également mise en évidence avec des amplitudes de contamination qui peuvent atteindre un facteur 10

(Austreberthe, février-juillet 2006). Les tendances observées semblent corrélées au fort degré d'anthropisation et d'industrialisation des bassins versants.

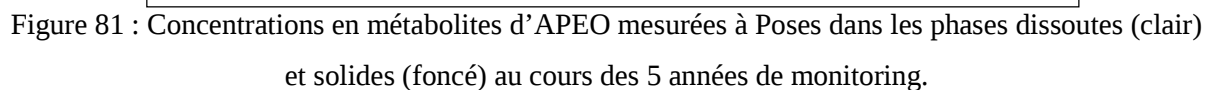
L'Andelle, Le Rançon, La Sainte-Gertrude et le Robec présentent des profils de contamination faibles à modérées avec des concentrations en composés alkylphénoliques comprises entre quelques dizaines et centaines de ng.l^{-1} . Par opposition au groupe précédemment exposé, les phases dissoutes sont dominées par le 4-NP devant les $\text{NP}_{1,2}\text{EO}$. Ces tributaires collectent les eaux de bassins versants plus ruraux présentant une anthropisation et industrialisation de leurs bassins versants plus faible. L'existence de sources de contamination situées en amont (et distantes) du point échantillonné ainsi que l'existence de phénomènes de dilution et/ou dégradation sont deux hypothèses qui peuvent être avancées. L'hypothèse de rejets diffus liés à des phénomènes de ruissellement (apports via les épandages agricoles de boues de stations d'épuration) peut également être émise.

L'évaluation du risque écotoxicologique induit par la présence d'une substance sur les organismes aquatiques peut être conduite par comparaison des valeurs mesurées dans le milieu à une valeur prédite sans effet (PNEC). Si le rapport est supérieur à 1 des effets sont susceptibles de se dérouler dans les milieux. En se basant sur la valeur de $\text{PNEC}_{\text{aqua}}$ du 4-NP égale à 330 ng.l^{-1} (INERIS, 2005) et celle du 4-NP1EC égale à 2000 ng.l^{-1} (Fenner et al., 2002).

Pour l'ensemble des tributaires, les concentrations totales mesurées sont inférieures d'une part au valeur de $\text{PNEC}_{\text{aqua}}$ du 4-NP et d'autre part aux EQS (300 ng.l^{-1} pour le 4-NP) fixés dans la cadre de la DCE, ce qui semblerait laisser penser que les risques environnementaux liés à la présence d'APEO dans les tributaires sont faibles. Néanmoins, il n'en demeure pas moins qu'en certains points (proximité des rejets de STEP) et en certaines conditions (débit d'étiage) ; un risque chimique lié à la présence d'APEO seuls ou en mélange persiste.

IV.2.2.2 Flux en métabolites d'APEO amenés par les tributaires

Au cours des 3 campagnes réalisées sur les tributaires, les flux de métabolites d'APEO ont pu être estimés (Figure 80). Les affluents qui présentent les profils de contamination des phases aqueuses les plus marqués ne sont pas ceux qui exercent le maximum de pression sur l'écosystème estuarien. Force est de constater l'importance de considérer les flux en contaminants dans la conduite d'études de monitoring. Ainsi, L'Eure et la Risle apparaissent comme étant responsables de la plus forte pression exercée par les tributaires sur le système estuarien avec des apports en métabolites qui peuvent atteindre la dizaine de grammes par jour. Les variations en flux sont importantes pour les plus grands systèmes mais ne semblent pas liées à des variations saisonnières (maximum en mai-2005 pour l'Eure, en février- 2006 pour l'Andelle). L'hypothèse d'une relation avec les variations dans les usages et dans l'efficacité des processus d'abattement des stations d'épuration peut être avancée.



IV.2.3 *L'influence de la zone amont : la région parisienne (Publication n°7)*

Une importante variabilité des concentrations mesurées à Poses a pu être mise en évidence aussi bien dans la phase dissoute que dans la phase particulaire (en ng.g^{-1} tout comme en ng.l^{-1}) (Figure 81). A titre d'exemple les concentrations mesurées en 4-NP1EC varient entre 146 et 2913 ng.l^{-1} dans la phase dissoute et entre 18 et 232 ng.l^{-1} pour le 4-NP dans la phase particulaire. Selon les saisons, la part de la phase solide dans la contamination globale apparaît également variable et peut atteindre des valeurs égales à 50 % de la contamination pour le 4-NP (mars-2003).

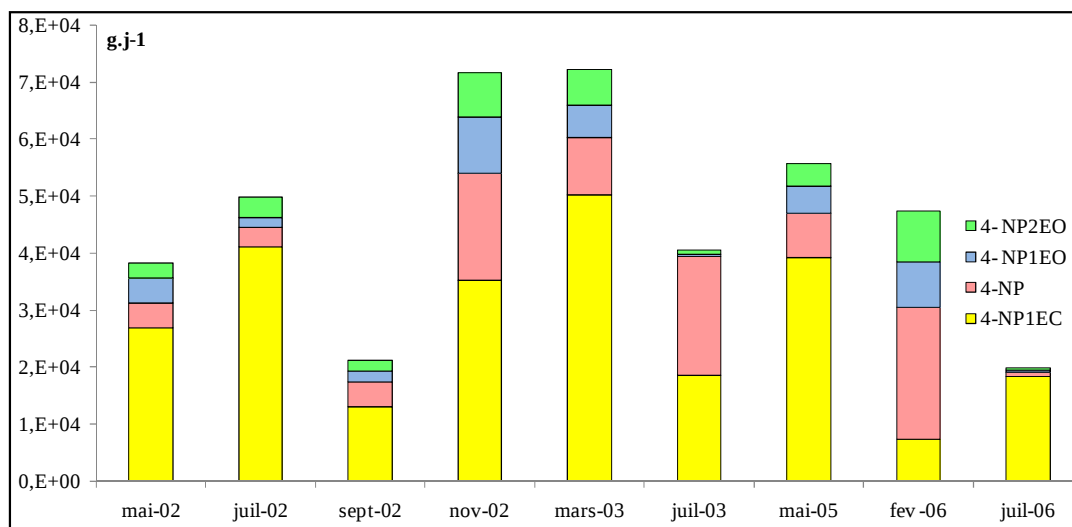


Figure 82 : Flux en métabolites d'APEO entrants dans l'estuaire durant la période d'étude 2002-2006.

Une part importante des variations mesurées dans les phases aqueuses peut être expliquée par les variations naturelles du débit de la Seine. Ainsi, si l'on raisonne en termes de flux d'APEO arrivant au niveau de l'estuaire, une amplitude maximale des quantités égales à 3,5 (Figure 82) peut être notée. D'autres phénomènes semblent s'ajouter aux facteurs de dilution pour expliquer les variations observées : l'influence de la variabilité des rejets des effluents situés en amont, notamment la station d'épuration d'Achères qui traite la grande majorité des eaux domestiques et/ou industrielles de la région parisienne, l'influence de rejets secondaires diffus liés aux ruissellements (épandages de boues), les variations des capacités épuratoires intrinsèques du milieu.

IV.2.4 *Bilan des apports en Seine (Publication n°7)*

Bien que les nonylphénol-polyéthoxylés fassent l'objet d'une restriction d'usages depuis le 17 janvier 2005, il semble que les processus de substitution ne soient pas encore établis comme le montrent les données acquises depuis l'année 2005 et qui confirment une contamination chronique de l'ensemble du système hydrologique de l'estuaire de la Seine.

A Poses, les quantités apportées en 2006 sont plus faibles que celles apportées, en général, durant les années antérieures, bien qu'elles restent néanmoins importantes. De nouvelles études devront être conduites pour confirmer les tendances observées.

La zone amont apparaît comme étant principalement responsable de l'état de contamination de l'estuaire de la Seine. Par comparaison, la part des stations d'épuration de l'estuaire et des affluents apparaît comme mineure mais non négligeable et d'autant plus importantes en conditions estivales. Ces 2 sources participent à la contamination chronique de l'estuaire (Figure 83).

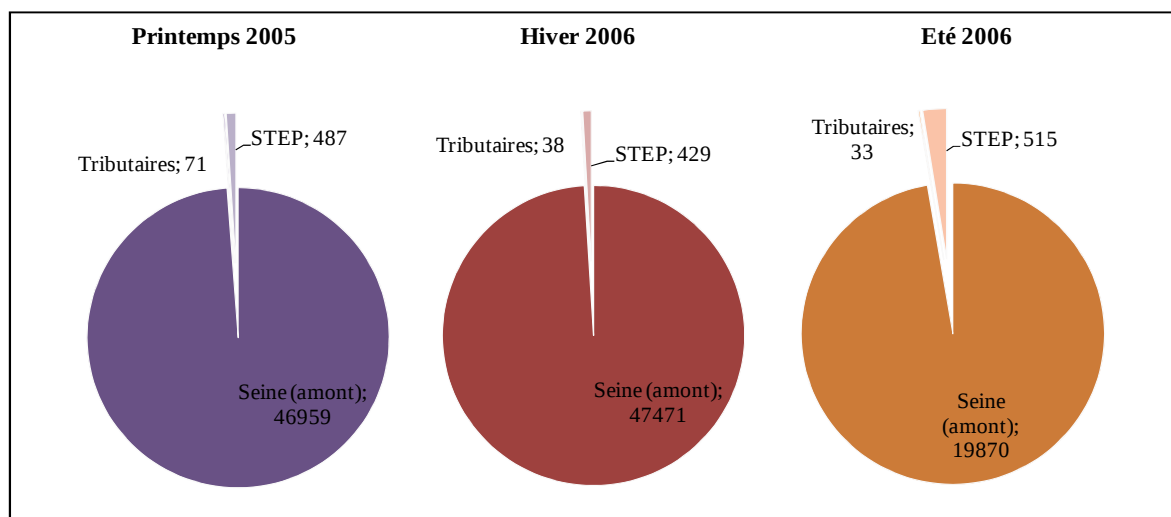


Figure 83 : Part des différentes sources d'APEO dans la contamination de l'estuaire de Seine en fonction des saisons (kg.jour⁻¹).

IV.3 Le devenir des métabolites d'APEO en estuaire de Seine (Publication n°6)

IV.3.1 Le devenir des métabolites d'APEO dans l'estuaire fluvial

Les données obtenues entre 2002 et 2006 ont mis en évidence une contamination chronique de l'estuaire de Seine par les alkylphénol-polyéthoxylés et leurs métabolites de biodégradation. Les concentrations observées sont fonction de la station, de la saison et de la structure des composés. Le 4-NP1EC est le composé majoritaire de la phase dissoute devant le 4-NP et les NP1EO et NP2EO (Figure 84). De l'amont vers l'aval la distribution en composés reste identique avec le 4-NP1EC majoritaire dans la phase dissoute. Le 4-NP est présent en concentrations importantes (quelques centaines de ng.g⁻¹) dans la phase particulaire devant les composés éthoxylés à courte chaîne: 4-NP1EO et 4-NP2EO (quelques dizaines ng.g⁻¹). En règle générale, peu de phénomènes de dilution sont observés dans la phase dissoute tout au long de l'estuaire à l'exception des mois estivaux (caractérisés par une dégradation (biodégradation et photodégradation) plus importante et des temps de résidence des eaux dans l'estuaire plus importants).

Au contraire au fur et à mesure que la concentration en MES (bouchon vaseux) augmente dans l'estuaire la concentration en composés dans la phase particulaire, exprimée en ng.g⁻¹, diminue. Si l'on regarde, en parallèle, la part des phases solides dans la contamination globale des eaux de

Seine, elle apparaît comme extrêmement variable selon le composé et la localisation spatio-temporelle : minoritaire pour le 4-NP1EC, pouvant atteindre plus de 50 % pour le 4-NP1EO et le 4-NP. Une tendance à l'augmentation de la part des solides en suspension au fur et à mesure de l'avancement dans l'estuaire a pu être observée, associée à l'augmentation des teneurs en matières en suspension, mettant en évidence le rôle joué par le bouchon vaseux dans le cycle biogéochimique des APEO en estuaire de Seine. Peu de données renseignent de la part des phases particulières dans la contamination (Isobe et al., 2001 ; Wang et al., 2006 ; Xu et al., 2006 ; Li et al., 2008) et spécialement dans les estuaires (Jonkers et al., 2005 ; Lara Martin et al., 2008).

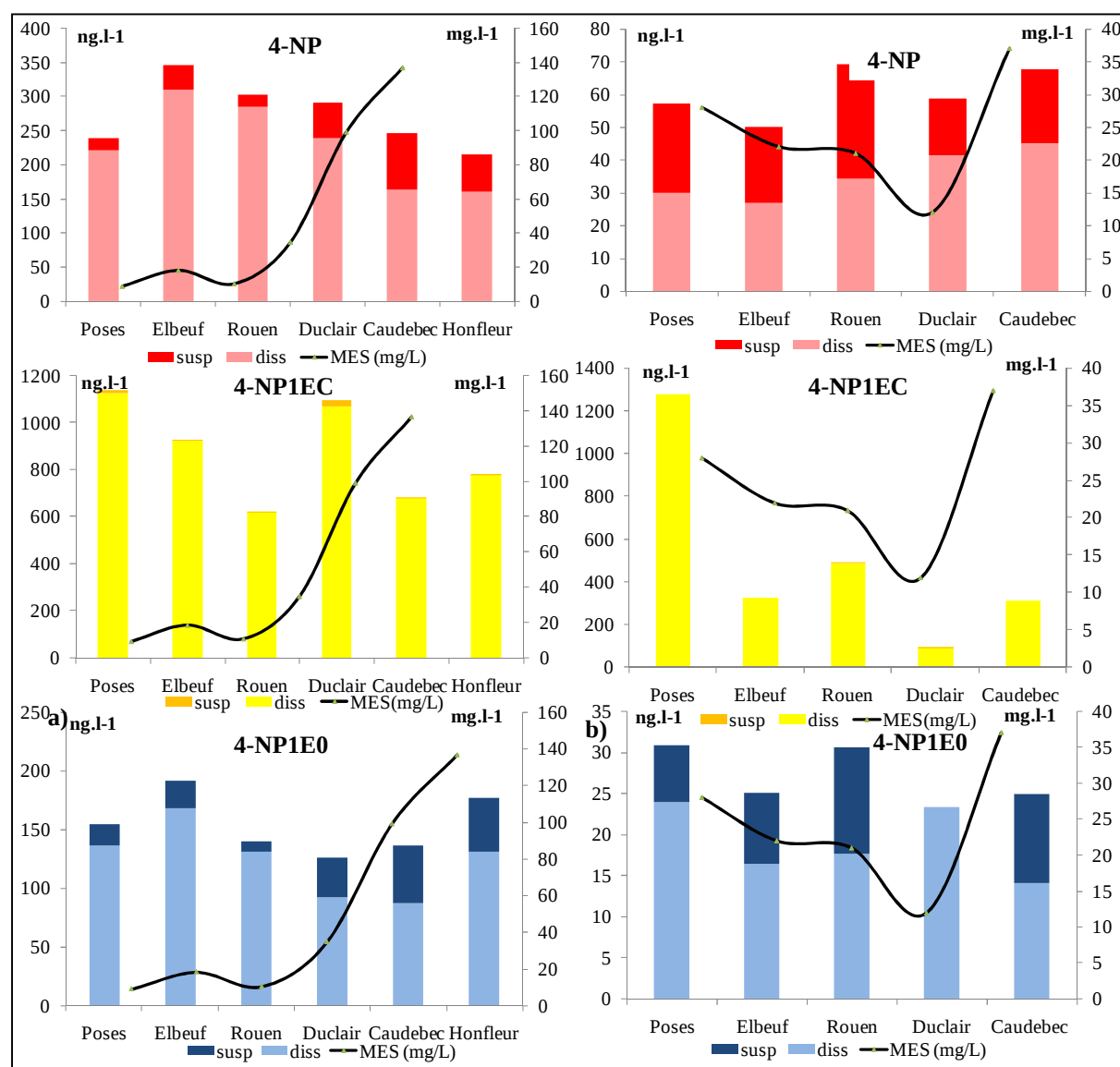


Figure 84 : Devenir des métabolites d'APEO dans l'estuaire de Seine au cours de 2 campagnes a) mai 2005 ; b) juillet 2006. Part de la phase solide dans la contamination de la phase aqueuse.

IV.3.2 Risque chimique lié à la présence de métabolites d'APEO dans l'estuaire fluvial

Au cours de la période d'étude, dans le cas du 4-NP, des rapports MEC/PNEC supérieurs à 1 ont été observés tout au long de l'estuaire à l'exception de la campagne de Juillet 2006 (Figure 85) ; des effets liés à la présence de 4-NP dans l'estuaire de Seine sont susceptibles de se dérouler. Concernant le 4-NP1EC, des rapports supérieurs à 1 ont été mesurés dans les périodes estivales. Bien que ce composé soit majoritaire en estuaire de Seine, les risques induits semblent être moindres que pour le 4-NP. Néanmoins il est à noter que peu de données de toxicité chronique existent pour ce composé. Par conséquent la représentativité de la valeur de PNEC du 4-NP1EC peut être remise en question. De plus, les métabolites d'APEO sont présents en mélange, associés à de nombreux autres contaminants chimiques : des effets synergiques sont susceptibles de se dérouler dans les milieux naturels. Ainsi, un risque chimique lié à la présence des APEO en estuaire de Seine a pu être mis en évidence.

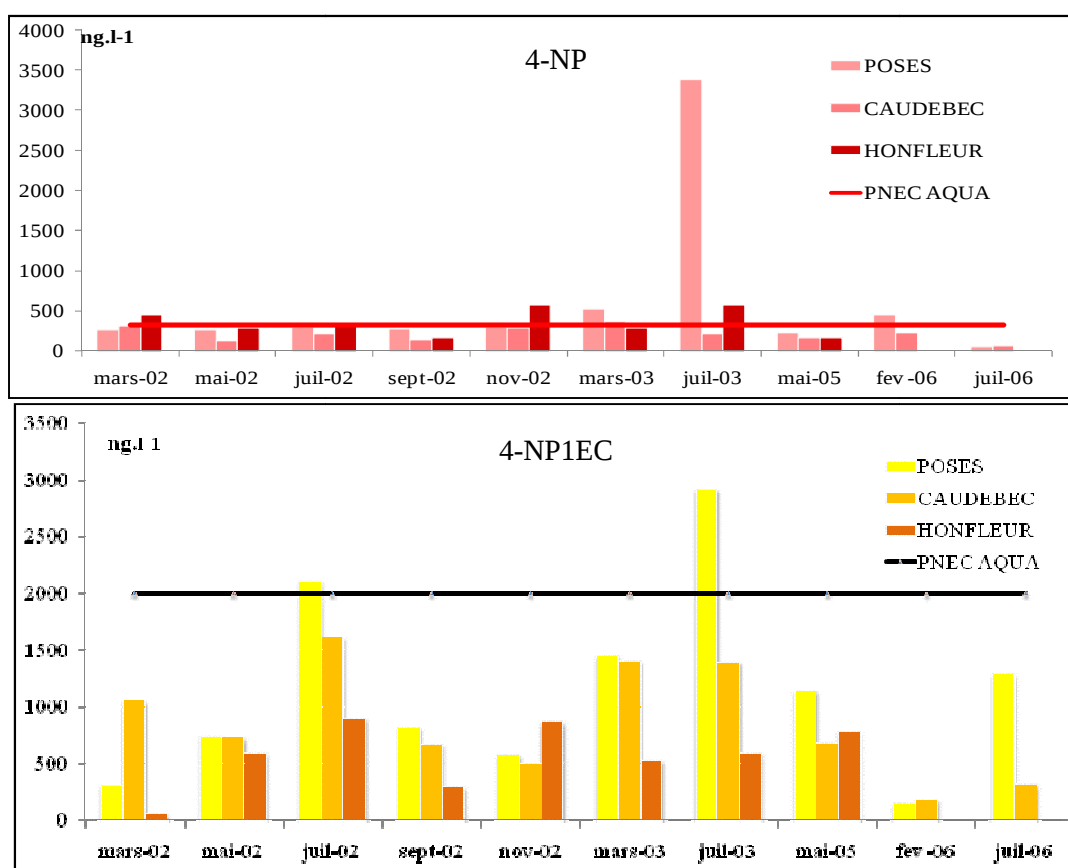


Figure 85 : Evaluation du risque lié à la présence de métabolites d'APEO en estuaire de Seine.
(Concentration totale exprimée en ng.l⁻¹)

Les tendances mesurées lors de la dernière campagne d'échantillonnage de juillet 2006 semblant mettre en évidence une diminution de l'état de contamination de l'estuaire de Seine par les APEO devront être confirmées.

IV.4 Présence et devenir des métabolites d'APEO dans l'estuaire de Seine marin (Publication°7)

Deux campagnes ont permis de mettre en évidence les phénomènes de transferts d'APEO de l'estuaire fluvial vers l'estuaire marin (Figure 86a et b). Quelle que soit la saison (hiver/été), le principal phénomène qui se déroule est un phénomène de dilution très marqué pour le 4-NP1EC (R^2 supérieurs à 0,9) et moins net pour les autres métabolites notamment le 4-NP (Figure 86c). Ce qui dénote que des phénomènes de dégradation (anaérobie) ou des phénomènes de sorption/désorption se déroulent. Ce qui conduit à la mesure de concentrations inférieures à la centaine de ng.l^{-1} pour les points les plus marins.

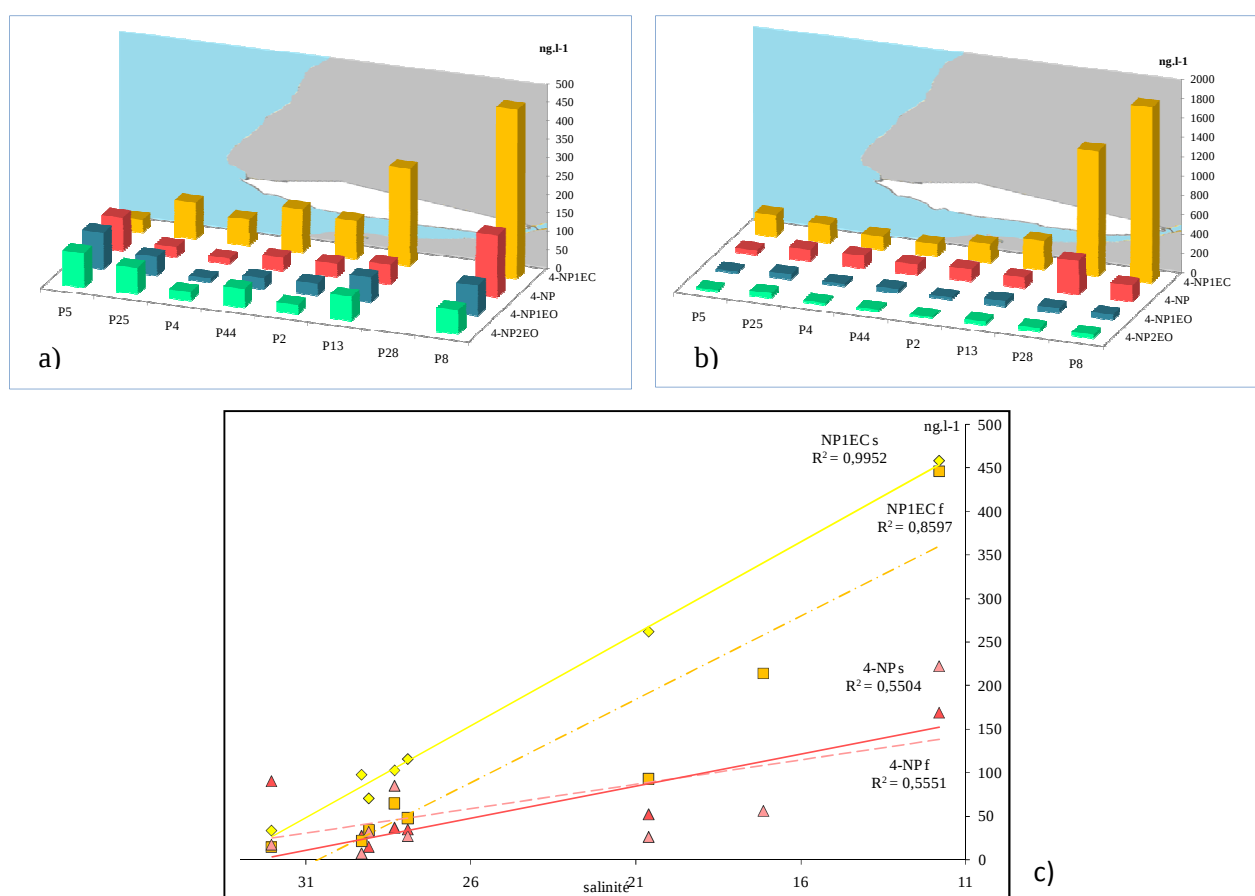


Figure 86 : Devenir des métabolites d'APEO dans l'estuaire de Seine marin a) Juillet 2003 ; b) Novembre 2004 ; c) corrélation entre salinité et concentrations en 4-NP1EC et 4-NP mesurées dans la phase aqueuse (phase dissoute + particulaire).

Dans l'estuaire marin et par extension dans la baie de Seine, les concentrations totales (dissoutes et particulaires) mesurées sont inférieures, d'une part, aux valeurs de PNECaqua du 4-NP et, d'autre part, aux EQS (300 ng.l^{-1} pour le 4-NP) fixés dans la cadre de la DCE, ce qui semblerait laisser penser que les risques environnementaux liés à la présence d'APEO dans la baie de Seine sont faibles. Néanmoins un risque chimique lié à la présence d'APEO seuls ou en mélange persiste.

V Les APEO et les substances pharmaceutiques : contaminants ubiquistes du littoral français

Les principaux objectifs de ce paragraphe sont de présenter les résultats obtenus dans le cadre des programmes de recherche Seine-Aval, ANR Ec2CO et le programme MEDICIS/METROC au travers d'une synthèse des principaux faits et conclusions acquis au cours de ces 3 études de monitoring.

V.1 Les sources de métabolites d'APEO et de substances pharmaceutiques en milieu marin

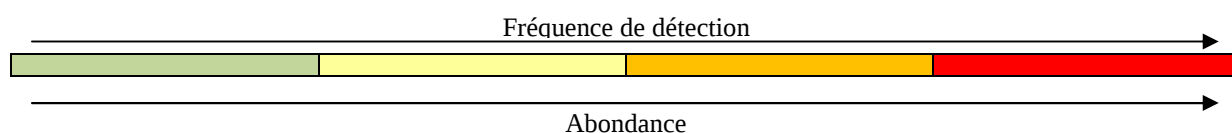
V.1.1 Etude de cas : La calanque de Cortiou, Impact d'un rejet en milieu marin (Publications 9et 10)

V.1.1.1 Données de présence dans la calanque de Cortiou

Deux campagnes d'échantillonnages se sont déroulées en novembre 2004 et novembre 2006.

Tableau 45 : Données de présence en métabolites d'APEO et substances pharmaceutiques dans la phase dissoute et les sédiments de la calanque de Cortiou

Phase aqueuse (ng.l ⁻¹)					Sédiments (µg.kg ⁻¹)				
		Min	Max	% det.			Min	Max	% det.
Stimulants	CAFF	1,1	911,8	100	Stimulants	CAFF	40	6222	100
Antidépresseurs, anxiolytiques	CARBA	<Lod	I	100	Antidépresseurs, anxiolytiques	CARBA	<Lod	36	40
	AMI	<Lod	I	100		AMI	<Lod	3	20
	IMI	<Lod	<Lod	0		IMI	<Lod	<Lod	0
	DOX	<Lod	1,0	67		DOX	<Lod	<Lod	0
	DZP	<Lod	1,1	17		DZP	<Lod	<Lod	0
Analgésiques, AINS	NDZP	0,6	2,3	100	Analgésiques, AINS	NDZP	<Lod	43	20
	ASP	16,1	1989,8	100		ASP	182	1870	100
	IBU	0,8	432,7	100		IBU	11	64	100
	PARA	1,3	540,8	100		PARA	14	28	100
	NAPRO	0,6	132,5	100		NAPRO	61	279	100
	KETO	1,5	461,4	100		KETO	<Lod	611	40
Bronchodilatateurs	DICLO	0,9	106,5	100	Bronchodilatateurs	DICLO	<Lod	<Lod	0
	TERBU	0,4	3,4	100		TERBU	<Lod	7	40
Hypolipémiant	SALBU	<Lod	2,4	67	Hypolipémiant	SALBU	<Lod	3	20
	GEMF	0,5	39,4	100		GEMF	<Lod	12	60
Détergents APEO et métabolites	4-	<Lod	<Lod	0	Détergents APEO et métabolites	4-NP1EC	<Lod	<Lod	0
	4-NP	182	17	100		4-NP	585	4114	80
	4-	471	21	100		4-NP1EO	449	3528	40
	4-	452	26	100		4-NP2EO	475	2598	100
	4-t-OP	<Lod	<Lod	0		4-t-OP	524	524	20



a) Présence dans la phase dissoute

Concernant les substances pharmaceutiques, les concentrations mesurées dans la calanque de Cortiou sont globalement très élevées, avec cependant une gamme de variation très importante selon les composés (Tableau 45). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (l'aspirine, le diclofénac, le

naproxène, l'ibuprofène et le kétoprofène), le paracétamol et la caféine sont présents à de très fortes concentrations, supérieures ou égales au $\mu\text{g l}^{-1}$ (Togola et Budzinski, 2008). Pour les antidépresseurs (l'amitriptyline, le diazépam, le nordiazépam) et l'hypolipémiant (le gemfibrozil) les concentrations sont plus faibles, de l'ordre de la dizaine de ng l^{-1} . Ces niveaux de concentrations sont représentatifs de la consommation de chaque composé. La caféine provient majoritairement de la consommation de boissons, les anti-inflammatoires et autres antipyrétiques sont des composés fortement utilisés sans prescription médicale. Par opposition, les antidépresseurs et les hypolipémiants sont des composés moins consommés quantitativement car ils nécessitent une prescription médicale et des prises beaucoup moins importantes.

La station d'épuration de Marseille présente une étape de traitement physicochimique des eaux usées et est dépourvue de traitement biologique. La distribution et les abondances des différentes substances pharmaceutiques dans la calanque de Cortiou sont similaires à celles des eaux entrant dans les stations d'épuration ou issues des traitements physicochimiques comme cela a été discuté précédemment.

Les métabolites d'APEO sont quantifiés à des concentrations comprises entre la dizaine et la centaine de ng.l^{-1} . L'absence de 4-NP1EC est notable. Là encore, cette distribution est la conséquence de la typologie des traitements mis en œuvre dans la station d'épuration de Marseille. Le 4-NP1EC et les autres APEC sont les métabolites issus de la biodégradation aérobie des APEO, or ce phénomène se déroule durant certains processus de traitement biologique des eaux (boues activées, comme cela a été discuté).

b) Présence dans la phase sédimentaire

Une contamination chronique des sédiments par les substances pharmaceutiques et les métabolites d'APEO (Tableau 45) est notable. Seules quelques substances pharmaceutiques ont été détectées dans les sédiments : la caféine, l'aspirine, le naproxène et le kétoprofène. Ce sont les composés qui présentent la plus forte teneur dans l'eau qui sont les composés majoritairement retrouvés dans les phases solides (concentrations supérieures à la centaine de $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Les métabolites d'APEO sont également quantifiés à des concentrations importantes, supérieures au mg.kg^{-1} pour les points les plus impactés, ce qui est consistant avec leurs caractères hydrophobe et persistant notamment pour le 4-NP et le 4-NP1EO.

V.1.1.2 Devenir dans la calanque de Cortiou

a) Devenir dans la phase aqueuse

Une diminution des concentrations mesurées dans la phase aqueuse des eaux de la calanque de Cortiou est observée au fur et à mesure de l'éloignement du point de rejet. Pour les molécules telles que l'aspirine, la caféine, l'ibuprofène ou le 4-NP, leur devenir semble être principalement dicté par les phénomènes de dilution qui se produisent dans la calanque (coefficients de corrélation supérieurs à

0,9) (Figure 87). Pour les autres molécules les coefficients de corrélation sont moins bons ce qui dénote que d'autres phénomènes contribuent à leur devenir dans la calanque. Des phénomènes de dégradation semblent s'ajouter à ce phénomène de dilution : des phénomènes de biodégradation dans le cas du 4-NP1EO et 4-NP2EO (qui sont des molécules connues pour être extrêmement biodégradables), des phénomènes de photodégradation dans le cas du naproxène (Lin et al., 2006 ; Lin and Reinhard, 2005).

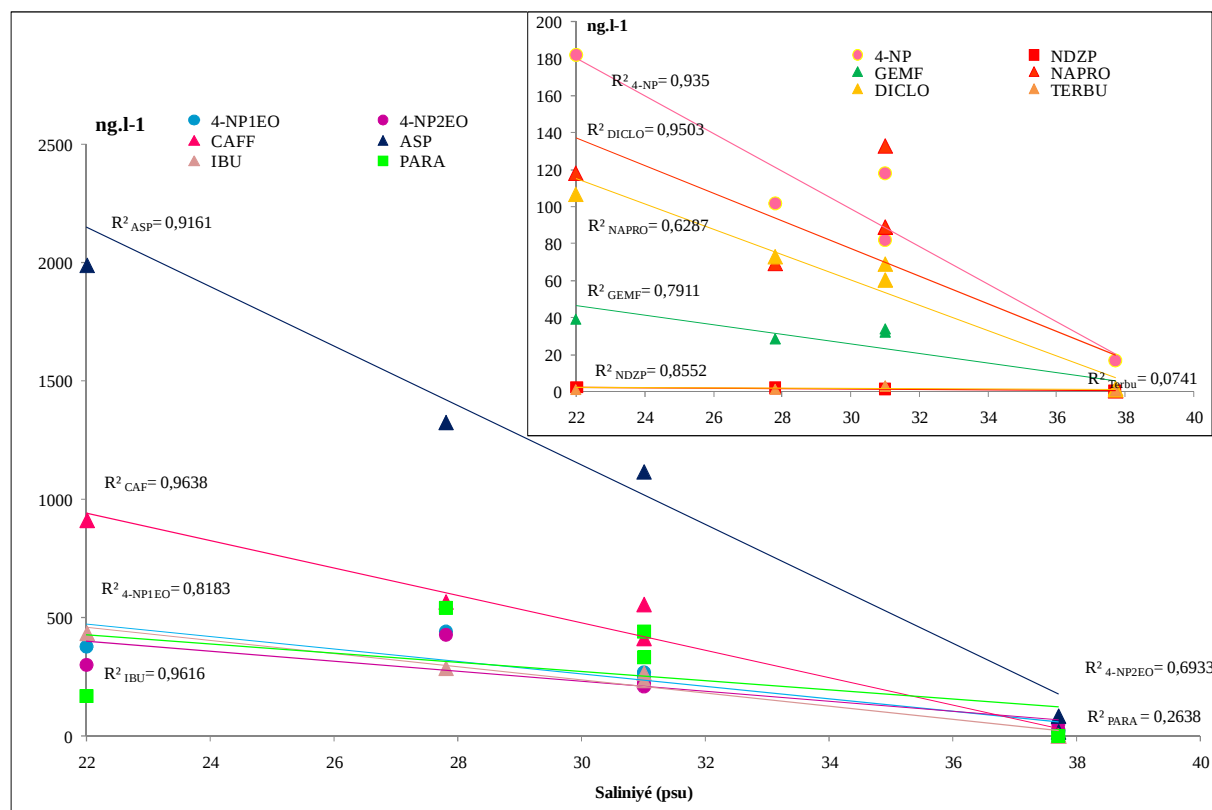


Figure 87 : Devenir des substances pharmaceutiques et des métabolites d'APEO dans la phase aqueuse de la calanque de Cortiou, sous influence du rejet de la station d'épuration de Marseille.

Bien que ces résultats ne soient pas présentés ici, les phases solides en suspension sont apparues comme, d'une part, d'importants réservoirs que ce soit pour les métabolites d'APEO ou certaines molécules pharmaceutiques telles que l'aspirine ou bien encore la caféine et, d'autre part, comme d'importants vecteurs de contamination vers le milieu marin.

b) Devenir dans la phase sédimentaire

Comme dans le cas de la phase aqueuse, on dénote une tendance à la décroissance de la contamination que ce soit en termes de distribution (nombre de molécules détectées) ou en termes d'abondance au fur et à mesure que l'éloignement de la calanque. Cependant, les tendances apparaissent moins marquées que celles observées dans la phase aqueuse. Elles peuvent s'expliquer par d'une part des phénomènes de biodégradation qui peuvent se dérouler au sein des sédiments et d'autre part par l'hétérogénéité de la nature du substrat (la granulométrie, la richesse en substances

organiques ; Delle Site et al., 2001 ; Lorphensri et al., 2006 ; Suntisukaseam et al., 2007) offrant ainsi des capacités de sorption pour les molécules organiques variables (Figure 88).

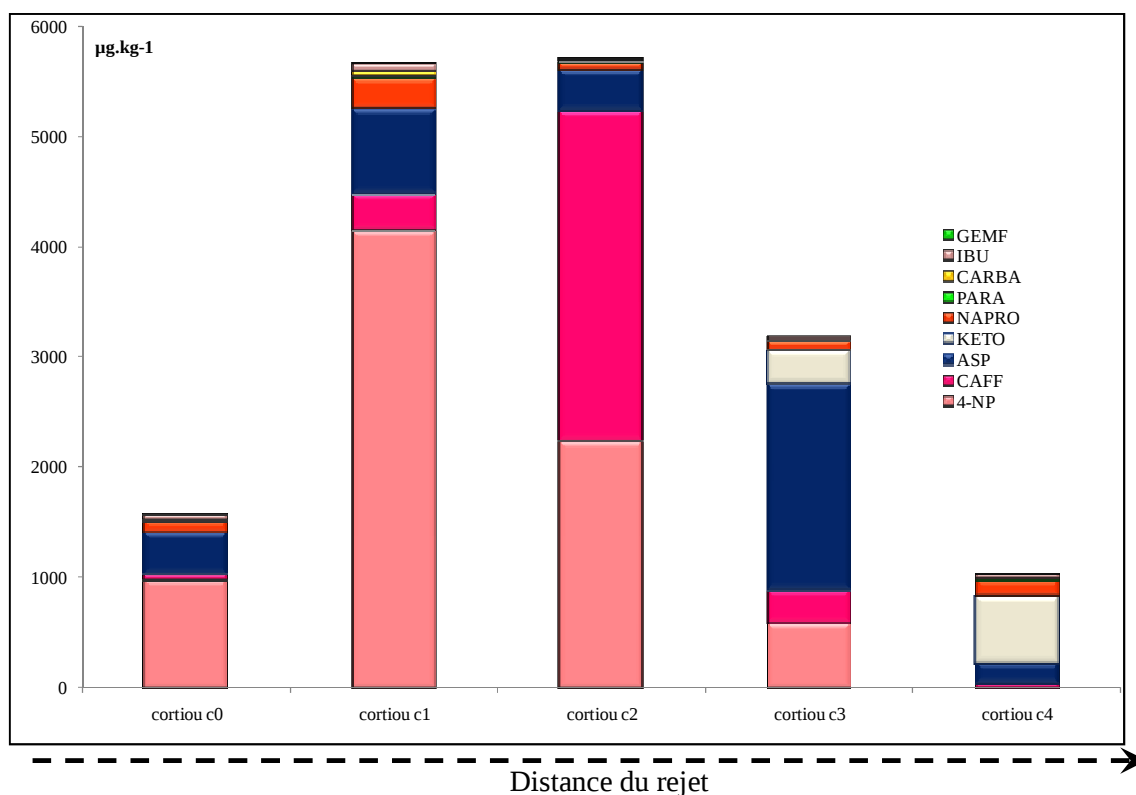


Figure 88 : Devenir des substances pharmaceutiques et des métabolites d'APEO dans la phase sédimentaire de la calanque de Cortiou, sous influence du rejet de la station d'épuration de Marseille.

Comme cette étude de cas le met en évidence, les apports directs et chroniques via les rejets de stations d'épuration en milieu marin sont d'importants vecteurs de contamination. Bien que leurs impacts semblent cantonnés à une zone à proximité du rejet (<1 km) au sein de laquelle ils sont susceptibles d'engendrer des risques toxicologiques et écotoxicologiques, ils apparaissent néanmoins comme d'importants points d'entrée des substances considérées pour les écosystèmes marins côtiers notamment *via* leurs apports en matières en suspension.

V.1.2 Les systèmes dulçaquicoles

Comme cela a pu être mis en évidence au travers des sections précédentes V et VI, les stations d'épuration sont le vecteur d'apports chroniques et significatifs de substances pharmaceutiques et d'APEO pour les milieux récepteurs. Ainsi, l'ensemble des systèmes dulçaquicoles étudiés (la Garonne, l'Adour, la Seine, la Vilaine, la Jalle d'Eysines ou bien encore la Lauch) ont montré une contamination de leurs phases aqueuses (dissoutes et particulaires lorsque qu'une analyse a pu être conduite) par les métabolites de biodégradation des APEO dans des gammes de concentrations variables selon le métabolite considéré, la distance des points de rejets, les facteurs

de dilution du milieu. Cela nous permet de conclure, d'une part, en une contamination chronique des systèmes dulçaquicoles par les métabolites d'APEO et, d'autre part, en l'existence d'un risque chimique lié à la présence de métabolites à l'échelle du territoire français (Figure 89). Ainsi, les fleuves et rivières français apparaissent comme une source d'apports en substances d'intérêt pour les systèmes littoraux de la façade ouest (Atlantique et Manche). Parce qu'à l'échelle du littoral atlantique ces apports se font via des systèmes estuariens, la question du rôle de ces écosystèmes dans le transfert des contaminants apparaît comme majeure.

V.2 Présence et devenir des métabolites d'APEO dans les estuaires macrotidaux (Publication n°8)

V.2.1 Données de présence dans la phase dissoute

Tableau 46 : Données de présence des métabolites d'APEO dans les phases dissoutes des principaux estuaires macrotidaux français.

Phase Dissoute ng.l ⁻¹		4-NP1EO	4-NP2EO	4-NP1EC	4-NP	4-t-OP
Baie de Vilaine	Min	6	3	7	5	2
	Max	248	38	74	50	7
	% détection	100%	82%	82%	100%	32%
Baie d'Authie	Min	12	3	<2	14	NR
	Max	64	49	47	76	NR
	% détection	100%	100%	50%	100%	NR
Estuaire de Gironde	Min	14	12	5	21	NR
	Max	89	83	88	125	NR
	% détection	100%	100%	100%	100%	NR
Estuaire d'Adour	Min	12	6	57	11	NR
	Max	53	36	99	35	NR
	% détection	100%	100%	100%	100%	NR
Estuaire de Seine	Min	87	59	685	161	NR
	Max	136	116	1128	221	NR
	% détection	100%	100%	100%	100%	NR

Une contamination généralisée de chacun des estuaires étudiés par les métabolites de biodégradation d'APEO (Tableau 46) est observée. L'estuaire de Seine est de loin le plus impacté avec des concentrations de plusieurs centaines de ng.l⁻¹ selon les composés. Ce qui met en avant l'intérêt de l'estuaire de Seine en tant que site modèle pour l'étude du devenir des APEO dans les systèmes estuariens. Les estuaires de l'Authie, la Gironde, l'Adour et la Vilaine apparaissent comme significativement moins contaminés même si des concentrations comprises entre le ng.l⁻¹ et plusieurs centaines de ng.l⁻¹ ont pu être mesurées. Ces contaminations modérées ainsi que la distribution des composés (bien que le 4-NP1EC soit dosé dans des teneurs significatives, il n'est pas nécessairement le composé majoritaire dans la phase dissoute) sont cohérentes avec les pressions auxquelles sont soumises les différents systèmes : bassins versants à dominantes agricoles, présentant des zones de pressions urbaines localisées (Bordeaux pour la Gironde ; Bayonne pour l'Adour) et des tissus industriels diffus.

V.2.2 Rôle des phases particulières dans la contamination des estuaires

Tableau 47 : Données de présence et rôle des matières en suspension dans la contamination des phases aqueuses des principaux estuaires macrotidaux français.

Estuaire de la Seine					Estuaire de la Seine				
C° ng.g ⁻¹ MES		Min	Max	Moy	Part des MES dans contamination (%)		Min	Max	Moy
Honfleur	4-NP1EO	35	396	211	Honfleur	4-NP1EO	26%	82%	46%
	4-NP2EO	32	449	194		4-NP2EO	33%	65%	49%
	4-NP	177	2510	906		4-NP	25%	85%	65%
Caudebec	4-NP1EO	173	519	398	Caudebec	4-NP1EO	5%	97%	36%
	4-NP2EO	986	1040	1013		4-NP2EO	4%	93%	38%
	4-NP	832	5182	2703		4-NP	20%	99%	57%
Poses	4-NP1EO	28	2367	917	Poses	4-NP1EO	0%	94%	33%
	4-NP2EO	180	1683	763		4-NP2EO	0%	94%	28%
	4-NP	2015	5453	3799		4-NP	4%	99%	34%
Estuaire de l'Adour					Estuaire de l'Adour				
C° ng.g ⁻¹ MES		Min	Max	Moy	Part des MES dans contamination (%)		Min	Max	Moy
Transect	4-NP1EO	114	179	135	Transect	4-NP1EO	22%	26%	24%
	4-NP2EO	30	86	66		4-NP2EO	4%	27%	15%
	4-NP	211	357	304		4-NP	33%	52%	43%
Estuaire de la Gironde					Estuaire de la Gironde				
C° ng.g ⁻¹ MES		Min	Max	Moy	Part des MES dans contamination (%)		Min	Max	Moy
Transect	4-NP1EO	11	139	62	Transect	4-NP1EO	16%	26%	21%
	4-NP2EO	9	113	60		4-NP2EO	13%	21%	19%
	4-NP	37	567	223		4-NP	30%	56%	40%
Baie de l'Authie					Baie de l'Authie				
C° ng.g ⁻¹ MES		Min	Max	Moy	Part des MES dans contamination (%)		Min	Max	Moy
Variations intersaison	4-NP1EO	21	177	102,6	Variations intersaison	4-NP1EO	0%	37%	15%
	4-NP2EO	25	89	66,8		4-NP2EO	0%	67%	20%
	4-NP	51	1337	517		4-NP	7%	92%	46%

Une fois encore une contamination généralisée des phases solides en suspension par les métabolites d'APEO a pu être mise en évidence (Tableau 47). Comme pour la phase dissoute, c'est en estuaire de Seine que les plus fortes concentrations sont mises en évidence avec des valeurs comprises entre la centaine de ng.g⁻¹ et plusieurs µg.g⁻¹, notamment pour le 4-NP et le 4-NP1EO (5453 ng.g⁻¹ pour le 4-NP, 2367 ng.g⁻¹ pour le 4-NP1EO). Les valeurs mesurées dans l'ensemble des autres estuaires étant significativement inférieures avec des valeurs maximales généralement inférieures au µg.g⁻¹. Quelque soit le système considéré, la part des phases solides dans la contamination globale des phases aqueuses est loin d'être négligeable avec en moyenne 50 % de la contamination apportée par les phases solides dans le cas du 4-NP dans les systèmes considérés (Isobe et al., 2001 ; Wang et al., 2006 ; Xu et al., 2006 ; Li et al., 2008). Quelque soit le système considéré, les variations observées semblent être liées à des remises en suspension, ponctuelles, liées à des phénomènes climatiques ou encore à des dragages (fréquents en estuaire de Seine et de Gironde) comme en Août 2004 dans la

Baie de l'Authie, où la contribution de la part solide dans la contamination totale en 4-NP atteint près de 90 % lors d'une campagne d'échantillonnage faisant suite à une tempête (Figure 89).

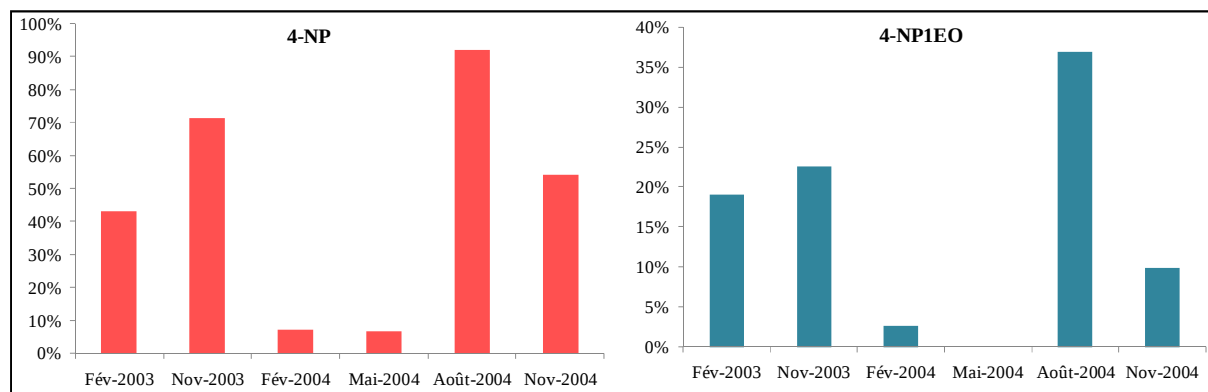


Figure 89 : Tendances dans la contribution des phases solides à la contamination de la Baie de l'Authie par les APEO (% de la contamination aqueuse).

V.3 Présence et devenir des métabolites d'APEO et des substances pharmaceutiques dans les écosystèmes marins côtiers

En conséquence d'apports continus *via*, d'une part, les rejets directs des stations d'épuration et d'autre part les apports chroniques des écosystèmes dulçaquicoles au milieu marin, une contamination des écosystèmes marins côtiers a pu être mise en évidence à la fois par les métabolites de dégradation des APEO (Figure 91) et par les substances pharmaceutiques (Figure 92). Les données mesurées démontrent un bruit de fond environnemental en métabolites d'APEO équivalent à la dizaine de ng.l^{-1} , compris entre le ng.l^{-1} et la dizaine de ng.l^{-1} pour les substances pharmaceutiques (Heemken et al., 2001 ; Weigel et al., 2002 ; Weigel et al., 2004 ; Comeau et al., 2008 ; Kasprzyk-Hordern et al., 2008 ; Togola et Budzinski, 2008). Lorsque des analyses des phases solides en suspension ont pu être conduites (Rade de Marseille), les valeurs obtenues indiquent que, bien que les teneurs en matières en suspension soient faibles, ces phases sont, d'une part, des réservoirs pour ces 2 classes de molécules et, d'autre part, qu'elles participent à leur dispersion dans l'environnement.

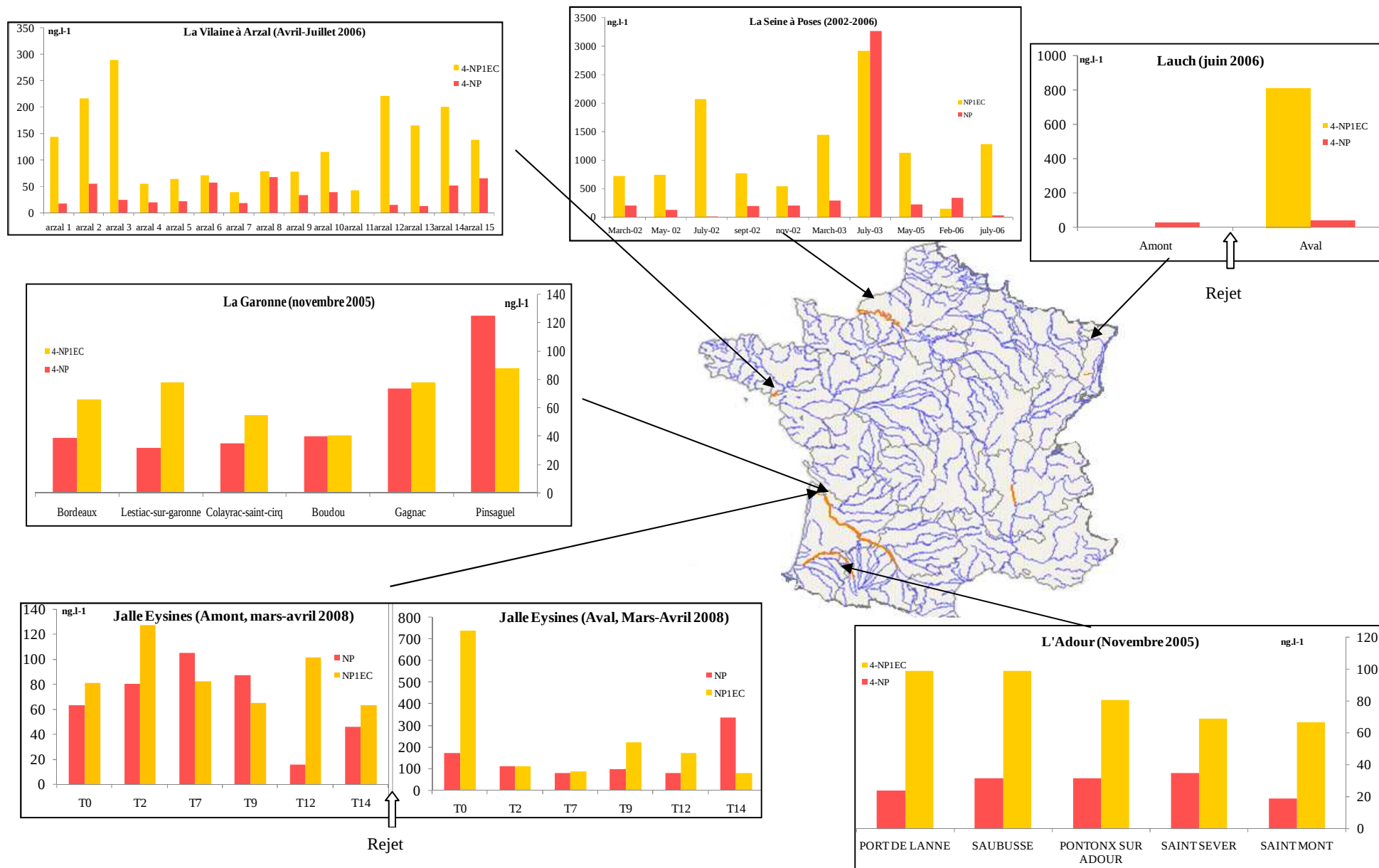


Figure 90 : Les APEO et leurs métabolites de dégradation. Contaminants ubiquistes des systèmes dulçaquicoles Français.

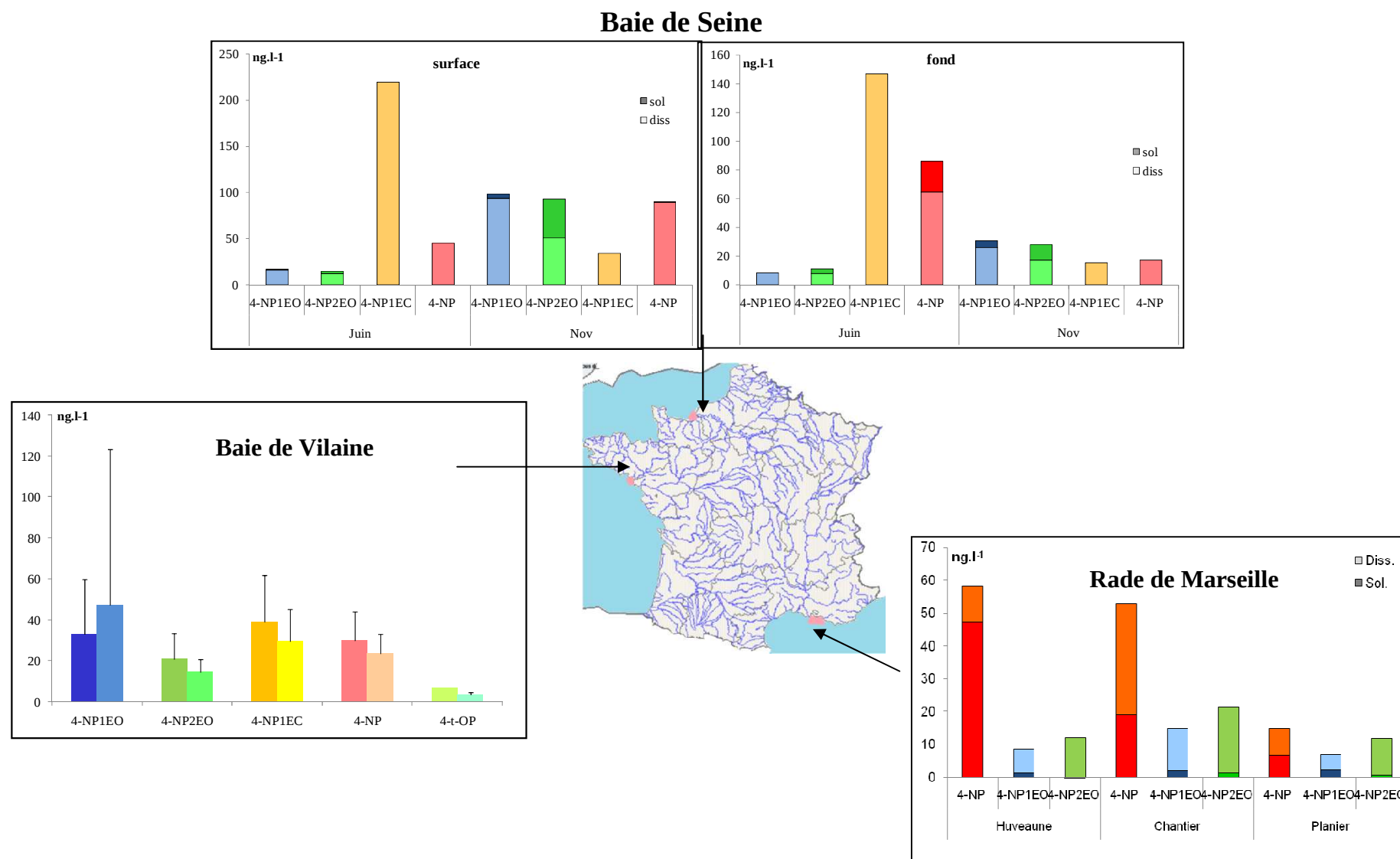


Figure 91 : LES APEO et leurs métabolites de dégradation. Contaminants ubiquistes des systèmes marins côtiers Français.

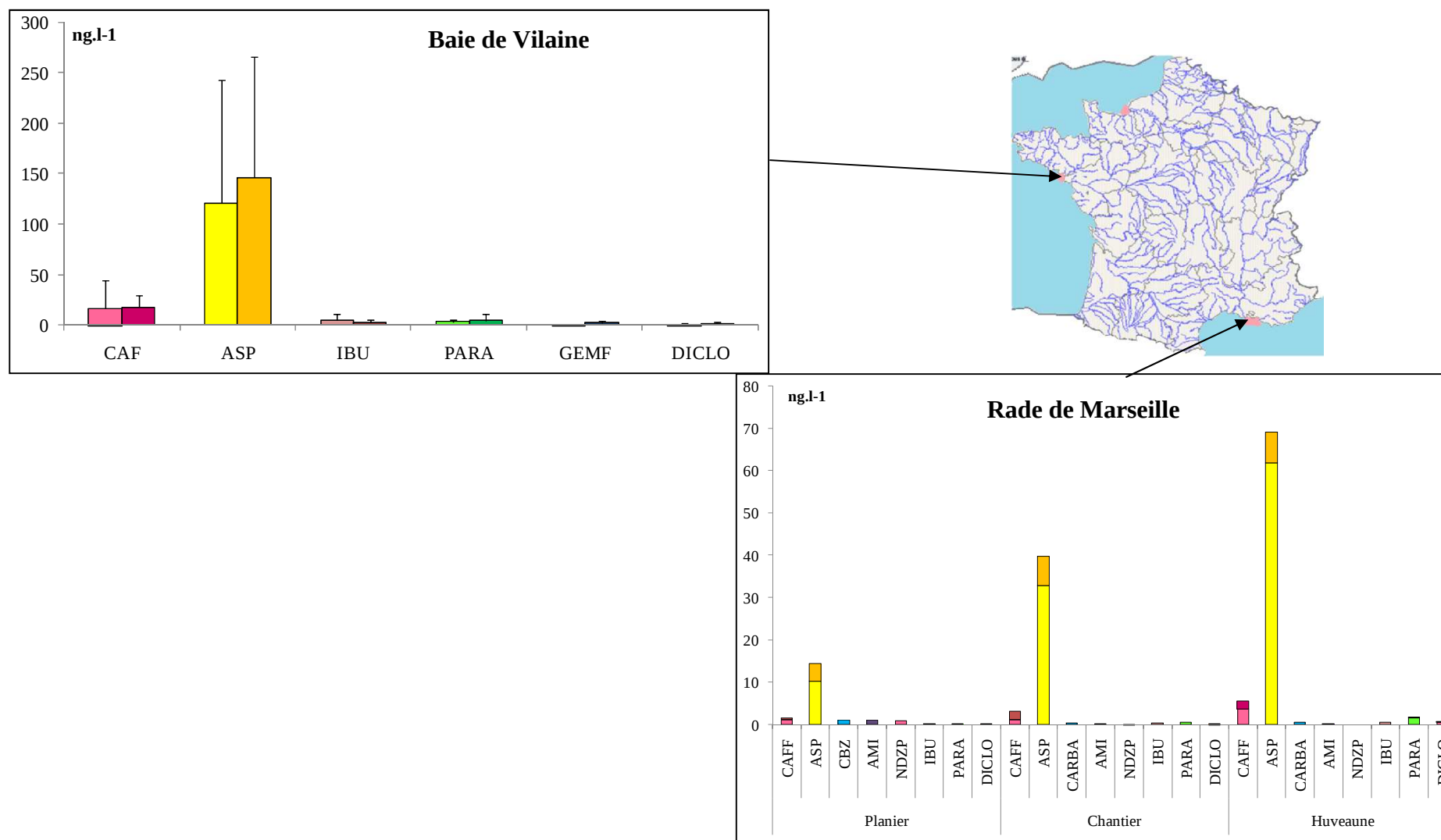


Figure 92: Les substances pharmaceutiques : Contaminants ubiquistes des systèmes marins côtiers Français.

V.4 Transferts aux organismes biologiques (Publication n°9)

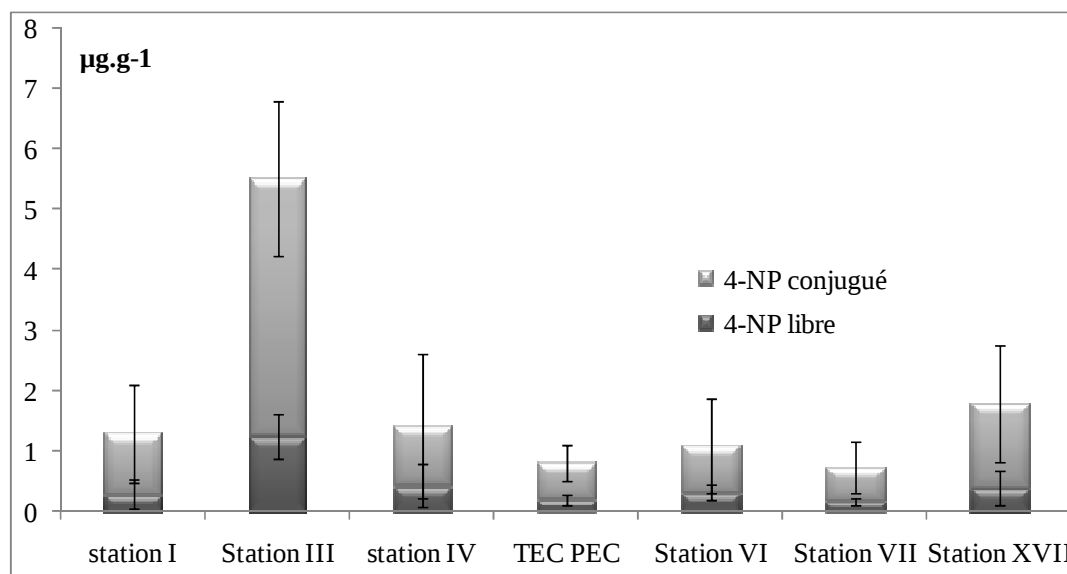


Figure 93 : Présence de 4-NP dans les biles de poissons *Merluccius merluccius* dans le Golfe du Lion (concentrations exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ bile).

Les résultats démontrent une contamination significative des biles par le 4-NP avec les concentrations totales mesurées (somme des formes libres et conjuguées) entre la centaine de ng.g^{-1} et plus de $5 \mu\text{g.g}^{-1}$. Une exposition chronique des espèces aquatiques dans le Golf du Lion est ainsi observée. Près de 75 % du 4-NP est présent sous forme conjuguée, ce qui est cohérent avec les données obtenues par Arukwe et al. (2000) sur le saumon atlantique. Une importante variabilité interindividuelle est observée. L'hypothèse d'une variabilité dans l'exposition et dans l'efficacité de la métabolisation peut être avancée (Martin-Skilton et al., 2006). En outre, une importante variabilité intersites est mise en évidence. Les concentrations maximales sont mesurées dans les sites III, XVII et I (concentration maximale supérieure au $\mu\text{g.g}^{-1}$), ces sites sont situés près de l'embouchure du Rhône et sont sous pressions anthropiques directes. Les individus des sites localisés dans la partie centrale, profonde, du golf du Lion présentent des niveaux de contamination plus faibles.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les principaux objectifs de ces travaux de thèse étaient, d'une part, de développer et valider des outils méthodologiques pour l'analyse de 3 classes de substances émergentes (les alkylphénol-polyéthoxylés, le bisphénol A et les substances pharmaceutiques) dans les matrices environnementales, d'autre part, d'appliquer ces méthodologies à l'étude des sources, de la présence et du devenir de ces molécules dans les systèmes aquatiques. Bien que ces travaux de thèse aient porté sur 3 classes de substances émergentes, l'étude des APEO en représente l'axe fort.

Ce travail de thèse a permis de poursuivre le développement et la validation de méthodologies analytiques pour l'analyse des APEO, BPA et substances pharmaceutiques dans les matrices environnementales complexes. Afin de satisfaire aux exigences liées à la mise en place de la Directive Loi Cadre sur l'Eau et la prise en compte de la Directive 2002-81-CE comme référence pour l'analyse des contaminants émergents dans les systèmes aquatiques, des démarches méthodologiques ont été entreprises.

Tout d'abord, l'amélioration des techniques d'échantillonnages afin d'acquérir une meilleure représentativité par, en outre, le développement de nouveaux outils d'échantillonnages intégratifs POCIS a été conduite. Les développements en laboratoire ont permis de déterminer les taux d'échantillonnage des 27 molécules sélectionnées dans cette étude. Les différentes expositions *in situ* ont conduit à la validation de ces outils en tant qu'outils de screening et de pré-monitoring capables d'apporter des informations semi-quantitatives sur la présence des contaminants dans les systèmes étudiées. Pour l'heure, les POCIS apparaissent comme de puissants outils de diagnostics et de prioritarisation.

D'importants efforts méthodologiques visant à améliorer l'assurance et le contrôle qualité des données générées dans le cadre de l'étude des perturbateurs endocriniens et les substances pharmaceutiques dans les systèmes aquatiques ont été conduits afin de lever certains verrous. Concernant les APEO, la mise en place d'une étape de purification supplémentaire ainsi que d'une méthode de quantification par étalonnage interne ont permis d'améliorer l'analyse en terme de sensibilité, sélectivité et robustesse. Concernant les substances pharmaceutiques, la transposition de la méthode d'analyse de la CG-SM-SM vers la (RR)CL-SM-SM a permis d'améliorer l'analyse en terme de sensibilité, de sélectivité et de robustesse. De plus, ces travaux ont permis d'apporter des éléments de réflexion d'importance notamment dans un contexte réglementaire. Les méthodologies répondent à des critères de validation et sont applicables pour la conduite d'études de monitoring dans les systèmes aquatiques.

Les méthodologies analytiques développées ont été appliquées à l'étude des APEO dans les stations d'épuration. Les études menées, en France, de 2002 à 2008, permettent de conclure à l'ubiquité des métabolites d'APEO dans les sites étudiés. Les observations conduites permettent d'affirmer que les formes linéaires d'APEO ne sont présentes ni dans les entrées de STEP (preuve qu'elles ne sont pas présentes dans les mélanges initiaux), ni dans les sorties de STEP, ni dans les

boues. Au travers des processus mis en œuvre dans les STEP, on observe une diminution des concentrations de NPEO et la génération, au cours de certains processus, de nouveaux métabolites NPEC qui peuvent être majoritaires dans les effluents de station d'épuration. Les phases solides en suspension, bien que fortement diminuées durant les phases de traitement (que l'on s'intéresse à leur charge contaminante ou bien à leur concentration dans la phase aqueuse), peuvent apporter plus de 50% de la charge contaminante finale pour les composés les plus hydrophobes, le 4-NP et le 4-NP1EO, et apparaissent comme des stocks secondaires réfractaires à la dégradation et susceptibles de participer à la dispersion des APEO vers les systèmes aquatiques récepteurs.

La considération seule du 4-NP pour estimer les risques induits par la présence des APEO dans les systèmes aquatiques apparaît comme insuffisante. Par comparaison à d'autres pays européens, notamment l'Allemagne, les données générées ne semblent pas mettre en évidence de diminution de la contamination des systèmes par les APEO en conséquence de leurs restrictions d'usages.

Cinq années de monitoring, de 2002 à 2006, de l'estuaire de la Seine permettent de conclure en une contamination chronique de l'estuaire par les APEO et leurs métabolites de dégradation. La phase dissoute apparaît dominée par les NPEC, les phases particulières par le NP et le NP1EO. La distribution relative apparaît similaire dans l'estuaire à celles des effluents de stations d'épuration. Dans la phase dissoute, des phénomènes de dilution sont mis en évidence dès lors que l'influence marine est présente ; au contraire des phases particulières pour lesquelles des phénomènes de dilution (en $\mu\text{g.g}^{-1}$) apparaissent tout au long de l'estuaire en conséquence du bouchon vaseux. Ces dernières apparaissent comme des stocks secondaires, réfractaires à la dégradation, participant à la dispersion des APEO vers le milieu marin. L'étude des sources a permis de mettre en évidence que la mégapole parisienne, via ses constants apports industriels et domestiques, est la source principale de contamination de l'estuaire. Une étude du bassin versant (Seine aval) montre également une contamination chronique des principaux affluents de l'estuaire aval. La distribution et l'abondance des métabolites semblent liées au degré d'anthropisation de leurs bassins versants. Les études entreprises permettent de conclure que le système présente une dynamique propre et que la considération seule des concentrations pour évaluer son état de contamination chimique peut conduire à des interprétations erronées. Ainsi, la prise en compte des flux de polluants entrants dans l'estuaire semble mettre en évidence qu'il n'existe pas de dynamique saisonnière dans la distribution et l'abondance des APEO.

L'estuaire de la Seine apparaît significativement plus impacté par comparaison à l'ensemble des autres sites étudiés que ce soit les estuaires macrotidaux de la façade ouest: les estuaires de la Gironde et de l'Adour, les Baies de la Vilaine et de l'Authie ou la Rade de Marseille. Ainsi, une contamination généralisée des systèmes dulçaquicoles, estuariens et marins par les métabolites d'APEO est mise en évidence. Quel que soit le système considéré, les phases en suspension semblent jouer un rôle important, de puits et de vecteurs, dans le cycle biogéochimique des substances étudiées. De plus, lorsque des organismes biologiques (poissons et mollusques) ont pu être échantillonnés et analysés, des phénomènes de transferts ont été mis en évidence. Ils confirment un faible potentiel de

bioaccumulation et de bioamplification dans les chaînes trophiques ainsi qu'un fort potentiel de métabolisation comme suggéré par les fortes concentrations en métabolites d'APEO, à l'exception du NP1EC, mesurées dans la bile (siège de la métabolisation) des poissons échantillonnés.

La présence des métabolites d'APEO, notamment le NP, dans des concentrations susceptibles d'engendrer des effets toxiques dans les systèmes aquatiques confirme le risque posé par cette classe de molécules. Et ce d'autant plus si l'on considère que, comme ont pu le mettre en évidence ces travaux et d'autres publiées antérieurement, les APEO sont présents en mélange, des effets additifs et synergiques sont ainsi susceptibles de se dérouler.

Concernant les substances pharmaceutiques, les travaux entrepris ont permis de mettre en évidence une contamination significative des systèmes aquatiques, dulçaquicoles et marins par les 21 molécules pharmaceutiques sélectionnées dans cette étude en lien avec des rejets chroniques des stations d'épuration. Ces dernières présentent une efficacité extrêmement variable quant à l'abattement des molécules, certaines molécules apparaissant comme réfractaires, notamment la carbamazépine, le diclofénac et les antidépresseurs (le diazépam, la fluoxétine, le nordiazépam). Même si les concentrations mesurées dans les phases solides sont modérées, elles peuvent néanmoins présenter un rôle significatif dans la contamination des phases aqueuses et participer à la dispersion des molécules dans l'environnement. Même si les concentrations mesurées dans l'environnement sont largement inférieures aux valeurs susceptibles d'engendrer des effets toxiques, il n'en demeure pas moins qu'un risque chimique lié à leur présence existe.

Les perspectives sont nombreuses :

1) Il conviendra de poursuivre les développements analytiques afin d'améliorer la fiabilité des données générées. Pour les APEO et le BPA, la transposition vers des méthodologies reposant sur la spectrométrie de masse en tandem permettra d'améliorer la spécificité et la sensibilité des méthodologies analytiques. La participation à des exercices d'inter-calibration dans l'attente d'une matrice certifiée qui apparaît plus que jamais nécessaire, notamment dans un contexte réglementaire, permettra d'améliorer la robustesse des méthodologies existantes.

2) Les premiers développements sur les échantillonneurs intégratifs apparaissent comme prometteurs. Néanmoins il apparaît essentiel de poursuivre les investigations concernant la calibration des échantillonneurs, notamment la détermination des facteurs affectant de manière significative les taux d'échantillonnage et l'affinage des Rs par des déploiements dans des milieux artificiels (mésocosmes) plus complexes que des unités expérimentales de laboratoire afin d'obtenir un outil quantitatif. Il conviendra également d'étudier la capacité d'autres échantillonneurs intégratifs (SPMD, Chemcatcher®) à échantillonner les 3 classes de molécules retenues. Enfin si certains verrous apparaissent comme persistants, il conviendra de réfléchir à une autre manière de déployer ces outils, notamment par des déploiements *ex situ*.

3) L'interprétation statistique des données générées dans le cadre du programme AMPERES devra permettre d'évaluer les différentes filières d'assainissement présentes sur le territoire quant à leur efficacité à abattre la contamination par les APEO et les substances pharmaceutiques, dans un premier temps. De plus, elle permettra d'évaluer les futurs processus et notamment les traitements tertiaires quant à leur efficacité à abattre les molécules. Dans un plus large contexte, un travail d'identification des produits issus de la dégradation (formes bromées, formes chlorées, CAPEC pour les APEO ; formes bromées, formes chlorées, métabolites de biodégradation pour les substances pharmaceutiques) devra être conduit, au regard du risque écotoxicologique qu'ils peuvent représenter.

4) Il conviendra également de poursuivre les études de surveillance du milieu entreprises au cours de ces travaux, notamment au niveau de l'estuaire de Seine et de la Calanque de Cortiou, afin d'évaluer l'état de contamination chimique des eaux à la suite des évolutions des processus de traitements des eaux usées entrepris sur les bassins versants respectifs (mise en place de Géolide, évolution de la station d'Achères).

5) La poursuite de travaux de recherche interdisciplinaires permettant de relier la présence de ces contaminants seuls ou en mélange à des effets toxiques dans les milieux naturels demeure un enjeu majeur. Le développement d'approches de type "Evaluation Direct Analysis" qui repose sur la combinaison d'un fractionnement associé à des bioessais (permettant de mettre en évidence les molécules ou mélanges de molécules responsables d'effets observés) et d'une approche analytique par des techniques de masse de haute résolution (spectrométrie de masse en tandem, temps de vol, trappes à ions ou association de ces différentes techniques) apparaît comme pertinente.

Références Bibliographiques

- Ahel, M., et Giger, W. (1985). Determination of alkylphenols and alkylphenol mono-and diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **57**, 1577-1583.
- Ahel, M., Giger, W. (1993). Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* 26(8) (1993) 1471-1478. **26**, 1471-1478.
- Ahel, M., et Giger, W., et Schaffner, C. (1994). Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment — II. Occurrence and transformation in river. *Wat. Res.* **28**, 1143-1152.
- Ahel, M., et Giger, W. (1993). Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Chemosphere* **26**, 1461-1470.
- Ahel, M. G., W. et Koch, M. (1994). Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment — I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat. Res.* **28**, 1131-1142.
- Algros Emilie, J. M.-J. (2007). "Contamination potentielle des échantillons de stations d'épuration (eaux brutes, eaux traitées, boues) et effluents d'élevage par des molécules pharmaceutiques à usage humain et vétérinaire." ADEME-IRH environnement.
- Alvarez, D. A., Petty, J. D., Huckins, J. N., Jones-Lepp, T. L., Getting, D. T., Goddard, J. P., et Manahan, S. E. (2004). Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**, 1640-1648.
- Alvarez, D. A., Stackelberg, P. E., Petty, J. D., Huckins, J. N., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., et Meyer, M. T. (2005). Comparison of a novel passive sampler to standard water-column sampling for organic contaminants associated with wastewater effluents entering a New Jersey stream. *Chemosphere* **61**, 610-622.
- Andreozzi, R., Raffaele, M., et Nicklas, P. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* **50**, 1319-1330.
- Antignac, J.-P., de Wasch, K., Monteau, F., De Brabander, H., Andre, F., et Le Bizec, B. (2005). The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Analytica Chimica Acta* **529**, 129-136.
- Aparicio, I., Santos, J. L., et Alonso, E. (2007). Simultaneous sonication-assisted extraction, and determination by gas chromatography-mass spectrometry, of di-(2-ethylhexyl)phthalate, nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and polychlorinated biphenyls in sludge from wastewater treatment plants. *Analytica Chimica Acta* **584**, 455-461.
- Araujo, L., Wild, J., Villa, N., Camargo, N., Cubillan, D., et Prieto, A. (2008). Determination of anti-inflammatory drugs in water samples, by in situ derivatization, solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* **75**, 111-115.
- Arditsoglou, A., et Voutsas, D. (2008). Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers. *Environmental Pollution*.

- Arslan, O. C., et Parlak, H. (2007). Embryotoxic effects of nonylphenol and octylphenol in sea urchin *Arbacia lixula*. *Ecotoxicology* **16**, 439-444.
- Arukwe, A., Forlin, L., et Goksøyr, A. (1997). Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**, 2576-2583.
- Arukwe, A., Goksøyr, A., Thibaut, R., et Cravedi, J. P. (2000). Metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine Environmental Research* **50**, 141-145.
- Atkinson, J. C., Diamond, F., Eichmiller, F., Selwitz, R., et Jones, G. (2002). Stability of bisphenol A, triethylene-glycol dimethacrylate, and bisphenol A dimethacrylate in whole saliva. *Dental Materials* **18**, 128-135.
- Ballesteros, O., Zafra, A., Navalon, A., et Vilchez, J. L. (2006). Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. *Journal of Chromatography A* **1121**, 154-162.
- Barnes, K. K., Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., Meyer, M. T., et Barber, L. B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - I) Groundwater. *Science of the Total Environment*.
- Barron, L., Tobin, J., et Paull, B. (2008). Multi-residue determination of pharmaceuticals in sludge and sludge enriched soils using pressurized liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Environmental Monitoring* **10**, 353-361.
- Basheer, C., et Lee, H. K. (2004). Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol-A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1057**, 163-169.
- Basheer, C., Parthiban, A., Jayaraman, A., Lee, H. K., et Valiyaveetil, S. (2005). Determination of alkylphenols and bisphenol-A: A comparative investigation of functional polymer-coated membrane microextraction and solid-phase microextraction techniques. *Journal of Chromatography A* **1087**, 274-282.
- Batt, A. L., Kim, S., et Aga, D. S. (2006). Enhanced biodegradation of lopromide and trimethoprim in nitrifying activated sludge. *Environmental Science and Technology* **40**, 7367-7373.
- Baugros, J. B., Giroud, B., Dessalces, G., Grenier-Loustalot, M. F., et Cren-Olive, C. (2008). Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Analytica Chimica Acta* **607**, 191-203.
- Beausse, J. (2004). Selected drugs in solid matrices: A review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **23**, 753-761.
- Belfroid, A., Van Velzen, M., Van der Horst, B., et Vethaak, D. (2002). Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: Evaluation of field measurements. *Chemosphere* **49**, 97-103.

- Bendz, D., Paxeus, N. A., Ginn, T. R., et Loge, F. J. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials* **122**, 195-204.
- Bennie, D. T., Sullivan, C. A., Lee, H. B., Peart, T. E., et Maguire, R. J. (1997). Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River. *Science of The Total Environment* **193**, 263-275.
- Berryman, D., Houde, F., DeBlois, C., et O'Shea, M. (2004). Nonylphenolic compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluents: a survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life. *Chemosphere* **56**, 247-255.
- Besse, J. P., et Garric, J. (2008). Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicology Letters* **176**, 104-123.
- Bjerregaard, L. B., Lindholm, C., Korsgaard, B., et Bjerregaard, P. (2008). Sex hormone concentrations and gonad histology in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to 17 β estradiol and bisphenol A. *Ecotoxicology* **17**, 252-263.
- Blackburn, M. A., et Waldock, M. J. (1995). Concentrations of alkylphenols in river and estuaries in England and Wales. *Wat .Res.* **29**, 1623-1629.
- Boitsov, S., Meier, S., Klungsoyr, J., et Svardal, A. (2004). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of alkylphenols in produced water from offshore oil installations as pentafluorobenzoate derivatives. *Journal of Chromatography A* **1059**, 131-141.
- Boleda, M. R., Galceran, M. T., et Ventura, F. (2007). Trace determination of cannabinoids and opiates in wastewater and surface waters by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1175**, 38-48.
- Bolz, U., Hagenmaier, H., et Korner, W. (2001). Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Wurttemberg, south-west Germany. *Environmental Pollution* **115**, 291-301.
- Boreen, A. L., Arnold, W. A., et McNeill, K. (2003). Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. *Aquatic Sciences* **65**, 320-341.
- Borgmann, U., Bennie, D. T., Ball, A. L., et Palabrica, V. (2007). Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations. *Chemosphere* **66**, 1278-1283.
- Bound, J. P., Kitsou, K., et Voulvoulis, N. (2006). Household disposal of pharmaceuticals and perception of risk to the environment. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **21**, 301-307.
- Boyd, G. R., Reemtsma, H., Grimm, D. A., et Mitra, S. (2003). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Science of the Total Environment* **311**, 135-149.
- Boyd, G. R., Zhang, S., et Grimm, D. A. (2005). Naproxen removal from water by chlorination and biofilm processes. *Water Research* **39**, 668-676.

- Bradley, P. M., Barber, L. B., Kolpin, D. W., McMahon, P. B., et Chapelle, F. H. (2007). Biotransformation of caffeine, cotinine, and nicotine in stream sediments: Implications for use as wastewater indicators. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**, 1116-1121.
- Brain, R. A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Hanson, M. L., Sanderson, H., Lam, M. W., Young, C., Mabury, S. A., Sibley, P. K., et Solomon, K. R. (2004). Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquatic Toxicology* **70**, 23-40.
- Bruchet Auguste, C. L., Esperanza Mar, Janex-Habibi Marie-Laure, Herry Gaela, Huyard Alain et Pasanau Jacqueline (2006). "Présence et devenir des perturbateurs endocriniens dans les stations de traitement des eaux résiduaires urbaines." ADEME, Suez environnement, Veolia environnement.
- Brunner P.H., Capri, S., Marcomini, A., et W., G. (1988). Occurance and behaviour of linear alkylbenzenesulphonates, noylphenol, nonylphenol mono- and nonylphenol. *Wat. Res.* **22**, 1465-1472.
- Bruno, F., Curini, R., Di Corcia, A., Fochi, I., Nazzari, M., et Samperi, R. (2002). Determination of surfactants and some of their metabolites in untreated and anaerobically digested sewage sludge by subcritical water extraction followed by liquid chromatography - Mass spectrometry. *Environmental Science and Technology* **36**, 4156-4161.
- Buser, H. R., Poiger, T., et Muller, M. D. (1998). Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: Rapid photodegradation in a lake. *Environmental Science and Technology* **32**, 3449-3456.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Lardy, S., Augagneur, S., et Budzinski, H. (2007). Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoid, copepod). Part 2: Alkylphenol-polyethoxylates. *Chemosphere* **70**, 281-287.
- Canesi, L., Lorusso, L. C., Ciacci, C., Betti, M., Regoli, F., Poiana, G., Gallo, G., et Marcomini, A. (2007a). Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* **69**, 994-1002.
- Canesi, L., Lorusso, L. C., Ciacci, C., Betti, M., Rocchi, M., Pojana, G., et Marcomini, A. (2007b). Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: In vitro and in vivo studies. *Aquatic Toxicology* **81**, 36-44.
- Canonica, S., Meunier, L., et von Gunten, U. (2008). Phototransformation of selected pharmaceuticals during UV treatment of drinking water. *Water Research* **42**, 121-128.
- Cantero, M., Rubio, S., et Perez-Bendito, D. (2006). Determination of alkylphenols and alkylphenol carboxylates in wastewater and river samples by hemimicelle-based extraction and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1120**, 260-267.
- Carballa, M., Fink, G., Omil, F., Lema, J. M., et Ternes, T. (2008). Determination of the solid-water distribution coefficient (Kd) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge. *Water Research* **42**, 287-295.

- Carballa, M., Omil, F., Alder, A. C., et Lema, J. M. (2006). Comparison between the conventional anaerobic digestion of sewage sludge and its combination with a chemical or thermal pre-treatment concerning the removal of pharmaceuticals and personal care products. In "Water Science and Technology", Vol. 53, pp. 109-117.
- Carballa, M., Omil, F., et Lema, J. M. (2005). Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. *Water Research* **39**, 4790-4796.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Rodriguez, I., Gomez, M., et Ternes, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research* **38**, 2918-2926.
- Carpinteiro, J., Quintana, J. B., Martinez, E., Rodriguez, I., Carro, A. M., Lorenzo, R. A., et Cela, R. (2004). Application of strategic sample composition to the screening of anti-inflammatory drugs in water samples using solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta* **524**, 63-71.
- Carrara, C., Ptacek, C. J., Robertson, W. D., Blowes, D. W., Moncur, M. C., Sverko, E., et Backus, S. (2008). Fate of pharmaceutical and trace organic compounds in three septic system plumes, Ontario, Canada. *Environmental Science and Technology* **42**, 2805-2811.
- Carson, R. (1962) Silent spring. Boston: Houghton Mifflin.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R., et Zuccato, E. (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A* **1092**, 206-215.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D., et Zuccato, E. (2006). Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental Science and Technology* **40**, 357-363.
- Cespedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., et Barcelo, D. (2008). Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia, NE Spain). *Environmental Pollution* **153**, 384-392.
- Chang, B. V., Chiang, F., et Yuan, S. Y. (2005). Anaerobic degradation of nonylphenol in sludge. *Chemosphere* **59**, 1415-1420.
- Chang, H., Wu, S., Hu, J., Asami, M., et Kunikane, S. (2008). Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1195**, 44-51.
- Chen, B., Mai, B.-X., Duan, J.-C., Luo, X.-J., Yang, Q.-S., Sheng, G.-Y., et Fu, J.-M. (2005). Concentrations of alkylphenols in sediments from the Pearl River estuary and South China Sea, South China. *Marine Pollution Bulletin* **50**, 993-997.
- Chen, P. J., Linden, K. G., Hinton, D. E., Kashiwada, S., Rosenfeldt, E. J., et Kullman, S. W. (2006). Biological assessment of bisphenol A degradation in water following direct photolysis and UV advanced oxidation. *Chemosphere* **65**, 1094-1102.
- Cheng, C.-Y., Li, W.-R., Chang, J.-W., Wu, H.-C., et Ding, W.-H. Synthesis and determination of dicarboxylic degradation products of nonylphenol polyethoxylates by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **In Press, Corrected Proof**.

- Cheng, C. Y., Liu, L. L., et Ding, W. H. (2006). Occurrence and seasonal variation of alkylphenols in marine organisms from the coast of Taiwan. *Chemosphere* **65**, 2152-2159.
- Chikae, M., Ikeda, R., Hasan, Q., Morita, Y., et Tamiya, E. (2003). Effect of alkylphenols on adult male medaka: plasma vitellogenin goes up to the level of estrous female. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **15**, 33-36.
- Chin, Y. P., Miller, P. L., Zeng, L., Cawley, K., et Weavers, L. K. (2004). Photosensitized degradation of bisphenol A by dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology* **38**, 5888-5894.
- Chiron, S., Minero, C., et Vione, D. (2006). Photodegradation processes of the antiepileptic drug carbamazepine, relevant to estuarine waters. *Environmental Science and Technology* **40**, 5977-5983.
- Christiansen, L. B., Pedersen, K. L., Korsgaard, B., et Bjerregaard, P. (1998). Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using in vivo synthesis of vitellogenin as a biomarker. *Marine Environmental Research* **46**, 137-140.
- Chu, S., et Metcalfe, C. D. (2007). Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1163**, 112-118.
- Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O., et Kroiss, H. (2005a). The solids retention time - A suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Research* **39**, 97-106.
- Clara, M., S. Scharf, et al. (2007). Occurrence of selected surfactants in untreated and treated sewage. *Water Research* **41**(19), 4339-4348.
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., et Kroiss, H. (2005b). Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research* **39**, 4797-4807.
- Clara, M., Strenn, B., et Kreuzinger, N. (2004a). Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: Investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Research* **38**, 947-954.
- Clara, M., Strenn, B., Saracevic, E., et Kreuzinger, N. (2004b). Adsorption of bisphenol-A, 17[beta]-estradiol and 17[alpha]-ethinylestradiol to sewage sludge. *Chemosphere* **56**, 843-851.
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters* **142**, 185-194.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, et acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **59**, 309-315.
- Comeau, F., Surette, C., Brun, G. L., et Losier, R. (2008). The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. *Science of the Total Environment* **396**, 132-146.

- Corcia, A. D., Costantino, A., Crescenzi, C., et Samperi, R. (1998). Characterization of recalcitrant intermediates from biotransformation of the Branched alkyl side chain of nonylphenol ethoxylate surfactants. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 2401-2409.
- Corvini, P. F. X., Schaffer, A., et Schlosser, D. (2006). Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols - Our evolving view. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 223-243.
- Crain, D. A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G. A., et Guillette Jr, L. J. (2007). An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology* **24**, 225-239.
- Crane, M., Watts, C., et Boucard, T. (2006). Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of the Total Environment* **367**, 23-41.
- Cueva-Mestanza, R., Sosa-Ferrera, Z., Torres-Padron, M. E., et Santana-Rodriguez, J. J. (2008). Preconcentration of pharmaceuticals residues in sediment samples using microwave assisted micellar extraction coupled with solid phase extraction et their determination by HPLC-UV. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **863**, 150-157.
- Cunningham, V. L., Buzby, M., Hutchinson, T., Mastrocco, F., Parke, N., et Roden, N. (2006). Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: Next steps. *Environmental Science and Technology* **40**, 3456-3462.
- Daidoji, T., Kaino, T., Iwano, H., Inoue, H., Kurihara, R., Hashimoto, S., et Yokota, H. (2006). Down regulation of bisphenol A glucuronidation in carp during the winter pre-breeding season. *Aquatic Toxicology* **77**, 386-392.
- Das, K. C., et Xia, K. (2008). Transformation of 4-nonylphenol isomers during biosolids composting. *Chemosphere* **70**, 761-768.
- Delle Site, A. (2001). Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbent/water systems and sorption coefficients for selected pollutants. A review. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **30**, 187-439.
- Di Corcia, A., Costantino, A., Crescenzi, C., Marinoni, E., et Samperi, R. (1998). Characterization of recalcitrant intermediates from biotransformation of the branched alkyl side chain of nonylphenol ethoxylate surfactants. *Environmental Science and Technology* **32**, 2401-2409.
- Di Corcia, A., Samperi, R., et Marcomini, A. (1994). Monitoring aromatic surfactants and their biodegradation intermediates in raw and treated sewages by solid-phase extraction and liquid Chromatography. *Environmental Science and Technology* **28**, 850-858.
- Drewes, J. E., Fox, P., et Jekel, M. (2001). Occurrence of iodinated X-ray contrast media in domestic effluents and their fate during indirect potable reuse. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* **36**, 1633-1645.
- Eertmans, F., Dhooge, W., Stuyvaert, S., et Comhaire, F. (2003). Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. *Toxicology in Vitro* **17**, 515-524.

- Ejlertsson, J., Nilsson, M. L., Kylin, H., Bergman, A., Karlson, L., Oquist, M., et Svensson, B. H. (1999). Anaerobic degradation of nonylphenol mono- et diethoxylates in digester sludge, landfilled municipal solid waste, and landfilled sludge. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 301-306.
- Enick, O. V., et Moore, M. M. (2007). Assessing the assessments: Pharmaceuticals in the environment. *Environmental Impact Assessment Review* **27**, 707-729.
- Eriksson, E., Christensen, N., Ejbye Schmidt, J., et Ledin, A. (2008). Potential priority pollutants in sewage sludge. *Desalination* **226**, 371-388.
- Esplugas, S., Bila, D. M., Krause, L. G. T., et Dezotti, M. (2007). Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of Hazardous Materials* **149**, 631-642.
- Fairgrieve, W. T., Masada, C. L., Peterson, M. E., McAuley, W. C., McDowell, G. C., et Strom, M. S. (2006). Concentrations of erythromycin and azithromycin in mature Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* after intraperitoneal injection, and in their progeny. *Diseases of Aquatic Organisms* **68**, 227-234.
- Fang, W. H., Hu, L. L., Yang, X. L., Hu, K., Liang, S. C., et Zhou, S. (2008). Effect of temperature on pharmacokinetics of enrofloxacin in mud crab, *Scylla serrata* (Forsskal), following oral administration. *Journal of Fish Diseases* **31**, 171-176.
- Farre, M., Gros, M., Hernandez, B., Petrovic, M., Hancock, P., et Barcelo, D. (2008a). Analysis of biologically active compounds in water by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**, 41-51.
- Farre, M., Petrovic, M., Gros, M., Kosjek, T., Martinez, E., Heath, E., Osvald, P., Loos, R., Le Menach, K., Budzinski, H., De Alencastro, F., Muller, J., Knepper, T., Fink, G., Ternes, T. A., Zuccato, E., Kormali, P., Gans, O., Rodil, R., Quintana, J. B., Pastori, F., Gentili, A., et Barcelo, D. (2008b). First interlaboratory exercise on non-steroidal anti-inflammatory drugs analysis in environmental samples. *Talanta* **76**, 580-590.
- Fatta, D., Achilleos, A., Nikolaou, A., et Meric, S. (2007). Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **26**, 515-533.
- Federle, T. W., Kaiser, S. K., et Nuck, B. A. (2002). Fate and effects of triclosan in activated sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 1330-1337.
- Fenner, K., C. Kooijman, et al. (2002). Including transformation products into the risk assessment for chemicals: The case of nonylphenol ethoxylate usage in Switzerland. *Environmental Science and Technology* **36**(6), 1147-1154.
- Ferguson, P. L., Iden, C. R., et Brownawell, B. J. (2000). Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography—electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72**, 4322-4330.
- Ferguson, P. L., Iden, C. R., et Brownawell, B. J. (2001). Analysis of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in environmental samples by mixed-mode high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **938**, 79-91.

- Ferreira-Leach, A. M. R., et Hill, E. M. (2001). Bioconcentration and distribution of 4-tert-octylphenol residues in tissues of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Environmental Research* **51**, 75-89.
- Fiedler, S., Foerster, M., Glaser, B., et Zech, W. (2007). Alkylphenols in sediments of the Atlantic Rainforest south-west of Sao Paulo, Brazil. *Chemosphere* **66**, 212-218.
- Flippin, J. L., Huggett, D., et Foran, C. M. (2007). Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology* **81**, 73-78.
- Focazio, M. J., D. W. Kolpin, et al. (2008). "A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources." *Science of the Total Environment*.
- Fraysse, B., et Garric, J. (2005). Prediction and experimental validation of acute toxicity of b-blockers in *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**, 2470-2476.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Muller, J., et Wenzel, A. (2002). Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research* **36**, 1429-1438.
- Fu, M., Li, Z., et Gao, H. (2007). Distribution characteristics of nonylphenol in Jiaozhou Bay of Qingdao and its adjacent rivers. *Chemosphere* **69**, 1009-1016.
- Gaido, K. W., L. S. Leonard, et al. (1997). Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and Applied Pharmacology* **143**(1), 205-212.
- Gebhardt, W., et Schroder, H. F. (2007). Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation. *Journal of Chromatography A* **1160**, 34-43.
- Ghanem, A., Bados, P., Estaun, A. R., de Alencastro, L. F., Taibi, S., Einhorn, J., et Mougin, C. (2007). Concentrations and specific loads of glyphosate, diuron, atrazine, nonylphenol and metabolites thereof in French urban sewage sludge. *Chemosphere* **69**, 1368-1373.
- Gibson, R., Wang, M. J., Padgett, E., et Beck, A. J. (2005). Analysis of 4-nonylphenols, phthalates, and polychlorinated biphenyls in soils and biosolids. *Chemosphere* **61**, 1336-1344.
- Giger, W., Ahel, M., Kock, M., Laubscher, H. U., Schaffner, C., et Schneider, J. (1987). Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactant and nitrilotriacetate in sewage treatment. *Wat. Sci. Technol.* **19**, 449-460.
- Giger, W., Brunner, P. H., et Schaffner, C. (1984). 4-nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science*. **225**, 623-625.
- Golet, E. M., Strehler, A., Alder, A. C., et Giger, W. (2002). Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Analytical Chemistry* **74**, 5455-5462.
- Gomez, M. J., Martinez Bueno, M. J., Lacorte, S., Fernandez-Alba, A. R., et Agüera, A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* **In Press, Corrected Proof**.

- Gomez, M. J., Mezcua, M., Martinez, M. J., Fernandez-Alba, A. R., et Aguera, A. (2006). A new method for monitoring oestrogens, N-octylphenol, and bisphenol A in wastewater treatment plants by solid-phase extraction-gas chromatography-tandem mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **86**, 3-13.
- Gonzalez-Casado, A., Navas, N., Del Olmo, M., et Vilchez, J. L. (1998). Determination of Bisphenol a in Water by Micro Liquid-Liquid Extraction Followed by Silylation and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Chromatographic Science* **36**, 565-569.
- Gonzalez, S., Petrovic, M., et Barcelo, D. (2004). Simultaneous extraction and fate of linear alkylbenzene sulfonates, coconut diethanol amides, nonylphenol ethoxylates and their degradation products in wastewater treatment plants, receiving coastal waters and sediments in the Catalanian area (NE Spain). *Journal of Chromatography A* **1052**, 111-120.
- Gourlay, C., Tusseau-Vuillemin, M.H., Mouchel, J.M. et Garric, J. (2005) The ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability increases with DOM biodegradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **61**(1), 74-82.
- Gray, J., L. Earl, Kelce, W. R., Wiese, T., Tyl, R., Gaido, K., Cook, J., Klinefelter, G., Desaulniers, D., et Wilson, E. (1997). Endocrine screening methods workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. *Reproductive Toxicology* **11**, 719-750.
- Gros, M., Pizzolato, T. M., Petrovic, M., de Alda, M. J. L., et Barcelo, D. (2008). Trace level determination of beta-blockers in waste waters by highly selective molecularly imprinted polymers extraction followed by liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1189**, 374-384.
- Gross, B., Montgomery-Brown, J., Naumann, A., et Reinhard, M. (2004). Occurrence and fate of pharmaceuticals and alkylphenol ethoxylate metabolites in an effluent-dominated river and wetland. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**, 2074-2083.
- Gultekin, I., et Ince, N. H. (2007). Synthetic endocrine disruptors in the environment and water remediation by advanced oxidation processes. *Journal of Environmental Management* **85**, 816-832.
- Guerreiro, A., Soares, A., Piletska, E., Mattiasson, B., et Piletsky, S. (2008). Preliminary evaluation of new polymer matrix for solid-phase extraction of nonylphenol from water samples. *Analytica Chimica Acta* **612**, 99-104.
- Han, G. H., Hur, H. G., et Kim, S. D. (2006). Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: Occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 265-271.
- Hao, C., Clement, R., et Yang, P. (2007). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry of bioactive pharmaceutical compounds in the aquatic environment-a decade's activities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**, 1247-1257.
- Hari, A. C., Paruchuri, R. A., Sabatini, D. A., et Kibbey, T. C. G. (2005). Effects of pH and cationic and nonionic surfactants on the adsorption of pharmaceutical to a natural aquifer material. *Environmental Science and Technology* **39**, 2592-2598.

- Harman, C., Boyum, O., Erik Tollefsen, K., Thomas, K., et Grung, M. (2008). Uptake of some selected aquatic pollutants in semipermeable membrane devices (SPMDs) and the polar organic chemical integrative sampler (POCIS). *Journal of Environmental Monitoring* **10**, 239-247.
- Heberer, T. (2002). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology* **266**, 175-189.
- Heberer, T., et Feldmann, D. (2005). Contribution of effluents from hospitals and private households to the total loads of diclofenac and carbamazepine in municipal sewage effluents - Modeling versus measurements. *Journal of Hazardous Materials* **122**, 211-218.
- Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D., Koutsouba, V., et Hiskia, A. (2001). Occurrence of pharmaceutical residues in sewage, river, ground, and drinking water in Greece and Berlin (Germany). In "ACS Symposium Series", Vol. 791, pp. 70-83.
- Heberer, T., Schmidt-Baumler, K., et Stan, H. J. (1998). Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Part I: Drug residues and other polar contaminants in Berlin surface and groundwater. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **26**, 272-278.
- Heemken, O. P., Reincke, H., Stachel, B., et Theobald, N. (2001). The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere* **45**, 245-259.
- Heinis, L. J., Knuth, Michael L., Liber, Karsten, Sheedy, Barbara R., Tunell, Renee L., Ankley et Gerald T. (1999). Persistence and distribution of 4-nonylphenol following repeated application to littoral enclosures. *Journal of Environmental Toxicology and Chemistry* **18**, 363-375.
- Hemmer, M. J., Hemmer, B. L., Bowman, C. J., Kroll, K. J., Folmar, L. C., Marcovich, D., Hoglund, M. D., et Denslow, N. D. (2001). Effects of p-nonylphenol, methoxychlor, and endosulfan on vitellogenin induction and expression in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 336-343.
- Hernandez-Raquet, G., Soef, A., Delgenes, N., et Balaguer, P. (2007). Removal of the endocrine disrupter nonylphenol and its estrogenic activity in sludge treatment processes. *Water Research* **41**, 2643-2651.
- Hernando, M. D., Mezcuca, M., Fernandez-Alba, A. R., et Barcelo, D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* **69**, 334-342.
- Hill, E. M., et Smith, M. D. (2006). Identification and steroid receptor activity of products formed from the bromination of technical nonylphenol. *Chemosphere* **64**, 1761-1768.
- Hoeger, B., Dietrich, D. R., Schmid, D., Hartmann, A., et Hitzfeld, B. (2007). Distribution of intraperitoneally injected diclofenac in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- Hohne, C., et Puttmann, W. (2008). Occurrence and temporal variations of the xenoestrogens bisphenol A, 4-tert-octylphenol, and tech. 4-nonylphenol in two German wastewater treatment plants. *Environmental Science and Pollution Research - International* **15**, 405-416.

- Hou, S. G., Sun, H. W., et Gao, Y. (2006). Sorption of small metabolites of nonylphenol polyethoxylates in single and complex systems on aquatic suspended particulate matter. *Chemosphere* **63**, 31-38.
- Houde, F., DeBlois, C., et Berryman, D. (2002). Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of nonylphenol polyethoxylates and nonylphenol carboxylic acids in surface water. *Journal of Chromatography A* **961**, 245-256.
- Hu, J., Jin, F., Wan, Y., Yang, M., An, L., An, W., et Tao, S. (2005). Trophodynamic Behavior of 4-Nonylphenol and Nonylphenol Polyethoxylate in a Marine Aquatic Food Web from Bohai Bay, North China: Comparison to DDTs. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 4801-4807.
- Hu, J. Y., Xie, G. H., et Aizawa, T. (2002). Products of aqueous chlorination of 4-nonylphenol and their estrogenic activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 2034-2039.
- Hu, X. l., Peng, J. f., Liu, J. f., Jiang, G. b., et Jonsson, J. A. (2006). Evaluating the impacts of some environmentally relevant factors on the availability of bisphenol A with negligible-depletion SPME. *Chemosphere* **65**, 1935-1941.
- Hua, J., An, P., Winter, J., et Gallert, C. (2003). Elimination of COD, microorganisms and pharmaceuticals from sewage by trickling through sandy soil below leaking sewers. *Water Research* **37**, 4395-4404.
- Huber, M. M., Gobel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., McArdell, C. S., Ried, A., Siegrist, H., Ternes, T. A., et Von Gunten, U. (2005a). Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: A pilot study. *Environmental Science and Technology* **39**, 4290-4299.
- Huber, M. M., Korhonen, S., Ternes, T. A., et Von Gunten, U. (2005b). Oxidation of pharmaceuticals during water treatment with chlorine dioxide. *Water Research* **39**, 3607-3617.
- Huerta-Fontela, M., Galceran, M. T., Martin-Alonso, J., et Ventura, F. (2008). Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain. *Science of the Total Environment* **397**, 31-40.
- Huschek, G., Hansen, P. D., Maurer, H. H., Krenzel, D., et Kayser, A. (2004). Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations. *Environmental Toxicology* **19**, 226-240.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., et Parrella, A. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of the Total Environment* **346**, 87-98.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Palumbo, M., Piccioli, V., et Parrella, A. (2007a). Influence of alkylphenols and trace elements in toxic, genotoxic, and endocrine disruption activity of wastewater treatment plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**, 1686-1694.
- Isidori, M., Nardelli, A., Parrella, A., Pascarella, L., et Previtera, L. (2006). A multispecies study to assess the toxic and genotoxic effect of pharmaceuticals: Furosemide and its photoproduct. *Chemosphere* **63**, 785-793.

- Isidori, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Rubino, M., et Parrella, A. (2007b). Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms. *Environment International* **33**, 635-641.
- Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A., et Takada, H. (2001). Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 1041-1049.
- Isobe, T., et Takada, H. (2004). Determination of degradation products of alkylphenol polyethoxylates in municipal wastewaters and rivers in Tokyo, Japan. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**, 599-605.
- Jahnke, A., Gandrass, J., et Ruck, W. (2004). Simultaneous determination of alkylphenol ethoxylates and their biotransformation products by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1035**, 115-122.
- Jiang, X., Tian, W., Zhao, C., Zhang, H., et Liu, M. (2007). A novel sol-gel-material prepared by a surface imprinting technique for the selective solid-phase extraction of bisphenol A. *Talanta* **72**, 119-125.
- Jiang, X., Zhao, C., Jiang, N., Zhang, H., et Liu, M. (2008). Selective solid-phase extraction using molecular imprinted polymer for the analysis of diethylstilbestrol. *Food Chemistry* **108**, 1061-1067.
- Jin, F., Hu, J., Liu, J., Yang, M., Wang, F., et Wang, H. (2008). Sequestration of nonylphenol in sediment from Bohai Bay, North China. *Environmental Science and Technology* **42**, 746-751.
- Jobling, S., et Sumpter, J. P. (1993). Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* **27**, 361-372.
- Jobling S., Nolan M., T. C. R., Brighty G., et Sumpter J.P. (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ Sci Technol.* **32**, 2498-2506.
- Jobling S., S. D., Osborne J., Mathiessen P., et Sumpter J.P., (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem* **15**, 194-202.
- Johnson, A. C., Aerni, H. R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K., Jurgens, M., Nakari, T., Pickering, A., et Suter, M. J. F. (2005). Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Research* **39**, 47-58.
- Johnson, A. C., et Sumpter, J. P. (2001). Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 4697-4703.
- Jones-Lepp, T. L., Alvarez, D. A., Petty, J. D., et Huckins, J. N. (2004). Polar organic chemical integrative sampling and liquid chromatography- electrospray/ion-trap mass spectrometry for assessing selected prescription and illicit drugs in treated sewage effluents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **47**, 427-439.

- Jones-Lepp, T. L., et Stevens, R. (2007). Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: The interface between analytical chemistry and regulation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**, 1173-1183.
- Jones, O. A. H., Green, P. G., Voulvoulis, N., et Lester, J. N. (2007). Questioning the excessive use of advanced treatment to remove organic micropollutants from wastewater. *Environmental Science and Technology* **41**, 5085-5089.
- Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., et Lester, J. N. (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research* **36**, 5013-5022.
- Jonkers, N., Laane, R. W. P. M., de Graaf, C., et de Voogt, P. (2005a). Fate modeling of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch Scheldt and Rhine estuaries: validation with new field data. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **62**, 141-160.
- Jonkers, N., Laane, R. W. P. M., et de Voogt, P. (2005b). Sources and fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch coastal zone of the North Sea. *Marine Chemistry* **96**, 115-135.
- Jonkers, N., T.P., K., et Voogt, P. D. (2001). Aerobic biodegradation studies of nonylphenol ethoxylates in river water using liquid chromatography— electrospray tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 335-340.
- Joss, A., Keller, E., Alder, A. C., Gobel, A., McArdell, C. S., Ternes, T., et Siegrist, H. (2005). Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research* **39**, 3139-3152.
- Joss, A., Zabczynski, S., Gobel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., McArdell, C. S., Ternes, T. A., Thomsen, A., et Siegrist, H. (2006). Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Research* **40**, 1686-1696.
- Kang, J. H., et Kondo, F. (2002). Effects of bacterial counts and temperature on the biodegradation of bisphenol A in river water. *Chemosphere* **49**, 493-498.
- Kang, J. H., et Kondo, F. (2005). Bisphenol A degradation in seawater is different from that in river water. *Chemosphere* **60**, 1288-1292.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., et Guwy, A. J. (2008a). Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-16.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., et Guwy, A. J. (2008b). The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*.
- Kawaguchi, M., Inoue, K., Yoshimura, M., Ito, R., Sakui, N., et Nakazawa, H. (2004a). Determination of 4-nonylphenol and 4-tert.-octylphenol in water samples by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **505**, 217-222.
- Kawaguchi, M., Inoue, K., Yoshimura, M., Sakui, N., Okanouchi, N., Ito, R., Yoshimura, Y., et Nakazawa, H. (2004b). Trace analysis of phenolic xenoestrogens in water samples by stir bar

- sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1041**, 19-26.
- Kawaguchi, M., Ito, R., Endo, N., Okanouchi, N., Sakui, N., Saito, K., et Nakazawa, H. (2006a). Liquid phase microextraction with in situ derivatization for measurement of bisphenol A in river water sample by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1110**, 1-5.
- Kawaguchi, M., Ito, R., Hayatsu, Y., Nakata, H., Sakui, N., Okanouchi, N., Saito, K., Yokota, H., Izumi, S. I., Makino, T., et Nakazawa, H. (2006b). Stir bar sorptive extraction with in situ de-conjugation and thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry for measurement of 4-nonylphenol glucuronide in human urine sample. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**, 82-87.
- Kawahata, H., Ohta, H., Inoue, M., et Suzuki, A. (2004). Endocrine disrupter nonylphenol and bisphenol A contamination in Okinawa and Ishigaki Islands, Japan--within coral reefs and adjacent river mouths. *Chemosphere* **55**, 1519-1527.
- Keller, H., Xia, K., et Bhandari, A. (2003). Occurrence and degradation of estrogenic nonylphenol and its precursors in Northeast Kansas wastewater treatment plants. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* **7**, 203-213.
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators* **8**, 1-13.
- Khan, S. J., et Ongerth, J. E. (2004). Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations. *Chemosphere* **54**, 355-367.
- Kim, I. H., Tanaka, H., Iwasaki, T., Takubo, T., Morioka, T., et Kato, Y. (2008). Classification of the degradability of 30 pharmaceuticals in water with ozone, UV and H₂O₂. In "Water Science and Technology", Vol. 57, pp. 195-200.
- Kitada, Y., Kawahata, H., Suzuki, A., et Oomori, T. (2008). Distribution of pesticides and bisphenol A in sediments collected from rivers adjacent to coral reefs. *Chemosphere*.
- Kloepfer, A., Quintana, J. B., et Reemtsma, T. (2005). Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *Journal of Chromatography A* **1067**, 153-160.
- Koh, C.-H., Khim, J. S., Villeneuve, D. L., Kannan, K., et Giesy, J. P. (2006). Characterization of trace organic contaminants in marine sediment from Yeongil Bay, Korea: 1. Instrumental analyses. *Environmental Pollution* **142**, 39-47.
- Kostich, M. S., et Lazorchak, J. M. (2008). Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use. *Science of the Total Environment* **389**, 329-339.
- Kot-Wasik, A., Debska, J., et Namiesnik, J. (2007). Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **26**, 557-568.
- Kreuzinger, N., Clara, M., Strenn, B., et Kroiss, H. (2004). Relevance of the sludge retention time (SRT) as design criteria for wastewater treatment plants for the removal of endocrine

- disruptors and pharmaceuticals from wastewater. In "Water Science and Technology", Vol. 50, pp. 149-156.
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L., et Feldman, D. (1993). Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* **132**, 2279-2286.
- Kuch, H. M., et Ballschmiter, K. (2001). Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environmental Science and Technology* **35**, 3201-3206.
- Kuehn, B. M. (2008). Traces of drugs found in drinking water: Health effects unknown, safer disposal urged. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **299**, 2011-2013.
- Kumazawa, T., X. P. Lee, et al. (2003). Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis. *Analytica Chimica Acta* **492**(1-2), 49-67.
- Kummerer, K. (2004). Pharmaceuticals in the environment. *Sources, Fate, Effects and Risks*, 2nd Edition.
- Kvestak, R., et Ahel, M. (1995). Biotransformation of nonylphenol polyethoxylate surfactants by estuarine mixed bacterial cultures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **29**, 551-556.
- La Guardia, M. J., Hale, R. C., Harvey, E., et Matteson Mainor, T. (2001). Alkylphenol ethoxylate degradation products in land-applied sewage sludge (biosolids). *Environmental Science and Technology* **35**, 4798-4804.
- Lacey, C., McMahon, G., Bones, J., Barron, L., Morrissey, A., et Tobin, J. M. (2008). An LC-MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Talanta*.
- Lam, M. W., et Mabury, S. A. (2005). Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquatic Sciences* **67**, 177-188.
- Leclercq, M., O. Mathieu, et al. (2008). Presence and Fate of Carbamazepine, Oxcarbazepine, and Seven of Their Metabolites at Wastewater Treatment Plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*: 1-8.
- Lee, H. B. (1999). Review of analytical methods for the determination of nonylphenol and related compounds in environmental samples. *Water Qual. Res. J. Canada*. **34**, 3-35.
- Lee, H. B., et Peart, T. E. (2000). Determination of bisphenol A in sewage effluent and sludge by solid-phase and supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International* **83**, 290-297.
- Lee, H. B., Peart, T. E., Bennie, D. T., et Maguire, R. J. (1997). Determination of nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic acid metabolites in sewage treatment plant sludge by supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Chromatography A*. **785**, 385-394.

- Lee, H. B., Peart, T. E., et Svoboda, M. L. (2005). Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1094**, 122-129.
- Lee, H. B., Sarafin, K., Peart, T. E., et Svoboda, M. L. (2003). Acidic pharmaceuticals in sewage - Methodology, stability test, occurrence, and removal from Ontario samples. *Water Quality Research Journal of Canada* **38**, 667-682.
- Levasseur, F. A., Caille, G., et Elie, R. (1985). Electron-capture gas chromatographic determination of loprazolam in plasma and a pharmacokinetic application. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* **6**, 381-387.
- Lewis, S. K., et Lech, J. J. (1996). Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol from water in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* **26**, 813-819.
- Li, D., Dong, M., Shim, W. J., Hong, S. H., Oh, J.-R., Yim, U. H., Jeung, J. H., Kanan, N., Kim, E. S., et Cho, S. R. (2005). Seasonal and spatial distribution of nonylphenol and IBP in Saemangeum Bay, Korea. *Marine Pollution Bulletin* **51**, 966-974.
- Li, D., Dong, M., Shim, W. J., Yim, U. H., Hong, S. H., et Kannan, N. (2008a). Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea. *Chemosphere* **71**, 1162-1172.
- Li, D., Kim, M., Oh, J.-R., et Park, J. (2004). Distribution characteristics of nonylphenols in the artificial Lake Shihwa, and surrounding creeks in Korea. *Chemosphere* **56**, 783-790.
- Li, J., Zhou, B., Liu, Y., Yang, Q., et Cai, W. (2008b). Influence of the coexisting contaminants on bisphenol A sorption and desorption in soil. *Journal of Hazardous Materials* **151**, 389-393.
- Li, J., Zhou, B., Shao, J., Yang, Q., Liu, Y., et Cai, W. (2007a). Influence of the presence of heavy metals and surface-active compounds on the sorption of bisphenol A to sediment. *Chemosphere* **68**, 1298-1303.
- Li, K., Yediler, A., Yang, M., Schulte-Hostede, S., et Wong, M. H. (2008c). Ozonation of oxytetracycline and toxicological assessment of its oxidation by-products. *Chemosphere*.
- Li, M. H. (2008). Effects of nonylphenol on cholinesterase and carboxylesterase activities in male guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- Li, X., Lin, L., Zou, S., Lan, C., et Luan, T. (2006). Determination of Bisphenol A in Landfill Leachate by Solid Phase Microextraction with Headspace Derivatization and Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **34**, 325-328.
- Li, X. l., Luan, T. g., Liang, Y., Wong, M. h., et Lan, C. y. (2007b). Distribution patterns of octylphenol and nonylphenol in the aquatic system at Mai Po Marshes Nature Reserve, a subtropical estuarine wetland in Hong Kong. *Journal of Environmental Sciences* **19**, 657-662.
- Lin, A. Y. C., et Reinhard, M. (2005). Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**, 1303-1309.

- Lin, W. C., Chen, H. C., et 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. *Journal of Chromatography A* **1065**, 279-285.
- Lindberg, R. H., Olofsson, U., Rendahl, P., Johansson, M. I., Tysklind, M., et Andersson, B. A. V. (2006). Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. *Environmental Science and Technology* **40**, 1042-1048.
- Lindholm, C., Pedersen, S. N., et Bjerregaard, P. (2001). Uptake, metabolism and excretion of bisphenol A in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* **55**, 75-84.
- Lindqvist, N., Tuhkanen, T., et Kronberg, L. (2005). Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Research* **39**, 2219-2228.
- Liu, R., Zhou, J. L., et Wilding, A. (2004). Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. *Journal of Chromatography A* **1038**, 19-26.
- Löffler, D., et Ternes, T. A. (2003). Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1021**, 133-144.
- Loos, R., Hanke, G., Umlauf, G., et Eisenreich, S. J. (2007). LC-MS-MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters. *Chemosphere* **66**, 690-699.
- Loos, R., Wollgast, J., Castro-Jiménez, J., Mariani, G., Huber, T., Locoro, G., Hanke, G., Umlauf, G., Bidoglio, G., Hohenblum, P., Moche, W., Weiss, S., Schmid, H., Leiendecker, F., Ternes, T., Ortega, A. N., Hildebrandt, A., Barceló, D., Lepom, P., Dimitrova, I., Nitcheva, O., Polesello, S., Valsecchi, S., Boutrup, S., Sortkjaer, O., de Boer, R., et Staeb, J. (2008). Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **27**, 89-95.
- Lorhensri, O., Intravijit, J., Sabatini, D. A., Kibbey, T. C. G., Osathaphan, K., et Saiwan, C. (2006). Sorption of acetaminophen, 17-ethynyl estradiol, nalidixic acid, and norfloxacin to silica, alumina, and a hydrophobic medium. *Water Research* **40**, 1481-1491.
- Lorhensri, O., Sabatini, D. A., Kibbey, T. C. G., Osathaphan, K., et Saiwan, C. (2007). Sorption and transport of acetaminophen, 17-ethynyl estradiol, nalidixic acid with low organic content aquifer sand. *Water Research* **41**, 2180-2188.
- Loyo-Rosales, J. E., Rice, C. P., et Torrents, A. (2007). Octyl and nonylphenol ethoxylates and carboxylates in wastewater and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Chemosphere* **68**, 2118-2127.
- Loyo-Rosales, J. E., Schmitz-Afonso, I., Rice, C. P., et Torrents, A. (2003). Analysis of Octyl- and Nonylphenol and Their Ethoxylates in Water and Sediments by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 4811-4817.
- Lowe, J., et Hossain, M. M. (2008). Application of ultrafiltration membranes for removal of humic acid from drinking water. *Desalination* **218**, 343-354.

- Lu, J., Jin, Q., He, Y., Wu, J., Zhang, W., et Zhao, J. (2008a). Anaerobic degradation behavior of nonylphenol polyethoxylates in sludge. *Chemosphere* **71**, 345-351.
- Lu, J., Jin, Q., He, Y., Wu, J., Zhang, W., et Zhao, J. (2008b). Biodegradation of nonylphenol polyethoxylates by denitrifying activated sludge. *Water Research* **42**, 1075-1082.
- Macia, A., Borrull, F., Calull, M., et Aguilar, C. (2004). Determination of some acidic drugs in surface and sewage treatment plant waters by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* **25**, 3441-3449.
- MacLeod, S. L., McClure, E. L., et Wong, C. S. (2007). Laboratory calibration and field deployment of the polar organic chemical integrative sampler for pharmaceuticals and personal care products in wastewater and surface water. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**, 2517-2529.
- Maguire, R. J. (1999). Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. *Water Qual. Res. J. Canada*. **34**, 37-78.
- Manzano, M. A., Perales, J. A., Sales, D., et Quiroga, J. M. (1999). The effect of temperature on the biodegradation of a nonylphenol polyethoxylate in river water. *Water Research* **33**, 2593-2600.
- Marcomini, A., Pavoni, B., Sfriso, A., et Orio, A. A. (1990). Persistent metabolites of alkylphenol polyethoxylates in the marine environment. *Marine Chemistry*. **29**, 307-323.
- Martin-Skilton, R., R. Lavado, et al. (2006). Evidence of endocrine alteration in the red mullet, *Mullus barbatus* from the NW Mediterranean. *Environmental Pollution* **141**(1), 60-68.
- Maskaoui, K., A. Hibberd, et al. (2007). Assessment of the interaction between aquatic colloids and pharmaceuticals facilitated by cross-flow ultrafiltration. *Environmental Science and Technology* **41**(23), 8038-8043.
- Matamoros, V., A. Caselles-Osorio, et al. (2008). Behaviour of pharmaceutical products and biodegradation intermediates in horizontal subsurface flow constructed wetland. A microcosm experiment." *Science of the Total Environment* **394**(1), 171-176.
- Matozzo, V., Rova, G., Ricciardi, F., et Marin, M. G. (2008). Immunotoxicity of the xenoestrogen 4-nonylphenol to the cockle *Cerastoderma glaucum*. *Marine Pollution Bulletin*.
- Matthiessen, P., Arnold, D., Johnson, A. C., Pepper, T. J., Pottinger, T. G., et Pulman, K. G. T. (2006). Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms. *Science of the Total Environment* **367**, 616-630.
- Mayer, T., Bennie, D., Rosa, F., Rekas, G., Palabrica, V., et Schachtschneider, J. (2007). Occurrence of alkylphenolic substances in a Great Lakes coastal marsh, Cootes Paradise, ON, Canada. *Environmental Pollution* **147**, 683-690.
- Mazzella, N., Dubernet, J. F., et Delmas, F. (2007). Determination of kinetic et equilibrium regimes in the operation of polar organic chemical integrative samplers. Application to the passive sampling of the polar herbicides in aquatic environments. *Journal of Chromatography A* **1154**, 42-51.

- Meier, S., Andersen, T. E., Norberg, B., Thorsen, A., Taranger, G. L., Kjesbu, O. S., Dale, R., Morton, H. C., Klungsøyr, J., et Svardal, A. (2007). Effects of alkylphenols on the reproductive system of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology* **81**, 207-218.
- Metcalf, C. D., Koenig, B. G., Bennie, D. T., Servos, M., Ternes, T. A., et Hirsch, R. (2003). Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of canadian sewage treatment plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**, 2872-2880.
- Metcalf, C. D., Metcalfe, T. L., Kiparissis, Y., Koenig, B. G., Khan, C., Hughes, R. J., Croley, T. R., March, R. E., et Potter, T. (2001). Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 297-308.
- Miao, X. S., Koenig, B. G., et Metcalfe, C. D. (2002). Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **952**, 139-147.
- Miege, C., Favier, M., Brosse, C., Canler, J. P., et Coquery, M. (2006). Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers. *Talanta* **70**, 739-744.
- Miege, C., J. M. Choubert, et al. (2008). Removal efficiency of pharmaceuticals and personal care products with varying wastewater treatment processes and operating conditions - Conception of a database and first results. *Water Science and Technology*. **57**: 49-56.
- Mills, G. A., Vrana, B., Allan, I., Alvarez, D. A., Huckins, J. N., et Greenwood, R. (2007). Trends in monitoring pharmaceuticals and personal-care products in the aquatic environment by use of passive sampling devices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**, 1153-1157.
- Mills, L. J., et Chichester, C. (2005). Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment* **343**, 1-34.
- Mimeault, C., Woodhouse, A. J., Miao, X. S., Metcalfe, C. D., Moon, T. W., et Trudeau, V. L. (2005). The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology* **73**, 44-54.
- Moldovan Z. (2006) Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere* **64**:1808-1817.
- Morales-Munoz, S., Luque-Garcia, J. L., Ramos, M. J., Martinez-Bueno, M. J., et Luque De Castro, M. D. (2005). Sequential automated focused microwave-assisted Soxhlet extraction of compounds with different polarity from marine sediments prior to gas chromatography mass spectrometry detection. *Chromatographia* **62**, 69-74.
- Nakada, N., Yasojima, M., Okayasu, Y., Komori, K., Tanaka, H., et Suzuki, Y. (2006). Fate of oestrogenic compounds and identification of oestrogenicity in a wastewater treatment process. *Water Science and Technology* **53**, 51-63.
- Nakajima, N., Teramoto, T., Kasai, F., Sano, T., Tamaoki, M., Aono, M., Kubo, A., Kamada, H., Azumi, Y., et Saji, H. (2007). Glycosylation of bisphenol A by freshwater microalgae. *Chemosphere* **69**, 934-941.

- Nasu, M., Goto, M., Kato, H., Oshima, Y., et Tanaka, H. (2001). Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants. In "Water Science and Technology", Vol. 43, pp. 101-108.
- Navas, J. M., et Segner, H. (2001). Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: Role of estrogen receptor. *Chemico-Biological Interactions* **138**, 285-298.
- Naylor, C. G., Staples, C. A., Klecka, G. M., Williams, J. B., Varineau, P. T., et Cady, C. (2006). Biodegradation of [14C] Ring-Labeled Nonylphenol Ethoxylate. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **V51**, 11-20.
- Neamtu, M., et Frimmel, F. H. (2006a). Degradation of endocrine disrupting bisphenol A by 254 nm irradiation in different water matrices and effect on yeast cells. *Water Research* **40**, 3745-3750.
- Neamtu, M., et Frimmel, F. H. (2006b). Photodegradation of endocrine disrupting chemical nonylphenol by simulated solar UV-irradiation. *Science of The Total Environment* **369**, 295-306.
- Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., et Marce, R. M. (2007). Pressurized liquid extraction of pharmaceuticals from sewage-sludge. *Journal of Separation Science* **30**, 979-984.
- Okuda, T., Kobayashi, Y., Nagao, R., Yamashita, N., Tanaka, H., Tanaka, S., Fujii, S., Konishi, C., et Houwa, I. (2008). Removal efficiency of 66 pharmaceuticals during wastewater treatment process in Japan. In "Water Science and Technology", Vol. 57, pp. 65-71.
- Packer, J. L., Werner, J. J., Latch, D. E., McNeill, K., et Arnold, W. A. (2003). Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibric acid, and ibuprofen. *Aquatic Sciences* **65**, 342-351.
- Patrolecco, L., Capri, S., De Angelis, S., Pagnotta, R., Polesello, S., et Valsecchi, S. (2006). Partition of nonylphenol and related compounds among different aquatic compartments in Tiber river (central Italy). *Water, Air, and Soil Pollution* **172**, 151-166.
- Pavlovic, D. M., Babic, S., Horvat, A. J. M., et Kastelan-Macan, M. (2007). Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **26**, 1062-1075.
- Peng, X., Wang, Z., Mai, B., Chen, F., Chen, S., Tan, J., Yu, Y., Tang, C., Li, K., Zhang, G., et Yang, C. (2007). Temporal trends of nonylphenol and bisphenol A contamination in the Pearl River Estuary and the adjacent South China Sea recorded by dated sedimentary cores. *Science of the Total Environment* **384**, 393-400.
- Peng, X., Wang, Z., Yang, C., Chen, F., et Mai, B. (2006a). Simultaneous determination of endocrine-disrupting phenols and steroid estrogens in sediment by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1116**, 51-56.
- Peng, X., Yu, Y., Tang, C., Tan, J., Huang, Q., et Wang, Z. (2008). Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Science of the Total Environment*.
- Peng, Z., Wu, F., et Deng, N. (2006b). Photodegradation of bisphenol A in simulated lake water containing algae, humic acid and ferric ions. *Environmental Pollution* **144**, 840-846.

- Petrovic, M., et Barcelo, D. (2001). Determination of phenolic xenoestrogens in environmental samples by liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International* **84**, 1074-1085.
- Petrovic, M., Barcelo, D., Diaz, A., et Ventura, F. (2003a). Low nanogram per liter determination of halogenated nonylphenols, nonylphenol carboxylates, and their non-halogenated precursors in water and sludge by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **14**, 516-527.
- Petrovic, M., Diaz, A., Ventura, F., et Barcelo, D. (2003b). Occurrence and Removal of Estrogenic Short-Chain Ethoxy Nonylphenolic Compounds and Their Halogenated Derivatives during Drinking Water Production. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 4442-4448.
- Petrovic, M., Gros, M., et Barcelo, D. (2006). Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1124**, 68-81.
- Petrovic, M., Hernando, M. D., Diaz-Cruz, M. S., et Barcelo, D. (2005). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: A review. *Journal of Chromatography A* **1067**, 1-14.
- Petrovic, M., Rodriguez Fernandez-Alba, A., Borrell, F., Maria Marce, R., Gonzalez Mazo, E., et Barcelo, D. (2002). Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 37-46.
- Petty, J. D., Huckins, J. N., Alvarez, D. A., Brumbaugh, W. G., Cranor, W. L., Gale, R. W., Rastall, A. C., Jones-Lepp, T. L., Leiker, T. J., Rostad, C. E., et Furlong, E. T. (2004). A holistic passive integrative sampling approach for assessing the presence and potential impacts of waterborne environmental contaminants. *Chemosphere* **54**, 695-705.
- Pickford, K. A., Thomas-Jones, R. E., Wheals, B., Tyler, C. R., et Sumpter, J. P. (2003). Route of exposure affects the oestrogenic response of fish to 4-tert-nonylphenol. *Aquatic Toxicology* **65**, 267-279.
- Piram, A., Salvador, A., Gauvrit, J. Y., Lanteri, P., et Faure, R. (2008). Development and optimisation of a single extraction procedure for the LC/MS/MS analysis of two pharmaceutical classes residues in sewage treatment plant. *Talanta* **74**, 1463-1475.
- Poiger, T., Buser, H. R., et Muller, M. D. (2001). Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: Pathway, field measurements, and mathematical modeling. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 256-263.
- Pojana, G., Bonfa, A., Busetti, F., Collarin, A., et Marcomini, A. (2004). Determination of natural and synthetic estrogenic compounds in coastal lagoon waters by HPLC-electrospray-mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **84**, 717-727.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., et Marcomini, A. (2007). Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International* **33**, 929-936.
- Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C., et Calamari, D. (2006). Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. *Environmental Science and Technology* **40**, 2442-2447.

- Pomati, F., Cotsapas, C. J., Castiglioni, S., Zuccato, E., et Calamari, D. (2007). Gene expression profiles in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells exposed to a mixture of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations. *Chemosphere* **70**, 65-73.
- Preuss, T. G., et Ratte, H. T. (2007). Ecotoxicological characterisation of nonylphenol isomers. *Ökotoxikologische Charakterisierung von Nonylphenol Isomeren* **19**, 227-233.
- Quednow, K., and Puttmann, W. (2008). Endocrine disruptors in freshwater streams of Hesse, Germany: Changes in concentration levels in the time span from 2003 to 2005. *Environmental Pollution* **152**, 476-483.
- Quinn, B., Gagne, F., et Blaise, C. (2008). An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of the Total Environment* **389**, 306-314.
- Quintana, J. B., Rodil, R., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., et Prada-Rodriguez, D. (2007). Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction-liquid desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1174**, 27-39.
- Ra, J. S., Oh, S. Y., Lee, B. C., et Kim, S. D. (2008). The effect of suspended particles coated by humic acid on the toxicity of pharmaceuticals, estrogens, and phenolic compounds. *Environment International* **34**, 184-192.
- Rabiet, M., Togola, A., Brissaud, F., Seidel, J. L., Budzinski, H., et Elbaz-Poulichet, F. (2006). Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized mediterranean catchment. *Environmental Science and Technology* **40**, 5282-5288.
- Reed, H.W.B., 1978. Alkylphenols, Dans *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 3rd ed., vol. 2. John Wiley and Sons Inc., New York
- Renner, R. (1997). European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 316A-320A.
- Ribeiro, C., Tiritan, M. E., Rocha, E., et Rocha, M. J. (2008). Seasonal and Spatial Distribution of Several Endocrine-Disrupting Compounds in the Douro River Estuary, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1-11.
- Rice, C. P., Schmitz-Afonso, I., Loyo-Rosales, J. E., Link, E., Thoma, R., Fay, L., Altfater, D., et Camp, M. J. (2003). Alkylphenol and Alkylphenol-Ethoxylates in Carp, Water, and Sediment from the Cuyahoga River, Ohio. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 3747-3754.
- Rice, S. L., et Mitra, S. (2007). Microwave-assisted solvent extraction of solid matrices and subsequent detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) using gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **589**, 125-132.
- Richards, S. M., Kelly, S. E., et Hanson, M. L. (2008). Zooplankton chitobiase activity as an endpoint of pharmaceutical effect. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **54**, 637-644.

- Rivero, C. L. G., Barbosa, A. C., Ferreira, M. F. N., Dorea, J. G., et Grisolia, C. K. (2008). Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: cichlidae). *Ecotoxicology*, 1-6.
- Roberts, P. H., et Bersuder, P. (2006). Analysis of OSPAR priority pharmaceuticals using high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1134**, 143-150.
- Roberts, P. H., et Thomas, K. V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment* **356**, 143-153.
- Rodriguez, I., Quintana, J. B., Carpinteiro, J., Carro, A. M., Lorenzo, R. A., et Cela, R. (2003). Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography A* **985**, 265-274.
- Routledge, E. J., et Sumpter, J. P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**, 241-248.
- Rudel, R. A., Melly, S. J., Geno, P. W., Sun, G., et Brody, J. G. (1998). Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage, and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 861-869.
- Safe S. (2000). Bisphenol A and related endocrine disruptor. *Toxicological Sciences* **56**, 251-252.
- Sajiki, J. (2001). Determination of bisphenol A in blood using high-performance liquid chromatography-electrochemical detection with solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **755**, 9-15.
- Sajiki, J., et Yonekubo, J. (2002). Degradation of bisphenol-A (BPA) in the presence of reactive oxygen species and its acceleration by lipids and sodium chloride. *Chemosphere* **46**, 345-354.
- Sajiki, J., et Yonekubo, J. (2004). Inhibition of seawater on bisphenol A (BPA) degradation by Fenton reagents. *Environment International* **30**, 145-150.
- Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E., et Callejon, M. (2005). Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Analytica Chimica Acta* **550**, 116-122.
- Satin, M. et Béchir S. (2001) Guide technique de l'assainissement (Broché). 3ème édition, Edition *Le Moniteur*.
- Scheytt, T., Grams, S., et Fell, H. (1998). Occurrence and reactive processes of a drug (clofibric acid) in groundwater. *Vorkommen und Verhalten eines Arzneimittels (Clofibrinsäure) im Grundwasser* **3**, 67-77.
- Schoenfuss, H. L., Bartell, S. E., Bistodeau, T. B., Cediell, R. A., Grove, K. J., Zintek, L., Lee, K. E., et Barber, L. B. (2008). Impairment of the reproductive potential of male fathead minnows by environmentally relevant exposures to 4-nonylphenol. *Aquatic Toxicology* **86**, 91-98.

- Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., et Puttmann, W. (2007). Pharmaceutical agents in the environment, their entries, occurrence, and an inventory of them. *Humanpharmakawirkstoffe in der Umwelt: Eintrage, Vorkommen und der Versuch einer Bestandsaufnahme* **19**, 168-179.
- Sedlak, D. L., Pinkston, K. E., Gray, J. L., et Kolodziej, E. P. (2003). Approaches for quantifying the attenuation of wastewater-derived contaminants in the aquatic environment. *Chimia* **57**, 567-569.
- Segner, H., Navas, J. M., Schafer, C., et Wenzel, A. (2003). Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **54**, 315-322.
- Serodio, P. and J. M. F. Nogueira (2005). Development of a stir-bar-sorptive extraction-liquid desorption-large- volume injection capillary gas chromatographic-mass spectrometric method for pyrethroid pesticides in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **382**(4), 1141-1151.
- Servos, M. R. (1999). Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual. Res. J. Canada*. **34**, 123-177.
- Shang, D. Y., Ikonou, M. G., et MacDonald, R. W. (1999a). Quantitative determination of nonylphenol polyethoxylate surfactants in marine sediment using normal-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **849**, 467-482.
- Shang, D. Y., Macdonald, R. W., et Ikonou, M. G. (1999b). Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the Strait of Georgia, British Columbia, Canada. *Environmental Science and Technology* **33**, 1366-1372.
- Shao, B., Han, H., Li, D., Ma, Y., Tu, X., et Wu, Y. (2007). Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* **105**, 1236-1241.
- Shioda, T., et Wakabayashi, M. (2000). Evaluation of reproductivity of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to chemicals using a 2-week reproduction test. In "Water Science and Technology", Vol. 42, pp. 53-60.
- Sjostrom, A. E., Collins, C. D., Smith, S. R., et Shaw, G. (2008). Degradation and plant uptake of nonylphenol (NP) and nonylphenol-12-ethoxylate (NP12EO) in four contrasting agricultural soils. *Environmental Pollution*.
- Smith, M. D., et Hill, E. M. (2004). Uptake and metabolism of technical nonylphenol and its brominated analogues in the roach (*Rutilus rutilus*). *Aquatic Toxicology* **69**, 359-370.
- Snyder, S. A., Keith, T. L., Naylor, C. G., Staples, C. A., et Giesy, J. P. (2001a). Identification and quantitation method for nonylphenol and lower oligomer nonylphenol ethoxylates in fish tissues. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 1870-1873.
- Snyder, S. A., Keith, T. L., Verbrugge, D. A., Snyder, E. M., Gross, T. S., Kannan, K., et J.P., G. (1999). Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 2814-2820.

- Snyder, S. A., Villeneuve, D. L., Snyder, E. M., et Giesy, J. P. (2001b). Identification and quantification of estrgen receptor agonists in wastewater effluents. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 3620-3625.
- Snyder, S. A., Wert, E. C., Rexing, D. J., Zegers, R. E., et Drury, D. D. (2006). Ozone oxidation of endocrine disruptors and pharmaceuticals in surface water and wastewater. *Ozone: Science and Engineering* **28**, 445-460.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., et Lester, J. N. (2008). Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*.
- Sohoni, P., Tyler, C. R., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C., Evans, M., Toy, R., Gargas, M., et Sumpter, J. P. (2001a). Reproductive Effects of Long-Term Exposure to Bisphenol A in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* **35**, 2917-2925.
- Sohoni, P., Tyler, C. R., Hurd, K., Gaunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C., Evans, M., Toy, R., Gargas, M., et Sumpter, J. P. (2001b). Reproductive effects of long-term exposure to Bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science and Technology* **35**, 2917-2925.
- Solé, M., Alda, M. J. L. D., Castillo, M., Porte, C., Ladegaard-pedersen, K., et Barcelo, D. (2000). Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface water from the Catalanian area (NE Spain). *Environ. Sci. Technol.* **34**, 5076-5086.
- Song, W., Huang, M., Rumbelha, W., et Li, H. (2007). Determination of amprolium, carbadox, monensin, and tylosin in surface water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**, 1944-1950.
- Soto, A. M., Justicia, H., Wray, J. W., and Sonnenschein, C. (1991). p-Nonyl-phenol: An estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environmental Health Perspectives* **92**, 167-173.
- Soulet, B., Tauxe, A., et Tarradellas, J. (2002). Analysis of acidic drugs in Swiss wastewaters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **82**, 659-667.
- Spengler, P., Korner, W., et Metzger, J. W. (2001). Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 2133-2141.
- Sponberg, A. L., et Witter, J. D. (2008). Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. *Science of the Total Environment*.
- Stachel, B., Ehrhorn, U., Heemken, O.-P., Lepom, P., Reincke, H., Sawal, G., et Theobald, N. (2003). Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. *Environmental Pollution* **124**, 497-507.
- Staples, C., Mihaich, E., Carbone, J., Woodburn, K., et Klecka, G. (2004). A weight of evidence analysis of the chronic ecotoxicity of nonylphenol ethoxylates, nonylphenol ether carboxylates, and nonylphenol. *Human and Ecological Risk Assessment* **10**, 999-1017.

- Staples, C. A., Dorn, P. B., Klecka, G. M., O'Block, S. T., Branson, D. R., et Harris, L. R. (2000). Bisphenol A concentrations in receiving waters near US manufacturing and processing facilities. *Chemosphere* **40**, 521-525.
- Staples, C. A., Dorn, P. B., Klecka, G. M., O'Block, S. T., et Harris, L. R. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* **36**, 2149-2173.
- Staples, C. A., Naylor, C. G., Williams, J. B., et Gledhill, W. E. (2001). Ultimate biodegradation of alkylphenol ethoxylate surfactants and their biodegradation intermediates. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 2450-2455.
- Staples, C. A., Williams, J. B., Blessing, R. L., et Varineau, P. T. (1999). Measuring the biodegradability of nonylphenol ether carboxylates, octylphenol ether carboxylates, and nonylphenol. *Chemosphere* **38**, 2029-2039.
- Stumpf, M., Ternes, T. A., Wilken, R. D., Silvana Vianna, R., et Baumann, W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of the Total Environment* **225**, 135-141.
- Sumpter, J. P. (2003). Endocrine disruption in wildlife: The future? *Pure and Applied Chemistry* **75**(11-12), 2355-2360.
- Sumpter, J. P., et Johnson, A. C. (2005). Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environmental Science and Technology* **39**, 4321-4332.
- Sun, W. L., Ni, J. R., et Liu, T. T. (2006). Effect of sediment humic substances on sorption of selected endocrine disruptors. *Water, Air, and Soil Pollution: Focus* **6**, 583-591.
- Sun, Z., Schussler, W., Sengl, M., Niessner, R., et Knopp, D. (2008). Selective trace analysis of diclofenac in surface and wastewater samples using solid-phase extraction with a new molecularly imprinted polymer. *Analytica Chimica Acta* **620**, 73-81.
- Suntisukaseam, U., Weschayanwivat, P., et Sabatini, D. A. (2007). Sorption of amphiphile pharmaceutical compounds onto polar and nonpolar adsorbents. *Environmental Engineering Science* **24**, 1457-1465.
- Talmage, S. S. (1994). "Environmental et human safety of major surfactants - alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates.," Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Tan, B. L. L., Hawker, D. W., Muller, J. F., Leusch, F. D. L., Tremblay, L. A., et Chapman, 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.
- Tanaka, Y., et Nakanishi, J. (2001). Life history elasticity and the population-level effect of p-nonylphenol on *Daphnia galeata*. *Ecological Research* **16**, 41-48.
- Tanghe, T., Devriese, G., et Verstraete, W. (1998). Nonylphenol degradation in lab scale activated sludge units is temperature dependent. *Water Research* **32**, 2889-2896.
- Taxe-Wuersch, A., De Alencastro, L. F., Grandjean, D., et Tarradellas, J. (2005). Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research* **39**, 1761-1772.

- Tayama, S., Nakagawa, Y., et Tayama, K. (2008). Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **649**, 114-125.
- Teles, M., Gravato, C., Pacheco, M., et Santos, M. A. (2004). Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to [beta]-naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17[beta]-estradiol individual and combined exposures. *Chemosphere* **57**, 147-158.
- TenEyck, M. C., et Markee, T. P. (2007). Toxicity of nonylphenol, nonylphenol monoethoxylate, and nonylphenol diethoxylate and mixtures of these compounds to Pimephales promelas (Fathead Minnow) and Ceriodaphnia dubia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **53**, 599-606.
- Ternes, T. (2001). Pharmaceuticals and metabolites as contaminants of the aquatic environment. In "ACS Symposium Series", Vol. 791, pp. 39-54.
- Ternes, T., Bonerz, M., et Schmidt, T. (2001). Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **938**, 175-185.
- Ternes, T. A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* **32**, 3245-3260.
- Ternes, T. A., Bonerz, M., Herrmann, N., Löffler, D., Keller, E., Lacida, B. B., et Alder, A. C. (2005). Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC tandem MS and GC/MS. *Journal of Chromatography A* **1067**, 213-223.
- Ternes, T. A., Herrmann, N., Bonerz, M., Knacker, T., Siegrist, H., et Joss, A. (2004a). A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Research* **38**, 4075-4084.
- Ternes, T. A., Joss, A., et Siegrist, H. (2004b). Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environmental Science and Technology* **38**, 392A-399A.
- Ternes, T. A., Stuber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., et Teiser, B. (2003). Ozonation: A tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Research* **37**, 1976-1982.
- Teske, S. S., et Arnold, R. G. (2008). Removal of natural and xeno-estrogens during conventional wastewater treatment. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 1-18.
- Thibaut, R., Debrauwer, L., Rao, D., et Cravedi, J. P. (1999). Urinary metabolites of 4-n-nonylphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Science of The Total Environment* **233**, 193-200.
- Thibaut, R., Schnell, S., et Porte, C. (2006). The interference of pharmaceuticals with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp liver: An in-vitro study. *Environmental Science and Technology* **40**, 5154-5460.
- Togola, A. and H. Budzinski (2008). Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A* **1177**(1), 150-158.

- Togola, A., et Budzinski, H. (2007). Development of polar organic integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems. *Analytical Chemistry* **79**, 6734-6741.
- Tolls, J. (2001). Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environmental Science and Technology* **35**, 3397-3406.
- Tominaga, T., Negishi, T., Hirooka, H., Miyachi, A., Inoue, A., Hayasaka, I., et Yoshikawa, Y. (2006). Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC-MS/MS method. *Toxicology* **226**, 208-217.
- Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Drewes, J. E., et Snyder, S. A. (2008). Determination of household chemicals using gas chromatography and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1190**, 253-262.
- Tusseau-Vuillemin, M.H., Lagarde, F., Chauvière, C. et Héduit, A. (2002) Hydrogen peroxide (H₂O₂) as a source of dissolved oxygen in COD-degradation respirometric experiments. *Water Research* **36**(3), 793-798.
- UE (2003), European Union Risk Assessment Report for 4,4'-isopropylidenediphenol (bisphenol-A) / CAS n°80-05-7, 3dd priority list, vol. 37 ; Luxembourg : Office for Official Publications of the European Communities, 288
- Urase, T., Kagawa, C., et Kikuta, T. (2005). Factors affecting removal of pharmaceutical substances and estrogens in membrane separation bioreactors. *Desalination* **178**, 107-113.
- Urase, T., et Kikuta, T. (2005). Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Research* **39**, 1289-1300.
- Urase, T., et Miyashita, K. (2003). Factors affecting the concentration of bisphenol A in leachates from solid waste disposal sites and its fate in treatment processes. *Journal of Material Cycles and Waste Management* **5**, 77-82.
- Van De Steene, J. C., et Lambert, W. E. (2008). Comparison of Matrix Effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS Analysis of Nine Basic Pharmaceuticals in Surface Waters. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*.
- Van De Steene, J. C., Mortier, K. A., et Lambert, W. E. (2006). Tackling matrix effects during development of a liquid chromatographic-electrospray ionisation tandem mass spectrometric analysis of nine basic pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Journal of Chromatography A* **1123**, 71-81.
- Van der Ven, K., Keil, D., Moens, L. N., Hummelen, P. V., van Remortel, P., Maras, M., et De Coen, W. (2006). Effects of the antidepressant mianserin in zebrafish: Molecular markers of endocrine disruption. *Chemosphere* **65**, 1836-1845.
- Van Der Ven, K., Van Dongen, W., Maes, B. U. W., Esmans, E. L., Blust, R., and De Coen, W. M. (2004). Determination of diazepam in aquatic samples by capillary liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Chemosphere* **57**, 967-973.
- Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A. F., et Viana, M. T. (2006). Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific review. *Applied Ecology and Environmental Research* **4**, 1-25.

- Verenitch, S. S., Lowe, C. J., et Mazumder, A. (2006). Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1116**, 193-203.
- Vermeirssen, E. L. M., Korner, O., Schonenberger, R., Suter, M. J. F., et Burkhardt-Holm, P. (2005). Characterization of environmental estrogens in river water using a three pronged approach: Active and passive water sampling and the analysis of accumulated estrogens in the bile of caged fish. *Environmental Science and Technology* **39**, 8191-8198.
- Vieno, N. M., Tuhkanen, T., et Kronberg, L. (2005). Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. *Environmental Science and Technology* **39**, 8220-8226.
- Vitali, M., Ensabella, F., Stella, D., et Guidotti, M. (2004). Nonylphenols in freshwaters of the hydrologic system of an Italian district: association with human activities and evaluation of human exposure. *Chemosphere* **57**, 1637-1647.
- Voogt, P. d., Kwast, O., Hendriks, R., et Jonkers, N. (2000). Alkylphenol ethoxylates and their degradation products in abiotic and biological samples from the environment. *ANALUSIS*. **28**, 776-782.
- Vrana, B., Allan, I. J., Greenwood, R., Mills, G. A., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J., et Morrison, G. (2005). Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **24**, 845-868.
- Wang, L., Sun, H., Wu, Y., and Xin, Y. (2008). Effect of sorbed nonylphenol on sorption of phenanthrene onto mineral surface. *Journal of Hazardous Materials*.
- Wang, L., Wu, Y., Sun, H., Xu, J., et Dai, S. (2006). Distribution and dissipation pathways of nonylphenol polyethoxylates in the Yellow River: Site investigation and lab-scale studies. *Environment International* **32**, 907-914.
- Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., et Huhnerfuss, H. (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.
- Weigel, S., Bester, K., et Huhnerfuss, H. (2001). New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **912**, 151-161.
- White R, J. S., Hoare SA, Sumpter JP & Parker MG (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* **135** 175–182.
- Xie, Z., Lakaschus, S., Ebinghaus, R., Caba, A., et Ruck, W. (2006). Atmospheric concentrations and air-sea exchanges of nonylphenol, tertiary octylphenol and nonylphenol monoethoxylate in the North Sea. *Environmental Pollution* **142**, 170-180.
- Xu, X., Wang, Y., et Li, X. (2008). Sorption behavior of bisphenol A on marine sediments. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* **43**, 239-246.

- Yamamoto, T., Yasuhara, A., Shiraishi, H., et Nakasugi, O. (2001). Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere* **42**, 415-418.
- Yang, L., Lin, L., Weng, S., Feng, Z., et Luan, T. (2008). Sexually disrupting effects of nonylphenol and diethylstilbestrol on male silver carp (*Carassius auratus*) in aquatic microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- Ying, G.-G., et Kookana, R. S. (2003). Degradation of Five Selected Endocrine-Disrupting Chemicals in Seawater and Marine Sediment. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 1256-1260.
- Zeng, L., Cawley, K., et Chin, Y. P. (2003). Indirect photolysis of bisphenol a by dissolved organic matter. In "ACS Division of Environmental Chemistry, Preprints", Vol. 43.
- Zhan, M., Yang, X., Yang, H., et Kong, L. (2007). Effect of natural aquatic humic substances on the photodegradation of bisphenol A. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China* **1**, 311-315.
- Zhang, J., Yang, M., Zhang, Y., et Chen, M. (2008a). Biotransformation of nonylphenol ethoxylates during sewage treatment under anaerobic and aerobic conditions. *Journal of Environmental Sciences* **20**, 135-141.
- Zhang, J. H., Jiang, M., Zou, L., Shi, D., Mei, S. R., Zhu, Y. X., Shi, Y., Dai, K., et Lu, B. (2006). Selective solid-phase extraction of bisphenol A using molecularly imprinted polymers and its application to biological and environmental samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **385**, 780-786.
- Zhang, Z., Hibberd, A., et Zhou, J. L. (2008b). Analysis of emerging contaminants in sewage effluent and river water: Comparison between spot and passive sampling. *Analytica Chimica Acta* **607**, 37-44.
- Zhao, J., Li, Y., Zhang, C., Zeng, Q., et Zhou, Q. (2008a). Sorption and degradation of bisphenol A by aerobic activated sludge. *Journal of Hazardous Materials* **155**, 305-311.
- Zhao, J. M., Li, Y. M., Zhou, Q., Zhang, C. J., et Zeng, Q. L. (2008b). Sorption behavior of bisphenol A on anaerobic sludge. *Huanjing Kexue/Environmental Science* **29**, 1681-1686.
- Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Chiabrando, C., Grassi, P., and Fanelli, R. (2008). Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants. *Water Research* **42**, 961-968.
- Zuccato, E., Castiglioni, S., et Fanelli, R. (2005). Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* **122**, 205-209.
- Zwiener, C. (2007). Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**, 1159-1162.
- Zwiener, C., et Frimmel, F. H. (2000). Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Research* **34**, 1881-1885.

Ressources INTERNET :

▲ Sites institutionnels

Agence de l'eau Adour Garonne: <http://www.eau-adour-garonne.fr/>

Agence de l'eau Seine Normandie: <http://www.eau-seine-normandie.fr/>

Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse: <http://www.eaurmc.fr/>

Agence Française de sécurité sanitaire des produits de santé AFSSAPS : <http://agmed.sante.gouv.fr/>

Directive loi cadre sur l'eau : <http://www.ecologie.gouv.fr/-La-directive-cadre-.html>

Institut français de recherche sur la mer IFREMER: <http://www.ifremer.fr/>

Institut national de l'environnement industriel et des risques INERIS: <http://www.ineris.fr/>

Ministère écologie et du développement durable MEDAD: <http://www.developpement-durable.gouv.fr/>

Portail des substances chimiques: <http://chimie.ineris.fr/fr/index.php>

▲ Sites divers

BIAM: <http://www.biam2.org/accueil.html>

COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C (2002) 3044)

http://eur-lex.europa.eu/pri/en/oj/dat/2002/l_221/l_22120020817en00080036.pdf

EAWAG Micropollunats- Le traitement des eaux usées face à un nouveau défi (par H.Siegrist)

http://www.eawag.ch/publications/eawagnews/www_en57/en57f_screen/en57f_siegrist_s.pdf

Encyclopédie VIDAL: <http://www.vidal.fr/>

Directive 1999/91/CE de la Commission, du 23 novembre 1999, portant modification de la directive 90/128/CEE concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)
http://admi.net/eur/loi/leg_euro/fr_399L0091.html

IFEN Institut Français de l'environnement, Les services publics de l'assainissement en 2004,
http://www.ifen.fr/uploads/media/d10_enqueteEau_assainissement.pdf

Le Figaro : <http://www.lefigaro.fr/>

Le Monde : <http://www.lemonde.fr/>

Le Parisien : <http://www.leparisien.fr/actualites-informations-direct-videos-parisien>

Libération : <http://www.liberation.fr/>

Observatoire français des drogues et des toxicomanies : <http://www.ofdt.fr/>

Ouest France <http://www.ouest-france.fr/>

Observatoire français des drogues et des toxicomanies OFDT
<http://www.ofdt.fr/BDD/publications/docs/dce.pdf>

Pharmaceuticals in the Environment, Information for Assessing Risk: <http://www.chbr.noaa.gov/peiar/>

Projet KNAPPE : <http://www.knappe-eu.org/>

Projet NORMAN : http://www.norman-network.net/index_php.php

Projet SWIFT : <http://www.swift-wfd.com/>

Site médical de la Faculté de médecine de Rennes 1 : <http://www.med.univ-rennes1.fr/etud/pharmaco/index4.htm>

Version consolidée de la Directive 67/548/CEE
http://ec.europa.eu/environment/dansub/main67_548/index_fr.htm

PUBLICATIONS

Liste des publications

PUBLICATION n°1 : Analyses des alkylphénol (C8 et C9)-polyéthoxylés et de leurs métabolites dans les matrices environnementales. Une synthèse.

PUBLICATION n°2 : Détermination des métabolites de nonylphénol-éthoxylés dans les eaux de rivière et les effluents de stations d'épuration par extraction en phase solide, chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (electrospray).

PUBLICATION n°3 : Analyse des métabolites d'alkylphénol-polyéthoxylés dans les matières en suspension de l'estuaire de Seine par le développement d'une méthode d'extraction assistée par micro-ondes, extraction en phase solide et chromatographie en phase liquide-electrospray- spectrométrie de masse.

PUBLICATION n°4 : Méthodologies analytiques pour l'analyse des APEO et de leurs métabolites dans les matrices complexes. Une application aux stations d'épuration françaises.

PUBLICATION n°5 : Les POCIS comme nouvel outil de monitoring. Que peut-on vraiment en attendre? Une première approche avec les substances pharmaceutiques et les alkylphénol-polyéthoxylés.

PUBLICATION n°6 : Présence et devenir des métabolites de nonylphénol-polyéthoxylés dans l'estuaire de Seine : le bilan de 5 années de surveillance.

PUBLICATION n°7 : Sources des alkylphénol-polyéthoxylés en estuaire de Seine. Identification et caractérisation.

PUBLICATION n°8 : Tendances dans la présence et le devenir des détergents, alkylphénol-polyéthoxylés, dans les estuaires macrotidaux français.

PUBLICATION n°9 : Caractérisation de la contamination de la côte méditerranéenne (NO) française par les métabolites d'alkylphénol-polyéthoxylés. Distribution, présence et devenir.

PUBLICATION n°10 : Présence et devenir de 16 composés pharmaceutiques au niveau de la côte méditerranéenne (nord-ouest). Une étude de cas dans la calanque de Cortiou.

Cette partie s'attache à présenter les dix publications issues de ces travaux de thèse. Elles peuvent être organisées comme suit. La première publication (publication n°1) est issue d'un travail de synthèse bibliographique portant sur les méthodologies d'analyse des alkylphénols-polyéthoxylés dans les matrices environnementales et analyse les principaux verrous qui demeurent dans les méthodes analytiques. Les trois publications suivantes sont des publications analytiques ayant pour objets les développements méthodologiques et analytiques mis en œuvre pour conduire ces travaux de recherche : analyse des matrices aqueuses (publication N°2), analyse des matrices solides (publication n°3) et analyse des matrices de stations d'épuration (publication n°4). La cinquième publication présente les premiers résultats relatifs au développement de nouvelles approches d'échantillonnage POCIS. Les deux publications suivantes résument les résultats marquants obtenus à l'issue des 5 années de suivi sur l'estuaire de Seine : étude de la présence et devenir des alkylphénol-polyéthoxylés (Publication n°6), étude des sources (publication n°7). Enfin les trois publications suivantes permettent de fournir des éléments quant à l'état de contamination des systèmes littoraux par les alkylphénol-polyéthoxylés (Publications n°8 et 9) et les substances pharmaceutiques (publication n°10).

Publication n°1**Analyse des alkylphénol-polyéthoxylés en C8 et C9 et de leurs métabolites dans les matrices environnementales - une revue**

Sophie Lardeux-Fontan, Hélène Budzinski*

Université Bordeaux 1, ISM-LPTC UMR 5255 CNRS
351 crs de la libération 33405 Talence Cedex

Auteur Correspondant* : h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Résumé :

Depuis les années 90, un intérêt croissant a été porté à l'étude de la présence et du devenir des alkylphénol-polyéthoxylés et de leurs métabolites dans l'environnement, conduisant à la publication de plusieurs centaines de travaux de recherche. Cet article passe en revue les méthodes analytiques couramment employées pour surveiller ces composés dans les systèmes aquatiques et présente les nouvelles tendances dans les développements analytiques conduits dans les laboratoires. Il couvre l'ensemble des protocoles analytiques depuis l'échantillonnage jusqu'à l'analyse finale et souligne les manques dans les démarches de validation analytique qui peuvent conduire à la production de données quantitatives incorrectes.

Mots-clés : alkylphénols, alkylphénol-polyéthoxylés, acide alkylphénoxyacétique, matrices environnementales, méthodologies analytiques, validation.

Pour soumission à Trends in Analytical Chemistry

Analysis of C₈ and C₉ alkylphenol-polyethoxylates and metabolites in environmental matrices - A review

Sophie Lardy-Fontan, H       Budzinski*

Université Bordeaux 1, ISM-LPTC UMR 5255 CNRS
351 crs de la libération 33405 Talence Cedex

*Corresponding author: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Abstract

A growing interest has been taken in the occurrence and fate of APEOs and their metabolites in the environment since the 90's leading to hundreds of publications. This paper reviews the state-of-the-art analytical methods currently used to monitor these compounds in aquatic systems and highlights some new trends in laboratory development. It covers all the analytical protocols from sampling to final analysis and is emphasize failures in analytical validation which can lead to erroneous quantitative data.

Keywords: alkylphenols, alkylphenol-polyethoxylates, alkylphenoxyacetic acid, environmental matrices, analytical methodologies, validation.

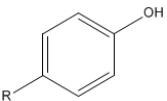
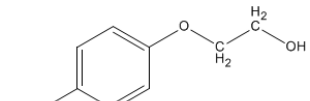
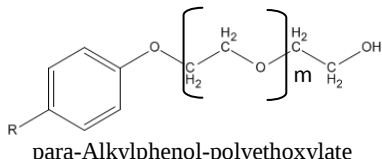
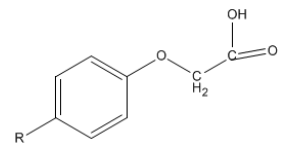
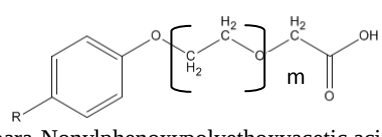
1-Introduction

The occurrence and fate of alkylphenol-polyethoxylates (APEOs) and their metabolites have been largely documented for the last ten years, worldwide. It can now be assumed that they are ubiquitous contaminants of the environment, especially the persistent, ultimate biodegradation products: shorter chain APEOs, alkylphenols (APs), alkylphenoxy-polyethoxyacetic acids (APECs), carboxyalkylphenoxy-polyethoxyacetic acids (CAPECs) (Ying et al., 2002; Vazquez-Duhalt et al., 2006; Soares et al., 2008). Moreover, the main environmental concern is that they display oestrogenic capabilities at measured environmental concentrations (see review by Ying et al., 2002; Vazquez-Duhalt et al., 2006; Soares et al., 2008). Following their inscription as priority dangerous substances in Europe, the nonylphenols (NPs) and the nonylphenol polyethoxylates (NPEOs); the octylphenols (OP) and octylphenol polyethoxylates (OPEOs) have been the subject of prohibition of use and marketing for large fields of uses (Soares et al., 2008). More recently, Environmental Quality Standards expressed as an annual average value (EQS-AA) for NPs and OPs have been published by the commission of the European Communities (Loos et al., 2008). The values are as low as 0.3 µg.l⁻¹ and 0.1 µg.l⁻¹, respectively. Some reviews have been published covering general analytical aspects (Lee, 1999), sample preparation aspects (Petrovic and Barcelo, 2002) and mass spectrometry aspects

(Petrovic and Barcelo, 2001; Lopez De Alda et al., 2003). Some raised questions about the validity of environmental data, due to the absence of strict quality assurance procedures or proficiency testing Loos et al. (2008). In fact, regarding the heterogeneity of published data (Soares et al., 2008), one needs to be cautious that some of these data may suffer from failures in global analytical strategies as highlighted by the first European intercomparison study for the analysis of NPs and OPs in surface waters (Loos et al., 2008).

Even if APEOs and metabolites in environmental matrices have been studied for a long time, it is still striking to find such heterogeneity of terms and nomenclatures. By consequence, it might be necessary to specify what we are talking about.

Table 1: General chemical structure of the investigated compounds

	Abbreviations	Molecular weight (g.mol ⁻¹)
 para-Alkylphenol	4-AP p-AP	R: C ₈ H ₁₇ 4-OP (p-OP) 206 R: C ₉ H ₂₁ 4-NP (p-NP) 220
 para-Alkylphenol-monoethoxylate	4-AP ₁ EO p-AP ₁ EO	R: C ₈ H ₁₇ 4-OP ₁ EO (p-OP) 250 R: C ₉ H ₂₁ 4-NP ₁ EO (p-NP) 264
 para-Alkylphenol-polyethoxylate	4-AP _n EO p-AP _n EO	m= 1 ethoxy units CH ₂ -CH ₂ -O = 44 0<m<100, typical 0<m<15
 para-Nonylphenoxyacetic acid	4-AP ₁ EC p-AP ₁ EC	R: C ₈ H ₁₇ 4-OP ₁ EC (p-OP) 264 R: C ₉ H ₂₁ 4-NP ₁ EC (p-NP) 278
 para-Nonylphenoxypolyethoxyacetic acid	4-AP _n EC	m= 1 ethoxy units CH ₂ -CH ₂ -O = 44 0<m<100, typical 0<m<15

NP is manufactured by the alkylation of phenol with nonene isomers. Therefore, it is expected that commercial NPs would be a mixture of *para* substituted monoalkylphenols with various isomeric and branched nonyl groups. Technical nonylphenol (usually CAS 84852-15-3), which is a complex mixture of isomers (Ieda et al., 2005), oligomers (Wheeler et al., 1997), chiral nonyl groups (Zhang and Chen, 2006) and contain traces of octylphenols and decylphenols (Ieda et al., 2005), is usually referred to as 4-NP or *p*-NP. It can contain theoretically 211 kinds of isomers. Ieda et al. (2005) reported that bidimensional gas chromatography coupled to mass spectrometry enabled the

identification of 102 components of 4-NP. Among possible isomeric forms, the linear one (4-*n*-NP or *p*-*n*-NP), exhibits different physicochemical properties and toxicological properties (Vazquez-Duhalt et al., 2006) and is not found in the technical mixture (Wheeler et al., 1997). The same kind of considerations can be taken for OP which present two isomers: the technical one which is the branched *para-tert*-octylphenol (4-*t*-OP, *p*-*t*-OP; CAS (140-66-9)) and the linear one which is the octylphenol (*p*-*n*-OP or 4-*n*-OP; CAS 1806-26-4); the linear form should not be found in the environment (see Figure1 adapted from Loos et al., 2008).

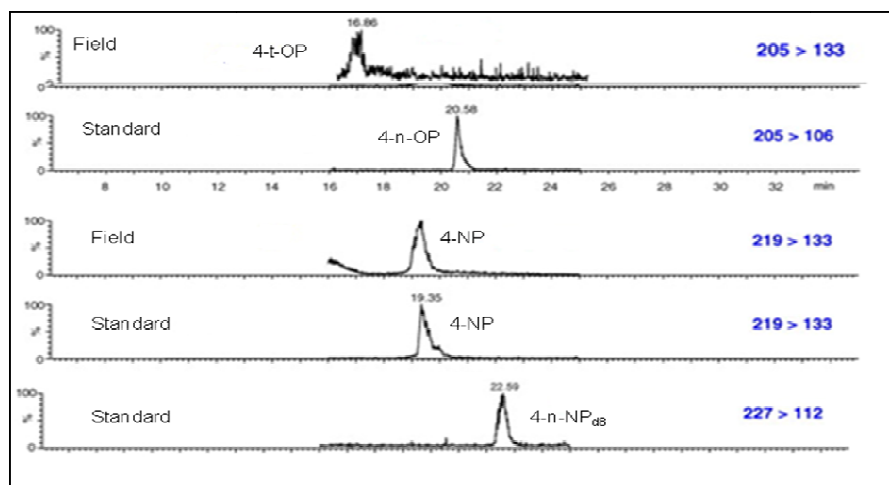


Figure 1: Alkylphenol chromatograms from Loos et al. (2008)

First, this paper aims to describe state-of-the-art techniques commonly used in the analysis of C₈-C₉-APEOs and metabolites in environmental matrices. As previously mentioned, reviews have been made in the past. As a consequence this paper covering the last decade will focus on papers from the period 2004-2008. Secondly, this paper will emphasize new trends in environmental surveys and try to highlight the failures regarding methodological aspects and validation processes that still need to be overcome to face up to the next challenges of regulatory environmental surveys.

2-Analytical methodologies

In order to detect, identify and quantify APEOs and metabolites in environmental matrices, analytes need to be isolated from the sample matrix and concentrated to some extent.

2-1-Aqueous matrix

2-1-1 Sample treatment from sampling to extraction

a) Sampling

As Petrovic and Barcelo (2002) noted, sampling and sample preservation are of great importance in any analytical procedure. Faced with the ubiquity of APs in the environment, one needs

to keep in mind the respect of the representativity and the integrity of the samples throughout analytical methodologies. Generally, samples are collected in amber glass bottles to prevent sorption and photodegradation phenomena; a wide range of pre-cleaning procedures exists: heating (450°C), solvents washings with acetone or methanol (Quintana et al., 2007; Céspedes et al., 2008). Samples are usually transported in a cooled portable refrigerator and stored at 4°C until treatment (Table 2).

b) Filtration

Most studies usually imply a filtration step. In fact, the consideration of total aqueous phase can lead to: - a partial extraction of compounds sorbed to suspended solids; - a filling during the solid phase extraction procedure which can affect the efficiency of extraction. The use of glass fibre filters is commonly reported but heterogeneity of pore sizes can be pointed out (1.6 µm: Fiedler et al., 2007; 1.2 µm: Jahnke et al., 2004; Lagana et al., 2004; Lee et al., 2008; 0.7 µm: Céspedes et al., 2008; 0.45 µm: Petrovic et al., 2003; Gonzalez et al., 2004; Li et al., 2008; 0.22 µm: Ballesteros et al., 2006a; Zafra-Gomez et al., 2008). Regarding the occurrence of APEO metabolites (APs, AP₁₋₂EOs) in suspended solids (Ying et al., 2002; Vazquez-Duhalt et al., 2006; Soares et al., 2008), these disparities in procedures make comparisons difficult or impossible.

c) Conservation of samples

As APEOs are readily biodegradable, the question of the conservation from the sampling time to the extraction time appears to be crucial. Preservatives such as formaldehyde (Lara-Martin et al., 2006), acidification (Baugros et al., 2008) have been used, prior or after filtration, to avoid biodegradation phenomenon. As their use can alter the chemical composition of the sample and need stronger evaluation (time and cost consuming), their uses are not so common. Consequently, in most cases, all the analytical procedure is conducted within the 24-48 hours following collection of the samples (Table 2).

2-1-2 Sample extraction

Since 2005, a standardised protocol (ISO 18857-1:2005) for the measurement of NPs in non filtered water has been published and has recommended liquid liquid extraction (LLE); a second methodology, using solid phase extraction (SPE), has been developed and is under approval (ISO 18857-2:2005). Classical extraction techniques: solvent sublation, steam distillation, LLE (Lee, 1999) have been supplanted by SPE which is nowadays the standard one. HLB[®] and C₁₈ are by far the most commonly used sorbents for the extraction of both neutral and acidic alkylphenolic compounds (Table 2). Typical extracted volumes are of 100-500 ml for wastewater treatment plant (WWTP), 500-1,000ml for natural samples (river water, marine water, tap water). Desorption is generally achieved with methanol, acetone, dichloromethane or their mixtures (Table 2). Typical ranges of recovery are higher than 80% (Table 2).

Quintana et al. (2007) applied stir bar sorptive extraction (SBSE) coated with polydimethylsiloxane (PDMS) for the analysis of 46 acidic and polar organic pollutants in river water, tap water and wastewater; the optimized methodology permitted an average recovery of 28% for 4-NP and 51% for 4-OP. Tan et al. (2008) reported recoveries of 110% for 4-NP and 35% for 4-t-OP for an optimized SBSE (PDMS) methodology applied to wastewater. Basheer et al. (2005) designed polymer-coated hollow fiber microextraction (PC-HFME) coated with hydroxylated polymer. PC-HFME showed high extraction efficiency, sensitivity and selectivity and was successfully applied to the marine waters of Singapore.

Table 2: Global analytical methodologies for the study of APEOs, APs and APECs in aqueous matrices.

Reference	Compounds investigated	Matrix	Sample preparation		Volume (ml)	Extraction methodologie		Purification methodologie		Analytical methodologie	
			Filtration	Conservation							
Li et al. (2008)	MRA	river water	0.45µm	T: 4°C;	1,000ml	LLE	dichloromethane	activated florisil	hexane (7 ml)	GC-MS (SIM)	Derivatization: BSTFA (prior to purification)
	4-t-OP			acidification							
	4-NP			0,01M; (HCl)							
Hohne et al. (2008)	MRA	wastewater	inf: glass fiber filter 589/2	T: 4°C; < 1 week	1,000ml	Bondelut PPL	methanol/dichloromethane (50/50; v/v)	activated florisil	hexane (7 ml)	GC-MS (Full scan)	
	4-t-OP		inf, eff: fluted filter 597.5								
	4-NP										
Lee et al. (2008)	MRA	water	1.2µm	T: 4°C; dark	1,000ml	SepPack Vac, C ₁₈	dichloromethane	activated florisil+ Na ₂ SO ₄	hexane (15 ml)	GC-MS (SIM)	Derivatization: MSTFA (prior to purification)
	4-t-OP			< 72 hours							
	4-NP										
Fiedler et al. (2007)	MRA	water	1.6µm	T: -20°C; before filtration		JT baker C ₁₈	methanol/dichloromethane (50/50; v/v)	Na ₂ SO ₄	dichloromethane (50 ml)	GC-MS (SIM)	Derivatization: BSTFA
	4-t-OP										
	4-NP										
Tan et al. (2008)	MRA	wastewater	NR		10ml	SBSE (PDMS)		NR		TD-GC-MS (SIM)	
	4-t-OP										
	4-NP										
Tan et al. (2007)	MRA	wastewater	centrifugation 3,000g; 4°C; 30 min		1,000ml	OASIS HLB	methanol;	NR	GC-MS (SIM)	Derivatization: BSTFA	
	4-t-OP						n-hexane/acetone (50/50; v/v)				
	4-NP										
Quintana et al. (2007)	MRA	wastewater, river water	NR			SBSE (PDMS)		NR		LD-GC-MS (SIM)	Derivatization: MTBSTFA
	4-t-OP										
	4-NP										
Ballesteros et al. (2006)	4-t-OP	wastewater	centrifugation	T: 4°C; dark	500ml	Lichrolut RP C ₁₈	diethylether/methanol (90/10; v/v)	NR		GC-MS (SIM)	Derivatization: BSTFA/ TMCS
	4-NP		0.22µm	< 48 hours							
Basheer et al.(2005)	MRA	sea water	NR			PC-HFME		NR		GC-MS (SIM)	Derivatization: BSTFA
	4-t-OP										
	4-NP										
Kawagushi et al. (2005)	MRA	river water	NR	T: 4°C	2ml	SBSE		NR		TD-GC-MS (SIM)	Derivatization: In tube silylation BSTFA
	4-t-OP										
	4-NP										
Baugros et al. (2008)	MRA	wastewater	Millipore YT30 142 HW	acidification pH 3 <24 hours	300ml	Strata C ₁₈	ethylacetate/acetone	Silica	ethylacetate; acetone	RPLC-ESI-MS-MS (MRM)	
	4-NP										
	4-n-NP										
	4-NP ₁ EO										
	4-NP ₂ EO										

	4-OP									
	4-t-OP									
	4-OP ₁ EO									
	4-OP ₂ EO									
Zafra-Gomez et al. (2008)	MRA	wastewater	centrifugation 4500rpm, 10min	T: 4°C; < 48 hours		Lichrolut RP C18	diethylether/methanol (90/10; v/v)	NR	RPLC-APCI-IT-MS	
	4-OP		0.22µm							
	4-t-OP									
	4-n-NP									
Loos et al. (2007)	MRA	wastewater, marine water	decantation	T: 5°C; < one week	400ml	OASIS HLB	methanol/acetone/ethylacetate (2/2/1;v/v/v) 0,1 % formic acid	NR	RPLC-ESI-MS-MS (MRM)	
	4-NP _n EO									
	4-NP ₁ EO									
	4-NP ₃ EO									
	4-NP ₂ EO									
	4-NP ₁ EC									
	4-NP ₂ EC									
	4-NP ₃ EC									
	4-OP ₁ EO									
	4-OP ₂ EO									
	4-OP ₁ EC									
	4-OP ₂ EC									
	4-t-OP									
	4-NP									
Cespedes et al. (2007)	4-NP ₁ EO	wastewater, river water	successive filtration: 1.0µm, 0.7µm and 0.45µm	T: 4°C; Overnight	influent: 100ml	Lichrolut RP C ₁₈	methanol/dichloromethane (90/10; v/v)	NR	RPLC-ESI-MS (SIM)	
	4-NP ₂ EO				effluent: 200ml					
	4-NP _n EO		0.45µm		500 ml					
	4-t-OP									
	4-NP									
Lara martin et al. (2006)	MRA	sea water; river water	NR	addition of 4% formadehyde; T: 4°C;	100ml	BondElut C ₁₈	acetone/methanol (50/50; v/v); dichloromethane/ethylacetate (50/50; v/v)	NR	RPLC-ESI-IT-MS	
	NP ₁₋₁₇ EO									
	OP ₁ EC									
	NP ₁ EC									
Jahnke et al. (2004)	4-NP ₁ EO	wastewater	1.2µm	T: 4°C; Overnight	1,000ml	OASIS HLB	methanol dichloromethane	NR	RPLC-ESI-MS-MS (MRM)	
	4-NP ₂ EO									
	4-NP ₁ EC									
	4-OP ₁ EO									
	4-OP ₂ EO									
	4-OP ₁ EC									
	4-t-OP									

	4-NP								
Lagana et al. (2004)	MRA	wastewater, river water	1.2µm	T: 4°C; <36hours	Influent:	OASIS HLB	methanol/dichloromethane (50/50; v/v)	NR	RPLC-ESI-MS-MS (MRM)
	4-NP				1,000ml				
Gonzalez et al (2004)	4-NP ₁ EO	wastewater, marine water	0.45µm	T: 4°C; < 48 hours	Influent: 100ml;	IST C ₁₈	methanol	NR	RPLC-ESI-MS (SIM)
	4-NP ₂ EO				Effluent: 200ml				
	4-NP _n EO n:3-15				500ml				
	4-NP1EC								
	4-t-OP								
	4-NP								
Petrovic et al. (2003)	4-NP	wastewater	0.45µm	T: 4°C; < 24 hours	500ml	Accubond C ₁₈	methanol	NR	RPLC-ESI-MS (SIR) RPLC-ESI-MS-MS (MRM)
	4-NPBr								
	4-NPCL								
	4-NP ₁ EC								
	4-NP ₁ ECBr								
	4-NP ₁ ECCL								
	4-NP ₂ EC								
	4-NP ₂ ECBr								
	4-NP ₂ ECCL								

MRA Multi Residu Analysis; NR Not Reffered

2-1-3 Sample purification

Purification of the aqueous matrix extracts can be complex to achieve depending on the studied compounds. It did not appear as a limiting step when considering APs and short chain APEOs which display similar physicochemical properties and for which purification can be achieved on silica gel and elution performed with hexane or dichloromethane (Fiedler et al., 2007; Lee et al., 2008; Li et al., 2008; Hohne and Puttmann, 2008). On the contrary, things appear tricky should you consider both APEOs and APECs; in fact APECs, due to their functional group, are trapped during the purification step on silica gel or amino propyl phase. To the best of our knowledge, until now no purification methodologies exist for both APEOs and APECs.

2-1-4 New trends

The monitoring survey displays the objectives of identifying and quantifying numerous molecules with a wide range of physicochemical properties. Although it provides many environmental data, it relies on sacrificing specificity, which can generate numerous erroneous data. To perform very heavy environmental monitoring surveys and to perform ecological risk assessment analysis, a need for new tools has emerged. In this context, uses of passive sampling techniques should be mentioned as being a powerful tool. When looking at the state of the art occurrence of APEOs in aquatic systems, worldwide, one should be aware of the heterogeneity of published data raising the question of representativeness and reliability of data. To overcome those limitations, at a realistic cost, passive sampling devices, able to provide time weighted average (TWA) concentrations, have been designed and are commercially available. Polar Organic Compounds Integrative Sampler (POCIS) have been designed to trap hydrophilic to mid polar compounds and have been successfully calibrated and applied to APEO metabolites (Arditsoglou and Voutsas, 2008). Because they concentrate more or less specifically pollutants, but not macromolecules they provide cleaner extracts from an analytical point of view by “on line purification” (steric exclusion, affinity of compounds for the sorbent), they are quite easy to manage (Facility in terms of storage, transport, conservation thanks to their compactness and their stability); POCIS are under extensive evaluation.

New trends in analyte extraction include less solvent consumption, improvement of extraction recovery, reproducibility and speed of execution, automation. The on-line coupled SPE procedure, using C_{18} cartridges, enables an approximately 300-fold reconcentration of analytes, which could be further enhanced by increasing the volume of sample. NP and OP were analysed by on-line SPE–LC–fluorescence detection (Rodriguez-Mozaz et al., 2007). Three types of on-line cartridges (C_{18} and the styrene divinylbenzene polymer cartridges) were tested, achieving LOD of 20 to 50 ng.l⁻¹. A river water sample spiked with these chemicals was analysed and no interference with the peaks of the selected analytes was observed (Rodriguez-Mozaz et al., 2007).

Molecular Imprinted Polymers (MIP) are synthetic polymer materials with specific recognition sites complementary in shape, size and functional groups to the template molecule, involving an interaction mechanism based on molecular recognition. Because of their stability, easiness of application and low cost, they appear as an attractive analytical alternative (Pichon and Chapuis-Hugon, 2008). Guerreiro et al. (2008) recently designed a MISPE technology for NP with 99% efficiency of recovery, it can be a powerful tool for sample pre-concentration and environmental analysis of this class of compounds. As Pichon and Chapuis-Hugon (2008) reported such tools can also be powerful for purification purposes.

2-2-Solid matrix

2-2-1 Sample pre treatment

As mentioned previously, care has to be taken to ensure the representativity and integrity of the samples; Petrovic and Barcelo (2002) highlighted some key points. The common approach is to freeze-dry samples (in order to remove water) prior to extraction (Petrovic and Barcelo, 2002; Liu et al., 2004) (Table 3). After freeze-drying, solid samples are then homogenized, grounded to powder, sieved (various sizes of exclusion: 100 μm Aparicio et al. (2007), <0.63 μm Lara martin et al. (2006), 120 μm Cespedes et al. (2007)) before storage (Table 3).

2-2-2 Sample extraction

Several extraction techniques are currently used: sonication (Aparicio et al., 2007; Nunez et al., 2007; Pojana et al., 2007), Soxhlet (Li et al., 2008), Microwave Assisted Extraction (MAE) (Liu et al., 2004), Pressurized Liquid Extraction (PLE) (Petrovic et al., 2003; Gonzalez et al., 2004; Lara-Martin et al., 2006; Andreu et al., 2007; Céspedes et al., 2008). “Old” generation extraction methodologies, sonication and Soxhlet are time and solvent consuming but still largely used nowadays (Table 3). The extraction step is usually carried out with dichloromethane, methanol, hexane, acetone, methyl tert-butyl ether or their mixtures (Table 3). Generally, recoveries are more variable than for the liquid phase, comprised between 20 to 120%, depending on the compound and the matrix (Table 3).

2-2-3 Sample purification

Suspended solids, sediments, sludge or soils display various complexities (presence of variable levels and kind of organic materials, presence of polymers, biological contents, etc...) but in any case need strong purification steps before chromatographic analysis. As publications usually refer to both aqueous and solid surveys, purification is achieved with the extraction procedure developed for the aqueous phase (Table 3).

Table 3: Global analytical methodologies for the study of APEOs, APs and APECs in solid matrices.

Reference	Compounds investigated	Matrix	Sample preparation		Quantity extracted (g)	Extraction methodologie		Purification methodologie		Analytical methodologie	
			Preparation	Conservation							
Tan et al. (2008)	MRA	sludge	centrifugation	NR	1g	SBSE (PDMS)		NR		TD-GC-MS (SIM)	
	4-t-OP										
	4-NP										
Li et al. (2008)	MRA	sediment	freeze drying	T: -20°C	NR	Soxhlet	dichloromethane	copper activated+ Na ₂ SO ₄	acetone	GC-MS (SIM)	derivatization: BSTFA (prior to purification)
	4-t-OP							activated	hexane		
	4-NP										
Nunez et al. (2007)	4-NP	soil, sediment, compost and sludge	NR		2g	sonication-assisted extraction in small columns	water/methanol (30/70; v/v)	DSC- ₁₈	methanol; acetonitrile	NPLC-Fluo RPLC-Fluo	
	4-NP ₁₋₂ EO										
	4-NP ₃₋₁₃ EO										
Gatidou et al. (2007)	MRA	sludge; suspended solids	sludge: oven dried at 40°C . grinded using a mortar and pestle	T: -18°C T: <5 days	sludge: 0.01-0.03g	sonication	water/methanol (3/5; v/v)	Sep-pack C ₁₈	dichloromethane/hexane (4:1; v/v)	GC-MS (SIM)	derivatization: BSTFA
	4-n-NP										
	4-NP1EO										
	4-NP2EO										
Aparicio et al. (2007)	MRA	sludge	freeze drying and sieve <100 µm	NR	0.5g	shaking, sonication (twice)	hexane	NR		GC-MS (SIM)	
	4-NP										
	4-NP1EO										
	4-NP2EO										
Cespedes et al. (2007)	4-NP ₁ EO	sludge	freeze drying, homogenized; sieve 120µm	T: -20°C;	2g	assisted solvent extraction	acetone/methanol (50/50; v/v)	Lichrolut RP C ₁₈	methanol/dichloromethane (90/10; v/v)	RPLC-ESI-MS (SIM)	
	4-NP ₂ EO										
	4-NP _n EO										
	4-t-OP										
	4-NP										
Andreu et al. (2007)	4-t-OP	sludge, soil	left to dry at room T°C. during 24 hours; 2mm sieve and homogenized	polyethylene boxes scaled	5g	assisted solvent extraction	acetone/hexane (50/50; v/v)	C ₁₈ glass column	methanol	RPLC-APCI-MS (SIM)	
	4-NP										
	4-NP ₁ EO										
	4-NP ₁₋₅ EO										
	4-OP ₁₋₅ EO										
	4-NP ₆₋₁₅ EO										
4-OP ₆₋₁₅ EO											
Lara martin et al. (2006)	MRA	sediment	dried in a heater (75°C); milled and sieved 0,63µm	T: 4°C;	4g	assisted solvent extraction	methanol in presence of Na ₂ SO ₄	BondElut C ₁₈	acetone/methanol (50/50; v/v); dichloromethane/ethylacetate (50/50; v/v)	RPLC-ESI-IT-MS	
	NP ₁₋₁₇ EO										
	OP ₁ EC										
	NP ₁ EC										

Gibson et al. (2005)	MRA	soils; biosolids	partially air dried; sieved to <2.0mm; mixed with Na ₂ SO ₄ in a freezer for a night); grounded	NR	25g soil; 0.75g sludge	Soxhlet	acetone/hexane (50/50; v/v)+ Na ₂ SO ₄	SPE (CN)	hexane/ether (50:50; v/v)	GC-MS (SIM)	
	4-NP										
Patrolecco et al. (2005)	MRA	suspended solids. sediment	freeze drying;	-20°C until preparation; then stored at room T°C; brown glass	sediment: 5g	tween 80	tween 80	SI C ₁₈		RPLC-Fluo	
	4-NP										
	4-NP ₁ EO										
	4-NP ₂ EO										
Pojana et al. (2006)	MRA	sediment	addition of HgCl ₂ ; Freeze drying	T: -30°C	sediment: 20g	sonication	methanol/acetone (80/20; v/v)	NR		RPLC-ESI-IT-MS	
	4-NP										
	4-NP ₁ EC										
Liu et al. (2004)	MRA	sediment	drying. oven at 100°C. 4 days	NR	5g	microwave assisted extraction	methanol	Silica gel+ Na ₂ SO ₄	ethylacetate/hexane (40/60; v/v)	GC-MS (SIM)	derivatization: BSTFA/ TMCS
	4-t-OP										
	4-NP										
Cantero et al. (2004)	OP ₉₋₁₀ EO	sludge	freeze drying. ground <0.5 mm	T: 4°C	0.1g	coacervative extraction	SDoS	NR		RPLC-APCI-IT-MS	
	NP ₆ EO										
Gonzalez et al 2004	4-NP ₁ EO	sediment	freeze drying. homogenized; sieve 120µm	T: -20°C	5g	assisted solvent extraction	acetone/methanol (50/50; v/v)	IST C ₁₈	methanol	RPLC-ESI-MS (SIM)	
	4-NP ₂ EO										
	4-NP ₃₋₁₅ EO										
	4-t-OP										
	4-NP										
Petrovic et al. (2003)	4-NP	sludge	centrifugation 4500 rpm. freeze drying	T: -20°C	1g	assisted solvent extraction	acetone/methanol (50/50; v/v)	Lichrolut RP C ₁₈		RPLC-ESI-MS (SIR) RPLC-ESI-MS-MS (MRM)	
	4-NPBr										
	4-NPCL										
	4-NP ₁ EC										
	4-NP ₁ ECBr										
	4-NP ₁ ECCL										
	4-NP ₂ EC										
	4-NP ₂ ECBr										
4-NP ₂ ECCL											

3-Analytical techniques

Among the different analytical techniques used for the analysis of APEO metabolites in environmental matrices: liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) are the most widespread ones and have supplanted other ones. The choice of the technique usually depends on the metabolites selected regarding the ranges of physicochemical properties they display.

3-1-Gas chromatography

The low volatility of surfactants, APs and APEOs ($n < 6$), limits the application of GC-MS for their analyses because a derivatization step is required. The advantages of better sensitivity (detection limits lower than ng.l^{-1} or ng.g^{-1} , Table 4-5) reached by GC-MS are offset by loss of time due to sample preparation and possible loss of sample during the additional manipulation. Nevertheless, GC-MS is still largely used for monitoring purposes aiming at 4-NP and 4-*t*-OP; especially because it is less susceptible to matrix effects than LC-MS (due to a stronger ionization process). Furthermore, its main advantage relies on its application with solid phase microextraction (SPME) and stir bar sorptive extraction (SBSE methodologies) (Table 2-3). Using various derivatization agents (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA), pentafluoropyridine) APs, APEOs, APECs and CAPECs (Liu et al., 2004; Basheer et al., 2005; Ballesteros et al., 2006b; Tan et al., 2007; Quintana et al., 2007; Bai-Juan et al., 2007; Fiedler et al., 2007; Li et al., 2008) have been extensively analyzed using by GC-MS.

3-2-Liquid chromatography

Separation of the APEOs according to the increase of the number of ethoxy group can be achieved by normal phase liquid chromatography (NP-LC); thus it leads to the co-elution of homologues with the same number of ethoxy groups but different alkyl chains (e.g. 4-NP₁EO and 4-OP₁EO) (Zwiener and Frimmel, 2004). On the contrary, reversed phase liquid chromatography (RP-LC), which is by far the more widespread separation technique, separates compounds according to their hydrophobic parts (alkyl chains); thus homologues with different numbers of ethoxy units co-elute (4-NP₁EO and 4-NP₂EO). Moreover, it is sufficiently resolute to separate linear forms of APEOs from branched ones (e.g., 4-NP mixtures and 4-*n*-NP; 4-*t*-OP and 4-*n*-OP). In any case, the association of NP-LC and RP-LC to mass spectrometry allows to overpass co-elution phenomena and allows the identification and quantification of APEOs and metabolites. Electrospray (ESI), in both ionization modes (negative and positive), is generally used because it is more sensitive than atmospheric pressure chemical ionization (APCI). Under ESI, APEOs show a high affinity for alkali metal ions, resulting in the formation of alkali adducts $[\text{M}+\text{Na}]$ in spite of protonated form $[\text{M}+\text{H}]$.

Major limitations are linked with the decreasing affinity of APEOs for alkali ions when decreasing number of ethoxy units and the fact that adducts ($[M+Na]$) are poorly fragmentable (Zwiener and Frimmel, 2004); thus the use of quaternary ammonium is currently mentioned (Zwiener and Frimmel, 2004). It leads to the formation of ammonium adducts $[M+NH_4]$. Jonkers et al. (2005) investigated the occurrence and formation of various types of adducts of NPEOs under LC-ESI-MS analysis. Although they highlighted some problems in adduct formation, they finally concluded that a correct quantification of 4-NP₁EO and 4-NP₂EO could be achieved; for longer chain oligomers they mentioned that a molar calibration followed by a correction of the average molar weight was needed.

The analysis of alkylphenolic compounds is complex because of the existence of different ethoxylate oligomers and alkyl-chain isomers. LC-MS has increasingly been used for the determination of a full range of APs, APEOs, APECs, CAPECs and WWTPs by-products (chlorinated, brominated forms) (Petrovic and Barcelo, 2002; Lopez De Alda et al., 2003; Jonkers et al., 2005; Lara-Martin et al., 2006; Gonzalez et al., 2007). Several LC-MS-MS methods have been recently reported for these compounds (Lopez De Alda et al., 2003; Jahnke et al., 2004; Loos et al., 2007; Loyo-Rosales et al., 2007); LC-IT-MS (Cantero et al., 2006); UPLC-Q-ToF MS (Gonzalez et al., 2008). They allow reliable quantification of APEOs combined with a high accuracy; furthermore a significant improvement of method detection limit was achieved (typical range under ng.l⁻¹).

3-3-Matrix effects

Matrix effects are the weak point of LC-ESI-MS, especially LC-ESI-MS-MS (Taylor, 2005). They occur when molecules co-elute with the compounds of interest and affect ionization efficiency of the electrospray interface resulting in signal enhancement and/or ion suppression. When occurring, matrix effects affect both the precision and accuracy of the method; ion suppression, for its part, leads to a decrease in sensitivity and higher limits of quantification (Taylor, 2005). To overcome such phenomena, further methodological strategies can be applied: extract dilution; more additional purification steps; use of multiple and appropriate internal standards; improvement of separation methodologies. By looking at the bibliography, it appears that investigations to assess matrix effects are usually absent from the validation criteria (Table 5). Baugros et al. (2008) investigated matrix effects on a wide range of polar pollutants (among them; 4-NP, 4-t-OP, 4-NP₁EO, 4-NP₂EO, 4-OP₁EO and 4-OP₂EO) analyzed by LC-ESI-MS-MS and observed significant matrix effects. They concluded that the methodology of standard addition would be the most reliable method for accurate quantification, despite its costs and additional time needed.

3-4-Trends

In Europe, the implementation of the WFD needs an improvement of analytical methodologies. The European commission decision (2002/657/EC) Communities (2002) has specified that for the confirmation of the identity of compounds a minimum of 3 identification points is required. Consequently, it appears that classical approaches are not sufficient to provide quality assurance. Thus, a need to develop new analytical methodologies is required. LC-MS-MS, which has become the most widely used analytical tool in environmental analysis, has been applied to the determination of target analytes using MRM and achieving high sensitivity and selectivity (Barcelo and Petrovic, 2007). Its advantages are strengthened by a recent enhancement in LC technologies and implementation of ultra fast chromatography technologies (UPLC[®] from Waters, RRLC[®] from Agilent) which are assumed to decrease analytical time, to enhance sensitivity (by improving resolution) and to decrease matrix effects. Gonzalez et al. (2008) developed a UPLC-Q-ToFMS methodology (Acquity C₁₈; 100mm; 2.1mm; 2.1µm) for the study of various classes of surfactants among which APEOs (1 to 15 units), APECs and APs in textile effluents; by comparing this new methodology to previous ones (referring to LC (reverse phase C₁₈; 100-250mm; 2.1-4.6mm; 3-5µm) separation) they achieved a 2 to 3-fold reduction in analytical times. Furthermore, the identification of degradation by products (Petrovic et al., 2003; Gonzalez et al., 2007), that may be toxics and of environmental concerns, will rely on the use of new hybrid mass spectrometric detector: hybrid quadrupole time of flight mass spectrometer with MS/MS capability (Q-ToF) , hybrid quadrupole ion trap mass spectrometer with MS/MS capability (Q-IT) (Gonzalez et al., 2007; Barcelo and Petrovic, 2007).

Table 4: Validation procedure for the study of APEOs, APs, APECs in aqueous matrices.

Reference	Compounds investigated	Matrix	Sensitivity			Recovery						Quantitation	Investigation matrix effects
Tan et al. (2008)	MRA	wastewater	LOD (ng.l ⁻¹) S/N=3	LOQ (ng.l ⁻¹) S/N=10		grab water spiked 500 ng.l ⁻¹ (n=3)							
	4-t-OP		2	5		35±15%						internal standard: 4-n-NP	NR
	4-NP		2	5		110±15%							
Tan et al. (2007)	MRA	wastewater	LOD (ng.l ⁻¹) S/N=3			recovery							
	4-t-OP		1.0-5.0			63.5						internal standard: 4-n-NP	NR
	4-NP					77.9							
Quintana et al. (2007)	MRA	wastewater, river water	LOD (ng.l ⁻¹) blank±3 SDbblank.			recovery	accuracy tap water (500ng.l ⁻¹ ; n=4)	accuracy river water (500ng.l ⁻¹ ; n=4)	accuracy well water (500ng.l ⁻¹ ; n=4)	accuracy treated water (2,000ng.l ⁻¹ ; n=4)	accuracy untreated water (2,000ng.l ⁻¹ ; n=4)		
	4-t-OP		750			51±17%	112±9%	113±13%	94±13%	82±11%	125±15%	internal standard: pentachlorophenol-13C6	NR
	4-OP		21			24±15%	86±12%	81 ± 12 %	80±8 %	59±3%	52 ± 7%		
	4-n-NP		6			11±20%	73±7%	53±8%	47±6%	30±9%	47±8%		
	4-NP		310			28±18%	101±6%	103±9%	89±5%	84±8%	123±11%		
Ballesteros et al. (2006)	MRA	wastewater	LOQ (ng.l ⁻¹) directive 96/23/EC			spiked WWTP 0.05 µg.l ⁻¹ (n=5)		spiked WWTP 0.250 µg.l ⁻¹ (n=5)		spiked WWTP 0.5 µg.l ⁻¹ (n=5)			
	4-OP		30			98.0±4.1%		96.4±3.7%		97.4±4.3%		surrogate standard: bisphenol F	no matrix effects
	4-t-OP		20			104.0±3.8%		96.8±5.0%		103.4±4.1%			
	4-NP		20			96.0±4.2%		104.8±4.2%		100.6±3.8%			
Kawagushi et al.(2005)	MRA	river water	LOD (pg.ml ⁻¹) S/N=3	LOQ (pg.ml ⁻¹) S/N=10		river water spiked 100pg.ml ⁻¹ (n=6)		river water spiked 1000 pg.ml ⁻¹ (n=6)					
	4-t-OP		2	10		93.3±11.3%		96.4±7.7%				external calibration	NR
	4-NP		10	50		94.7±14.8%		93.3±11.0%					
Baugros et al . (2008)	MRA	wastewater	LOD (ng.l ⁻¹) S/N=3	LOQ (ng.l ⁻¹) S/N=10		spiked WWTP 500 ng.l ⁻¹ (n=6)							
	4-NP		7.5	25		99±1.5%						standard addition	Yes, standard Addition to compensate
	4-n-NP		67	223		91±6.8%							
	4-NP ₁ EO		4.9	16		100±6.2%							
	4-NP ₂ EO		0.7	2,3		102±1.3%							
	4-OP		220	734		91±3.8 %							
	4-t-OP		19.2	64		91±5.1%							
	4-OP ₁ EO		7.6	25		107±3.6%							
	4-OP ₂ EO		38.8	129		109±9.9 %							

Zafra-Gomez et al.(2008)	MRA	wastewater	LOQ (ng.l ⁻¹) directive 96/23/EC			spiked WWTP 0.1 μg.l ¹ (n=6)		spiked WWTP 0.5 μg.l ¹ (n=6)		spiked WWTP 1 μg.l ⁻¹ (n=6)			
	4-OP		59			104.2±4.8%		97.2±3.3%		102.4±2.9%		surrogate standard:bisphenol F	NR
	4-t-OP		69			95±3.3%		101.2±3.7%		97.8±2.8%			
	4-n-NP		51			97.5±4.1%		97.6±2.5%		102.0±3.5%			
Loos et al. 2007	MRA	wastewater, marine water	IDL (pg) v= 5μl S/N	MDL (ng.l ⁻¹) S/N =3		spiked Milli Q water 0.1 to 1 μg.l ⁻¹							
	4-NP ₁ EO		5	100	50-90%						external calibration	not investigated too diicult	
	4-NP ₂ EO		50	10							external calibration		
	4-NP ₃ EO		20	5							external calibration		
	4-NP ₁ EC		2	1							external calibration		
	4-NP ₂ EC		na	na							4-NP ₁ EC		
	4-NP ₃ EC		na	na							4-NP ₁ EC		
	4-OP ₁ EO		5000	100							external calibration		
	4-OP ₂ EO		50	10							external calibration		
	4-OP ₁ EC		2	1							external calibration		
	4-OP ₂ EC		na	na							external calibration		
	4-t-OP		50	5							external calibration		
	4-NP		50	10							external calibration + internal standard 4-n-		
Cespedes et al. (2007)		wastewater, river water	IDL (ng) v= 25μl; S/N =3	LOD water (μg.l ⁻¹)S/N =3		distilled water spiked 1μg.l ⁻¹ (n=6)		surface water spiked 1μg.l ⁻¹ (n=6)		surface water spiked 10μg.l ⁻¹ (n=6)			
	4-NP ₁ EO		0.9	0.12	80-102%	87-105 %	79-113%		internal standards: heptylphenol; DEHP _{d4}	NR			
	4-NP ₂ EO		0.3	0.06									
	4-N ₃₋₁₅ EO		0.2	0.06									
	4-t-OP		0.1	0.06									
	4-NP		0.2	0.07									
Lara martin et al. (2006)	MRA	marine water, river water	MDL (ng.ml ⁻¹) S/N =3			recoveries (n=5) spiked reconstituted sea water							
	NP ₁₋₁₇ EO		0.05-0.5			72± 4%						external standards addition + internal standard (C16 LAS)	negligible in surface water
	OP ₁ EC				72±14%								
	NP ₁ EC				71±17%								
Jahnke et al. (2004)		wastewater	LOD water (ng.l ⁻¹) S/N =3			recovery of non diluted extracts (spike 100-1,000ng.l ⁻¹)		recovery of four fold diluted extracts (spike 100-1,000ng.l ⁻¹)					
	4-NP ₁ EO		10		25-47%	50-75%					external calibration	ion suppression from 39 % to 72 % dilution of extracts decrease ion suppression effects	
	4-NP ₂ EO		0.2										
	4-NP ₁ EC		0.1										
	4-OP ₁ EO		12										

	4-OP ₂ EO		0.1								
	4-OP ₁ EC		0.04								
	4-t-OP		4								
	4-NP		2								
Lagana et al. 2004	MRA	wastewater, river water	LOD influent (ng.l ⁻¹) S/N	LOD effluent (ng.l ⁻¹) S/N =3	LOD river water	spiked influent (n=5)	spiked effluent (n=5)		spiked river water (n=5)		
	4-n-NP		182	55	36	80±5%	86±7%		87±4%		internal standard NR
Gonzalez et al 2004		wastewater, marine water	LOD water (ng.l ⁻¹) S/N =3			spiked water (100µg.l ⁻¹)					
	4-NP ₁ EO		50			86±3.8%					internal standard
	4-NP ₂ EO		50			81±2.4%					internal standard
	4-NP ₃ EO n:3-		5			98±4%					internal standard
	4-NP ₁ EC		100			83±1.3%					internal standard
	4-t-OP		50			85±4.7%					internal standard
	4-NP		50			88±7%					internal standard
Petrovic et al. (2003)		wastewater	IDL (pg) LC-MS- MS (LC- MS) S/N	MDL (ng.l ⁻¹) LC-MS-MS S/N =3		spiked water (n=3)					
	4-NP		10 (60)	1		85±5%					external calibration
	4-NPBr		15 (50)	2		73±7%					external calibration
	4-NP ₁ Cl					73±7%					external calibration
	4-NP ₁ EC		30 (150)	2		98±5%					external calibration
	4-NP ₁ ECBr		50 (150)	2		92±7%					external Calibration
	4-NP ₁ EC ₁ Cl					90±6%					external calibration
	4-NP ₂ EC		30 (100)	2		88±4%					external calibration
	4-NP ₂ ECBr		50 (200)	2		79±7%					external calibration
	4-NP ₂ EC ₁ Cl					87±6%					external calibration

Table 5: Validation procedure for the study of APEOs, APs, APECs in solid matrices.

Reference	Compounds investigated	Matrix	Sensitivity		Recovery				Quantitation	Investigation matrix effects
Tan et al. (2008)	MRA	sludge	LOD (ng.g ⁻¹) S/N=3	LOQ (ng.g ⁻¹) S/N=10	spiked sludge (10; 25; 500 ng.g ⁻¹)					
	4-t-OP		0.02	0.06	15%				internal standard: 4-n-NP	
	4-NP		0.02	0.06	55%					
Nunez et al. (2007)		soil. sediments. compost and sludge	LOD (µg.g ⁻¹) S/N=3	LOQ (µg.g ⁻¹) S/N=10	spike level 1 (n=5)	spike level 2 (n=5)				
	4-NP		0.06	0.62	90.8±11.1%	78.3±15.6%			external calibration	
	4-NP ₁ EO		0.06	0.15	90.6±10.1%	82.8±3.5%				
	4-NP ₂ EO		0.05	0.08	97.3±5.2%	90.4±5.0%				
	4-NP ₃₋₁₃ EO		0.52	1.72	90.8±11.1%	78.3±15.6%				
Gatidou et al. (2007)		sludge; suspended solids	LOD (µg.g ⁻¹) S/N=3	LOQ (µg.g ⁻¹) 3.3*LOD	spiked sludge 50ng (n=5)	spiked sludge 100ng (n=5)	spiked sludge 200ng (n=5)			
	4-n-NP		0.04	0.13	54.5±5.8%	62.7±8.1%	47.6±2.7%		internal standard: BPA _{d16}	NR
	4-NP ₁ EO		0.49	1.61	99.5±6.4%	106± 2.1%	106±6.8%			
	4-NP ₂ EO		0.96	3.17	87.6±8.3%	101±7.9%	86.3±12.2%			
Aparicio et al. (2007)	MRA	sludge	LOD (µg.kg ⁻¹) S/N=3	LOQ (µg.kg ⁻¹) S/N=10	spiked sludge					
	4-NP		189.13	630.43	77.9±9.9%				internal standard: tert-butylphenol	
	4-NP ₁ EO		751.19	2,503.96	88.6±7.2%					
	4-NP ₂ EO		420.68	1,402.28	61.4±9.1%					
Andreu et al.(2007)		sludge. soil	LOD (µg.kg ⁻¹)		spiked sludge (n=3; 3 days)					
	4-t-OP		30		91±15%				external calibration	NR
	4-NP		30		97±19%					
	4-NP ₁ EO		3		89±13%					
	4-NP ₁₋₅ EO		1		89±15%-94±12%					
	4-OP ₁₋₅ EO		1		89±18%-97±11%					
	4-NP ₆₋₁₅ EO		0.3		89±15%-95±10%					
	4-OP ₆₋₁₅ EO		0.3		89±19%-102±11%					
Lara martin et al.(2006)	MRA	sediments	LOD (ng.g ⁻¹) S/N=3		spiked reconstituted sediments					
	NP ₁₋₁₇ EO		1.0-10.0		70±3%				external standard addition+internal standard (C16 LAS)	estimated to less than 10 %
	OP ₁ EC				65±6%					
	NP ₁ EC				74± 0%					

Gibson et al. (2005)	MRA	soils; biosolids	LOD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) S/N=3		spiked soils (n=4; 2 operators; 40 and 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	spiked soils (n=4; 2 operators; 2,000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	spiked sludge (n=4; 2 operators; 4,000 and 20,000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)			
	4-NP		10		75±16%	95±6%	91 ± 16%		internal standard: 4-n-	NR
Pojana et al. (2006)	MRA	sediments	MDL ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) S/N=3		spiked sediments (n=3; 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	spiked sediments (n=3; 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)				
	4-NP		0.2-5		84±6%	61±15%			internal standard: 4-n-NP _{d4}	NR
	4-NP ₁ EC				86±5%	67±14%				
Cantero et al. (2004)		sludge	LOD (mg.kg^{-1}) S/N=3		spiked sludge					
	OP ₉₋₁₀ EO		0.09-0.38		85±7%				internal standard:	NR
	NP ₆ EO				87±7%					
Cespedes et al. (2007)		sludge	IDL (ng) v= 25 μl S/N =3	LOD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) S/N =3	suspended solids					
	4-NP ₁ EO		0.9	5 to 23	47-76%				internal standards: heptylphenol, DEHP _{d4}	NR
	4-NP ₂ EO		0.3							
	4-NP ₃₋₁₅ EO		0.2							
	4-t-OP		0.1							
	4-NP		0.2							
Petrovic et al. (2003)		wastewater	IDL (pg) LC-MS-MS (LC-MS)	MDL (ng.g ⁻¹) LC-MS-MS	Spiked sludge (n=3)					
	4-NP		10 (60)	0.5	81±9%				external calibration	ion suppression checked with surrogate standard 4 - nonyloxybenzoic acid
	4-NPBr		15 (50)	1	64±11%					
	4-NP ₁ Cl				60±14%					
	4-NP ₁ EC		30(150)	1.5	78±8%					
	4-NP ₁ ECBr		50 (150)	1.5	75±9%					
	4-NP ₁ EC ₁ Cl				71±12%					
	4-NP ₂ EC		30 (100)	1.5	68±10%					
	4-NP ₂ ECBr		50 (200)	1.5	NR					
	4-NP ₂ EC ₁ Cl				NR					

4-Validation of the analytical methodologies

4-1-Stability

It has been observed that an insufficient stability of the analyte or matrix constituents in the sample during storage or analysis may give rise to significant deviations in the outcome of the results of the analysis. Furthermore, the stability of the calibration standard in solution should be checked. As it has been first highlighted, this part of the validation is usually not mentioned. With the implementation of the WFD this specific point of the analytical procedure should be investigated to improve laboratory management faced with a growing number of samples and to ensure comparability of data on National and European scales.

Loyo-Rosales et al. (2003) investigated the stability of APs and AP₁₋₅EOs in solvents (MeOH/Water; 50/50; v/v) stored at -20°C over a 12 week period; analytes concentrations in the mixture were constant during 12 weeks and stability was not concentration dependent (RSD comprised between 4 to 13%). Similarly, they studied the stability of ENV+ cartridge stored at -20°C (previously spiked with analytes) and concluded at stability for APs and APEOs with less than 4 ethoxy. Finally, they studied stability of analytes in water (deionized water and stream water), stored at 4°C, over a 29 day period. By comparing different matrices (deionized water, groundwater, stream water and wastewater) they found analytes in deionized water and groundwater to be stable even without additives. On the contrary, streams and wastewater displayed significant alteration in their integrity even over short periods. Moreover, they also mentioned that the use of preservatives (acidification) might affect extraction depending on the interactions involved in sorption phenomena. To sum up, the investigation of stability should be experimentally plan and carefully investigated.

4-2-Recovery/Trueness

Trueness for an analyte means the closeness of agreement between the average value obtained from a large series of test results and an accepted reference value. Trueness is usually expressed as bias and can only be established by means of certified reference material (CRM). If no CRM is available, instead of trueness, recovery can be determined. Recovery is the percentage of the true concentration of a substance recovered during the analytical procedure. Most reported data mention recoveries using ultrapure water for aqueous samples or organic solvent for solid samples. Faced with the ubiquity and occurrence of APEOs, the determination of recovery in natural matrix is tricky. Thus, a minority of works reported recoveries on natural matrix (especially wastewater, sludge) and its representativeness should be pointed out, especially for solid samples. In fact, spiking is not considered as an ideal method, because the sorption of analytes cannot be ensured.

Quintana et al. (2007) studied the recoveries of their SBSE-liquid desorption-GC-MS methodologies on different matrices (n=4): 86% in tap water, 81% in river water; 59% in effluent and

52% in influent for 4-OP, highlighting that matrix components can affect recovery. Similarly, Jahnke et al. (2004) studied recovery on WWTP effluent, using SPE-LC-MS-MS procedure, spiked from 100 to 1,000 ng.l⁻¹. First, they reported typical recoveries between 25 to 47%; after a four-fold dilution of the extracts, they reported an increase of recoveries from 50 to 75%. Those results highlight that a true evaluation of recovery in natural matrix relies on the knowledge of matrix effects which can lead to both enhancement or suppression of signal and consequently to over or underestimation of recoveries.

Tan et al. (2008) designed a SBSE-ThermoDesorption-GC-MS methodology for the study of endocrine disruptors in WWTP; they reported recoveries of 110% for 4-NP and 45% for 4-t-OP in water, only 55% and 15% in sludge.

To sum up, it is important to determine recoveries for each type of matrix, and for different levels of spiking (representative of investigated levels). That it is for aqueous or solid matrix, even if things are worse for solids, these approaches are unsatisfactory especially because none of the natural matrix is free from compounds; CRM to validate the trueness of the analytical methodology is clearly needed.

4-3-Sensitivity of the analytical methods: limit of detection (LOD) and limit of detection (LOQ)

Different methodologies exist to determine the sensitivity of an overall methodology. Limit of detection (LOD) is usually determined as the lowest concentration on analyte with signal to noise of three; limit of quantification (LOQ) as lowest concentration of analyte with signal to noise of 10. Some authors report instrumental detection limit (IDL) and method detection limit (MDL) (generally obtained by spiking laboratory waters with solvents). Because matrix components can affect both LOD and LOQ (increase of the analytical noise; matrix effects), it is important to note that it should be determined in real samples.

IDL are usually in the range of tens to thousands pg injected. Petrovic et al. (2003) reported IDL for both LC-MS and LC-MS-MS methodologies of 60 pg and 10 pg for 4-NP, 100 pg and 30 pg for 4-NP₂EC, highlighting the strong interest of developing LC-MS-MS methodologies to increase both sensitivity and selectivity. MDL was between 1-2 ng.l⁻¹ for all investigated compounds.

Depending on the compounds (oligomers and isomers), the analytical methodologies, the extracted volume or quantity, the reconcentration factor, LOD is between low ng.l⁻¹ to hundreds ng.l⁻¹ for the aqueous phase, tens to hundreds ng.g⁻¹ for solids (Table 4-5).

4-4-Accuracy

Accuracy is the degree of conformity of a measured quantity to its actual value (true value). It is determined by delimiting trueness and precision. The evaluation of accuracy relies on multiple quality

controls and method validation. As no CRM is currently available, the evaluation of accuracy cannot be fully made.

Precision means the closeness of agreement between independent test results obtained under stipulated conditions. The measure of precision usually is expressed in terms of imprecision. Repeatability and reproducibility are the main components of precision, and should be determined in real appropriate samples. Repeatability conditions mean conditions where independent test results are obtained with the same method on identical test items in the same laboratory by the same operator using the same equipment. Andreu et al. (2007) conducted three sets of tests on three replicated samples which were extracted on three different days and subsequently analyzed on different days. Satisfactory recoveries were achieved for all target analytes ranging from 89 to 102% with $RSD \leq 20\%$. In the same manner, Gatidou et al. (2007) investigated repeatability and reproducibility for both wastewater and sludge. Repeatability was achieved on six replicates of wastewater and sludge, spiked with 100ng of the target compounds and analyzed for 1 day. Reproducibility was achieved on three replicates of wastewater and sludge samples spiked with 100ng of the target compound and analyzed on 3 different days over a period of 1 week. RSD were less than 12%; the authors concluded the methodology offered good precision.

The first European interlaboratory comparison study for the analysis of APs in water was held in 2006. Loos et al. (2008) summed up the principal lessons: all the laboratory did not work on the same isomers (4-*tert*-OP; 4-*n*-OP); LC-MS-MS and GC-MS proved to be comparable methods for the analysis of APs; analysis of 4-NP at concentrations $<100 \text{ ng.l}^{-1}$ is difficult, due to the contamination of laboratory blanks.

5-Conclusion

Nowadays, hundreds of publications have referred to the study of APEOs, APs, APECs in the aquatic environment. Analytical methodologies are generally designed according to the investigated compounds and the matrix; LC-MS, LC-MS-MS and GC-MS are by far the most commonly used technologies; leading to LOD (ng.l^{-1} for aqueous sample, hundreds ng.g^{-1} for solid samples) which can be insufficient to conduct environmental surveys, especially in a restriction context. Furthermore, analytical methodologies suffer from failures in their analytical validation with a misuse of terminology. To succeed in correct validation procedure (as required in a regulatory context), analytical methodologies will have to focus on:

- The presence of laboratory blank to ensure trueness of data,
- The study of the stability of analytes in a natural matrix,
- The use of appropriate internal standards (labeled compounds, linear forms of APEOs),
- The improvement of specificity,
- The determination of sensitivity in a natural matrix,

- The investigation of matrix effects, especially when LC-ESI-MS-(MS) is used,
- The participation to intercomparison laboratory studies to improve precision and thus accuracy.

Bibliography

Ying, G.-G., Williams, B. and Kookana, R. (2002) Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environment International* 28(3), 215-226.

Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E. and Lester, J.N. (2008) Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*.

Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A.F. and Viana, M.T. (2006) Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Scientific review. Applied Ecology and Environmental Research* 4(1), 1-25.

Loos, R., Wollgast, J., Castro-Jiménez, J., Mariani, G., Huber, T., Locoro, G., Hanke, G., Umlauf, G., Bidoglio, G., Hohenblum, P., Moche, W., Weiss, S., Schmid, H., Leiendecker, F., Ternes, T., Ortega, A.N., Hildebrandt, A., Barceló, D., Lepom, P., Dimitrova, I., Nitcheva, O., Polesello, S., Valsecchi, S., Boutrup, S., Sortkjaer, O., de Boer, R. and Staeb, J. (2008) Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27(1), 89-95.

Lee, H.B. (1999) Review of analytical methods for the determination of nonylphenol and related compounds in environmental samples. *Water Qual. Res. J. Canada*. 34(1), 3-35.

Petrovic, M. and Barcelo, D. (2002) Review of advanced sample preparation methods for the determination of alkylphenol ethoxylates and their degradation products in solid environmental matrices. *Chromatographia* 56(9-10), 535-544.

Petrovic, M. and Barcelo, D. (2001) Determination of phenolic xenoestrogens in environmental samples by liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International* 84(4), 1074-1085.

Lopez De Alda, M.J., Diaz-Cruz, S., Petrovic, M. and Barcelo, D. (2003) Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A* 1000(1-2), 503-526.

Ieda, T., Horii, Y., Petrick, G., Yamashita, N., Ochiai, N. and Kannan, K. (2005) Analysis of nonylphenol isomers in a technical mixture and in water by comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Environmental Science and Technology* 39(18), 7202-7207.

Wheeler, T.F., Heim, J.R., LaTorre, M.R. and Janes, A.B. (1997) Mass Spectral Characterization of p-Nonylphenol Isomers Using High-Resolution Capillary GC-MS. *Journal of Chromatographic Science* 35(1), 19-30.

Zhang, D. and Chen, L. (2006) The analysis of isomer and carbon number distribution of alkylphenol by HPLC-MS. *Petroleum Processing and Petrochemicals* 37(12), 48-52.

Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A. and Barceló, D. (2008) Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia, NE Spain). *Environmental Pollution* 153(2), 384-392.

- Quintana, J.B., Rodil, R., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P. and Prada-Rodriguez, D. (2007) Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction-liquid desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1174(1-2), 27-39.
- Fiedler, S., Foerster, M., Glaser, B. and Zech, W. (2007) Alkylphenols in sediments of the Atlantic Rainforest south-west of Sao Paulo, Brazil. *Chemosphere* 66(2), 212-218.
- Lee, J., Lee, B.C., Ra, J.S., Cho, J., Kim, I.S., Chang, N.I., Kim, H.K. and Kim, S.D. (2008) Comparison of the removal efficiency of endocrine disrupting compounds in pilot scale sewage treatment processes. *Chemosphere* 71(8), 1582-1592.
- Jahnke, A., Gandrass, J. and Ruck, W. (2004) Simultaneous determination of alkylphenol ethoxylates and their biotransformation products by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1035(1), 115-122.
- Lagana, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G. and Marino, A. (2004) Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta* 501(1), 79-88.
- Petrovic, M., Barcelo, D., Diaz, A. and Ventura, F. (2003) Low nanogram per liter determination of halogenated nonylphenols, nonylphenol carboxylates, and their non-halogenated precursors in water and sludge by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 14(5), 516-527.
- Gonzalez, S., Petrovic, M. and Barcelo, D. (2004) Simultaneous extraction and fate of linear alkylbenzene sulfonates, coconut diethanol amides, nonylphenol ethoxylates and their degradation products in wastewater treatment plants, receiving coastal waters and sediments in the Catalanian area (NE Spain). *Journal of Chromatography A* 1052(1-2), 111-120.
- Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H. and Kannan, N. (2008) Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea. *Chemosphere* 71(6), 1162-1172.
- Ballesteros, O., Zafra, A., Navalon, A. and Vilchez, J.L. (2006a) Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. *Journal of Chromatography A* 1121(2), 154-162.
- Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., Navalon, A. and Vilchez, J.L. (2008) Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using liquid chromatography-mass spectrometry. *Microchemical Journal* 88(1), 87-94.
- Lara-Martin, P.A., Gomez-Parra, A. and Gonzalez-Mazo, E. (2006) Development of a method for the simultaneous analysis of anionic and non-ionic surfactants and their carboxylated metabolites in environmental samples by mixed-mode liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1137(2), 188-197.
- Baugros, J.B., Giroud, B., Dessalces, G., Grenier-Loustalot, M.F. and Cren-Olive, C. (2008) Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Analytica Chimica Acta* 607(2), 191-203.
- Tan, B.L.L., Hawker, D.W., Muller, J.F., Tremblay, L.A. and Chapman, H.F. (2008) Stir bar sorptive extraction and trace analysis of selected endocrine disruptors in water, biosolids and sludge samples by thermal desorption with gas chromatography-mass spectrometry. *Water Research* 42(1-2), 404-412.

- Basheer, C., Parthiban, A., Jayaraman, A., Hian, K.L. and Valiyaveetil, S. (2005) Determination of alkylphenols and bisphenol-A: A comparative investigation of functional polymer-coated membrane microextraction and solid-phase microextraction techniques. *Journal of Chromatography A* 1087(1-2), 274-282.
- Hohne, C. and Puttmann, W. (2008) Occurrence and temporal variations of the xenoestrogens bisphenol A, 4-tert-octylphenol, and tech. 4-nonylphenol in two German wastewater treatment plants. *Environmental Science and Pollution Research - International*, 1-12.
- Arditsoglou, A. and Voutsas, D. (2008) Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers. *Environmental Pollution*.
- Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J. and Barcelo, D. (2007) Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *Journal of Chromatography A* 1152(1-2), 97-115.
- Pichon, V. and Chapuis-Hugon, F. (2008) Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants-A review. *Analytica Chimica Acta*.
- Guerreiro, A., Soares, A., Piletska, E., Mattiasson, B. and Piletsky, S. (2008) Preliminary evaluation of new polymer matrix for solid-phase extraction of nonylphenol from water samples. *Analytica Chimica Acta* 612(1), 99-104.
- Liu, R., Zhou, J.L. and Wilding, A. (2004) Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. *Journal of Chromatography A* 1038(1-2), 19-26.
- Aparicio, I., Santos, J.L. and Alonso, E. (2007) Simultaneous sonication-assisted extraction, and determination by gas chromatography-mass spectrometry, of di-(2-ethylhexyl)phthalate, nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and polychlorinated biphenyls in sludge from wastewater treatment plants. *Analytica Chimica Acta* 584(2), 455-461.
- Nunez, L., Turiel, E. and Tadeo, J.L. (2007) Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1146(2), 157-163.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N. and Marcomini, A. (2007) Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International* 33(7), 929-936.
- Andreu, V., Ferrer, E., Rubio, J.L., Font, G. and Pico, Y. (2007) Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenol ethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in soils treated with sewage sludges. *Science of the Total Environment* 378(1-2), 124-129.
- Tan, B.L.L., Hawker, D.W., Muller, J.F., Leusch, F.D.L., Tremblay, L.A. and Chapman, H.F. (2007) Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. *Environment International* 33(5), 654-669.
- Bai-Juan, Y., Feng-Hua, J., Xiao-Qin, X., Jun-Hui, C. and Lee, F.S.C. (2007) Determination of Alkylphenols in Water by Solid-Phase Extraction with On-column Derivatization Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 35(5), 633-637.

Ballesteros, O., Zafra, A., Navalón, A. and Vílchez, J.L. (2006b) Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. *Journal of Chromatography A* 1121(2), 154-162.

Zwiener, C. and Frimmel, F.H. (2004) LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment - A critical review: Part II: Applications for emerging contaminants and related pollutants, microorganisms and humic acids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(4), 862-874.

Jonkers, N., Govers, H. and De Voogt, P. (2005) Adduct formation in LC-ESI-MS of nonylphenol ethoxylates: mass spectrometrical, theoretical and quantitative analytical aspects. *Analytica Chimica Acta* 531(2), 217-228.

Gonzalez, S., Barcelo, D. and Petrovic, M. (2007) Advanced liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods applied to wastewater removal and the fate of surfactants in the environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 26(2), 116-124.

Loos, R., Hanke, G., Umlauf, G. and Eisenreich, S.J. (2007) LC-MS-MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters. *Chemosphere* 66(4), 690-699.

Loyo-Rosales, J.E., Rice, C.P. and Torrents, A. (2007) Octyl and nonylphenol ethoxylates and carboxylates in wastewater and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 68(11), 2118-2127.

Cantero, M., Rubio, S. and Perez-Bendito, D. (2006) Determination of alkylphenols and alkylphenol carboxylates in wastewater and river samples by hemimicelle-based extraction and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1120(1-2), 260-267.

Gonzalez, S., Petrovic, M., Radetic, M., Jovancic, P., Ilic, V. and Barcelo, D. (2008) Characterization and quantitative analysis of surfactants in textile wastewater by liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22(10), 1445-1454.

Taylor, P.J. (2005) Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 38(4), 328-334.

Communities, O.J.o.t.E. (2002) COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044), *Official Journal of the European Communities*.

Barcelo, D. and Petrovic, M. (2007) Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 26(1), 2-11.

Loyo-Rosales, J.E., Schmitz-Afonso, I., Rice, C.P. and Torrents, A. (2003) Analysis of Octyl- and Nonylphenol and Their Ethoxylates in Water and Sediments by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 75(18), 4811-4817.

Gatidou, G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S. and Lekkas, T.D. (2007) Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1138(1-2), 32-41.

Publication n°2**Détermination des métabolites de nonylphénol-éthoxylés dans les eaux de rivière et les effluents de stations d'épuration par extraction en phase solide, chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (électrospray)**

Xuejun Pan, Sophie Lardy-Fontan, Hélène Budzinski*

Laboratoire de Physico-ToxicoChimie des systèmes naturels, UMR 5472 CNRS,
Université de Bordeaux I, 33405, Talence Cedex, France

* auteur: Tel.: 33 5 40 00 69 98; Fax: 33 5 40 00 69 98.

E-mail: h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

Résumé:

Une méthode analytique complète basée sur la chromatographie liquide en phase inverse et la spectrométrie de masse en mode d'ionisation électrospray (LC-ESI-MS) a été développée pour la détermination quantitative simultanée des métabolites d'alkylphénol-éthoxylés dans les matrices environnementales complexes. L'extraction et la purification des échantillons d'eau a été exécutée par extraction en phase solide sur cartouche C18. Le nonylphénol (4-NP technique), l'octylphénol (4-t-OP), et l'acide nonylphénoxyacétique (4-NP1EC) ont été analysés par CL (phase inverse)-ESI-SM en mode d'ionisation négative (NI), alors que le nonylphénol-éthoxylés (4-NP1EO, 4-NP2EO) ont été analysés par CL (phase inverse)-ESI-SM en mode d'ionisation positive (PI). La méthode a été validée et appliquée avec succès à la détermination des niveaux de contamination par les métabolites de NPEO dans les effluents de stations d'épuration et les eaux de surface en estuaire de Seine.

Pour soumission à Analytical and Bioanalytical Chemistry (ABC)

E-mail address: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Alkylphenol ethoxylates (APnEOs) are one of the most widely used classes of effective non-ionic surfactants. They have been used in various domestic detergents, paints, herbicides, pulp and paper production, textile manufacturing, pesticide formulations and industrial cleaning agents and wherever their interfacial effects of detergency, (de)foaming, (de)emulsification, dispersion or solubilization can enhance product or process performance. Nonylphenol ethoxylates (NPnEOs) and octylphenol ethoxylates (OPnEOs) are two of the most common surfactants in the marketplace. APnEOs are discharged to wastewater treatment facilities or directly released into the environment. Biotransformation occurs when APnEO surfactants are exposed to secondary wastewater treatment Giger et al. (1984), and a complex mixture of metabolites is released to the aquatic environment via discharge of the treated sewage. Primary degradation of APnEOs in wastewater treatment plants or in the

environment generates more persistent shorter-chain APnEOs and alkylphenols (APs) such as nonylphenol (4-NP), octylphenol (4-t-OP), nonylphenol mono- or diethoxylates (4-NP₁EO, 4-NP₂EO), and nonylphenolcarboxylates (4-NP₁EC, 4-NP₂EC) in aerobic or anaerobic conditions (Thiele et al., 1997). Furthermore, the ultimate biodegradation products: nonylphenol (4-NP) in the case of NPnEO and octylphenol (4-t-OP) in the case OPnEO are persistent (Ekelund et al., 1993; Ejlertsson et al., 1999; Staples et al., 1999; Heinis, 1999; Vazquez-Duhalt et al., 2006; Soares et al., 2008) and toxic (Servos, 1999; Soares et al., 2008) at environmental measured concentrations. In fact, APnEO metabolites are weak endocrine disruptors (R M Harrison, 1999; Lintelmann et al., 2003; Mills and Chichester, 2005; Soares et al., 2008) they have been shown to be oestrogeno-mimetic with an agonist action of the natural hormone: 17- β -oestradiol (White R, 1994; Jobling S., 1996). Vethaak et al. (2005) showed, in a multi parameter monitoring study, that 4-NP was the principle contributor to endocrine disruption activity in Dutch aquatic systems.

Since the last ten years, high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry has become the prevalent analytical technique to study polar organic compounds in environmental media. The occurrence of alkylphenol ethoxylate metabolites at low concentration together with the complex matrix interference often present in environmental media means that highly sensitive and specific analytical methods are needed for their determination. As shown in Table 1, APnEOs as well as their degradation metabolites have been reported in different aquatic ecosystems: marine, estuarine and river, worldwide. Measured concentrations vary from lower than ten ng.l⁻¹ to more than ten μ g.l⁻¹ depending of the systems and the compounds. Although alkylphenols (4-NP and 4-OP) are suitably documented as well as the anaerobic biodegradation metabolites (NPnEOs, specially 4-NP₁EO and 4-NP₂EO), it can be pointed out the lack of data about the environmental occurrence of the aerobic biodegradation metabolites (APnEC). A highly specific and sensitive analytical method, which can provide accurate and precise data for the determination of alkylphenol ethoxylate metabolites, is required. HPLC with mass spectrometry detection has been used frequently to analyze alkylphenol ethoxylates, their metabolites, and other nonionic surfactants in the environment (Table1).

Table 1: A non exhaustive view of the state of knowledge on APnEO metabolites: environmental levels (ng.l⁻¹) and analytical tools

Location	Environment type	[4-NP]	[4-NP ₁ EO]	[4-NP ₂ EO]	[4-NP _n EO]	[4-NP ₁ EC]	[4-NP ₂ EC]	[4-t-OP]	Analytical methods	Reference
Laurentian great lakes	Freshwater	<10-920	<20-7,800	<20-10,000	-	-	-	<5-470	In situ acetylation,	Bennie et al.
Gualdalquivir river	Freshwater	900-1,100	-	-	-	1,000-4,000	-	800-9,000	SDS helimicelles-	Cantero et al.
Taiwan rivers	Freshwater	<10-2,600	<10-500	-	-	<10-63,600		-	SPE (GCB or ENVI-	Cheng et al.
Hudson river	Freshwater	12-95	-	-	-	-	-	-	XAD2 adsorbent ;	Dachs et al.
Elbe river	Freshwater	13-87	<0.5-120			-	-	<0.5-5	LLE;	Stachel et al.
Santa ana river	Freshwater	0-6,200	-	-	-	-	-	-	SPE (C 18,);	Gross et al.
Back river	Freshwater	140-200	<9-67	12-54	-	-	-	<9	SPE (ENV+);	Loyo-Rosales et
Netherlands river	Freshwater	<LOD-140	<LOD	-	-	-	-	<LOD	SPE (C18);	Voogt et al.
Yellow river	Freshwater	50-170	50-140	50-450	700-1,500	30-100		-	SPE (HLB);	Wang et al.
Tokyo	Freshwater	<LOD-2,870	<LOD-3,380	-	-	470-2820	180-1770	<LOD-118	SPE (C18) ;	Isobe and
Detroit river	Freshwater	<LOD-37 000	<LOD-332,000			-	-	<LOD-670	Empore disk ;	Takada (2004) Snyder et al. (1999)
Cuyahoga river	Freshwater	130-1,000				-	-	-	SPE (ENV+);	Rice et al. (2003)
Tokyo metropolitan	Freshwater	50-1,080	40-810	-	-	-	-	10-180	SPE (SEP-PAK	Isobe et al.
Italian and Belgian	Freshwater	320-2,500	300-1,300	60-3,600	3770-19900	280-2200		12-111	SPE(C18) LC-ESI-	Loos et al.
Lyon area	Freshwater, Groundwater	<LOD	<LOD – 1,009	<LOD – 1,4141				<LOD	SPE(Strata)LC-ESI- MS-MS	Baugros et al. (2008)
Jamaica bay	Brackish water	201	157	320	-	-	-	3.27	SPE (Bondesil);	Ferguson et al.
Rhine estuary	Brackish water	12-88	<15-32	<6-64	<30-225	60-322	<13-247	-	SPE(C18) ;	Jonkers et al.
Sheldt estuary	Brackish water	50-962	<15-443	6.8-234	<30-447	37-1,030	<13-2,339	-	SPE(C18) ;	Jonkers et al.
Venice lagoon	Brackish water	300	800	900	-	-	-	-	SPE (C18);	Marcomini et al.
North sea	Saltwater	0.09-1.4	0.017-1.66	-	-	-	-	0.013-0.3	GC-EI-MS	Xie et al. (2006)
Catalonian area and	Saltwater	<150-4100	-	-	<200-11,000	-	-	-	SPE (C18) ;	Petrovic et al.
Catalonian area	Saltwater	<LOD-0.21	<LOD-9.2	<LOD-160	-	<LOD-200	-	<LOD-70	SPE (C18);	Cespedes et al.
Catalonian area	Saltwater	<50-210	<50-9,200	<50-160	-	<100-220	-	<50-71	SPE (C18);	González et al.
Pearl river delta	Saltwater	<20-628	-	-	-	-	-	<2-68	SPE (SEP-PAK	Chen et al.
Jiaozhou Bay,adjacent	Saltwater, Freshwater	24.7-28,600						1.2-16.1	LLE-GC-EI-MS	Fu et al. (2007)
Cadiz Bay, Guadalate	Saltwater				<LOD-5,000	<LOD-3,900			SPE(C18) LC-IT-	Lara-Martín et
Lagoon Venice	Saltwater	0.5-211				0.1-82			SPE LC-ESI-MS	Pojana et al. (2007)
Masan Bay	Creek water, Saltwater	23-928	0.5-1,210	85-1,840					GC-EI-MS (BSTFA)	Li et al. (2008)

The objective of this study was to develop a very simple as well as reliable method that could analyze the most important APnEO metabolite byproducts of the anaerobic pathway as well as the aerobic pathway that always occur in aquatic environment. Solid-phase extraction and reversed-phase HPLC-ESI-MS were optimized for specific and sensitive analysis of the APnEO metabolites. The protocol was validated with environmental samples from river water and sewage treatment plant (STP) effluent near Seine estuary (France).

2-Experimental

2-1-Quantitation standards

Unlabeled p-n-nonylphenol (98%+, 4-n-NP), p-n-nonylphenol monoethoxylate (95%+, 4-n-NP₁EO), p-n-nonylphenol diethoxylate (p-n-NP₂EO), 4-nonylphenoxyacetic acid (ring chain isomers) (98%+, 4-NP₁EC) - nonylphenoxyethoxyacetic acid (ring chain isomers) (98%+, p-n-NP₂EC) (100 µg/ml in nonane, respectively) were purchased from Promochem (Molsheim, France). Labeled p-n-nonylphenol (98%+, p-n-NP_{c13}), 4-n-nonylphenol monoethoxylate (95%+, 4-n-NP₁EO_{c13}) were purchased from Promochem (Molsheim, France). 4-nonylphenol (100%, 4-NP, Technical), 4-octylphenol (99.5%, 4-OP), 4-nonylphenol-mono-ethoxylate (99.5%, 4-NP₁EO) and 4-nonylphenol-di-ethoxylate (99.5%, 4-NP₂EO) were purchased from labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers (Augsburg, Germany). Internal standard 2,4,6-Trimethylphenol (97%, 2,4,6-TMP) was purchased from ALDRICH (St Quentin Fallavier, France). Except unlabeled p-n-NP, p-n-NP₁EO, p-n-NP₂EO, 4-NP₁EC, p-n-NP₂EC all others compounds stock solutions were prepared in acetonitrile (ACN) at a concentration of 1 mg.ml⁻¹ respectively. The spiked solutions were prepared in acetonitrile (LC-FLUO) or methanol (LC-MS) at concentration of 1 µg.ml⁻¹ of each compound.

2-2-Reagents and chemicals

Acetonitrile was ultra gradient HPLC grade from J.T.Baker (Atlantic Labo, Bruges, France). Methanol (MeOH) used for LC/MS analysis was for analysis of pesticides residues from PESTINORM™, PROLABO (France). Methanol for other uses was HPLC grade from SDS (Peypin, France). Dichloromethane (DCM) was for organic residue analysis from J.T.Baker (Eysines, France). All the above solvents were used without further purification. Water used for LC/MS analysis was sterilized water for injections from LABORATOIRE AGUETTANT (Lyon, France). Hydrochloric acid (37%) was purchased from VWR (Strasbourg, France). Ammonium acetate (minimum purity 98%) was purchased from SIGMA (St Quentin Fallavier, France). All chemicals were tested for background levels for the compounds of interest.

Due to the ubiquitous occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in plastics and detergents, glassware and sampling apparatus required special treatment prior to use. All the glassware was washed and then heated at 450°C for 6 h prior to use. Glass microfiber filter (GF/F, 0.7 µm nominal, Whatman, VWR, Strasbourg, France) were also heated at 450°C for 6 h prior to use.

2-3-Sample collection

River water and STP effluent in the Seine estuary were collected in 4l glass bottles, which were previously washed and heated at 450°C for 6 h. All aqueous samples were filtered through glass microfiber filters (GF/F) and acidified with 3.5M hydrochloric acid to pH2 before solid-phase extraction. Water samples were preconcentrated and cleaned up on C18 (Bond Elut, Varian, Courtabœuf, France) SPE cartridges within 24 h in order to avoid any degradation of target compounds.

2-4-Solid-phase extraction preconcentration and clean-up

Disposable 3 ml cartridges were activated first with 5 ml of methanol, and then conditioned with 5 ml of M.Q. water (adjusted to pH 2) at a flow rate of 1 ml.min⁻¹. Water samples were loaded at a flow rate of 8-10 ml.min⁻¹ under vacuum. Different volumes of samples were loaded, depending on the type of water (spiked M.Q. water, 100 ml; STP effluent, 0.4 l; river water, 1 l). After preconcentration, 2 ml of pH 2 M.Q. water was passed through the sorbent to elute impurities in water samples which cannot be absorbed by the sorbent. Different solvents were used for cleaning up the sorbent after loading the water samples. When 10% methanol in M.Q. water (pH 2) was used, most of the pigments cannot be eluted out, but when 100% methanol was used, most of the interesting compounds were also eluted out together with pigments. So 50% methanol in M.Q. water (pH 2) was chosen for clean up; most of the pigments were eluted out but the target compounds still remain on to the sorbent. The cartridges were then completely dried under vacuum (about 50 min) to avoid hydrolysis using a SUPELCO (VISIPREP™) SPE apparatus connected to a vacuum system set at -10 psi. After drying, the SPE cartridges were eluted with 5 ml (twice, first 3 ml, second 2 ml) mixture of MeOH: DCM (1/1, v/v). The eluates were evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen and reconstituted with acetonitrile (spiked M.Q. water for development of SPE protocol, LC-FLUO) or methanol (environmental sample, LC-MS) to a final volume of 100 µl. The eluate is clear and fits for LC-MS injection directly.

To obtain maximum sensitivity for each target compound, the optimal detection parameters were obtained in series of flow injection sequences by direct injection 10 μl of each target compound at a concentration of 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ into the flow of the carrier solvent (70% solvent B) which was maintained at a flow-rate of 0.15 ml min^{-1} . The detection parameter values were optimized evaluating the sensitivity, and fragmentation voltage of each analyte in the scan mode (m/z scan value, 100-500). The following operating parameters were optimized: drying gas flow and temperature, nebulizer pressure, capillary voltage, and fragmentation voltage. NP, OP, 4-NP1EC and p-n-NP₂EC were detected under negative ionization (NI) conditions as $[\text{M-H}]^-$, and NP₁EO and NP₂EO were detected under positive ionization (PI) conditions as $[\text{M+H}]^+$, $[\text{M+NH}_4]^+$ and $[\text{M+Na}]^+$. The chromatographic conditions and mobile phases used were the same as optimal conditions of the MS detector that are given in Table 2.

2-7-Quantitation

Quantitative analysis was performed in selected ion monitoring (SIM) mode using external calibration. Initially, a series of injections of compounds in the concentration range from 0.2 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$ to 6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ was used to determination the linear concentration range and instrument detection limits. Calibration curves were generated using linear regression analysis and over the established concentration range gave good fits (typically R^2 values >0.998) for each of the metabolites (See Table 3). For environmental samples, the extract concentration was converted into metabolites concentration in the sample by using the volume of sample extracted and the volume of the extract analyzed (controlled by gravimetrical mean).

Table 3: Linear calibration range and instrument detection limits

Compounds	Linear injection amount range, ng	R^2	n	Instrument detection limits, pg injected on to the column
4-OP	0.03-5.0	0.9996	9	30
4-NP	0.67-10.0	0.9978	9	30
p-n-NP	0.67-10.00	0.9926	9	30
4-NP ₁ EC	2.0-30.0	0.9998	9	30
4-NP ₁ EO	0.5-10.0	0.9983	7	20
p-n-NP ₁ EO	0.25-5.0	0.9988	7	30
4-NP ₂ EO	0.25-10.0	0.9985	8	10
p-n-NP ₂ EO	0.12-5.0	0.9987	8	20

3-Results and discussion

3-1-HPLC-FLUO

4-NP₁EC, 2,4,6-TMP, technical 4-NP, 4- OP, p-n-NP₂EO and p-n-NP₁EO are completely separated (see Figure 1). A good linear range from 0.2 to 2.0 ng injection amount is found ($R^2 > 0.990$, $n=10$). The analytical operation can be completed in 15 min. This method is sensitive and accurate with good reproducibility; it can be used for solid-phase extraction (SPE) method development.

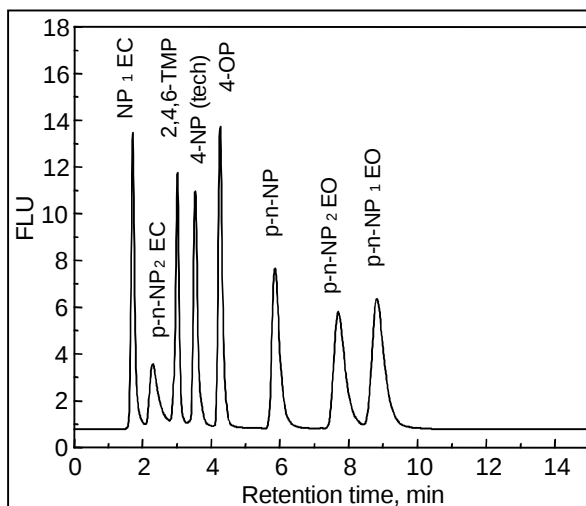


Figure 1: Chromatogram of alkylphenol standards (conditions see above)

3-2-Solid-phase extraction (SPE)

Five kinds of solid-phase extraction (SPE) cartridges were used to preconcentrate and clean up the water samples (see Table 4). For the detailed protocol see above. The results in Table 4 show that all the kinds of cartridges used can receive almost the same average recovery of each compound, but Bond Elut C18 (200 mg, Varian) gives the best relative standard deviation (RSD) compared with other kinds of C18 and Water OASIS hydrophilic-lipophilic balance (HLB). So Bond Elut C18 has been used in processing environmental samples.

Table 4: The results of solid-phase extraction

Sorbent	Zorbax C18		J.T.Baker C18		Alltech C18		Bond Elut C18		Waters OASIS	
Compounds	Average	RSD	Average	RSD	Average	RSD	Average	RSD	Average	RSD
4-NP ₁ EC	76.7	1.6	75.0	3.7	85.9	2.1	81.0	2.0	78.0	6.1
4-NP	87.4	2.5	79.4	6.0	80.7	9.0	85.0	5.6	99.5	6.2
4-OP	81.9	6.0	83.4	9.3	82.6	5.0	82.3	1.5	82.6	5.6
p-n-NP	69.1	6.1	78.7	6.3	74.2	5.1	71.7	3.8	74.1	5.2
p-n-NP ₁ EO	59.1	3.0	66.8	4.0	65.1	4.7	61.3	2.5	66.9	6.0
p-n-NP ₂ EO	57.4	6.6	65.3	2.5	64.1	4.8	58.3	2.4	63.6	7.8

3-3-HPLC-ESI-MS

With gradient elution (see Table 2) on a C18 reversed-phase column, 4-NP₁EC, p-n-NP₂EC, 4-NP and 4-n-NP are completely separated. Distinct peaks are evident in the SIM chromatogram (Figure 2a) for those compounds in reverse-phase LC-ESI-MS negative mode. The separation of the 4-n-NP from the technical 4-NP analyte (a mixture of branched nonyl-phenol isomers, containing no detectable 4-n-NP) provides an advantage in SIM analysis. These compounds have the same molecular weight, therefore they can be monitored using a single m/z channel ($m/z=219$, 220 (isotope)) (Figure 2b-c), increasing the relative instrument dwell time and enhancing sensitivity. The 4-OP cannot be separated completely from technical 4-NP (Figure 2a), however these signals are easily resolved by using selective ions with the mass spectrometer (4-OP: $m/z=205$, 4-NP: $m/z=219$) (Figure 2b) and (4-OP: $m/z=206$, 4-NP: $m/z=220$) (isotope) (Fig 2c).

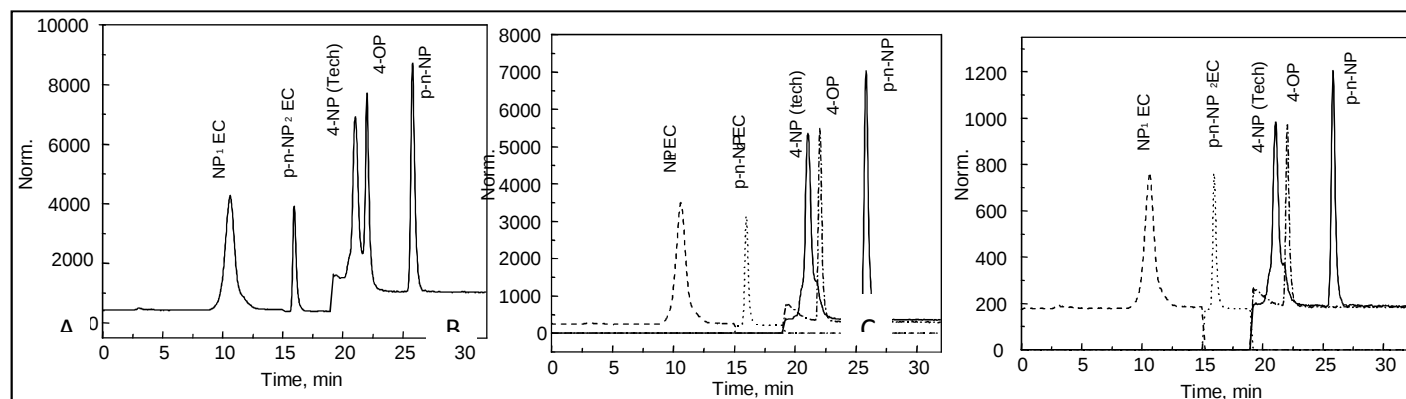


Figure 2: LC/MS chromatograms obtained by injecting the composite standard solution containing target compounds with LC-ESI-MS detection in negative mode (conditions see above and Table 2).

A) SIM chromatogram obtained by injecting standard solution. B) Extract ion chromatogram of 4-NP₁EC ($m/z=277$), p-n-NP₂EC ($m/z=321$), NP ($m/z=219$) and OP ($m/z=205$). C) Extract ion chromatogram of NP₁EC ($m/z=278$), p-n-NP₂EC ($m/z=322$), NP ($m/z=220$) and OP ($m/z=206$) (isotope).

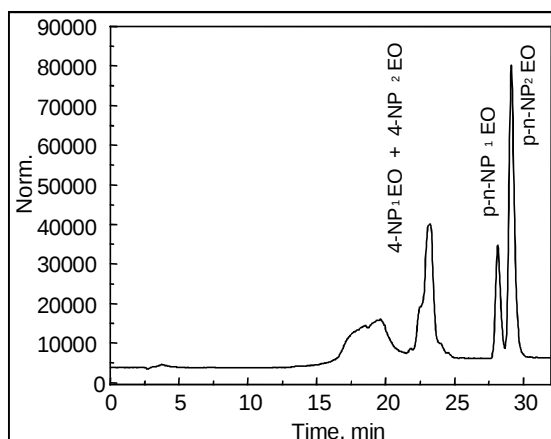


Figure 3: SIM chromatogram obtained by injecting standard solution with LC-ESI-MS detection in positive mode.

Like the alkylphenols, the nonylphenol ethoxylates are separated on the basis of alkyl chain length under gradient elution on a C18 reversed-phase column, however, the ethoxymers of given chain length co-elute (Figure 3). This represents a problem for quantification of the individual ethoxymers when using reversed-phase HPLC spectroscopic detection. However, as shown in Figure 4 a-c, the co-eluting nonylphenol ethoxylates are resolved by the mass spectrometer in reversed-phase LC-ESI-MS positive mode due to their characteristic mass shift of 44 Da (mass of the ethoxylate moiety). The separation of the p-n-NP₁EO from p-NP₁EO analyte (a mixture of branched nonyl isomers, containing no detectable p-n-NP₁EO), and p-n-NP₂EO from 4-NP₂EO analyte (a mixture of branched nonyl isomers, containing no detectable p-n-NP₂EO) also provides an advantage in SIM analysis. These compounds have the same molecular weight; therefore they also can be monitored using two single *m/z* channels. Complete separation of all the non-fully resolved interested compounds is achieved by the mass spectrometer and all co-eluting impurities are discriminated by monitoring the *m/z* of the target analytes.

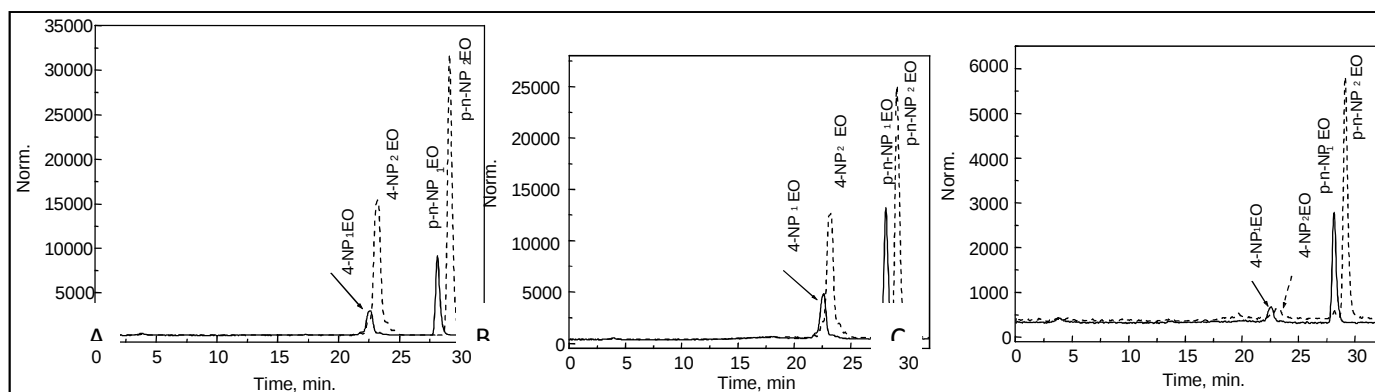


Figure 4: LC/MS chromatograms obtained by injecting the composite standard solution containing target compounds with LC-ESI-MS detection in positive mode (conditions see above and Table 2).

A) Extract ion (NH_4^+ adduct) chromatogram of NP_1EO ($m/z=282$) and NP_2EO ($m/z=326$). B) Extract ion (Na^+ adduct) chromatogram of NP_1EO ($m/z=287$) and NP_2EO ($m/z=331$). C) Extract ion (H^+ adduct) chromatogram of NP_1EO ($m/z=265$) and NP_2EO ($m/z=309$).

Under negative ion conditions, nonylphenol (technical 4-NP, p-n-NP), octylphenol (4-OP) and nonylphenolcarboxylates (4- NP_1EC ; p-n- NP_2EC) give exclusively $[\text{M}-\text{H}]^-$ ions, consistent with previous reports in the literature (Petrovic et al., 2002; Cespedes et al., 2004; Wang et al., 2006) for this class of compounds. These ions are formed by loss of a proton from the phenolic moiety.

Nonylphenol ethoxylate (NPnEOs) molecules show a remarkable affinity for alkali metal ions, which is reflected in the positive ion electrospray spectra of these analytes. Even in the absence of added electrolyte (Na^+), NPnEOs are detected as Na^+ adducts ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), presumably due to the ubiquity of this metal in the solvents and surfaces employed. Na^+ (Petrovic et al., 2002; Xie et al., 2006) or NH_4^+ (Rice et al., 2003) have been added to enhance the response. Because of a possible reduction in NPEO ionization due to insufficient ion availability, it is necessary to add 5 mM ammonium acetate to the mobile phase to enhance the response of NPnEOs as NH_4^+ adducts ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$). This provides sufficient ions for analyte-ion adduct formation. At the same time, H^+ adducts ($[\text{M}+\text{H}]^+$) are also found (Figure 4c) although the response is not very high compared with $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (Figure 4a) and $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Figure 4b). Either in negative or positive conditions, isotopes ($\text{M}+1$) are found as the same analyte-ion adducts. They are also detected in the analysis. As reported previously, absolute response in the ESI-MS signal increases with increasing degree of alkylphenol ethoxylation (absolute response of 4- NP_2EO is higher than that of 4- NP_1EO for the same concentration) (Figure 4).

3-4-Method validation

3-4-1 Test of conservation

Before undertaking sampling campaigns, tests of conservation were carried out at the laboratory. Two factors being able to influence the conservation of the sample were tested: filtration (GF/F, 0.7 μm) and acidification (HCl, pH 2) of the sample. Briefly, a water sample taken near the laboratory and being able to present a potential contamination in APnEO metabolites underwent the protocol exposed in Figure 5. Each sample ($n=3$) have been characterized (qualification and quantification) at T+0, T+2 days and T+5 days after sampling, according to the protocol presented previously. As reported in Table 5, the results obtained seem to highlight that the integrity of the sample is influenced by filtration and acidification. Some compounds such as 4- NP_1EC seem to be very influenced by these parameters. It appears that the conservation of the sample is better when filtration is led just

after the sampling. In the same way, it seems that acidification of the sample before filtration can also influence the distribution of the compounds. It appears that the conservation of a filtered sample, over a 5th days period, at a room temperature of 4°C is compatible with the leading of an environmental analysis on APnEO metabolites from a qualitative and a quantitative point of view.

Table 5: The results of the conservation tests.

	Concentration of metabolites, ng.l ⁻¹														
	Ac-Fil			NAC-Fil			Ac-Nfil			NAC-NFil			Nac-Fil-Ac		
	T+0	T+5	Degradation (%)	T+0	T+5	Degradation (%)	T+0	T+5	Degradation (%)	T+0	T+5	Degradation (%)	T+0	T+5	Degradation (%)
4-NP ₁ EO	43	31	29%	28	35	-26%	43	35	19%	43	32	26%	26	37	-42%
4-NP ₂ EO	21	22	-6%	21	16	25%	21	23	-11%	21	23	-11%	31	16	48%
4-NP ₁ EC	75	78	-4%	98	103	-5%	75	95	-26%	75	95	-26%	105	91	14%
4-NP	94	78	17%	100	102	-2%	94	78	17%	94	78	17%	100	98	3%

Measured concentrations at T+0 and T+5days are expressed in ng.l⁻¹. Degradation ratio (%) is expressed as $(([T0]-[T5])/([T0]) * 100$

3-4-2 Matrix effects

Matrix effects occur when molecules coeluting with the compounds of interest alter the ionization processes (Taylor, 2005). 3 main mechanisms have been suggested to explain a part of the ion suppression phenomena (Antignac et al., 2005): the decrease of the evaporation efficiency (due to the presence of matrix components), the competition between nonvolatile matrix components and the analytes to access to the droplet surface for the transfer to the gas phase (King et al., 2000) and the competition between analytes and interferences regarding to the maximal ionization efficiency of the interface. Matrix components can be provided in one hand by the sample itself (in the case of environmental sample: pigments, macromolecules, humic substances) and in the other hand by the sample preparation steps (ion pairing reagents, SPE by-products). Bonfiglio et al. (2006) have demonstrated that ion suppression phenomenon is compound dependent. In the case of APnEO, such mechanisms may be prevalent. In fact, when analysing in reverse phase-HPLC, APnEO are separated according to their hydrophobic part, in consequence all APnEO ethoxymers co-elute, involving a potential competitive ionisation suppression during electrospray ionisation (especially when sample present a high level of long chain ethoxymers) Ferguson et al. (2000). Matrix effects may lead to: non detection of present analytes, underestimation of analytes, non repeatability, non linearity which may induce dramatic quantitative estimation (Taylor, 2005; Antignac et al., 2005). Two techniques are currently used to assess matrix effects: the postextraction addition and the postcolumn infusion. Because of its easiness of application, the postextraction addition was chosen to evaluate matrix effects. The principle is to compare the difference of response between a postextraction extract fortified with analytes of

interest (A) and a pure solution of solvent fortified with the same quantity of analytes (B). The ratio $((A-B)/B)*100$ provides the percentage of ion suppression for each analyte of interest under chromatographic conditions.

A first approach has been conducted in order to evaluate the robustness, selectivity and sensitivity of the developed protocol.

Three environmental extracts, one of sewage treatment plant effluent and two of surface water have been extracted according to the protocol exposed previously. 100 μ l extracts have been supplemented, prior to injection, with a mixture of five compounds (p-n-NP, p-n-NP_{C13}, p-n-NP_{1EO}, p-n-NP_{2EO}, p-n-NP_{1EOC13}). In parallel, a pure methanol extract has been supplemented with the same quantity of compounds.

Table 6: The results of the matrix effects investigation

Analytes of interest	WWTP effluent (0.3 l)			Surface water (0.5 l)			Surface water (0.3 l)		
	Post extraction (Ion intensity)	Pure solution (Ion intensity)	ME	Post extraction (Ion intensity)	Pure solution (Ion intensity)	ME	Post extraction (Ion intensity)	Pure solution (Ion intensity)	ME
	(A)	(B)		(A)	(B)		(A)	(B)	
p-n-NP	58181	67812	-14%	131620	147457	-11%	133192	147457	-10%
p-n-NP _{C13}	55548	62994	-12%	100542	113109	-11%	102526	113109	-9%
p-n-NP _{1EO}	233588	356569	-34%	328191	326611	0%	366655	326611	12%
p-n-NP _{2EO}	985938	1370460	-28%	1588290	1697500	-6%	1724320	1697500	2%
p-n-NP _{1EOC13}	225983	356569	-37%	326611	328000	0%	366890	326611	12%

Matrix effects (ME) are expressed as $(([A]-[B])/[B])*100$

The results showed matrix effects depending of the compound and the matrix (Table 6). Effluents extracts present the higher matrix effects with values included between -14% to -37%, surface water extracts present matrix effects values included between -11% to 12%, which is coherent with the hypothesis according which organic burden is responsible of ion suppression phenomena (King et al., 2000). Compared to others works (Ferguson et al, 2000; Petrovic et al., 2003; Baugros et al., 2008) which measured extinction phenomena in the range of 15% to 20%, our results are quiet similar. As reported by Ferguson (2001) in a previous work, there were no significant decrease responses between surrogate and internal standards (linear forms and C₁₃ labelled forms) and targeted analytes; which suggested that in a limited retention window matrix effects where constant. In consequence we can assume that linear forms of APnEO (p-n-NP, p-n-NP_{1EO}, p-n-NP_{2EO}) and labelled forms of APnEO (p-n-NP_{C13}, p-n-NP_{1EOC13}) have good quality to become internal standards. Baugros et al. (2008), in their investigation on matrix effects affecting STP effluents and natural waters, reported that the only way to overpass matrix effects was the

standard addition; even if it was time and cost consuming. Meanwhile, it has to be noticed that matrix effects may vary from sample to sample; in consequence it had to be pointed out the necessity to improve our analytical protocol by adding a purification step and introducing quantification by internal calibration and control standard.

The overall analytical method was tested for the method detection limits (MDLs), precision, selectivity and robustness. The method detection limit (MDLs), defined as the minimum amount of a compound present in a sample that produces a signal-to-noise ratio of 3 upon final analysis, was typical 2 ng.l^{-1} under negative ionization mode SIM conditions, and typical 1 ng.l^{-1} under positive ionization mode SIM conditions. In all river water samples, the method detection limits were based on an injection of a $5 \mu\text{l}$ aliquot from the final $100 \mu\text{l}$ extract of a 1 l water sample (STP effluents samples are based on 400 ml). All environmental samples were analyzed under SIM conditions.

3-5-Method application-analysis of river water and STP effluents near Seine estuary

APnEO metabolites were quantified in triplicate water samples to evaluate the method's performance in handling real samples. Results from these analyses (5 samples of river water sampled in the Seine estuary (sampling in May 2002, May 2005) and 3 STP effluent samples (STP Rouen, STP Elbeuf and STEP Tancarville May 2002 and May 2005) are shown in Table 7 and Table 8.

Table 7: The average concentration of APnEO metabolites in Seine estuary water samples

	Concentration of metabolites, ng.l^{-1} , (RSD)*									
	Poses		Elbeuf		Rouen		Caudebec		Honfleur	
	<i>pK 202</i>		<i>pK 218</i>		<i>pK 246</i>		<i>pK310</i>		<i>pK 355</i>	
	May 2002	May 2005	May 2002	May 2005	May 2002	May 2005	May 2002	May 2005	May 2002	May 2005
4-NP1EO	121 (3.9)	136	110 (3.8)	168	99 (4.4)	131	81 (1.1)	87	83 (14.0)	131
4-NP2EO	76 (5.3)	116	72 (6.5)	138	64 (0.8)	90	35 (12.8)	59	99 (18.0)	90
4-NP1EC	727 (4.6)	1128	718 (2.8)	925	711 (4.6)	622	727 (2.0)	685	597 (16.7)	782
4-NP	108 (4.4)	221	128 (9.5)	311	137 (7.6)	285	108 (4.9)	164	61 (8.5)	161

* RSD based on triplicate sample measurements, given in percent

Table 8: The average concentration of APnEOs metabolites in STP effluent

	Concentration of metabolites, ng.l ⁻¹ ,(RSD)**					
	STP ELBEUF effluent		STP ROUEN effluent		STP TANCARVILLE effluent	
	May 2002	May 2005	May 2002	May 2005	May 2002	May 2005
4-NP1EO	136 (11.9)	232	308 (9.4)	377	<1	238
4-NP2EO	400 (5.8)	142	172 (16.4)	176	<1	259
4-NP1EC	862 (6.5)	1861	800 (10.0)	4171	307 (2.65)	2166
4-NP	81 (7.9)	369	176 (5.0)	627	59 (11.3)	367

**Based on independent triplicate sample measurements. RSDs are given in percent.

As shown in the sampling campaign of May 2002, overall precision of the data is excellent, with relative standard deviations (RSDs) of the measured APs and APnEOs concentrations falling generally between 1-15%. In consequence, it has been decided to realize analyze in one replicate for the next sampling campaigns (data in ways of publication). 4-NP, 4-NP1EC, 4-NP₁EO and 4-NP₂EO are found at all sites of the Seine River and in all STP effluent samples. No linear forms (p-n-NP, p-n-NP₁EO, p-n-NP₂EO and p-n-NP₂EC) are detected in effluents or River samples. Chromatographic determinations highlighted linear forms of APnEO were absent of the technical mixtures; as technical mixtures are the constituents employed in by-products, these results appeared coherent. 4-NP₁EC is the predominant form of APnEO metabolites in STP effluents (307 ng.l⁻¹ to 2,166 ng.l⁻¹) as well as in the Seine estuary (597 ng.l⁻¹ to 1,128 ng.l⁻¹). NP₁₋₂EO are usually quantified in concentrations ranging between tens to hundreds ng.l⁻¹. 4-NP, although hydrophobic compound, is measured in concentrations between 100 to 300 ng.l⁻¹ depending on the station, 311 ng.l⁻¹ at Elbeuf (May 2005) to 61 ng.l⁻¹ at Honfleur (May 2002), and the sampling period (between 61 to 137 ng.l⁻¹ in 2002 and between 161 to 311 ng.l⁻¹ in 2005). These data seem to highlight a chronic state of contamination of the Seine estuary with measured concentrations closes to PNEC (Predicted No Effect Concentrations). The INERIS INERIS) reported a PNEC value of 330 ng.l⁻¹ for 4-NP. For 4-NP1EC, 4-NP1EO and 4-NP2EO PNEC values are, respectively of 2.0, 0.11, 0.11 µg.l⁻¹ (Fenner et al., 2002). Consequently, the risks linked to the occurrence of APnEOs in the Seine Estuary appeared harmful; especially considering the fact that these results did not consider the suspended solids (data in preparation) which are known to be a significant well for these compounds (Soares et al., 2008).

4-Conclusion

Reversed-phase HPLC-ESI-MS has been shown to be a highly sensitive, rapid, and robust method for the determination of nonylphenol ethoxylate metabolites in environmental samples. The high sensitivity of the

technique allows the use of small water sample volume and makes it possible to determine the concentration in river water and STP effluent samples. The present methods will be most useful for analyzing NPnEO metabolites in natural waters where there has been high degradation of highly ethoxylated NPnEO. It overcomes some of the limitations of currently used GC-MS, LC-UV, LC-FLUO and normal-phase LC-ESI-MS methods. SPE preconcentration and clean-up protocol was developed and validated.

Acknowledgements

This work was supported by a grant of the program Seine-Aval II-III. Dr. X.-J. Pan acknowledges the post-doctoral fellowship from French Ministry of Research. The authors thank the following co-workers for their assistance: Karyn Lemenach and Olivier Geffard (sample collection); Olivier Mazéas (LC-ESI-MS technique).

References

- Giger, W., Brunner, P.H. and Schaffner, C. (1984) 4-nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science*. 225, 623-625.
- Thiele, B., Günther, K. and Schwuger, M.J. (1997) Alkylphenol ethoxylates: trace analysis and environmental behavior. *Chem. Rev.* 97, 3247-3272.
- Ejlertsson, J., Nilsson, M.L., Kylin, H., Bergman, A., Karlson, L., Oquist, M. and Svensson, B.H. (1999) Anaerobic degradation of nonylphenol mono- and diethoxylates in digester sludge, landfilled municipal solid waste, and landfilled sludge. *Environ. Sci. Technol.* 33, 301-306.
- Ekelund, R., Granmo, A., Magnusson, K., Berggren, M. and Bergman, A. (1993) Biodegradation of 4-nonylphenol in seawater and sediment. *Environmental Pollution* 79(1), 59-61.
- Staples, C.A., Williams, J.B., Blessing, R.L. and Varineau, P.T. (1999) Measuring the biodegradability of nonylphenol ether carboxylates, octylphenol ether carboxylates, and nonylphenol. *Chemosphere* 38(9), 2029-2039.
- Heinis, L.J., Knuth, Michael L., Liber, Karsten, Sheedy, Barbara R., Tunell, Renee L., Ankley, Gerald T. (1999) Persistence and distribution of 4-nonylphenol following repeated application to littoral enclosures. *Journal of Environmental Toxicology and Chemistry* 18(3), 363-375.
- Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A.F. and Viana, M.T. (2006) Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Scientific review. Applied Ecology and Environmental Research* 4(1), 1-25.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E. and Lester, J.N. (2008) Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*.
- Servos, M.R. (1999) Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual. Res. J. Canada*. 34(1), 123-177.

R M Harrison, R.E.H. (1999). Chemistry, R.S.o. (ed), p. 151 pages

Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L. and Wenzel, A. (2003) Endocrine disrupters in the environment-(IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem. 75, 631-681.

Mills, L.J. and Chichester, C. (2005) Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? Science of the Total Environment 343(1-3), 1-34.

White R, J.S., Hoare SA, Sumpter JP & Parker MG (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinology 135 175–182.

Jobling S., S.D., Osborne J., Mathiessen P., Sumpter J.P., (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. Environ. Toxicol. Chem 15, 194-202.

Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., De Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M., Kuiper, R.V., Legler, J., Murk, T.A.J., Peijnenburg, W., Verhaar, H.J.M. and De Voogt, P. (2005) An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. Chemosphere 59(4), 511-524.

Bennie, D.T., Sullivan, C.A., Lee, H.B., Peart, T.E. and Maguire, R.J. (1997) Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River. Science of The Total Environment 193(3), 263-275.

Cantero, M., Rubio, S. and Perez-Bendito, D. (2006) Determination of alkylphenols and alkylphenol carboxylates in wastewater and river samples by hemimicelle-based extraction and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1120(1-2), 260-267.

Cheng, C.Y., Liu, L.L. and Ding, W.H. (2006) Occurrence and seasonal variation of alkylphenols in marine organisms from the coast of Taiwan. Chemosphere 65(11), 2152-2159.

Dachs, J., Van Ry, D.A. and Eisenreich, S.J. (1999) Occurrence of estrogenic nonylphenols in the urban and coastal atmosphere of the lower Hudson river estuary. Environ. Sci. Technol. 33(15), 2676-2679.

Stachel, B., Ehrhorn, U., Heemken, O.P., Lepom, P., Reincke, H., Sawal, G. and Theobald, N. (2003) Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. Environmental Pollution 124(3), 497-507.

Gross, B., Montgomery-Brown, J., Naumann, A. and Reinhard, M. (2004) Occurrence and fate of pharmaceuticals and alkylphenol ethoxylate metabolites in an effluent-dominated river and wetlands. Environmental Toxicology and Chemistry 23(9), 2074-2083.

Loyo-Rosales, J.E., Schmitz-Afonso, I., Rice, C.P. and Torrents, A. (2003) Analysis of Octyl- and Nonylphenol and Their Ethoxylates in Water and Sediments by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. Anal. Chem. 75(18), 4811-4817.

Voogt, P.d., Kwast, O., Hendriks, R. and Jonkers, N. (2000) Alkylphenol ethoxylates and their degradation products in abiotic and biological samples from the environment. Analusis. 28(9), 776-782.

Wang, L., Wu, Y., Sun, H., Xu, J. and Dai, S. (2006) Distribution and dissipation pathways of nonylphenol polyethoxylates in the Yellow River: Site investigation and lab-scale studies. Environment International 32(7), 907-914.

- Isobe, T. and Takada, H. (2004) Determination of degradation products of alkylphenol polyethoxylates in municipal wastewaters and rivers in Tokyo, Japan. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(3), 599-605.
- Snyder, S.A., Keith, T.L., Verbrugge, D.A., Snyder, E.M., Gross, T.S., Kannan, K. and J.P., G. (1999) Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2814-2820.
- Rice, C.P., Schmitz-Afonso, I., Loyo-Rosales, J.E., Link, E., Thoma, R., Fay, L., Altfater, D. and Camp, M.J. (2003) Alkylphenol and Alkylphenol-Ethoxylates in Carp, Water, and Sediment from the Cuyahoga River, Ohio. *Environ. Sci. Technol.* 37(17), 3747-3754.
- Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A. and Takada, H. (2001) Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1041-1049.
- Loos, R., Hanke, G., Umlauf, G. and Eisenreich, S.J. (2007) LC-MS-MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters. *Chemosphere* 66(4), 690-699.
- Baugros, J.B., Giroud, B., Dessalces, G., Grenier-Loustalot, M.F. and Cren-Olive, C. (2008) Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Analytica Chimica Acta* 607(2), 191-203.
- Ferguson, P.L., Iden, C.R. and Brownawell, B.J. (2001) Analysis of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in environmental samples by mixed-mode high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 938(1-2), 79-91.
- Jonkers, N., Govers, H. and De Voogt, P. (2005a) Adduct formation in LC-ESI-MS of nonylphenol ethoxylates: mass spectrometrical, theoretical and quantitative analytical aspects. *Analytica Chimica Acta* 531(2), 217-228.
- Jonkers, N., Laane, R.W.P.M. and de Voogt, P. (2005b) Sources and fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch coastal zone of the North Sea. *Marine Chemistry* 96(1-2), 115-135.
- Marcomini, A., Pavoni, B., Sfriso, A. and Orto, A.A. (1990) Persistent metabolites of alkylphenol polyethoxylates in the marine environment. *Marine Chemistry*. 29, 307-323.
- Xie, Z., Lakaschus, S., Ebinghaus, R., Caba, A. and Ruck, W. (2006) Atmospheric concentrations and air-sea exchanges of nonylphenol, tertiary octylphenol and nonylphenol monoethoxylate in the North Sea. *Environmental Pollution* 142(1), 170-180.
- Petrovic, M., Rodriguez Fernandez-Alba, A., Borrell, F., Maria Marce, R., Gonzalez Mazo, E. and Barcelo, D. (2002) Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(1), 37-46.
- Cespedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, U., Pina, B., Lacorte, S., Viana, P. and Barcelo, D. (2004) Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(3), 697-708.

González, S., Petrovic, M. and Barceló, D. (2004) Simultaneous extraction and fate of linear alkylbenzene sulfonates, coconut diethanol amides, nonylphenol ethoxylates and their degradation products in wastewater treatment plants, receiving coastal waters and sediments in the Catalanian area (NE Spain). *Journal of Chromatography A* 1052(1-2), 111-120.

Chen, B., Mai, B.-X., Duan, J.-C., Luo, X.-J., Yang, Q.-S., Sheng, G.-Y. and Fu, J.-M. (2005) Concentrations of alkylphenols in sediments from the Pearl River estuary and South China Sea, South China. *Marine Pollution Bulletin* 50(9), 993-997.

Fu, M., Li, Z. and Gao, H. (2007) Distribution characteristics of nonylphenol in Jiaozhou Bay of Qingdao and its adjacent rivers. *Chemosphere* 69(7), 1009-1016.

Lara-Martín, P.A., Gómez-Parra, A. and González-Mazo, E. (2006) Development of a method for the simultaneous analysis of anionic and non-ionic surfactants and their carboxylated metabolites in environmental samples by mixed-mode liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1137(2), 188-197.

Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N. and Marcomini, A. (2007) Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International* 33(7), 929-936.

Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H. and Kannan, N. (2008) Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea. *Chemosphere* 71(6), 1162-1172.

Taylor, P.J. (2005) Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 38(4), 328-334.

Antignac, J.-P., de Wasch, K., Monteau, F., De Brabander, H., Andre, F. and Le Bizec, B. (2005) The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Analytica Chimica Acta* 529(1-2), 129-136.

King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C. and Olah, T. (2000) Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11(11), 942-950.

Ferguson, P.L., Iden, C.R. and Brownawell, B.J. (2000) Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography—electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72, 4322-4330.

Petrovic, M., Barcelo, D., Diaz, A. and Ventura, F. (2003) Low nanogram per liter determination of halogenated nonylphenols, nonylphenol carboxylates, and their non-halogenated precursors in water and sludge by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 14(5), 516-527.

INERIS Nonylphenols.

Fenner, K., Kooijman, C., Scheringer, M. and Hungerbühler, K. (2002) Including transformation products into the risk assessment for chemicals: The case of nonylphenol ethoxylate usage in Switzerland. *Environmental Science and Technology* 36(6), 1147-1154.

Publication n°3**Analyse des métabolites d'alkylphénol -polyéthoxylés dans les matières en suspension de l'estuaire de Seine par le développement d'une méthode d'extraction assistée par micro-ondes, extraction en phase solide et chromatographie en phase liquide-electrospray- spectrométrie de masse**

Sophie Lardy-Fontan, Xuejun Pan, Hélène Budzinski*

Université Bordeaux 1, ISM-LPTC UMR 5255 CNRS 351, crs de la libération 33405 Talence Cedex.

auteur correspondant * Tél. : 33 5 56 84 69 98 ; Fax : 33 5 56 84 69 98.

e-mail : h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Résumé :

Une méthode d'extraction assistée par micro-ondes (MAE) performante a été développée pour l'analyse des métabolites d'alkylphénol-éthoxylés dans les matières en suspension et les sédiments. En outre, une méthodologie de purification en 2 étapes (C18 et HF-PSA) a été développée avec succès et est, à notre connaissance, la première méthodologie de purification permettant la récupération simultanée des métabolites aérobies et anaérobies d'APEO. Ainsi, la méthodologie globale a permis la détermination de cinq métabolites d'APEO avec des taux de récupération supérieurs à 90% et des écarts- type relatifs inférieurs à 20%. Cette méthode qui montre répétabilité, reproductibilité et sensibilité a été appliquée avec succès à l'étude de la contamination des matières en suspension par le nonylphénol (NP), l'octylphénol (OP), les nonylphénol mono et di-éthoxylés (NP1EO et NP2EO) et l'acide nonylphénoxyacétique dans les eaux du fleuve et les effluents des stations d'épuration en estuaire de Seine (France). Les concentrations des composés ciblés dans les matières en suspension varient considérablement selon la localisation et le temps d'échantillonnage et sont comprises entre la dizaine de ng.g^{-1} et le $\mu\text{g.g}^{-1}$ selon les métabolites. Les résultats ont indiqué une forte affinité des NP(0-2)EO pour les matières en suspension, les métabolites d'APEO à courte chaîne «éthoxy» sont associés aux matières en suspension tout au long de l'estuaire. Les matières en suspension jouent un rôle prépondérant dans la contamination de la phase aqueuse d'autant plus lorsque les valeurs de matières en suspension augmentent. Dans les eaux de l'estuaire, la part des phases solides dans la contamination est comprise entre 10-60% pour les NP(0-2)EO et moins de 1% pour le NP1EC

Mots-clés : *matières en suspension, alkylphénols, nonylphénols, métabolites d'alkylphénol- polyéthoxylés, MAE, CL-SM, purification.*

Pour soumission à Analytical and Bioanalytical Chemistry (ABC)

1-Introduction

Alkylphenol polyethoxylates (APEO) are one of the most widely used classes of effective non-ionic surfactants. They have been used in various industrial, institutional and household applications (Talmage, 1994) the most significant commercial APEOs are NPEOs and OPEOs. Approximately, 500,000 tons were produced annually worldwide (1997), 60% of which end up in the aquatic environment (Renner, 1997; Sole et al., 2000). APEOs are highly biodegraded in wastewater treatment processes and by consequence a complex mixture of metabolites is released into the aquatic environment via discharges of the treated sewage (Soares et al., 2008). The metabolites demonstrate persistency, toxicity, and accumulation in the food chain (Servos, 1999; Ying et al., 2002; Vazquez-Duhalt et al., 2006; Soares et al., 2008). The main environmental concern, however, is not their acute toxicity but rather the estrogenic potential of APEOs towards aquatic organisms at lower concentration (Servos, 1999). Concerns over the toxicity and estrogenic potential of APEO biodegradation products led to their inscription in the list of the 33 priority substances of the European Water Framework Directive. Furthermore their ban from a wide range of applications has been adopted by French authorities as from 17 January 2005 (INERIS).

Table 1: State of the art of recent published sets of data presenting suspended solid and sediment contamination by APEO metabolites, worldwide.

ng.g ⁻¹ (d.w.)		NP	NP ₁ EO	NP ₂ EO	OP	Localization	Reference
Surface water	Suspended solids+sediments	427-6,105	<88-513	<19-960	na	Rhine estuary (Germany)	Jonkers et al. (2005)
	Suspended solids+sediments	764-16,637	<88-2,344	<26-3,784	na	Sheldt estuary (Netherlands)	
	Sediments	3.6-239	na	na	<10d-3.6	Jiaozhou Bay (China)	Fu et al. (2007)
	Sediment core	76.9-702,7	na	na	na	Pearl river estuary (China)	Chen et al. (2005)
	Suspended solids	240-7,320	250-2,260	90-2,430	na	Italian river	Patrolecco et al. (2006)
	Sediments	<10-1,750	<25-690	<25-1,250	<5-52	Great lakes (Canada)	Mayer et al. (2007)
	Suspended solids	49.6-2,835.2	na	na	na	Yellow River (China)	Xu et al. (2006)
	Sediments	38.4-863	na	na	na		
Sludge	Sludge (composting units)	16,500-216,500	na	na	na	Paris area (France)	Ghanem et al. (2007)
	Solids /Sludge	<0.02-406	na	na	<0.02-10.9	Queensland (Australia)	Tan et al. (2008)
Soils amended	Soil+Sludge	142-500	na	na	105-238	Mediterranean area	Andreu et al. (2007)

(concentrations are expressed in ng.g⁻¹ d.w.); na: not analyzed

As brought above, the complex biodegradation scheme of APEOs, which is characterized by the loss of amphiphilic properties, leads to the coexistence of a wide range of metabolites. The main point is that it leads to the formation of highly lipophilic compounds, particularly $AP_{(0-2)}EO$ which have low water solubility and tend to adsorb onto suspended particulates and are finally deposited into the bottom sediment.

Although APEOs and metabolites are some of the most concerned classes of compounds, worldwide; it has to be noted that data concerning their occurrence and fate in solid matrix (suspended solids, sludge, soil or organisms) were sporadic. Two main explanations may be advanced: the analytical costs of both analytical developments and sample analysis and the absence of legislation. It has to be noted that, recently (years 2005-2007), some relevant sets of data have been published. The most interesting ones are summarized in Table 1. Globally, measured environmental concentrations are comprised between detection limits ($ng.g^{-1}$, for marine suspended solids) and more than hundred $\mu g.g^{-1}$ (for sludge or amended soils), depending on analytical capabilities, matrix type and site locations. In any case, it can be assumed that the association of APEOs with aquatic suspended particles is one of the important processes controlling the fate of APEOs in the rivers or coastal environments.

“Old” generation extraction methodologies techniques: sonication, Soxhlet are still currently used although they are time and solvent consuming and can, in certain cases miss of sensitivity. Furthermore, it has to be noted that few are the works which consider both the aerobic and the anaerobic APEO metabolites. A need for developing new analytical methodologies (automatizable and “economic”) able to provide reliable quantitative information in environmental matrices particularly the presence of APEO biodegradation metabolites

To the best of our knowledge, no reports have established the distribution or concentration of APEO and the metabolites in the suspended solids of France estuary water and wastewater treatment plant effluents. In the present paper, focused microwave-assisted extraction (MAE) was developed for extraction of alkylphenol polyethoxylates metabolites from suspended solids or sediments. Distributions in the suspended solids were studied for the river surface water and STP effluent.

2-Experimental

2-1-Chemical standards

Unlabeled p-n-nonylphenol (98%+, p-n-NP), p-n-nonylphenol monoethoxylate (95%+, p-n-NP₁EO), nonylphenoxyacetic acid (ring chain isomers) (98%+, NP₁EC), were purchased from Promochem. (Molsheim,

France), ($100\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ in nonane, respectively). 4-nonylphenol (100%, NP, technical), 4-nonylphenol-monoethoxylate (99.5%, NP₁EO) and 4-nonylphenol-diethoxylate (99.5%, NP₂EO) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). The spiked solutions were prepared in methanol at concentrations of $1\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ of each compound.

2-2-Reagents and chemicals

Methanol was for the analysis of pesticide residues from Merck (VWR international, Strasbourg, France). Dichloromethane (DCM) was for organic residue analysis from J.T.Baker; Acetone, hexane and pentane were for organic residue analysis from Scharlau, water used for LC/MS analysis was from JT Baker (Atlantic Labo, Bruges, France). All the above solvents were used without further purification. Water used for solid phase extraction was Evian™ water in glass bottles (France Boisson, France). Hydrochloric acid (37%) was purchased from VWR international (Strasbourg, France). Ammonium acetate (minimum 98%) was purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), trifluoroacetic acid (ACS, minimum 99%) was purchased from Acros (Noisy le grand, France). All the chemicals were tested for background levels for the compounds of interest.

Due to the ubiquitous occurrence of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates, materials in plastic and detergents, glassware was chosen to avoid contamination of the sample. Furthermore, all the glassware and sampling apparatus required special treatment prior to use. All the glassware was washed and then heated at 450°C for 6 h prior to use. Whatman GF/F glass fibre filters (pore size $0.7\text{ }\mu\text{m}$) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France) were also heated at 450°C for 6 h prior to use. 200 mg Bondelut® C18 cartridges, 500 mg Bondelut® PSA and 500mg HF-Bondelut® PSA were purchased from Varian (Courtabœuf, France), LC-NH2 cartridges were purchased from Supelco (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

2-3-Site description and sample collection

The Seine River, which flows out onto the north-western European continental shelf, has a macrotidal estuary, of which 120 km have a dual marine-river influence [Guezennec et al. (1999)]. The watershed of the Seine estuary is $79,000\text{ km}^2$; it represents about 25% of the French population and 40 % of French economic activities. The middle estuary is characterized by a turbidity maximum zone (TMS) which is a zone of maximum turbidity particular to estuaries, ranging between freshwaters not very charged with suspension material and marine salted water. Its situation is not stable because it evolves/moves with the fluctuation of hydrological conditions (flows, cycles of tide) (Guezennec et al., 1999) (Figure 1).

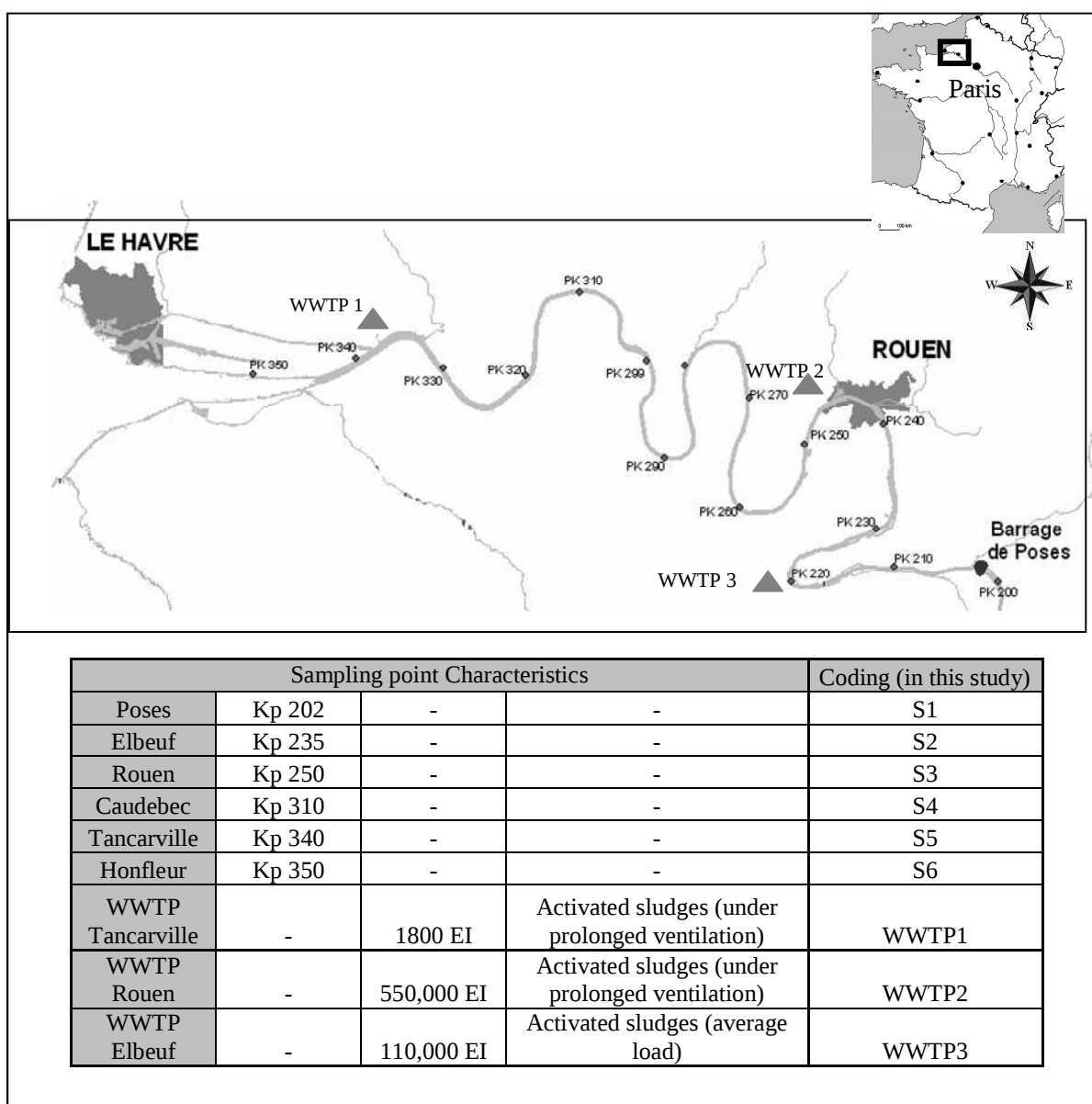


Figure 1: Sampling point localization on the Seine estuary.

River water and STP effluent near the Seine estuary (Figure 1) were collected in May 2005 and July 2006. They were kept in 4 l amber glass bottles, which were previously washed and heated at 450°C for 6 h. All aqueous samples were filtered through glass microfiber filters (GF/F). The GF/F filters, which trapped suspended solid matters, were stored in an aluminum container at -20°C until analysis. The sediment samples were also stored in an aluminum container at -20°C until analysis. The suspended solids and sediment samples were freeze-dried (RP2V, CIRP, Argenteuil, France) before focused microwave-assisted extraction at atmospheric pressure (Soxwave 100 apparatus, Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France). Total suspended solids (TSS, mg.l⁻¹) were determined gravimetrically.

2-4-Sample preparations and APEO metabolites determination

2-4-1 Extraction

Focused microwave-assisted extraction was performed at a frequency of 2,450 MHz with programmable heating power (total 800 W) operated at atmospheric pressure. Many research works (Budzinski et al., 1996; Budzinski et al., 1999; Letellier and Budzinski, 1999a; Letellier and Budzinski, 1999b) have reported on the influence of time, power, solvent nature and volume, matrix nature and moisture on focused microwave-assisted extraction of organic compounds from solid matrix at atmospheric pressure. Extraction conditions based on a mono-parameter approach have been roughly optimized for the selection of important parameters such as power (from 10% to 50%), time of irradiation (from 2 to 12 min), nature of solvent (100% methanol, methanol/dichloromethane (3/1; v/v), methanol/dichloromethane (1/1; v/v), methanol/dichloromethane (1/3; v/v), 100% dichloromethane), volume of solvent (from 10 to 50 ml per gram of sediment), matrix moisture (spiked water from 10 to 60%, dry weight). There is no significant difference from power from 10% to 50% and from irradiation time from 6 to 12 min. The results show that the mixture of methanol/dichloromethane (3/1; v/v) is good for the recovery of all the five selected alkylphenolic compounds. The focused microwave-assisted extraction was shown to be not significantly matrix-dependent and there was no need for precise and specific optimization depending on the type of matrix to be extracted (Letellier and Budzinski, 1999a). The sketch of the analytical methods can be seen in Figure 2. The freeze-dried GF/F filters, which trapped particulate matters, were extracted using focused microwave-assisted extraction with methanol/dichloromethane mixture (3/1; v/v). Before the extraction, the weights of the suspended solids on the filters were measured; therefore, the suspended solid APEO concentrations are reported on a weight basis (i.e. ng.g^{-1}). Freeze-dried sediment samples were also extracted using focused microwave-assisted extraction with a methanol/dichloromethane mixture (3/1; v/v). All the extracts were evaporated under vacuum (600 mbars, 80°C) with an automatic reconcentrator (RapidVap, Bioblock, Fontenay-sous-Bois, France) to remove the solvent and then about 60 ml of water (pH 2) were added.

2-4-2 Purification

The SPE purification (C_{18}), reversed-phase liquid chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry detection have been described in a detailed protocol (Pan et al., submitted). Briefly, disposable 3 ml cartridges (BondElut™ C_{18}) were activated first with 5 ml of methanol, and then conditioned with 5 ml of water (adjusted to pH2) at a flow rate of 1 ml.min^{-1} . The extracts (60 ml) were loaded at a flow rate of $8\text{-}10 \text{ ml.min}^{-1}$ under vacuum. After preconcentration, 2 ml of pH 2 water were passed through the sorbent to elute the impurities

in the water samples which could not be absorbed by the sorbent. Most of the pigments were eluted out with 50% methanol in water (pH 2) for rinsing, and then completely dried under vacuum (about 50 min) to avoid hydrolysis. After drying, the SPE cartridges were eluted with a 5 ml mixture of methanol/dichloromethane (1/1; v/v). The eluates were evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen and reconstituted with methanol to a final volume of 100 μ l. Most of the eluates were clear and fit for LC-MS injection directly.

For some heavy colorful suspended solids and sediment samples, more purification was needed. The eluates were evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen and reconstituted with hexane to a volume of 5 ml. Disposable 3 ml cartridges (Supelco LC-NH₂) were activated first with 5 ml of acetone, and then conditioned with 5 ml of pentane at a flow rate of 1 ml.min⁻¹. The eluates (5 ml) from the last purification step were loaded. After preconcentration, 2 ml of pentane were passed through the sorbent to rinse impurities that cannot be absorbed by the sorbent. LC-NH₂ cartridges were eluted with 5 ml mixture of acetone/pentane (1/3; v/v). The eluates were evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen and reconstituted with methanol to a final volume of 100 μ l. The very polar compounds, such as nonylphenoxyacetic acid (NP₁EC), cannot be eluted out from LC-NH₂ cartridge even with pure acetone or methanol due to the strong polarity of the cartridge. In consequence, a second optimization development occurred, in order to improve purification methodologies in keeping NP₁EC in the extracts. Three types of sorbents were tested LC-NH₂, PSA and HF-PSA. Three elution mixtures were tested: methanol/dichloromethane, methanol/dichloromethane/acetic acid, methanol/dichloromethane/trifluoroacetic acid. Finally HF-PSA sorbent was selected for its ability to provide satisfactory recovery rates for the five APEO metabolites. The optimized SPE protocol was carried out with disposable 3 ml HF-PSA (Bondelut, 500 mg, HF-PSA, Varian). The cartridges were conditioned with 3 ml of methanol and 3 ml mixture of methanol/dichloromethane (80/20; v/v). After deposit of the extracts, HF-PSA cartridges were eluted with mixture of methanol/dichloromethane (80/20; v/v) followed with mixture of methanol/dichloromethane/trifluoroacetic acid (79/19/2; v/v/v). The final eluates were evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen and reconstituted with methanol to a final volume of 100 μ l.

The HPLC system consisted of an Agilent 1100 series (Palo Alto, CA, USA). The HPLC separation was achieved on a 3.5 μ m, 150 $\times$ 2.1 mm i.d. C18 reversed-phase column (Zorbax-SB, Agilent, USA) and the same kind of guard column with gradient elution procedure as follows: 0-2 min, 60%B (A: water/Methanol (3/1; v/v, 5 mmol.l⁻¹ ammonium acetate); B: Methanol), 2-7 min, from 60%B to 80%B, 7-32 min, 80%B, 32-33 min, from 80%B to 60%B, 33-50 min, 60%B. The injection volume was set at 5 μ l, and the flow rate was 0.15 ml.min⁻¹. Detection was carried out using an Agilent 1100 UV detector coupled in series with an Agilent 1100 series LC/MSD mass selective detector equipped with an electrospray interface in Single Ion Monitoring (SIM) mode.

NP, OP, NP₁EC were detected under negative ionization (NI) conditions as $[M-H]^-$, m/z 219, 205, 277 respectively. NP₁EO and NP₂EO were detected under positive ionization (PI) conditions as $[M+NH_4]^+$ and $[M+Na]^+$, m/z 282 and 331 respectively (Lardy-Fontan S., submitted).

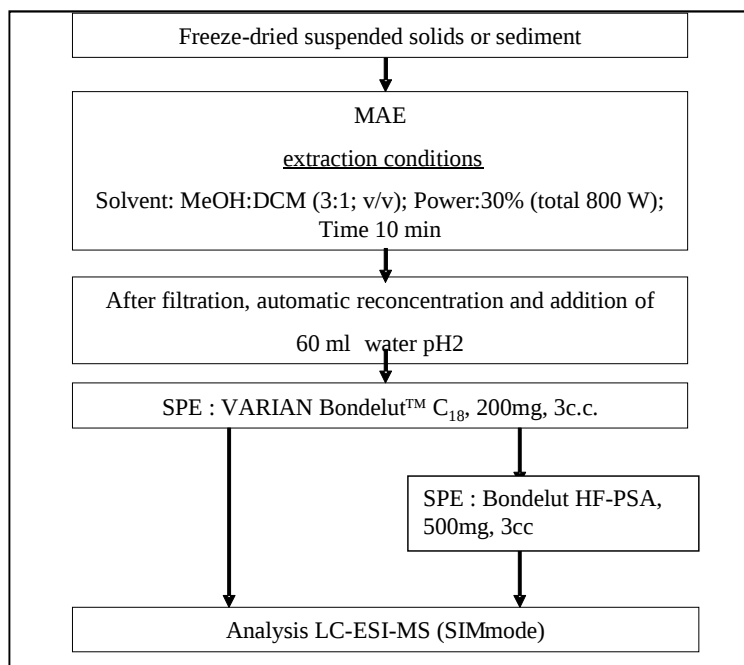


Figure 2: The sketch of analytical methodology.

Calibration curves were generated using linear regression analysis and over the established concentration range (0.2 ng.ml^{-1} to $6 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$) gave good fits (typically R^2 values >0.998) for each of the metabolites. For environmental samples, the extract concentration was converted into metabolite concentration in the sample by using the amount of sample extracted, the volume of the extract analyzed and average recovery obtained from a parallel assay of spiked samples. The sample concentrations were expressed on a freeze-dried weight basis. A protocol blank and a supplemented extracts are joined to each analytical serie in order to control contamination (which may happen during sample treatment procedure) and the efficiency of the analytical methodology.

Optimization of this technique lead to the following average recoveries for suspended solids and sediment analyses as following: MAE-C₁₈: 4-NP: 901%; 4-NP₁EO: 75%; 4-NP₂EO: 73%; NP₁EC: 76%; (spiked concentration, $0.2 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ respectively); MAE-C₁₈-(LC-NH₂): 4-NP: 86%; 4-NP₁EO: 43%; 4-NP₂EO: 46% (spiked concentration, $0.2 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ respectively); MAE-C₁₈ only for nonylphenoxyacetic acid: NP₁EC: 73% (spiked concentration, $1 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$) (spiked concentration, $0.2 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$); with standard deviation less than 15% for all procedures.

3-Results and discussion

3-1-Extraction

An optimized Microwave Assisted Extraction technique coupled to a C₁₈ purification was successfully developed and lead to the following average recoveries for suspended solids and sediment analyses: 4-NP: 91%; 4-NP₁EO: 75%; 4-NP₂EO: 73%; NP₁EC: 76%; (spiked concentration, 0.2 µg.g⁻¹ respectively) with standard deviation less than 15% for all procedures. Furthermore, the optimized protocol allows the achievement of all the preparation procedures of no less than 24 samples in one day (8 hours) with respect of the green chemistry challenges. Overall procedure gave satisfactory method detection limit lower than ng.g⁻¹ which was a significant improvement of sensitivity and allowed the detection and quantification of APEO metabolites in natural solid matrices at concentrations lower than tens ng.g⁻¹.

3-2-Purification

Because most of suspended solids and sediment samples eluates are heavy colorful, more purification was needed. Several preliminary tests were performed with different elution mixtures on three types of sorbent: NH₂, PSA, HF-PSA. Whatever was the elution applied the recoveries for the NP₁EC were between 0 to 3% for NH₂ and PSA sorbents. With HF-PSA sorbent, recoveries for NP₁EC were 1% with mixture of methanol/dichloromethane (80/20; v/v), 15% with mixture of methanol/dichloromethane/acetic acid (79/19/2; v/v/v) and 127% with mixture of methanol/dichloromethane/trifluoroacetic acid (79/19/2; v/v/v). Average recoveries of the purification procedure using, elution mixtures of methanol/dichloromethane (80/20; v/v) followed by mixture of methanol/dichloromethane/trifluoroacetic acid (79/19/2; v/v/v), were satisfactory, upper than 90% for the five compounds. HF-PSA differs from PSA with their porosity (120 µm against 40 µm), the results seems to highlight that it was a limiting factor to explain the low recovery when PSA was used.

3-3-Method validation parameters

Figure 3 presents average recoveries and standard deviation of the global protocol for 5 independent times of manipulation (6 months period), it shows that developed methodology gave satisfactory repeatability and reproducibility with relative standard deviation lower than 20%.

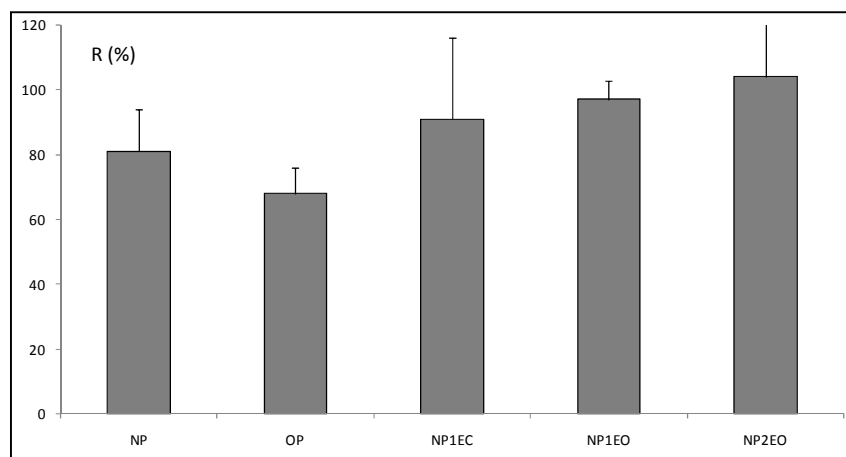


Figure 3: Average recoveries of the global analytical methodology for the study of APEOs in solid samples.

(n=5, 5 separate extraction procedures)

As previously mentioned, the linearity and range of application were established by the calibration curves (0.2 ng.ml^{-1} to $6 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$) with coefficients of correlation values upper than 0.99 (5 points calibration).

The intraday and interday precision was checked by injecting two independent quality standards mixture ($1 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$) at the beginning of each sequence of injection on the apparatus and in the course of each sequence of analysis. RSD are satisfactory between 1% to 10%. The analysis of highly complex mixtures did not seem to impact both sensitivity and linearity of the LC-MS (Table2).

It lets us assume that the overall analytical procedure answer the criteria of validation and is consequently applicable to environmental monitoring studies.

Table 2: Performance data: Intra-day and inter-day precision

	1st day RSD (%) (n=3)	2st day RSD (%) (n=3)	3rd day RSD (%) (n=3)
NP	3%	4%	1%
OP	1%	5%	3%
NP1EC	7%	7%	7%
NP1EO	3%	3%	10%
NP2EO	3%	1%	10%

3-4-Distribution and partitioning of APEO metabolites to suspended solids in river water

Table 3: Partition coefficients for APEO metabolites determined in freshwater lab and field studies.

	NP	NP ₁ EO	NP ₂ EO	OP	River	Reference
Log K_{ow}	4.48 (0.12)	4.17 (0.15)	4.21 (0.18)	4.12 (0.11)		Ahel and Giger
Log K'_{oc}	5.39 (0.12)	5.46 (0.12)	5.18 (0.25)	5.18 (0.35)	USA river	Ferguson et al. (2001)
	4.7-5.6				Canadian	Sekela et al. (1999)
	4.7-6.1				Japan river	Isobe et al. (2001)
	5.10 (0.48)				USA river	Van Ry et al. (2000)

Short ethoxy-chain APEOs are moderately hydrophobic contaminants (see $\log K_{ow}$ values in Table 3) that have been found to associate strongly with organic-rich particulate matter in aqueous systems (John et al., 2000).

In the present work, significant amounts of NP (from 32-2,015 ng.g^{-1}), NP₁EO (from lod-1,237 ng.g^{-1}) and NP₂EO (from lod-2,661 ng.g^{-1}), NP1EC (from lod-1,102 ng.g^{-1}) are present in suspended solids in the river water samples from Seine Estuary in May 2005 and July 2006 (as shown in Table 4). OP have been detected and quantified (from lod to tens of ng.g^{-1} , data not shown) in the Seine estuary, but as sets of data were not complete; no more attention will be carried out in this study. As is obvious from Table 3, NP is normally more adsorbed to suspended solids than NP₁EO and NP₂EO. This difference can be explained by differences in their hydrophobicity. It was reported that the $\log K_{ow}$ (octanol-water partition coefficient) of NP is 4.48 while that of NP₁EO and NP₂EO is 4.17 and 4.21, respectively (see Table 3). The difference in partitioning between NP and NP₁EO and NP₂EO suggests that more NP accumulates in the sediments and/or in the biological tissues than NP₁EO and NP₂EO. As anticipated the more polar compound NP1EC is present in lower proportions (except in some specific points) although it is the prevalent form in dissolved phase (see Table 4).

Table 4: Occurrence of APEO metabolites in suspended solids (expressed in ng.g^{-1}) and dissolved phase (expressed in ng.l^{-1}) of the Seine estuary obtained during 2 sampling campaigns (May 2005 and July 2006)

		S6			S5			S4			S3			S2			S1		
		C° susp. solids		C° diss. phase	C° susp. solids		C° diss. phase	C° susp. solids		C° diss. phase	C° susp. solids		C° diss. phase	C° susp. solids		C° diss. phase	C° susp. solids		C° diss. phase
		ng.g^{-1} (d.w.)	ng.l^{-1}	ng.l^{-1}	ng.g^{-1} (d.w.)	ng.l^{-1}	ng.l^{-1}	ng.g^{-1} (d.w.)	ng.l^{-1}	ng.l^{-1}	ng.g^{-1} (d.w.)	ng.l^{-1}	ng.l^{-1}	ng.g^{-1} (d.w.)	ng.l^{-1}	ng.l^{-1}	ng.g^{-1} (d.w.)	ng.l^{-1}	ng.l^{-1}
July 2006	NP1EO	NS	NS	NS	<7	-	11	291	11	14	605	13	18	381	9	16	243	7	24
	NP2EO	NS	NS	NS	<7	-	2	1,134	42	<2	2,661	57	4	642	14	<2	368	10	8
	NP1EC	NS	NS	NS	<15	-	277	<15	-	312	45	1	489	<15	-	327	<15	-	1,279
	NP	NS	NS	NS	32	3	25	602	23	45	1,628	35	34	1,028	23	27	957	27	30
	TSS (mg.l^{-1})	NS			93			37			21			23			28		
May 2005	NP1EO	339	46	131	NS	NS	NS	489	49	87	863	9	131	1,237	23	168	1,181	18	136
	NP2EO	449	64	90	NS	NS	NS	350	35	59	<10	-	90	1,013	19	138	<10	-	116
	NP1EC	<15	-	782	NS	NS	NS	<15	-	685	136	1	622	150	3	925	1,102	10	1,128
	NP	392	54	161	NS	NS	NS	832	83	164	1714	18	285	1,943	36	311	2,015	18	221
	TSS (mg.l^{-1})	137			NS			99			11			18			9		

NS: Not Sampled; d.w. dried weight; Diss. Phase: dissolved phase ($<0.7 \mu\text{m}$); Susp. Solids: Suspended solids ($> 0.7 \mu\text{m}$); TSS : Total Suspended Solids

As highlighted by Figure 4 which presents the part of suspended solids in the global NP contamination of the water column, it appears that suspended solids may represent from 10% to more than 50% of the water contamination depending on the site and the season. By way of consequence, it can be assumed that the non consideration of suspended solids in environmental monitoring surveys (especially in highly turbid aquatic systems) can lead to the underestimation of real water contamination by a factor, at worst, of 2.

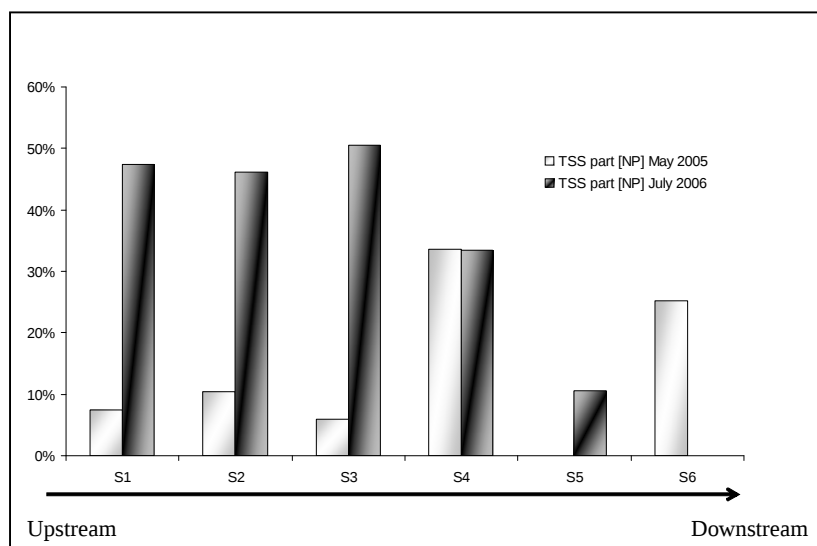


Figure 4: Part of suspended solids in the global contamination of the Seine estuary water (May 2005 and July 2006).

(TSS Total Suspended Solids)

If isotherm and equilibrium partitioning are assumed, K'_{oc} of nonpolar compounds can be predicted from K_{ow} , which is referred to as predicted K_{oc} . The predicted $\log K_{oc}$ value calculated from K_{ow} value of NP is 3.81 (Isobe et al., 2001). All of the $\log K'_{oc}$ values observed in the river water samples are 1 order of magnitude higher than the predicted $\log K_{oc}$ (see Table 3). This means that APEOs partition more to suspended solids than expected from their hydrophobicity. This also implies that the suspended solid APEO metabolites could play a significant role in their transfer in the aquatic environments and their incorporation into bottom sediments and could be one of the most important reservoirs. APEOs in suspended solids are finally deposited into the bottom sediment, which may act as a reservoir and/or ultimate reservoir of APEO metabolites.

The sorbent properties and mechanisms controlling sorption of APEO metabolites onto suspended solids are not fully understood. In a comparison between the sorption of APEOs on organic-rich sediment before and after organic matter removal, John et al. (2000) provided data indicating that interactions with organic matter were important in controlling sorption of APs and short chain APEOs.

3-5-Distribution and partitioning of APEO metabolites in suspended solids in WWTP effluents

Table 5: Occurrence of APEO metabolites in suspended solids (expressed in ng.g^{-1}) and dissolved phase (expressed in ng.l^{-1}) in WWTP effluents of the Seine estuary obtained during 2 sampling campaigns (May 2005 and July 2006).

		WWTP1			WWTP2			WWTP3		
		C° susp. solids		C° diss. phase	C° susp. solids		C° diss. phase	C° susp. solids		C° diss. phase
		ng.g^{-1} (d.w.)	ng.l^{-1}	ng.l^{-1}	ng.g^{-1} (d.w.)	ng.l^{-1}	ng.l^{-1}	ng.g^{-1} (d.w.)	ng.l^{-1}	ng.l^{-1}
July 2006	NP1EO	14,300	1,049	1,417	1,585	27	56	2,621	24	146
	NP2EO	5,490	403	129	1,794	31	<2	2,003	18	75
	NP1EC	189	14	3,569	1,880	32	4851	<15	-	2,558
	NP	1,313	96	205	3,503	60	148	1,023	9	116
	TSS (mg.l^{-1})	73			17			9		
May 2005	NP1EO	7,107	62	238	906	9	377	2,717	40	232
	NP2EO	5,071	44	259	291	3	176	1,537	20	142
	NP1EC	5,117	44	2,166	570	6	4,171	2,904	37	1,861
	NP	6,626	57	367	508	6	627	2,796	36	369
	TSS (mg.l^{-1})	9			10			15		

d.w. dried weight; Diss. Phase: dissolved phase ($<0.7\mu\text{m}$); Susp. Solids: Suspended solids ($>0.7\mu\text{m}$); TSS: Total Suspended Solids

In the 3 screened effluents (Table 5), it can be observed that NP (508-6,626 ng.g^{-1}) and NP1EO (906-14,300 ng.g^{-1}) are the predominant metabolites which is in accordance with previous remarks. Interestingly, NP1EC is also quantified in significant proportions (maximum concentration of 5,117 ng.g^{-1}) whereas it was not detected in suspended solids of receiving waters. As suggested before, NP1EC is the most polar APEO metabolite, it differs from other APEO metabolites by its carboxylic function. The hypothesis of a punctual trapping, which does not obey the hydrophobic rule, could be advanced. In any case, the proportion of suspended solid NP1EC did not exceed 1% of the global contamination of effluents (data not shown). On the contrary, for more lipophilic compounds such as NP, NP1EO and NP2EO (Figure 5) the proportion is between 13% to 21% when the suspended solids load is low (9 mg.l^{-1}) and between 32% to 75% when the suspended solids load is high (73 mg.l^{-1}) (It can reasonably be deduce that WWTP1 were faced with a non conventional functioning period during sampling campaign of July 2006). In any case, the control of the suspended solid loads in aquatic systems is one the key points to succeed in the decrease of natural ecosystem contamination by APEO metabolites.

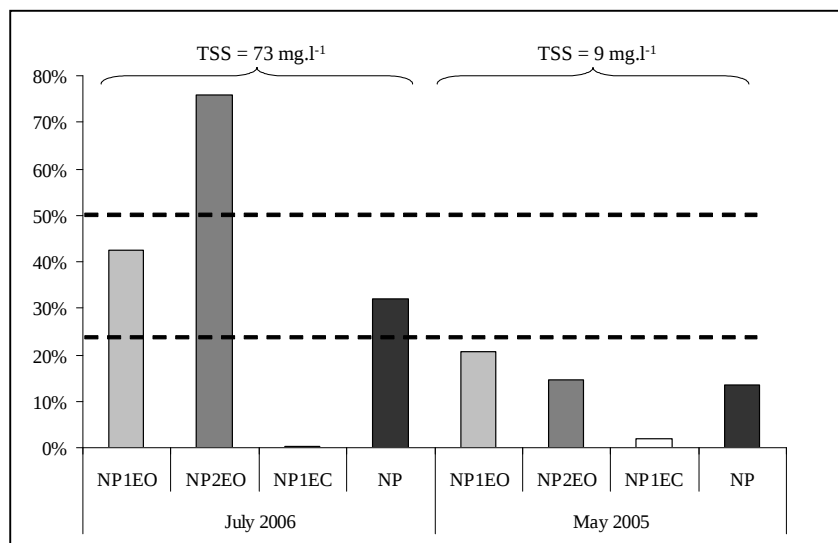


Figure 5: Part of the suspended solids in the global contamination of the effluent of WWTP1 (May 2005 and July 2006).

4-Conclusion

This paper presents a simple, easy and powerful methodology for the study of APEO metabolites in environmental solid matrix. The Seine estuary exhibits a chronic and relevant state of contamination of both dissolved and suspended solid phase by APEO metabolites. In the Seine estuary, suspended solids can represent, at worst, more than 50% of the global contamination of the water. In the Seine estuary, suspended solids act as a temporary reservoir and participate in the dissipation of APEOs toward the Seine Bay. Furthermore the fact that they participate in the reprotoxic effects (Minier et al., 2000) that occurred in the Seine hydrosystem could not be excluded.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Seine-Aval. S. Lardy-Fontan acknowledges the French Ministry of Research for a PhD grant. X.-J. Pan acknowledges the post-doctoral fellowship from the French Ministry of Research. The authors thank Dr. Henri Etcheber (University Bordeaux1) for organic carbon analysis.

References

Talmage, S.S. (1994) Environmental and human safety of major surfactants - alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates., Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.

Renner, R. (1997) European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environ. Sci. Technol.* 31, 316A-320A.

Sole, M., Lopez de Alda, M.J., Castillo, M., Porte, C., Ladegaard-Pedersen, K. and Barcelo, D. (2000) Estrogenicity Determination in Sewage Treatment Plants and Surface Waters from the Catalanian Area (NE Spain). *Environ. Sci. Technol.* 34(24), 5076-5083.

Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E. and Lester, J.N. (2008) Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*.

Servos, M.R. (1999) Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual. Res. J. Canada.* 34(1), 123-177.

Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A.F. and Viana, M.T. (2006) Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Scientific review. Applied Ecology and Environmental Research* 4(1), 1-25.

Ying, G.-G., Williams, B. and Kookana, R. (2002) Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environment International* 28(3), 215-226.

INERIS Nonylphenols.

Jonkers, N., Laane, R.W.P.M. and de Voogt, P. (2005) Sources and fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch coastal zone of the North Sea. *Marine Chemistry* 96(1-2), 115-135.

Fu, M., Li, Z. and Gao, H. (2007) Distribution characteristics of nonylphenol in Jiaozhou Bay of Qingdao and its adjacent rivers. *Chemosphere* 69(7), 1009-1016.

Chen, B., Mai, B.-X., Duan, J.-C., Luo, X.-J., Yang, Q.-S., Sheng, G.-Y. and Fu, J.-M. (2005) Concentrations of alkylphenols in sediments from the Pearl River estuary and South China Sea, South China. *Marine Pollution Bulletin* 50(9), 993-997.

Patrolecco, L., Capri, S., De Angelis, S., Pagnotta, R., Polesello, S. and Valsecchi, S. (2006) Partition of nonylphenol and related compounds among different aquatic compartments in Tiber river (central Italy). *Water, Air, and Soil Pollution* 172(1-4), 151-166.

Mayer, T., Bennie, D., Rosa, F., Rekas, G., Palabrica, V. and Schachtschneider, J. (2007) Occurrence of alkylphenolic substances in a Great Lakes coastal marsh, Cootes Paradise, ON, Canada. *Environmental Pollution* 147(3), 683-690.

Xu, J., Wang, P., Guo, W., Dong, J., Wang, L. and Dai, S. (2006) Seasonal and spatial distribution of nonylphenol in Lanzhou Reach of Yellow River in China. *Chemosphere* 65(9), 1445-1451.

Ghanem, A., Bados, P., Estaun, A.R., de Alencastro, L.F., Taibi, S., Einhorn, J. and Mougin, C. (2007) Concentrations and specific loads of glyphosate, diuron, atrazine, nonylphenol and metabolites thereof in French urban sewage sludge. *Chemosphere* 69(9), 1368-1373.

Tan, B.L.L., Hawker, D.W., Muller, J.F., Tremblay, L.A. and Chapman, H.F. (2008) Stir bar sorptive extraction and trace analysis of selected endocrine disruptors in water, biosolids and sludge samples by thermal desorption with gas chromatography-mass spectrometry. *Water Research* 42(1-2), 404-412.

Andreu, V., Ferrer, E., Rubio, J.L., Font, G. and Pico, Y. (2007) Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenol ethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in soils treated with sewage sludges. *Science of the Total Environment* 378(1-2), 124-129.

Guezennec, L., Lafite, R., Dupont, J.P., Meyer, R. and Boust, D. (1999) Hydrodynamics of suspended particulate matter in the tidal freshwater zone of a macrotidal estuary (the Seine Estuary, France). *Estuaries* 22(3 A), 717-727.

Budzinski, H., Letellier, M., Garrigues, P. and Le Menach, K. (1999) Optimisation of the microwave-assisted extraction in open cell of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils and sediments. Study of moisture effect. *Journal of Chromatography A* 837(1-2), 187-200.

Letellier, M. and Budzinski, H. (1999a) Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis* 27(3), 259-271.

Letellier, M. and Budzinski, H. (1999b) Influence of sediment grain size on the efficiency of focused microwave extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analyst* 124(1), 5-14.

Budzinski, H., Baumard, P., Papineau, A., Wise, S. and Garrigues, P. (1996) Focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic compounds from standard reference materials, sediments and biological tissues. *Polycyclic Aromatic Compounds* 9(1-4), 225-232.

Lardy-Fontan S. , P.X., Budzinski H. Determination of nonylphenol ethoxylate metabolites in river water and sewage treatment plant effluents by solid-phase extraction, high performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. submitted to *Analytical Bioanalytical Chemistry*.

John, D.M., House, W.A. and White, G.F. (2000) Environmental fate of nonylphenol ethoxylates: Differential adsorption of homologs to components of river sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(2), 293-300.

Ahel, M. and Giger, W. (1993) Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* 26(8) (1993) 1471-1478. 26(8), 1471-1478.

Ferguson, P.L., Iden, C.R. and Brownawell, B.J. (2001) Distribution and fate of neutral alkylphenol ethoxylate metabolites in a sewage-impacted urban estuary. *Environmental Science and Technology* 35(12), 2428-2435.

Sekela, M., Brewer, R., Moyle, G. and Tuominen, T. (1999) Occurrence of an environmental estrogen (4-nonylphenol) in sewage treatment plant effluent and the aquatic receiving environment, pp. 217-220.

Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A. and Takada, H. (2001) Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1041-1049.

Van Ry, D.A., Dachs, J., Gigliotti, C.L., Brunciak, P.A., Nelson, E.D. and Eisenreich, S.J. (2000) Atmospheric seasonal trends and environmental fate of alkylphenols in the lower Hudson river estuary. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2410-2417.

Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquené, G., Godefroy, D., Burgeot, T. and Leboulenger, F. (2000) Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research* 50(1-5), 373-377.

Publication n°4

Méthodologies analytiques pour l'étude des APEO et de leurs métabolites dans les matrices complexes. Une application aux stations d'épuration françaises

Sophie Lardy-Fontan⁽¹⁾, Samuel Martin-Ruel⁽²⁾, Jean-Marc Choubert⁽³⁾, Marina Coquery⁽³⁾, Hélène Budzinski⁽¹⁾

⁽¹⁾ Université Bordeaux 1, ISM-LPTC, UMR CNRS 5255, 351 Crs de la libération, 33405 Talence Cedex (France)

⁽²⁾ Cirsee, Suez Environnement, 38 rue du Président Wilson, 78230 Le Pecq, France

⁽³⁾ Cemagref, U.R. Qualité des eaux et prévention des pollutions, 3bis quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 09, France

Auteur correspondant: Hélène Budzinski

Tel.: 33 5 56 84 69 98; Fax: 33 5 56 84 69 98.

e-mail adresse: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Résumé :

Cet article présente des méthodologies puissantes pour la détermination des alkylphénols (AP), des alkylphénol-polyéthoxylés (APEO) et des acides alkylphénoxy-polyéthoxyacétiques (APEC) dans les phases dissoutes et particulaires des échantillons d'eau usagée ainsi que les boues d'épuration. Les méthodologies développées répondent à des critères de validation et montrent des taux de récupération satisfaisants (habituellement supérieurs à 80%), une bonne répétabilité et reproductibilité intra-laboratoire (RSD < 20%). Des effets de matrice significatifs sont mis en évidence dans les matrices les plus complexes; ce qui met en évidence la nécessité de leur évaluation pour conduire des analyses quantitatives fiables. La méthodologie développée a été appliquée avec succès à l'étude des stations d'épuration françaises. L'ensemble des échantillons étudiés montre une contamination significative par les métabolites d'APEO. Bien que l'efficacité des stations d'épuration pour abattre les AP et les APEO soit clairement démontrée; des apports significatifs de 4-NP, de 4-NP1-2EO et de 4-NP1EC se produisent par l'intermédiaire de la phase dissoute (centaines de ng.l⁻¹ à quelques µg.l⁻¹), des phases solides en suspension (dizaines de ng.g⁻¹ à la dizaine de µg.g⁻¹) et des boues d'épuration (jusqu'au mg.kg⁻¹). Les tendances observées démontrent que les restrictions d'usages et de marketing entrées en application en 2005 ne sont pas encore entièrement accomplies, en France.

Pour soumission à Water Research

**Analytical methodologies for the study of APEOs and their metabolites in complex matrices.
An application to French Wastewater Treatment Plants**

Sophie Lardy-Fontan⁽¹⁾, Samuel Martin-Ruel⁽²⁾, Jean-Marc Choubert⁽³⁾, Marina Coquery⁽³⁾, Hélène Budzinski⁽¹⁾

⁽¹⁾ Université Bordeaux 1, ISM-LPTC, UMR CNRS 5255, 351 Crs de la libération, 33405 Talence Cedex (France)

⁽²⁾ Cirsee, Suez Environnement, 38 rue du Président Wilson, 78230 Le Pecq, France

⁽³⁾ Cemagref, U.R. Qualité des eaux et prévention des pollutions, 3bis quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 09, France

Corresponding author:

Hélène Budzinski: Tel.: 33 5 56 84 69 98; Fax: 33 5 56 84 69 98.

e-mail address: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Abstract

This paper presents methodologies for the determination of alkylphenols (APs), alkylphenol polyethoxylates (APEOs) and alkylphenoxy polyethoxyacetic acids (APECs) in the dissolved and particulate phases of wastewater samples as well as sludge. The overall methodologies answer validation criteria and display satisfactory recovery rates (usually higher than 80%), repeatability and within-laboratory reproducibility (RSD<20%). Significant matrix effects are encountered in highly complex matrices; highlighting the fact that their estimation is prevalent to conduct reliable quantitative analysis. The developed methodology was successfully applied to the survey of French WWTPs. All the investigated samples display significant contamination by APEO metabolites. Although the efficiency of investigated sewage to remove APs and APEOs is clearly demonstrated; significant loads of 4-NP, 4-NP1-2EO and 4-NP1EC occur *via* the dissolved phase (hundreds of ng.l⁻¹ to a few µg.l⁻¹), the suspended solids (tens of ng.g⁻¹ to tens of µg.g⁻¹) and the sludge (up to mg.kg⁻¹). The trends demonstrate that the restrictions of uses and marketing implemented as from 2005 are not yet fully achieved, in France.

1-Introduction

Alkylphenol-polyethoxylates (APEOs) are non ionic surfactants widely used for their properties as emulsifiants, wetting agents, adjuvants (Renner, 1997); nonylphenol production is estimated to reach 154,200 tons in the USA, 73,500 tons in Europe (Review by Soares et al., 2008). 80% of the production are nonylphenol-polyethoxylates (NPEOs), 20% are octylphenol-polyethoxylates (OPEOs). Commercial mixtures are highly complex mixtures of ethoxymers, oligomers and isomers used in agricultural applications, industrial and institutional applications

(textile industry, tanneries, chemical industry, food industry, steam industry; Terzic et al., 2008) and domestic applications (Renner, 1997). Since the first research works by Ahel and Giger (1994) who studied the fate and occurrence of APEOs in wastewater treatment plants and receiving waters, APEOs are known for their extensive biodegradation properties (review by Soares et al., 2008). Through complex degradation ways, it leads to the formation of numerous metabolites of degradation: shorter chain ethoxy APEOs under anaerobic conditions, shorter chain alkylphenoxyacetic acids (APECs) and carboxyalkylphenoxyacetic acids (CAPECs) under aerobic degradation; under both conditions the ultimate biodegradation products are alkylphenols (APs) (e.g., nonylphenol NP; octylphenol OP). Their main environmental concern lies on the fact that biodegradation phenomena lead to the formation of ubiquitous, lipophilic, persistent and toxic compounds (reviews by Vazquez-Duhalt et al., 2006; Soares et al., 2008). Consequently, they have been included in the Water Framework Directive priority substances and some environmental quality standards (EQS) have been suggested: $0.3 \mu\text{g.l}^{-1}$ for NP in surface waters, $0.1 \mu\text{g.l}^{-1}$ for OP in river waters ($0.01 \mu\text{g.l}^{-1}$ for OP in marine waters). More than 60% of APEOs and their metabolites are estimated to be released into aquatic systems (Renner, 1997); WWTPs are the main entrance. Consequently, the control of their occurrence in the environment relies on both control of their production and use (implemented in Europe since 2003) and the efficiency of WWTP processes to remove them. Numerous research works have investigated the fate and occurrence of APEOs and have been reviewed by Teske and Arnold (2008).

20 years of environmental research has led to the development of numerous analytical methodologies. Solid phase extraction (SPE) has become the most conventional extraction technique for liquid samples; numerous extraction techniques from ultrasonication to accelerated solvent extraction (ASE) are still used for solid samples. Mass spectrometry (single or tandem MS) has become the conventional detector coupled with either gas chromatography or liquid chromatography. State of the art, failures and future needs for their analysis in complex environmental matrices have been recently reviewed (Lardy-Fontan et al., submitted).

This study aims to develop and to improve an analytical method to detect and to quantify five of the most persistent APEOs metabolites in sewage matrices. The strong axis of this research is the consideration of both dissolved and suspended solid phases as well as sludge. The overall method was successfully applied to study 7 French biological wastewater treatment plants, which are of particular interest due to their relatively common use. The measured concentrations allowed to determine the average efficiency of French WWTPs faced with APEOs.

2-Material and methods

2-1-Quantification standards

Unlabeled p-n-nonylphenol (98%+, p-n-NP), p-n-nonylphenol monoethoxylate (95%+, p-n-NP₁EO), nonylphenoxyacetic acid (ring chain isomers) (98%+, 4-NP₁EC) were purchased from Promochem (Molsheim, France) (100 µg.ml⁻¹ in nonane, respectively). 4-nonylphenol (100%, 4-NP, technical), 4-nonylphenol-monoethoxylate (99.5%, 4-NP₁EO) and 4-nonylphenol-diethoxylate (99.5%, 4-NP₂EO) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The spiked solutions were prepared in methanol at concentrations of 1 µg.ml⁻¹ of each compound.

2-2-Reagents and chemicals

Methanol (MeOH) was used for the analysis of pesticide residues and was purchased from Merck (VWR international, Strasbourg, France). Dichloromethane (DCM) was used for organic residue analysis and came from J.T.Baker; water used for LC/MS analysis was from JT Baker (Atlantic Labo, Bruges, France). All the above solvents were used without further purification. Water used for solid phase extraction was Evian[®] water in glass bottles (France Boisson, France). Hydrochloric acid (37%) was purchased from VWR international (Strasbourg, France). Ammonium acetate (minimum purity 98%) was purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France); trifluoroacetic acid (ACS, minimum purity 99%) was purchased from Acros (Noisy le grand, France). All the chemicals were tested for background levels for the compounds of interest.

Due to the ubiquitous occurrence of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates (in plastic materials and detergents), glassware was chosen to avoid contamination of the sample. Furthermore, all the glassware and sampling apparatus required special treatment prior to use. All the glassware was washed and then heated at 450°C for 6 hours prior to use. Whatman GF/F glass fibre filters (pore size 0.7 µm) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France) and were also heated at 450°C for 6 hours prior to use. 200 mg Bondelut[®] C18 cartridges and 500 mg HF-Bondelut[®] PSA were purchased from Varian (Courtabœuf, France).

2-3-Sample collection

In order to representative fluxes of micropollutants received and released, 24 hours flow proportional composite samples were collected thanks to refrigerated automatic samplers (Bühler 5010) equipped with glass containers to prevent from degradation. Daily average composite samples were then stored in coolers (4°C) and shipped to the laboratory in 24 hours. Samples were immediately filtered through glass microfiber filters: highly complex samples (influent) followed a sequential filtration on GF/A (1.6 µm) then GF/F (0.7 µm) filters; effluents followed a single filtration step on GF/F filters. Filters from each sample were pooled and stored at -20°C until freeze-drying.

Flow proportional composite samples of sludge were reconstituted, stored in coolers (4°C) and carried to the laboratory in 24 hours. Solid sludge was homogenized and divided before being

stored at -20°C until freeze-drying. 500 ml liquid sludge samples were manually homogenized and divided before being centrifuged (2*15 min; 3000 rpm); solids were pooled in an aluminium container and stored at -20°C until freeze-drying.

Sampling collections were carried out under dry-weather conditions only onto, 7 WWTPs chosen in the overall territories. These facilities were representative of the French panel of activate sludge WWTPs that is the most widely used process for biological treatment. They are presented in Table 1.

Table 1: Presentation of the 7 investigated WWTPs

	Sampling	PE.	Water treatment steps	Sludge treatment stages	Type of receiving wastewaters
CA-1	05/02-08/02	2,900	AS (C,N)+ dec	Reed bed	Industrial: no; Domestic yes; Hospitals: yes
SE-1	26/02-01/03	36,000	AS (C,N,P)	Centrifugation+polymers	Industrial: yes, a few; Domestic: yes; Hospitals: no
CA-2	19/03-22/03	13, 000	AS (C,N)+dec	Reed bed	Industrial: no; Domestic: yes; Hospitals: no
SE-2	24/04-26/04	250, 000	I ^{ary} dec., AS(C,N,P)+ rapid decantation	Anaerobic digestion + centrifugation+ liming	Industrial: yes, (leachates, food industry); Domestic: yes; Hospitals: yes
CA-3	21/05-24/05	700,000	Iary settl..., AS (C)+ biofilters (N) (15%)	Centrifugation+ polymers	Industrial: yes (chemical industry); Domestic: yes; Hospitals: yes
SE-3	11/06-14/06	50,000	AS (C,N,P)	Centrifugation +thermal drying	Industrial: yes,(chemical industry); Domestic: yes; Hospitals: yes
SE-4	10/09-13/09	110,000	AS (C,N)	Centrifugation+ polymers	Industrial: yes, a few; Domestic: yes; Hospitals: no

PE : population equivalent; AS(C,N,P): Activated sludge; treatment of carbon, nitrogen, phosphorus; AS (C,N) : Activated sludge, treatment carbon, nitrogen; Iary settl...: Primary Settling tank.

2-4-Dissolved phase analytical treatment

Disposable 3 ml cartridges (BondElut® C18, 200 mg, Varian) were activated first with 5 ml of methanol and then conditioned with 5 ml of Evian® water (adjusted to pH 2). Water samples (acidified to pH 2 with hydrochloric acid), 300 ml to 500 ml, were loaded at a flow rate of 8-10 ml.min⁻¹ under vacuum. After preconcentration, 2 ml of pH 2 Evian® water were passed through the sorbent followed by a mixture of Evian® water (pH 2)/ MeOH (50/50; v/v) to elute impurities in water samples which cannot be adsorbed by the sorbent. The cartridges were then completely dried under vacuum (about 50 min) to avoid hydrolysis using a SUPELCO (VISIPREP™) SPE apparatus connected to a vacuum system set at -10 psig. After drying, the SPE cartridges were eluted with a 5 ml mixture of MeOH/DCM (1/1; v/v). The eluates were evaporated with a gentle stream of nitrogen and reconstituted in 2 ml mixture MeOH/DCM (80/20; v/v) (Pan et al., submitted).

Disposable 3 ml cartridges (HF-BondElut® PSA, 500 mg, Varian) were activated and conditioned with 5 ml of MeOH followed by a 5 ml mixture of MeOH/DCM (80/20; v/v). The extracts

were loaded to the cartridge and elution was achieved with 6 ml of a mixture of MeOH/DCM (80/20; v/v) followed by a 6 ml mixture of MeOH/DCM/TFA (79/19/2; v/v/v). The eluates were evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen and reconstituted in 200 µl methanol (Lardy-Fontan et al., submitted).

2-5-Solid phase analytical treatment

The suspended solids and sludge samples were freeze-dried (RP2V, CIRP, Argenteuil, France) before focused microwave-assisted extraction (MAE) at atmospheric pressure (Soxwave 100 apparatus, Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France). The freeze-dried solids (SPM; sludge: 0.1 g), were extracted using focused microwave-assisted extraction with a MeOH/DCM mixture (3/1; v/v). After being filtrated on glass cotton, the extracts were evaporated under vacuum (600 mbars, 80°C) with an automatic reconcentrator (RapidVap, Bioblock, Fontenay-sous-Bois, France) to remove the solvent and then 60 ml of Evian® water (pH 2) were added to undergo the 2 step SPE purification methodology (as exposed in previous section) (Lardy-Fontan et al., submitted).

2-6-Liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) analysis

The HPLC system consisted of an Agilent Technologies 1100 series (Massy, France). The HPLC separation was achieved on a 3.5 µm, 150× 2.1 mm i.d. C18 reversed-phase column (Zorbax-SB, Agilent, Massy, France) and the same kind of guard column. Detection was carried out using an Agilent MSD mass selective detector (G1946 VL) equipped with an electrospray interface. 4-NP, 4-t-OP, 4-NP1EC and p-n-NP were detected under negative ionization (NI) conditions as [M-H]⁻; 4-NP₁EO, 4-NP₂EO and p-n-NP1EO were detected under positive ionization (PI) conditions as [M+NH₄]⁺ and [M+Na]⁺ (Pan et al., submitted to ABC). Quantification was performed by internal calibration. 4-NP1EC, 4-t-OP and 4-NP were quantified using p-n-NP as internal standard, 4-NP1EO and 4-NP2EO were quantified using p-n-NP1EO as internal standard.

2-7-Quality Assurance/Quality Control

2-7-1 Sampling apparatus integrity

In order to prevent cross contaminations, all sampling apparatus were tested for their background levels of compounds of interest. Evian® water was passed through the system after its use. Quantification of both Evian® water and sample was carried out before and after their flow through the apparatus. Compounds of interests were quantified in Evian® water in non significant proportion (<10⁻³ for 4-NP1EC to tens ng.l⁻¹ for 4-NP), after its flow through the sampling apparatus. Consequently, the integrity of the samples was achieved and sampling schemes and procedures were validated.

2-7-2 Evaluation of the conservation of samples from sampling to extraction

Before undertaking sampling campaigns, tests of conservation were carried out in the laboratory. In the context of this research work, the filtration of the samples could not be achieved immediately after the sampling. Although previous validation works (Lardy-Fontan S., submitted) have highlighted the fact that the filtration of the sample significantly reduced the degradation phenomena, this parameter was not tested in this case. Unfiltered waters from WWTPs were sampled, 2 conservative agents were tested: 1% of methanol and 1% formaldehyde. Each sample, stored at 4°C in an amber glass bottle, was characterized (qualification and quantification) at T0, T0+2 days and T0+7 days after sampling, following the protocol presented previously. The results highlight the fact that the integrity of the sample is rapidly altered by degradation phenomena, even 2 days after sampling time (IS 1). It can affect both the distribution of the compounds and their abundance. The use of preservatives (methanol or formaldehyde) did not succeed in controlling the phenomenon. Consequently, all the analytical procedure took place in the first 48 hours following the sampling.

2-7-3 Validation of recoveries

Recovery means the percentage of the true concentration of a substance recovered during the analytical procedure. It is determined during validation, if no certified reference material is available. As no certified reference material (CRM) exists for APEOs or their metabolites, the evaluation of the efficiency of extraction in real samples is hard to achieve. Faced with the ubiquity of APEOs and their metabolites, it appeared that the fortifying of natural samples with analytes of interest, at realistic environmental concentrations, might generate erroneous data. As a consequence, it was decided to create artificial complex matrices which were fortified with a mixture of the compounds of interest.

In order to mimic domestic effluent and influent, Viandox[®] which is a sort of “gravy” of synthesis, made up mainly of sugar and proteins was chosen. It is a substrate whose degradation is close to that of domestic water (Tusseau-Vuillemin et al., 2002; Gourlay et al., 2005). 2 sets of samples were prepared: one liter of Evian[®] water was supplemented with 1 ml of Viandox[®] and fortified with 1 ml of a mixture of APEOs at a concentration of 5 µg.ml⁻¹ (for each compound) to mimic influent water. One liter of Evian[®] water was supplemented with 0.2 ml of Viandox[®] and fortified with 1 ml of a mixture of APEOs at a concentration of 5 µg.ml⁻¹ (for each compound) to mimic effluent water. In order to mimic natural surface waters, 10 mg of Aldrich humic acid were added to 1 liter of Evian[®] water which was supplemented with 0.1 ml of a mixture of APEOs at a concentration of 2 µg.ml⁻¹ (for each compound). The samples were stored at 4°C for 20 hours, in order to equilibrate. They were then acidified and internal standards were added before the samples to be extracted (in triplicates).

For solid samples, a natural sediment sample which was previously tested for a low content in APEOs was chosen. 1 g of sediment was supplemented in order to obtain a final concentration of 100 ng.g⁻¹ and 10 µg.g⁻¹. The fortified samples were stored for 20 hours at -20°C to equilibrate. 0.1 g of each matrix was analyzed in triplicates following the previously described methodology.

2-7-4 Evaluation of matrix effects

Matrix effects are the weak point of LC-ESI-MS, especially LC-ESI-MS-MS (Taylor, 2005). They occur when molecules co-elute with the compounds of interest and affect the ionization efficiency of the electrospray interface resulting in signal enhancement and/or ion suppression. When occurring, matrix effects affect both the precision and accuracy of the method; ion suppression, for its part, leads to a decrease in sensitivity and higher limits of quantification (Taylor, 2005). By looking at the bibliography, it appears that investigations to assess matrix effects are usually absent from the validation criteria because they are time consuming and difficult to implement (see Review Lardy-Fontan and Budzinski, submitted).

Three sets of samples were prepared in order to evaluate matrix effects on surface waters (SW) and wastewaters (influent (INF) and effluent (EFF)). The samples were extracted on C18 and were divided into 2 sub-samples. One of them underwent the purification step on HF-PSA; the second one was evaporated under a nitrogen stream. All the extracts have been supplemented, prior to injection, with a mixture of compounds of interest (a mixture of internal standards and compounds to quantify). In parallel, a pure methanol extract had been supplemented with the same quantity of compounds. The evaluation of matrix effects relies on the comparison of abundances measured in pure methanolic extracts and sample methanolic extracts.

3-Results and discussion

3-1-Method performance

Performance characteristic means the functional quality that can be attributed to an analytical method. This may be for instance, accuracy, repeatability, reproducibility, recovery, detection capability and ruggedness (Decision 2002/657/EC).

3-1-1 Trueness-Extraction efficiency

Figure 1 shows the average recovery rates (calculated by internal calibration) obtained with the global analytical methodology applied to the 4 types of tested liquid matrices. Except for the 4-NP1EC which shows a rate of recovery of 50% in the matrix mimicking surface water samples, the other studied molecules present average recovery rates from 80% to 130% depending on the

compound. Figure 2 presents the average recovery rates obtained with the global analytical methodology applied to the 3 types of solid matrices tested. Except for the 4-NP1EC which shows a rate of recovery of 50% in the sediment supplemented at 1 $\mu\text{g.g}^{-1}$, all the other studied molecules present rates of recovery from 60% to 130% depending on the compound.

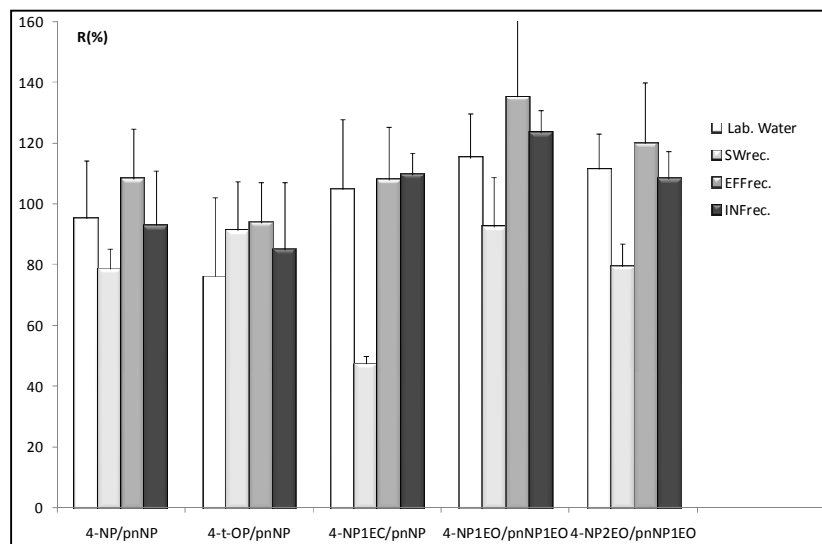


Figure 1: Validation of the dissolved phase methodology.

Lab water: laboratory water (Evian® water); average recovery of the global protocol (extraction + purification) (n=28, 7 months)

SW rec.: water supplemented with 10 mg.l^{-1} of humic acid, average recovery of the global protocol (extraction + purification) (n=3),

Effrec.: water supplemented with 2 mg.l^{-1} of Viadox, average recovery of the global protocol (extraction + purification) (n=3),

Infrec.: water supplemented with 10 mg.l^{-1} of Viadox, average recovery of the global protocol (extraction + purification) (n=3).

Horizontal axis presents the compound to be quantified and the standard compound used as internal standard (e.g. 4-NP quantified by internal standard p-n-NP).

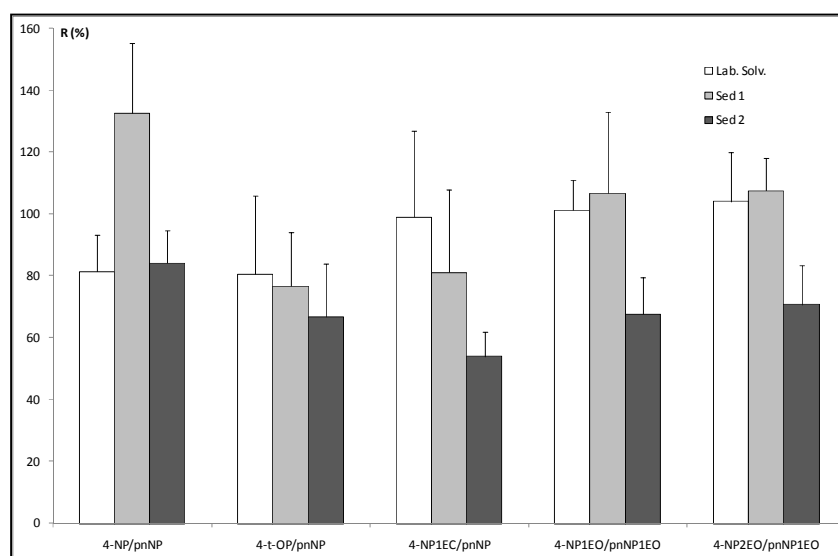


Figure 2: Validation of the solid phase methodology.

Lab. solv: organic solvent supplemented, average recovery of the global protocol (n=4, independents),

Sed 1: sediment supplemented at 100 ng.g^{-1} , average recovery of the global protocol ($n=3$),
Sed 2: sediment supplemented at $1 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$, average recovery of the global protocol ($n=3$),
Horizontal axis presents the compound to be quantified and the standard compound used as internal standard (e.g. 4-NP quantified by internal standard p-n-NP).

3-1-2 Repeatability and within-laboratory reproducibility

Repeatability conditions mean conditions under which independent test results are obtained with the same method on identical test items in the same laboratory by the same operator using the same equipment. Within-laboratory reproducibility means the precision obtained in the same laboratory under stipulated (predetermined) conditions (concerning *e.g.* method, test materials, operators and environment) over justified long time intervals (Decision 2002/657/EC).

Both methodologies (MAE+2 step SPE for solid samples; 2 step SPE for aqueous samples) show good recoveries and low relative standard deviation for all the analytes; average recoveries ranged from $76 \pm 26\%$ to $115 \pm 14\%$ for aqueous methodology, from $68 \pm 8\%$ to $104 \pm 18\%$ for solid phase methodology (Figure 1 and Figure 2). Consequently, the applied methodologies show good repeatability and within-laboratory reproducibility.

3-1-3 Ruggedness

Ruggedness means the susceptibility of an analytical method to changes in experimental conditions which can be expressed as a list of the sample materials, analytes, storage conditions, environmental and/or sample preparation conditions under which the method can be applied as presented or with specified minor modifications (Decision 2002/657/EC).

a) Laboratory Blank

APs are ubiquitous contaminants of the environment and consequently of a laboratory. As previously reported, they can be found in plastics and detergents which can enter in contact with analytical materials (solvents, SPE material, etc...). As highlighted by Loos et al. (2008) in their report on the first inter-calibration study for the analysis of NP and OP in river water, blanks can significantly affect the ability of a laboratory to quantify APs in natural samples. Furthermore, one can observe that mentions concerning such control in quality control and assurance are generally absent from published works.

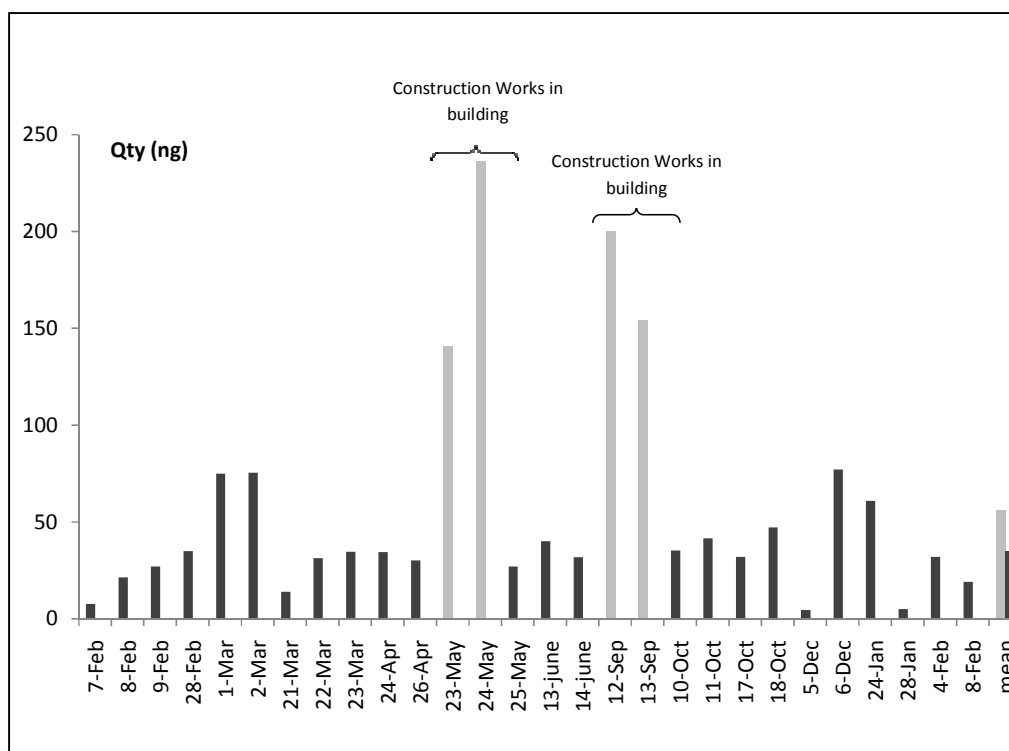


Figure 3: One year survey of protocol blank. Quantity of 4-NP expressed in ng (n=28; 2 operators).
 Clear barrel: mean of 28 values of blank
 Dark barrel: mean without contaminated blank (23, 24 may; 12-13 September)

Figure 3 presents a one year survey of 4-NP blank contamination (global protocol, 2 step SPE, 28 analyses, 2 operators). Some variations are observed in the laboratory background level in 4-NP whose average value of 34 ng is compatible with the analysis of 4-NP in WWTP samples. Nevertheless, it also suggests that some specific contamination could have occurred and were linked with building remediation; consequently the addition of no less than one blank to each extraction series should be recommended to achieve sufficient quality control and quality assurance.

b) Matrix effects

Table 2 presents the matrix effects for the 3 sets of investigated waters: surface water (SW), effluent (EFF) and influent (INF). The principle is to compare the differences of response between a post extraction extract fortified with analytes of interest (A) and a pure solution of solvent fortified with the same quantity of analytes (B). The ratio $((A-B)/B)*100$ provides the percentage of ion suppression for each analyte of interest under chromatographic conditions.

Table 2: Evaluation of matrix effects under LC-ESI-MS conditions

	Surface water		Effluent		Influent	
	SPE C18+HF-PSA	SPE C18	SPE C18+HF-PSA	SPE C18	SPE C18+HF-PSA	SPE C18
4-NP	-18%	38%	29%	39%	36%	54%
4-t-OP	7%	39%	-8%	17%	20%	46%
4-NP1EC	9%	69%	39%	22%	42%	I
p-n-NP	6%	55%	45%	42%	56%	62%
4-NP1EO	4%	9%	24%	16%	96%	78%
4-NP2EO	21%	23%	38%	32%	79%	78%
p-n-NP1EO	7%	10%	12%	12%	34%	29%

Table 2 presents the measured matrix effects for the 3 studied matrices (river water, influent and effluent) and for the 2 tested conditions (with or without HF-PSA purification). The observations highlight a positive effect of the implementation of the HF-PSA purification step. This is illustrated by Figure 4. In fact, it leads to an improvement of the selectivity especially in the case of highly complex matrices (e.g., raw waters) with the reduction of matrix interferences (Figure 4a and 4b present the chromatographic profiles of a WWTP influent extract with and without the stage of purification and clearly demonstrate the reduction of interferences especially with 4-NP1EC). Furthermore, it leads to a decrease in ion suppression and consequently to an increase of the sensitivity (Figure 4c presents the chromatographic profiles of a river water extract with and without the HF-PSA purification, it shows an increase of abundance of almost 50% for all the molecules when the purification step is conducted). The matrix phenomena appear to be correlated with the matrix load of the sample (INF > EFF > SW, as highlighted by Table 2). In the negative mode of ionization, the phenomena seem to affect all the compounds in a homogeneous way (standards of quantification as well as compounds to be quantified). The quantification by internal calibration appears to be effective to control this effect and allows the production of reliable quantitative data. In the positive mode of ionization, the phenomenon affects the standards of quantification and the compounds to be quantified in a homogeneous way in the river water extracts and in the effluent extracts. Nevertheless, an important phenomenon of signal suppression is observed for the 4-NP1EO and the 4-NP2EO in raw waters extracts. The hypothesis of a competition for ionization between all the NPEOs which are abundant in untreated water, since the commercial mixtures are made up of them, can be advanced. Indeed, in reversed phase liquid chromatography, the molecules are separated by their hydrophobic character; it leads to the non separation of the NPEOs. The strong degradation that these molecules undergo during the WWTP processes may explain why these phenomena are stronger in raw water extracts by comparison with final effluent extracts. The assumption of an interaction between the NPEOs and the organic matter having the potential to be strongly degraded during the treatment of raw water cannot however be isolated. Few are the studies which have evaluated the matrix effects because as said by Loos et al. (2007) "It is too difficult". Nevertheless, these results clearly demonstrate the need to evaluate the matrix effects for all the molecules. Even if the implementation of internal standards

succeeds in controlling them (as recommended by Lee Ferguson et al., 2000; Jahnke et al., 2004); it may not be sufficient in some highly complex matrices. The implementation of a standard addition methodology, despite being time consuming and expensive, appears to be a suitable way to overpass matrix effects (Baugros et al., 2008).

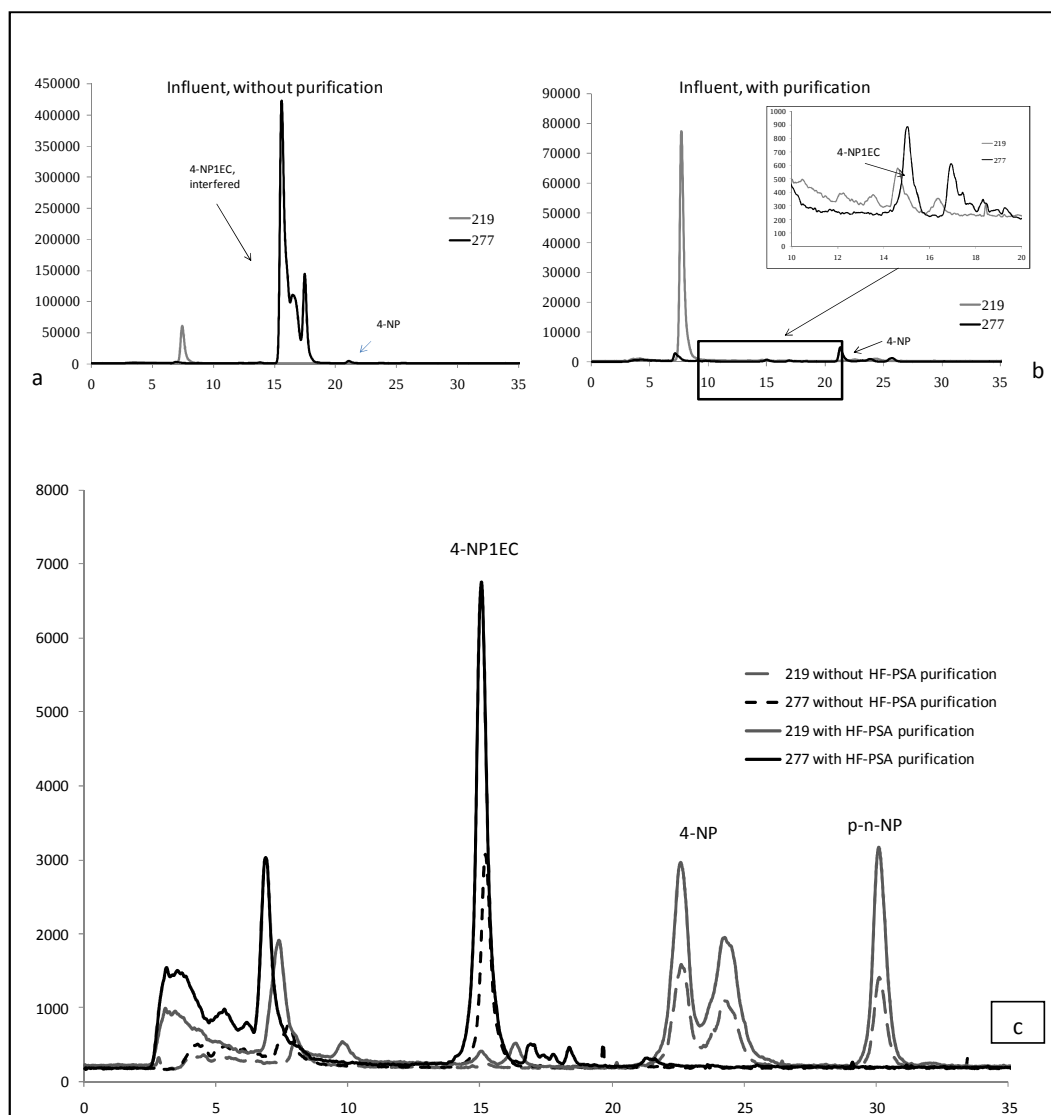


Figure 4: Positive effect of the implementation of the HF-PSA purification step.
a) and b) influents chromatograms in negative mode ionization, with or without the HF-PSA[®] purification step,
c) Chromatograms of a surface water extracts with or without the HF-PSA[®] purification step.

3-2-Occurrence of APEOs in WWTPs

3-2-1 Occurrence in influents (raw water)

Table 3: Occurrence of APEO metabolites in the dissolved phase of the 7 investigated WWTPs.

Influent				Effluent			
C° $\mu\text{g.l}^{-1}$	Min	Max	Mean	C° $\mu\text{g.l}^{-1}$	Min	Max	Mean
4-NP	0.68	15.78	6.89	4-NP	0.05	1.97	0.34
4-t-OP	<LOD	16.06	2.20	4-t-OP	<LOD	0.48	0.11
4-NP1EO	0.29	12.72	1.98	4-NP1EO	0.04	0.22	0.14
4-NP2EO	0.14	2.32	0.57	4-NP2EO	0.06	0.14	0.10
4-NP1EC	<LOD	10.10	1.64	4-NP1EC	0.27	5.31	1.85

Concentrations are expressed in $\mu\text{g.l}^{-1}$ ($<0.7\mu\text{m}$)

The 7 investigated WWTPs highlight a chronic state of contamination of their influents by APEO metabolites (Table 3). Influent contamination is dominated by 4-NP and 4-NP1EO and confirmed litterature review (Martin-Ruel *et al.*, 2008); 4-t-OP and 4-NP1EC are usually not detected (despite a LOD of ng.l^{-1}). The distribution appears to be consistent with the uses of alkylphenolic compounds: 80% of NPEOs and 20% of OPEOs (Renner, 1997). Huge inter-day variability is observed depending on the compound and the WWTP and can reach 90% in some cases. It seems to be correlated with the type of WWTPs: the more the WWTP treats industrial wastes the higher the variability. Furthermore, an important variability of the contributions among WWTPs is observed. The average concentrations in the dissolved phase vary from 0.68 to 15.78 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-NP, from 0.29 to 12.72 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-NP1EO. The influents of WWTPs SE-1, SE-2 and SE-3 appear to be significantly more contaminated than those of WWTPs CA-1, CA-2, CA-3 and SE-4. Although SE-1 is situated in a peri-urban area, its wastewater contains the effluents of a refinery, the processes of which implement the use of APEOs (Boitsov *et al.*, 2004; Boitsov *et al.*, 2007). SE-2 and SE-3, for their part, treat a lot of industrial wastes which use APEOs (numerous industries from various sectors: agro-alimentary, chemical industry, contributions of leachates). CA-1 and CA-2 are smaller WWTPs located in rural areas and treat domestic wastewater exclusively; CA-3 and SE-4 although being situated in highly urbanized areas, to which a diffuse industrial fabric is associated, treat mainly domestic water and some industrial wastes. These results are in accordance with those published by the national research action for the reduction of the loads of dangerous substances in water by classified installations (RSDE, 2007). They have reported occurrence of APs in effluents from different French sectors of activity: 45% in treatment and storage of waste, 56% for petroleum industries, 35% for hospitals, 30% for tanneries, 48% for mechanical work of metals. To summarize, it appears that, in France, the domestic and institutional uses are responsible for a chronic contribution of APEOs to the WWTPs; the dominant and discriminating component appears to be the industrial use. These results highlight the fact that, in France, the uses of APEOs in industrial, institutional and domestic applications seem

to be common although a restriction of uses and marketing has come into force since January 17, 2005; the steps of substitution of these products seem to be still under way.

3-2-2 Occurrence in final effluents (treated water)

The 7 investigated WWTPs highlight a chronic state of contamination of their effluents by APEO metabolites (Table 3). The distribution of compounds is drastically different from the one observed for influents. In fact, effluents are dominated by 4-NP1EC, 4-NP and 4-NP1EO. 4-t-OP is usually not detected. Contrary to influents, inter-day variations are of less lower magnitude in effluents; due to 24 hour hydraulic retention time and to the removal efficiency of the plant. Moreover, effluent fluctuations in terms of abundance appear to be more homogenous with the exception of 4-NP1EC. Measured concentrations vary from 0.27 to 5.31 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-NP1EC, from 0.05 to 1.97 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-NP, from 0.04 to 0.22 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-NP1EO and from 0.06 to 0.14 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-NP2EO and seem to be clearly influenced by the type of process and efficiency in the removal of APEOs. It appears there is a shift in the distribution of oligomers due to the cleavage of their ethoxy units and carboxylation through the biological treatment process in relation with extensive biodegradation phenomena. These data are in agreement with those reported in other European countries. In some Spanish WWTP effluents, Cespedes et al. (2008) measured concentrations from 0.33 to 2.07 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-NP, from 0.13 to 0.33 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-t-OP. Similarly, Loos et al. (2007) reported concentrations from 0.26 to 0.73 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-NP, 0.23 to 4.5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-NP1EC in some Belgian and Italian WWTP effluents. The only exception was the comparison with the observed trends in German WWTP effluents which displays a significant decrease in their concentrations ($< \text{lod}$ to 0.011 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-NP, $< \text{lod}$ -0.333 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-t-OP) as reported by Quednow and Puttmann (2008). They concluded that it was a consequence of the ban on the use of the compounds.

3-3-Role played by suspended solids

One of the strong axis of these research tasks was the consideration of suspended solids and the evaluation of their role in the contamination of the aqueous phases. Concerning the metabolites of APEOs, the observations highlight values of contamination ranging from tens of ng.g^{-1} and a few tens of $\mu\text{g.g}^{-1}$, in both raw and treated waters, depending on the metabolite. 4-NP and 4-NP1EO are the prevalent metabolites in suspended solids which is consistent with their hydrophobic character (log Kow 4.1 for 4-NP1EO and 4.5 for 4-NP). Usually, a reduction in the contamination of the suspended solid phase is observed along the treatment process.

In raw waters, the contribution of suspended solids in the contamination to the aqueous phase can reach 20 to 80% of the contaminant load depending on the metabolite and the site. In treated water their share is extremely variable: lower than 10% for the 4-NP1EC which is the most polar metabolite, but it can reach 90% for 4-NP (a hydrophobic compound) in the case of CA-1 or SE-1

(Figures 5a and 5b). Few are the studies which have considered suspended solids in WWTP processes. Recently, Koh et al. (2008) reported the relevance of the sorption of some alkylphenolic compounds to suspended solids in WWTP samples (68% for 4-NP; 50% for 4-t-OP).

3-4-Fate and removal of APEOs in the process

3-4-1 Fate in the process

Figure 5 presents the trends of measured concentrations in both phases (suspended solids and dissolved phase) in 4 of the investigated WWTPs. Figure 5c presents 2 day average measured concentrations in the influent, primary settling tank effluent and final effluent in the WWTP-SE2. The results highlight a decrease in the contamination of APEO metabolites in relation with the primary decantation process: corresponding to the removal of suspended solids, a removal of 64% for 4-NP, and of 36% for 4-NP1EO is observed. In the dissolved phase, removal of 59% for 4-NP is measured confirming the efficiency of this process to remove APEOs (Teske and Arnold, 2008; Martin-Ruel et al., 2008). The main center of the removal is the activated sludge in which both biodegradation and sorption phenomena occur (as previously shown, a significant decrease in the contamination of both liquid and solids phases occur (in the aqueous phase removal of 96% for 4-NP and 96% for 4-NP1EO in WWTP SE-2; -82% for 4-NP1EC and 55% for 4-NP in WWTP CA-3) (Teske and Arnold, 2008). Additional treatment steps provide a higher quality of the final effluents (reduction of the suspended solids concentration for phosphorus removal, biological nitrogen removal) into the natural environment. As highlighted by figure 5c-d, the implementation of a complementary of biofiltration for nitrogen removal leads to an improvement of removal of APEOs and metabolites by almost 50%, in this case study.

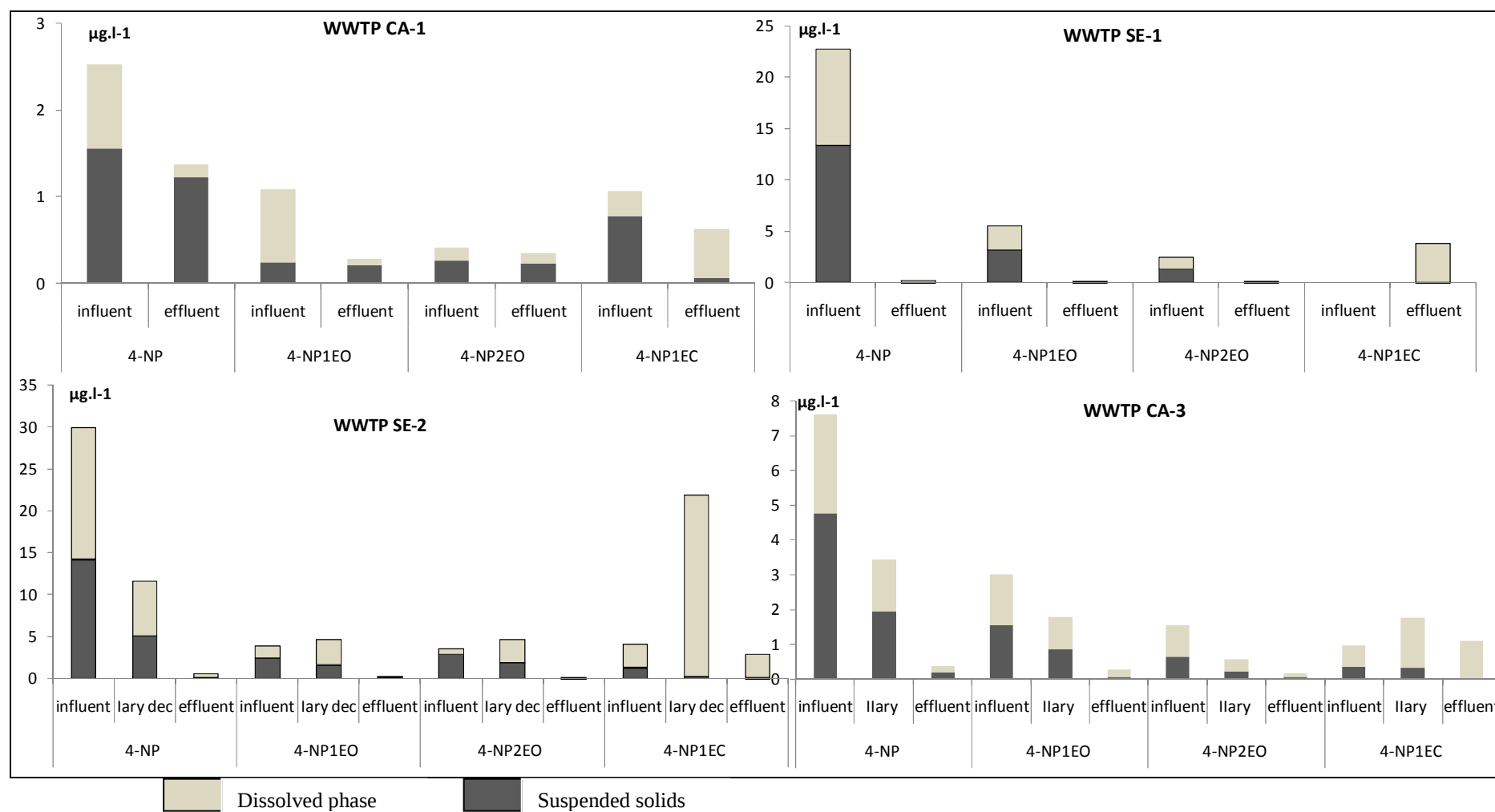


Figure 5: Fate and occurrence of APEO metabolites in WWTPs. Part of each phase (Dissolved/solid phases) in the global contamination.

3-4-2 Efficiency of AS process

Table 4: Efficiency of WWTP processes for the removal of APEOs and their metabolites

<i>R</i> (%)	Dissolved phase	Solid phase	Aqueous phase
4-NP	88 ± 12%	80 ± 30%	83 ± 20%
4-NP1EO	87 ± 8%	78 ± 31%	87 ± 9%
4-NP2EO	76 ± 26%	78 ± 33%	85 ± 10%
4-NP1EC	-812 ± 1300%	90 ± 7%	-47 ± 157%

Average removals are calculated by using mean measured concentrations at each WWTP for the overall period of study. $R\ (%) = (([Influent] - [Effluent]) / [Influent]) * 100$. Aqueous phase: sum of dissolved phase and solid phase

The measured concentrations allow the estimation of the removal rate for APEO metabolites in the investigated WWTP process. Table 4 presents the average removal rates of APEO metabolites in the dissolved phase, the suspended solids and the aqueous phase (sum of dissolved phase + suspended solids). For 4-NP, 4-NP1EO and 4-NP2EO, the observed trends in the dissolved phase and in the suspended solids are similar to significant removal rates higher than 75 % in both phases, it leads to the a global elimination rate of 83 ± 20% for 4-NP, 87 ± 9% for 4-NP1EO and 85 ± 10% for 4-NP2EO. For NP, a similar removal efficiency has been obtained by Martin-Ruel (2008) from the summary of literature data The trends are obviously different for 4-NP1EC. In the suspended solids, the average rate of removal is of 90%, contrary to the dissolved phase which presents a negative removal rate of -812 ± 1300%. It leads to an overall elimination of -47 ± 157% and clearly demonstrates that 4-NP1EC is generated through AS WWTP processes (Loyo-Rosales et al., 2007; Teske and Arnold, 2008).

These results clearly demonstrate the efficiency of AS WWTPs to remove 4-NP, 4-NP1EO and 4-NP2EO from the aqueous phase as confirmed by the low standard deviation (maximum value of 20%). On the contrary, 4-NP1EC, the dominant biodegradation metabolite in this study, appears to be strongly affected by the WWTP process. Some more investigations will be necessary in order to highlight and understand the major explanatory parameters (effects of the temperature of the reactor which can affect the kinetics of biodegradation, known to be sensitive temperature, Loyo-Rosales et al., 2007; effects of other operating parameters of the sewage, Teske and Arnold, 2008).

3-5 Occurrence of APEOs in sludge

On the dried weight basis, measured concentrations are between 9.1 ± 5.1 mg.kg⁻¹ for 4-NP; 3.3 ± 2.9 mg.kg⁻¹ for 4-t-OP; 8.0 ± 2.8 mg.kg⁻¹ for 4-NP1EO; 5.0 ± 3.3 mg.kg⁻¹ for 4-NP2EO and 15.0 ± 25.1 mg.kg⁻¹ for 4-NP1EC. It is interesting to note the distribution of compounds with the 4-NP1EC dominant metabolite with 4-NP1EO and 4-NP. These results seem to suggest the existence of various mechanisms of sorption: interactions of a hydrophobic type for 4-NP1EO and 4-NP (as suggested by

their high contents in suspended solids); other types of interactions may be involved to explain the sorption of 4-NP1EC. Some electrostatic interactions between the molecule and the bacterial wall (bacteria present in the activated sludge) may occur. In an internal publication, the EAWAG reports a study on the sorption phenomena of 3 pharmaceutical substances among which norfloxacin (which has a molecular structure comparable to that of 4-NP1EC, with the presence of a -COOH function) during secondary treatment. Their observations highlight the fact that the fraction of sorbed norfloxacin increases along the treatment of water: 33% in raw wastewaters to reach 72% in secondary sludge. They assumed the sorption of norfloxacin to be related to electrostatic interactions which are all the more supported by the content of micro-organisms (of the wall which is negatively charged).

A huge variability of the measured concentrations is observed in the final sludge and is related with the profile of contamination of the clarified treated waters (Figure 6). Indeed, WWTPs SE-1, SE-2, SE-3 which have the most important levels of contamination in their influents, are also those which show the most important levels of contamination in final sludge.

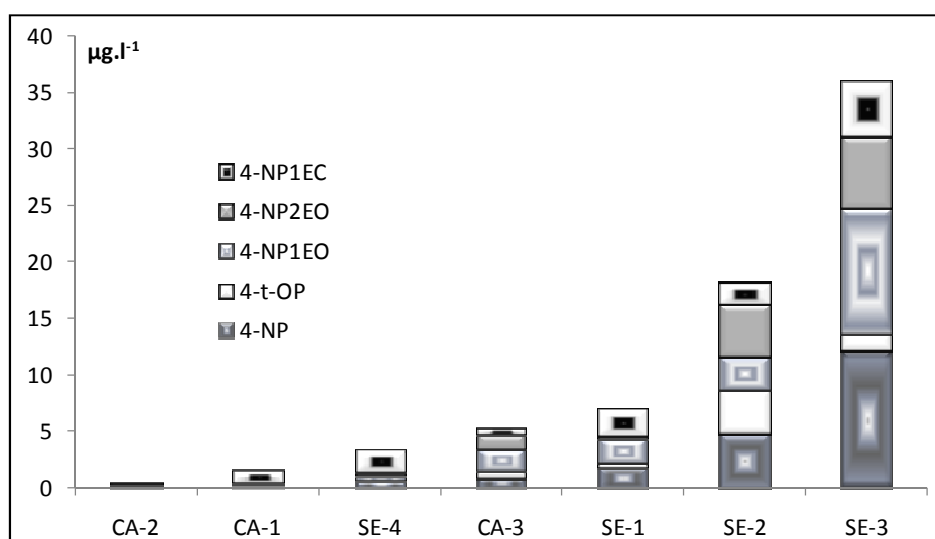


Figure 6: Occurrence of APEO metabolites in the final sludge of the 7 investigated WWTPs.

Nevertheless the measured concentrations are of the same order of magnitude as those which have been reported by Ghanem et al. (2007) in a study on 4 French WWTP sludge (contents of 4-NP were from $17.3 \pm 6.2 \text{ mg.kg}^{-1}$ to $130.0 \pm 35.8 \text{ mg.kg}^{-1}$, dried weight).

4-Conclusion and perspectives

MAE, 2 steps SPE and LC-ESI-MS as described in this work allow the simultaneous enrichment and determination of the major estrogenic APEO biotransformation products. With the sensitivity, the selectivity, the ruggedness provided, it is most useful for the analysis of WWTPs and

natural samples. For highly complex matrices, interferences are distinct and have to be controlled. The transposition of the methodology to new powerful ones; such as UPLC[®]-MS-MS, will lead to significantly reduced signal suppression (the need for a lower enrichment factor, a new geometry of ionization source “Z-spray” which have shown to be favorable (Koh et al., 2008). Methodological validation clearly demonstrates that the ultra traces analysis of APEOs, especially 4-NP, is tricky due to potential contamination in the processing sequence of samples.

From an ecological point of view, this monitoring work clearly highlights a chronic state of contamination of French influents and effluents by APEO metabolites. Although removal higher than 80% are observed do these compounds through biological AS WWTPs large loads of APEO metabolites in both liquid and solid matrices were found in aquatic systems (*via* the final effluents) and terrestrial ecosystems (*via* the valorization of sludge in the French context). Finally, this work clearly demonstrates that consideration of APs and APEOs only, can lead to an underestimation of the chemical risk linked with the occurrence of APEOs in the natural environment. Further works and regulations should consider other classes of biodegradation metabolites, especially APECs and CAPECs.

Acknowledgments

The authors wish to thank the French national research agency ANR AMPERES and the Region Aquitaine for research fundings. The authors are grateful to Sylvain Coulon and Karyn Le Menach for their technical help as well as Jean-Marc Perret, Clément Crétollier, Jean-Luc Beckert, Mohamed Hadjab and Alain Liénard for sampling strategy assistance. The authors want also to acknowledge the French Ministry of Research for the PhD grant of S. Lardy-Fontan.

Bibliography

Renner, R. (1997) European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environ. Sci. Technol.* 31, 316A-320A.

Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E. and Lester, J.N. (2008) Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*.

Terzic, S., Senta, I., Ahel, M., Gros, M., Petrovic, M., Barcelo, D., Muller, J., Knepper, T., Marti, I., Ventura, F., Jovancic, P. and Jabucar, D. (2008) Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Science of The Total Environment* 399(1-3), 66-77.

Ahel, M.G., W. and Koch, M. (1994) Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment — I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat. Res.* 28(5), 1131-1142.

Ahel, M., Conrad, T. and Giger, W. (1987) Persistent organic chemicals in sewage effluents 3. Determination of nonylphenoxy carboxylic acids by high-resolution gas chromatography/mass spectrometry and high-performance liquid chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 21, 697-703.

Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A.F. and Viana, M.T. (2006) Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific review. *Applied Ecology and Environmental Research* 4(1), 1-25.

Teske, S.S. and Arnold, R.G. (2008) Removal of natural and xeno-estrogens during conventional wastewater treatment. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 1-18.

Pan, X., Lardy-Fontan S., and Budzinski H.; Determination of nonylphenol ethoxylate metabolites in river water and sewage treatment plant effluents by solid-phase extraction, high performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry; *submitted to Analytical Bioanalytical Chemistry*.

Lardy-Fontan S., Pan. X. and Budzinski H.; Analysis of alkylphenol polyethoxylate metabolites in suspended solids from the Seine estuary by development of focused microwave-assisted extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography- electrospray mass spectrometry, *submitted to Analytical Bioanalytical Chemistry*.

Gourlay, C., Tusseau-Vuillemin, M.H., Mouchel, J.M. and Garric, J. (2005) The ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability increases with DOM biodegradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61(1), 74-82.

Tusseau-Vuillemin, M.H., Lagarde, F., Chauvière, C. and Héduit, A. (2002) Hydrogen peroxide (H₂O₂) as a source of dissolved oxygen in COD-degradation respirometric experiments. *Water Research* 36(3), 793-798.

Taylor, P.J. (2005) Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 38(4), 328-334.

Loos, R., Wollgast, J., Castro-Jimenez, J., Mariani, G., Huber, T., Locoro, G., Hanke, G., Umlauf, G., Bidoglio, G., Hohenblum, P., Moche, W., Weiss, S., Schmid, H., Leiendecker, F., Ternes, T., Ortega, A.N., Hildebrandt, A., Barcelo, D., Lepom, P., Dimitrova, I., Nitcheva, O., Polesello, S., Valsecchi, S., Boutrup, S., Sortkjaer, O., de Boer, R. and Staeb, J. (2008) Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 27(1), 89-95.

Loos, R., Hanke, G., Umlauf, G. and Eisenreich, S.J. (2007) LC-MS-MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters. *Chemosphere* 66(4), 690-699.

Lee Ferguson, P., Iden, C.R. and Brownawell, B.J. (2000) Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography - Electrospray mass spectrometry. *Analytical chemistry* 72(18), 4322-4330.

Jahnke, A., Gandrass, J. and Ruck, W. (2004) Simultaneous determination of alkylphenol ethoxylates and their biotransformation products by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1035(1), 115-122.

Baugros, J.B., Giroud, B., Dessalces, G., Grenier-Loustalot, M.F. and Cren-Olive, C. (2008) Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Analytica Chimica Acta* 607(2), 191-203.

Boitsov, S., Meier, S., Klungsoyr, J. and Svoldal, A. (2004) Gas chromatography-mass spectrometry analysis of alkylphenols in produced water from offshore oil installations as pentafluorobenzoate derivatives. *Journal of Chromatography A* 1059(1-2), 131-141.

Boitsov, S., Mjøs, S.A. and Meier, S. (2007) Identification of estrogen-like alkylphenols in produced water from offshore oil installations. *Marine Environmental Research* 64(5), 651-665.

Cespedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A. and Barcelo, D. (2008) Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia, NE Spain). *Environmental Pollution* 153(2), 384-392.

Quednow, K. and Puttmann, W. (2008) Endocrine disruptors in freshwater streams of Hesse, Germany: Changes in concentration levels in the time span from 2003 to 2005. *Environmental Pollution* 152(2), 476-483.

Koh, Y.K.K., Chiu, T.Y., Boobis, A.R., Cartmell, E., Pollard, S.J.T., Scrimshaw, M.D. and Lester, J.N. (2008) A sensitive and robust method for the determination of alkylphenol polyethoxylates and their carboxylic acids and their transformation in a trickling filter wastewater treatment plant. *Chemosphere* 73(4), 551-556.

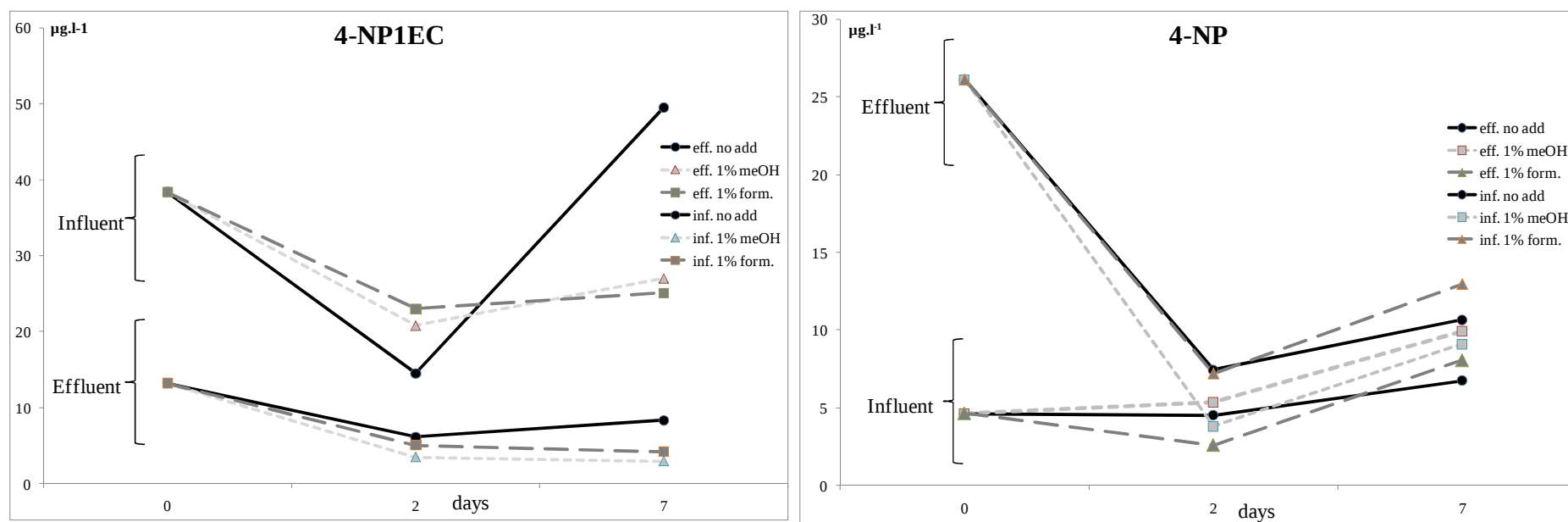
Loyo-Rosales, J.E., Rice, C.P. and Torrents, A. (2007) Fate of octyl- and nonylphenol ethoxylates and some carboxylated derivatives in three American wastewater treatment plants. *Environmental Science and Technology* 41(19), 6815-6821.

Ghanem, A., Bados, P., Estaun, A.R., de Alencastro, L.F., Taibi, S., Einhorn, J. and Mougin, C. (2007) Concentrations and specific loads of glyphosate, diuron, atrazine, nonylphenol and metabolites thereof in French urban sewage sludge. *Chemosphere* 69(9), 1368-1373.

COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (*notified under document number C(2002) 3044*)(Text with EEA relevance)(2002/657/EC

Rsde ineris <http://rsde.ineris.fr/document/DRC-07-82615-13836C.pdf>

IS 1: Conservation of WWTP matrices



eff no add : effluent samples without preservative; inf no add : influent samples without preservative ; eff 1% meOH : effluent samples with 1% methanol; inf 1% meOH: influent samples with 1% methanol; eff 1% form. : effluent samples with 1% formaldehyde; inf 1% form.: influent samples with 1% formaldehyde.

Publication n°5**Les POCIS comme nouvel outil de monitoring****Que peut-on vraiment en attendre?****Une première approche avec les substances pharmaceutiques et les alkylphénol-polyéthoxylés**

Sophie Lardy-Fontan, Anne Togola, Hélène Budzinski⁽¹⁾

Université Bordeaux 1, ISM-LPTC, UMR 5255 CNRS
351 cours de la libération 33405 TALENCE CEDEX (France)

⁽¹⁾ Auteur Correspondant : h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Résumé :

Les prélèvements ponctuels ne sont pas capables de donner une concentration moyenne dans le temps, ainsi les études de monitoring pour le contrôle de l'environnement exigent de nombreux prélèvements lourds à mettre en œuvre, un besoin pour de nouveaux outils a émergé. Les techniques de prélèvements passifs intégratifs sont de nouvelles approches développées pour le contrôle de l'environnement. L'utilisation des POCIS (Polar Organic Compounds Integrative Sampler) a été récemment documentée pour la détection des composés organiques polaires dans l'environnement. Le but de cette étude était d'exposer ces outils au cours de 2 essais *in situ* au niveau de la Meuse et de l'Alsace et d'étudier leur applicabilité pour les études de surveillance de 2 principales classes de composés organiques polaires : les substances pharmaceutiques et les alkylphénol-polyéthoxylés. La capacité des POCIS à devenir un outil performant pour la surveillance des systèmes aquatiques a été mise en évidence. Néanmoins, quelques restrictions quant à leur capacité à devenir un outil quantitatif ont été soulignées.

Pour soumission à Journal of Environmental Monitoring (JEM)

POCIS as a new monitoring tool. What can really be expected?
A first approach with pharmaceuticals and alkylphenol-polyethoxylates

Sophie Lardy-Fontan, Anne Togola, H       Budzinski ⁽¹⁾

Université Bordeaux 1, ISM-LPTC, UMR 5255 CNRS
351 cours de la libération 33405 TALENCE CEDEX (France)

⁽¹⁾ Corresponding author :h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Abstract

As spot sampling cannot give time weighted average concentrations, which requires very heavy environmental monitoring surveys, a need for new tools has emerged. Integrative passive sampling is a new approach developed for environmental monitoring purposes. The use of Polar Organic Chemical Integrative Sampling (POCIS) has been recently documented for the detection of polar organic compounds in the field. The aim of this study was to expose such tools in 2 river basin field trials: Meuse and Alsace and to study the application of the integrative sampling tool POCIS for the monitoring of 2 major classes of polar organic compounds: pharmaceutical substances and alkylphenol-polyethoxylates. POCIS tools have been applied in various aquatic systems in order to test their use as a monitoring tool. The ability of POCIS to become a powerful tool for the monitoring of aquatic systems has been highlighted. Nevertheless, some restrictions concerning its abilities to become a quantitative tool were underscored.

1-Introduction

For more than half a century, a general awareness of the impact of human activities on the environment has emerged and is nowadays a common project for political authorities, scientists or citizens. Considering that water has become an invaluable resource and that aquatic systems are the final receptacles of anthropic waste, a strong interest focused on these systems. The impact of anthropic contamination can be assessed by monitoring the numerous pollutants that can be present in aquatic compartments. Monitoring refers to the continuous or frequent standardised measurement and observation of the environment (air, water, land/soil, biota), often used for warning and control (OECD, 1997). It has become a keyword in all environmental approaches.

In Europe, the implementation of the Water Framework Directive (2000/60/EC) marks a strong standpoint. Its objectives are to improve, to protect water quality (surface water, coastal water,

and groundwater) and to prevent further deterioration of across Europe by the year 2015. To date, a first list of 33 pollutants identified as “dangerous substances” has been suggested for chemical monitoring.

These compounds belong to several chemical groups, such as PAHs, pesticides, alkylphenols, but this list needs to be regularly updated depending on scientific research and developments in analytical technologies (liquid chromatography or gas chromatography, coupled to mass spectrometry (LC-MS, LC-MS-MS, GC-MS, GC-MS-MS). Indeed, advances in compound detection allow us to identify new compounds of interest, especially polar organic compounds which until now had very often been ignored in aquatic systems and can show toxicity towards aquatic organisms. Thus, an important and widespread contamination of aquatic systems by this kind of compounds has been highlighted. In this large class of polar compounds two classes caught attention: detergents (among them alkylphenol-polyethoxylates and their breakdown products which are part of the priority list of compounds (Annexe X, 2000/60/EC) (Ying et al., 2002a; Ying, 2006) and the PCPP (Pharmaceuticals and Personal Care Products) with more specifically pharmaceutical substances (Halling-Sorensen et al., 1998; Ternes, 2001a; Ternes, 2001b; Hilton and Thomas, 2003), and steroid hormones (Ying et al., 2002b). Regarding their ubiquity and their potential toxicity, some of these compounds require a specific attention (Jobling and Sumpter, 1993; Ahel et al., 1994a; Ahel et al., 1994b; Brooks et al., 2003; Jobling et al., 2004; Crane et al., 2006).

Surveillance monitoring (designed to provide information to: supplement and validate impact assessment procedures; enable the adequate preparation of future monitoring programs; and, assess long-term changes in natural conditions or as a result of anthropogenic activity), operational monitoring (designed to provide information useful to classify the status of water bodies identified as being at risk of failing their environmental objectives and investigative monitoring (designed to understand the causes of objective failure and to assess the extent of the impact of accidental pollution events) are the three modes which have been specified by the Directive (Allan et al., 2006). The purpose of any ecological risk assessment analysis for chemical stressors is the determination of the time-weighted average (TWA) concentrations. Spot samplings cannot succeed without numerous and expensive approaches and integrative passive sampling appears to be a powerful tool for that purpose (Namiesnik et al., 2005).

Limited research involving the passive sampling of polar organic compounds has been performed (Vrana et al., 2005a). Among passive sampling tools dedicated to the monitoring of polar compounds, POCIS (Polar Organic Compounds Integrative Sampler) has been successfully applied for the monitoring (qualitative and semi-quantitative data) of steroids (Vermeirssen et al., 2005; Zhang et al., 2008; Arditoglou and Voutsas, 2008), pharmaceuticals and alkylphenol-polyethoxylates (Jones-Lepp et al., 2004; Petty et al., 2004; Alvarez et al., 2004; MacLeod et al., 2007; Arditoglou and Voutsas, 2008) in different aquatic systems (Mills et al., 2007; Robinson et al., 2007). POCIS has been designed by the USGS in order to handle large volumes of water over a period of several days or weeks and to integrate episodic changes in environmental contaminant concentrations. To perform a quantitative

approach, laboratory calibration studies need to be made for each analyte of interest (Togola and Budzinski, 2007).

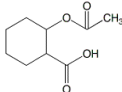
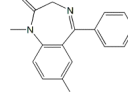
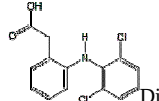
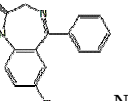
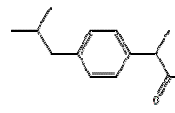
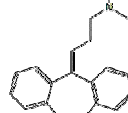
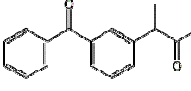
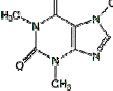
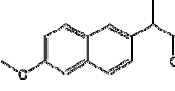
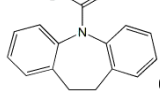
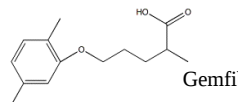
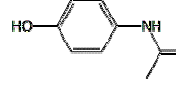
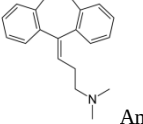
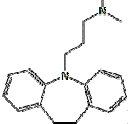
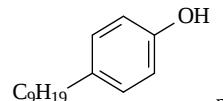
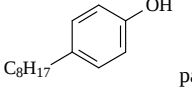
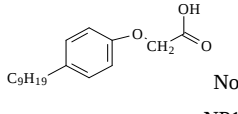
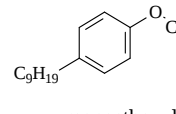
The aim of this work is to apply the integrative sampling tool POCIS for the monitoring of major classes of polar organic compounds: pharmaceutical substances and alkylphenol-polyethoxylates. POCIS tools have been applied in several aquatic systems in order to test their capability as a monitoring tool. In order to achieve that, several POCIS devices have been exposed in different aquatic systems: the Meuse River and the Lauch River watersheds through several kinds of water typology: surface waters, groundwater but also WWTP effluents. This study presents an assessment of the availability of this tool considering qualitative and quantitative data obtained this way, compared with classical sampling methods currently used, showing the positive inputs but also the limits of this new approach of monitoring.

2-Material and methods

2-1-Chemicals and reagents

Pharmaceutical compounds were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France; purity > 98%). Deuterated products (diazepam_{d5}, amitryptiline_{d6}, nordiazepam_{d5}) used for pharmaceutical quantification were purchased from Euriso-Top (St Aubin, France; purity > 98%). Nonylphenoxyacetic acid (ring chain isomers) (98%+, p-NP₁EC) was purchased from PROMOCHEM (Molsheim, France). p-nonylphenol (100%, p-NP, Technical), p-tert-octylphenol (99.5%, p-t-OP), p-nonylphenol-monoethoxylate (99.5%, p-NP₁EO) were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France; purity > 98%). All the compounds are presented with their chemical structures in Table 1. POCIS AQUASENSE-P Pharmaceuticals[®] were purchased from Exposmeter (Tavelsjö, Sweden). Acetone, dichloromethane, ethyl acetate and methanol (HPLC reagent grade, Scharlau) were purchased from ICS (Belin-Beliet, France). Hydrochloric acid 37% (reagent grade) was obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Ultrapure deionised water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). 60 mg Oasis MCX[®] and cartridges were purchased from Waters (St Quentin en Yvelines, France) and 200 mg Bondelut[®] C18 cartridges were purchased from Varian (Courtabœuf, France). MSTFA (n-methyl-n(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, purity > 97%; Acros Organics, Noisy-le-Grand, France) was used as the silylation agent for GC-MS analysis. Whatman GF/F glass fibre filters (pore size 0.7 µm) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France).

Table1: Chemical structures of investigated compounds.

Chemical structure	MW (g.mol ⁻¹)	Chemical structure	MW (g.mol ⁻¹)
Pharmaceuticals substances			
 Aspirin (ASP)	180	 Diazepam (DZP)	284
 Diclofenac (DICLO)	295	 Nordiazepam (NDZP)	270
 Ibuprofen (IBU)	206	 Doxepine (DOX)	279
 Ketoprofen (KETO)	254	 Caffeine (CAF)	194
 Naproxen (NAP)	230	 Carbamazepine (CBZ)	236
 Gemfibrozil (GEMF)	250	 Paracetamol (PARA)	151
 Amitriptyline (AMI)	277	 Imipramine (IMIP)	280
Alkylphenol-polyethoxylates (APEOs)			
 para-Nonylphenol (p-NP)	220	 para-tert-Octylphenol (p-t-OP)	206
 Nonylphenoxyacetic acid (p-NP1EC)	278	 Nonylphenol-monoethoxylates (p-NP1EO)	264

2-2-Analytical protocols

2-2-1 Aqueous phase analysis

4 l of water sample were filtered through a GF/F glass fibre filter (previously heated at 450°C for 6 hours) (0.7 µm pore size) in order to separate dissolved and particulate phases. The aqueous phase was then stored at 4°C until analysis which occurred in the 48 hours following the sampling.

a) Solid phase extraction for pharmaceutical substances

The protocol previously described has been used for pharmaceutical compound extraction (Togola and Budzinski, 2008). Briefly, the filtered water was acidified at pH2 and between 0.5 l and 1 l was loaded on an OASIS MCX[®] cartridge. The cartridges were then dried under vacuum and successively eluted with 3 ml of ethyl acetate, 3 ml of an ethyl acetate/acetone mixture (50/50; v/v) and 3 ml of an ethyl acetate/acetone/NH₄OH mixture (49/49/2; v/v/v). The extracts were evaporated under a nitrogen flux to a final volume of 100 µl prior to GC-EI-MS analysis (SIM mode) for neutral compound analysis. After a derivatization step (30 µl of MSTFA, incubation 35 min at 65°C) the extract was analysed (GC-EI-MS analysis in SIM mode) for acidic drug analysis. The quantification was performed by internal calibration (diazepam_{d5}, amitryptiline_{d6}, nordiazepam_{d5}).

b) Solid phase extraction for alkylphenol-polyethoxylates

The protocol previously described has been used (Pan et al., submitted). Briefly, the filtered water was acidified to pH 2. Between 0.5 l and 1 l were loaded on the cartridges (Bondelut[®] C18, 200 mg, 3 c.c.). The cartridges were then dried under vacuum and the elution was achieved by 5ml of a mixture of methanol/dichloromethane (50/50; v/v). The extracts were evaporated under a nitrogen flux, to a final volume of 150 µl, prior to LC-ESI-MS analysis (SIM). The quantification was performed by external calibration.

2-2-2 POCIS extraction

After field retrieval, POCIS devices were rinsed with ultrapure water to remove any material adhering to the surface membrane and stored at - 20°C until extraction. The POCIS devices were opened; the disc arrays were disassembled and the membranes were detached from the stainless steel collars and rinsed with ultrapure water (pH2). The sorbent powder was also carefully transferred into a glass chromatography microcolumn, blocked by glass fibre cotton (previously cleaned by ultrasonication three times in dichloromethane). The sorbent was dried under vacuum for 90 minutes. For the Meuse River trial, the elution was performed with a mixture of ethyl acetate/acetone (50/50; v/v) and analyses were conducted by GC-MS (Togola and Budzinski, 2008).

For the Alsace River trial, the protocol was adapted in order to extract both classes of compounds: APEOs and pharmaceuticals. The elution was carried out successively by methanol and a mixture of ethyl acetate/acetone/NH₄OH (79/19/2; v/v/v). The extracts were then divided (gravimetric control) and aliquots were individually evaporated under a nitrogen flux and reconstituted (methanol for APEO and ethyl acetate for pharmaceuticals) prior to analysis (LC-MS for APEOs and their metabolites, GC-MS for pharmaceuticals).

2-3-Use of POCIS as a quantitative tool

Time weighted average concentration can be calculated from laboratory obtained uptake rate (R_s) and from the mass of analytes sorbed into the POCIS device using equation 1:

$$(1) \quad C_w = \frac{C_s * M_s}{R_s * d}$$

Where C_w is the water concentration (ng.l^{-1}), C_s is the analyte concentration in the sorbent (ng.g^{-1}), M_s is the mass of sorbent (g) and d (j) the POCIS exposure duration in the environmental field.

In order to determine the sampling rate values (R_s), expressed in litre per day per gram of sorbent, laboratory experiments have been carried out under representative environmental conditions (Togola and Budinski, 2007).

2-4-Case study

Two representative pilot river basins were investigated: the Meuse River and the Lauch River basin in Alsace.

2-4-1 The Meuse pilot river basin field trial

On the one hand a first experiment was undertaken in controlled conditions with the use of an experimental system of 300 liters fed continuously by water from the Meuse and spiked with a pharmaceutical substance mixture (theoretical concentration of 500 ng.l^{-1} then 1,000 ng.l^{-1}). POCIS devices were exposed for 5 days. POCIS devices were taken to the field in their original containers. Containers were opened upon arrival at the field site. Each POCIS device was attached to a 0.5 cm stainless steel which was enclosed in a canister to prevent degradation by macro remains in the water flow. The canisters were attached and maintained in the river bed with strings. At the end of the sampling period, the POCIS devices were placed in alumina paper (individually) and stored at -20°C until analysis. In parallel, water samples were carried out regularly in order to compare results obtained by integrative tools and spot samplings.

For the second experiment, POCIS devices were exposed in the Meuse for 5 days. In parallel, the measurement of the concentration in water was conducted at the T0 and T+5 days (22 to 27 April 2005). Only pharmaceutical compounds were considered during this field trial.

2-4-2 The Alsace pilot river basin field trial

The watershed of the Lauch, a small tributary of the Rhine, was investigated in May and June 2006. Several sites were investigated: groundwater (ESO 7), the river Lauch upstream (ESU 3) and downstream (ESU 4) of the wastewater treatment plant of Merxheim (1,300 equivalent inhabitants) and

the waste water treatment plant effluent (RESO 7). For each station, the monitoring approach shown in Figure 1 was applied. Briefly, the monitoring approach was based on the complementarity of spot samplings (one sampling) and passive sampling deployment (retrieval step at days 7 and 21). In this case, both pharmaceuticals and detergent pollutants were analysed.

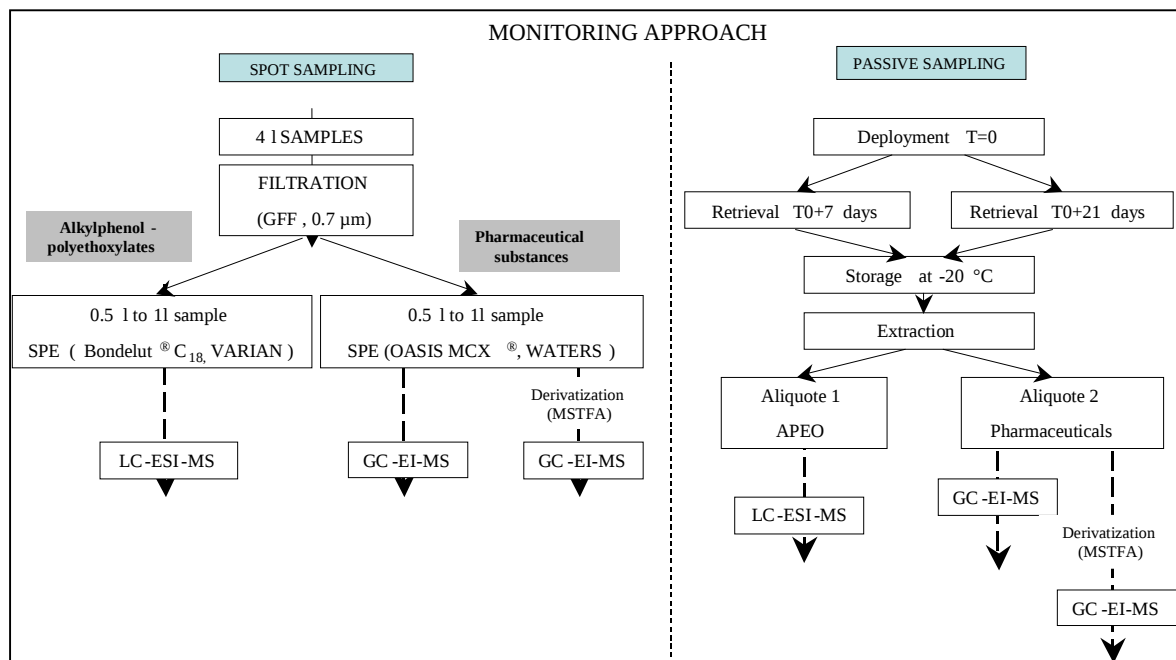


Figure 1: Monitoring scheme of the monitoring approach developed in the Alsace field trial.

3-Results and discussion

3-1-Validation of POCIS extraction

For pharmaceutical substances, the average recoveries are higher than 70% for most compounds. For APEO, recoveries are good between 60% to 120% with standard deviation between 5 to 8%. Considering the high variability of the physico-chemical properties of the studied compounds (lipophily, polarity), it appeared that this protocol was usable for this study.

3-2- Spot sampling monitoring

3-2-1 The Alsace pilot river basin field trial

All the studied compounds are detected in all of the selected sites, which highlight a widespread contamination of the aquatic ecosystems by pharmaceutical substances and detergents (Table 2). Concerning APEOs, the concentrations in the natural environment are around a few tens of ng.l^{-1} for the p-NP, p-NP1EO. The p-NP1EC is the main measured compound in the dissolved phase with concentrations around a few $\mu\text{g.l}^{-1}$. The p-t-OP is lower than the limit of detection ($<2 \text{ ng.l}^{-1}$). The influence of the effluent of the WWTP is highly significant concerning the p-NP1EC, but for the other

alkylphenolic compounds the influence of the effluent does not appear to generate a marked additional contamination (increase in the concentrations of a factor 2 at the maximum).

Concerning the pharmaceutical substances, the concentrations in the natural environment are low upstream of the WWTP effluent with values around tens of ng.l^{-1} and increase to several hundreds of ng.l^{-1} downstream of the WWTP effluent, depending on the compounds. An important increase of pharmaceutical concentrations downstream of the WWTP effluent can be noted: 700 times more concentrated for diclofenac, 60 times more concerning naproxen. Some compounds such as imipramine, amitriptyline and doxepine are below the detection limits ($<2 \text{ ng.l}^{-1}$). The presence of some pharmaceutical compounds in groundwater is shown in this study (presence of aspirin and caffeine, see Table 2). Other results (Ternes, 2001c; Heberer et al., 2001) have already highlighted the presence of pharmaceutical compounds in drinking water or in groundwater... Data seem to identify widespread sources of contamination concerning the APEOs (agricultural activities, spread of sewage, WWTP effluents...) and more punctual sources (WWTP effluents) for the pharmaceutical substances.

Table 2: Concentrations in pharmaceutical substances and alkylphenol-polyethoxylates in the dissolved phase obtained with the spot sampling approach, in the Alsace field trial.

Concentration (ng.l^{-1})	Dissolved phase ($<0.63\mu\text{m}$)	ESO 7 Groundwater	ESU 3 Lauch	ESU 4 Lauch	RESO7 WWTP
Pharmaceutical substances	ASPIRIN	37	24	72	61
	IBUPROFEN	nd	2	24	23
	PARACETAMOL	5	3	59	4
	GEMFIBROZIL	nd	nd	13	11
	NAPROXEN	4	3	174	98
	DICLOFENAC	nd	1	707	183
	KETOPROFEN	1	1	93	45
	DIAZEPAM	1	2	30	7
	CAFFEINE	61	337	227	14
	CARBAMAZEPINE	5	3	96	22
	AMITRYPTILINE	nd	nd	nd	98
	IMIPRAMINE	nd	nd	nd	nd
	DOXEPINE	nd	nd	nd	nd
	NORDIAZEPAM	1	nd	nd	7
Alkylphenol- polyethoxylates	p-NP1EC	nd	nd	812	2,819
	p-NP	59	31	45	100
	p-t-OP	nd	nd	nd	nd
	p-NP1EO	23	17	44	55

(concentrations are expressed in ng.l^{-1})

3-2-2 The Meuse pilot river basin field trial

The Meuse River seems to be moderately contaminated by pharmaceutical compounds whose concentrations range between tens of ng.l^{-1} and hundreds of ng.l^{-1} , depending on the compound (Table 3). Concentrations are in the same range as those measured in other estuaries (Hilton and Thomas, 2003). What is really significant is the fluctuation of the concentrations even on a short scale of time (5 days). The important variations of the flow can explain the differences of concentrations between two

measurements corresponding to a dilution phenomenon. This is a good example of the complexity encountered when trying to acquire representative environmental data.

Spot samplings show a chronic contamination of the investigated sites. Measured concentrations varied from ng.l^{-1} to more than $\mu\text{g.l}^{-1}$, depending on the compound and the location. Although the limits of detection of the analytical protocols are satisfying ($< 2\text{ng.l}^{-1}$), they are still too high to quantify some compounds such as diazepam or p-t-OP. These two features (variability and sensitivity) highlight a crucial key-point of environmental monitoring: the representativeness of measured concentrations.

Table 3: Concentrations in pharmaceutical substances in the dissolved phase obtained with the spot sampling approach, in the Meuse field trial.

C° (ng.l^{-1})	22/04/2005	27/04/2005		22/04/2005	27/04/2005
CAFFEINE	199 ± 27	18 ± 4	IBUPROFEN	37 ± 4	13 ± 2
AMITRYPTILINE	<1	<1	PARACETAMOL	<2	<2
DOXEPINE	<1	<1	GEMFIBROZIL	2 ± 1	<1
IMIPRAMINE	<2	<2	NAPROXEN	23 ± 6	10 ± 1
CARBAMAZEPINE	196 ± 33	40 ± 3	DICLOFENAC	29 ± 7	14 ± 3
DIAZEPAM	nd	8 ± 3	ASPIRIN	30 ± 6	$11 \pm 0,2$
NORDIAZEPAM	3 ± 1	2 ± 1	KETOPROFEN	10 ± 2	4 ± 1

(concentrations are expressed in ng.l^{-1} , standard deviation is expressed as sampling variability ($n=3$))

3-3- The inputs given by passive sampling monitoring

3-3-1 POCIS as an integrative tool

Table 4: Concentrations in pharmaceutical substances (a) and alkylphenol-polyethoxylates (b) in the POCIS' sorbent from the Alsace field trial.

(a)

C° (ng. g^{-1} sorbent)	ESO 7	ESU 3	ESU 3	ESU4	ESU4	RESO 7	RESO 7
ASPIRIN	357	291	391	371	675	289	571
IBUPROFEN	64	155	388	357	1,142	1,769	4,479
PARACETAMOL	267	847	668	658	951	1,028	264
GEMFIBROZIL	17	16	19	122	275	804	843
NAPROXEN	38	74	206	593	2,379	4,829	11,764
DICLOFENAC	38	66	111	1,287	4,922	11,458	25,115
KETOPROFEN	74	93	179.4	623	1,989	5,318	10,705
CAFFEINE	18	1,181	1,035	1,471	1,115	2,716	194
CARBAZ.	873	412	464	2,895	7,813	19,332	49,342
DIAZEPAM	4	11	nd	35	45	205	284
AMITRYPTILINE	1	9	7	100	228	727	2,093
IMIPRAMINE	nd	nd	nd	14	nd	76	nd
DOXEPINE	18	6	8	19	24	nd	nd
NORDIAZEPAM	101	38	31	86	107	29	515

(concentrations are expressed in ng. g^{-1} sorbent)

(b)

C° (µg.g ⁻¹ sorbent)	ESO 7	ESU 3	ESU 3	ESU4	ESU4	RESO 7	RESO 7
p-NP	0.597	0.591	0.505	0.436	0.716	1.022	5.177
p-t-OP	0.097	nd	0.161	nd	0.123	nd	0.366
p-NP1EC	nd	0.145	0.326	4.890	13.911	35.392	95.429
p-NP1EO	0.812	0.572	1.077	0.818	0.818	1.366	5.612

(concentrations are expressed in µg. g⁻¹ sorbent)

Some compounds, not detected by the analysis of water (amitryptiline, doxepine, imipramine, diazepam, ...), are on the contrary put in evidence in the field by the use of the integrative sampler (Table 4). It can be noted that one of the very interesting characteristics of this new tool, is its capacity to allow the identification and the quantification of compounds present at concentrations lower than the limits of detection obtained with 1l water samples; the sampler indeed makes it possible to concentrate the analytes present in several litres (caffeine, ibuprofen...) or in several tens of liters (carbamazepine, amitryptiline...) (Table 4 a, b).

3-3-2 POCIS as a pre-monitoring tool

If POCIS sorbent contamination (ng.g⁻¹ POCIS), for the same period of exposition, is compared, it appears that the contamination profile of POCIS for pharmaceutical substances as well as for APEOs is consistent with the level of contamination measured by spot sampling, in the Alsace field trial. [ESU7] < [ESO3] < [ESO4] < [RESO7] (Table 4). In consequence, it can be concluded that POCIS could be a very powerful tool for a pre-monitoring study. It can help to discriminate an impacted site from a pristine site, according to a representative scale of time.

3-3-3 POCIS as a quantitative tool

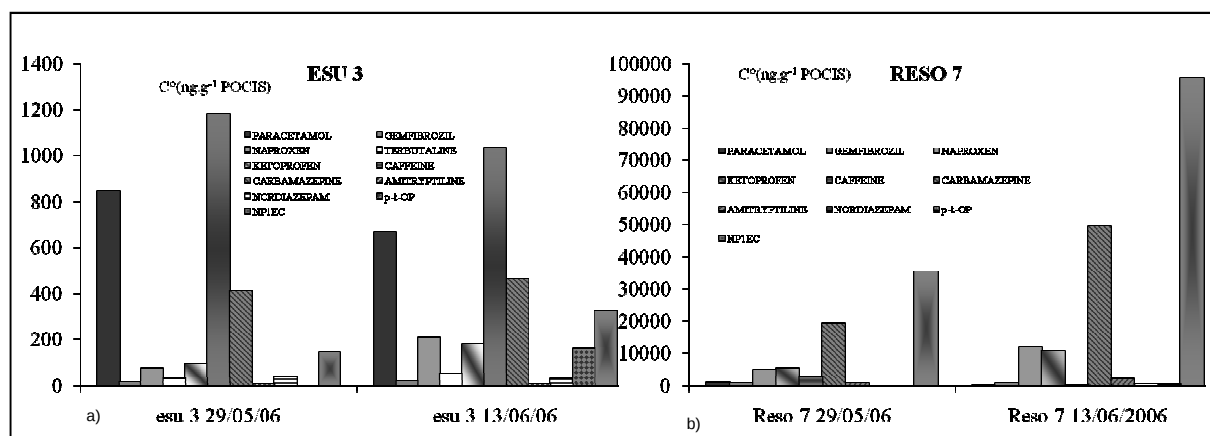


Figure 2: Concentrations in pharmaceuticals and APEOs in the sorbent of POCIS (ng.g⁻¹ sorbent) after 7 days and 21 days of deployment in the field.

- a) Trends in the Lauch River, upstream of the WWTP effluent (ESU3)
 b) Trends in the effluents of the WWTP of Merxheim (RESO7)

Considering the trends of the compound adsorption on the POCIS sorbent (Figure 2), the adsorption does not seem to be linear. The pharmaceutical and APEO concentrations in the sorbent of POCIS (ng.g⁻¹) after 7 days and 21 days of exposition in the field are not in agreement with what was expected.

The calculation of ratios ([T21] / [T7]) gives 3 different tendencies in the river Lauch. For NP1EC, naproxen, amitryptiline and carbamazepine, ratios are close to 3; for caffeine and paracetamol ratios are close to 0.5, which means that there is a loss of compounds in the sorbent between the two days of sampling; finally for compounds such as gemfibrozil the ratio is close to 1.

In the WWTP effluent, tendencies are a little bit different; NP1EC and naproxen have ratios around 2.5; carbamazepine and gemfibrozil have ratios close to 1; caffeine, paracetamol have ratios below 1. Such tendencies have been mentioned previously by Togola and Budzinski (2007). Firstly, some fluctuations of the compound concentrations occurred in the field as well as in WWTP (Ying et al., 2002a; Tauxe-Wuersch et al., 2005; Vrana et al., 2005b ; Xu et al., 2006; Togola, 2006) but it is not sufficient to explain all the observed tendencies. Secondly, various environmental physicochemical characteristics are suspected to modify the adsorption rate (biofouling, suspended matter, flow, etc ...) (Vrana et al., 2005b; MacLeod et al., 2007; Togola and Budzinski, 2007; Arditoglou and Voutsas, 2008). Thirdly, the fact that some degradation phenomena occurred in the POCIS sorbent cannot be minored. In fact, pharmaceuticals such as paracetamol, caffeine are known to be readily degradable. What is relevant here is the crucial point that the choice of the period of deployment: a short period (less than 1 week) can lead to the non detection of compounds, on the contrary a long period of deployment (more than 1 month, less in some cases) can lead to the degradation of compounds in the sorbent and as a consequence to the underestimation of field contamination.

Table 5: Rs values used to estimate water contamination by pharmaceutical substances and alkylphenol-polyethoxylates in field deployment.

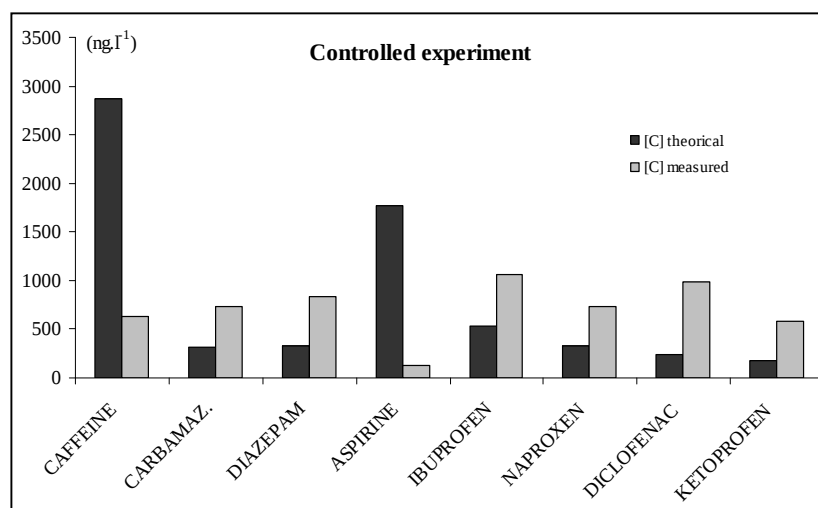
Compound	Rs	Compound	Rs	Compound	Rs	Reference
CAFFEINE	0.39	DIAZEPAM	1.4	NAPROXEN	0.72	Togola et al. (2007) ^{22(a)}
AMITRYPTILINE	2.24	ASPIRINE	0.04	DICLOFENAC	0.83	
DOXEPINE	2.68	IBUPROFEN	0.48	TERBUTALINE	0.83	
IMIPRAMINE	2.02	PARACETAMOL	0.12	SALBUTAMOL	0.44	
CARBAMAZ.	1.99	GEMFIBROZIL	0.27	KETOPROFEN	1.43	
Compound	Rs (L.j ⁻¹)	Compound	Rs (L.j ⁻¹)	Compound	Rs (L.j ⁻¹)	
<i>p</i> -NP	0.1167	<i>p</i> -NP1EO	0.0899	<i>p</i> - <i>t</i> -OP	0.1204	Arditsoglou et al.(2008) ^{20 (b)}

(a) stirred conditions, 20°C ; (b) stirred conditions, 23.5⁺/- 0.5°C

By determining Rs values in the laboratory, POCIS can estimate a TWA water concentration in compounds of interest. Rs values have been calculated for a wide range of pharmaceutical compounds, under different conditions (salinity, temperature) (Togola and Budzinski, 2007). The Rs values obtained for a salinity of 0 PSU and a temperature of 20 °C were selected as representative of the

field conditions of deployment and are presented in Table 5 (Togola and Budzinski, 2007). For alkylphenol polyethoxylates, R_s values recently published by Arditsoglou and Voutsas (2008) were used in order to estimate a derivatized water concentration and are summed in Table 5. The comparisons of measured concentrations (spot sampling) with estimated ones (passive sampling) are shown in Figures 3-4 and Table 6.

Figure 3: Comparison of the concentrations in pharmaceutical compounds in water (ng.l^{-1}) given by



discrete sampling and POCIS, during the Meuse river field trial. Trends in the controlled experiment diverted from the Meuse River.

For pharmaceuticals, it can be noted that, in both cases, POCIS tools overestimate the pharmaceutical concentration. The trends are lower in the controlled experiment than in the field (Figure 3, Table 6).

Table 6: Concentrations ($\text{ng.g}^{-1}\text{sorbent}$) in pharmaceutical compounds in POCIS' sorbent after 5 days of deployment in the Meuse River ($n=3$). Calculated concentrations (ng.l^{-1}) from POCIS sorbent.

	Average concentration in the POCIS sorbent (ng.g^{-1} /. standard deviation)	Average calculated concentration in the Meuse river (ng.l^{-1} /. standard deviation)
CAFFEINE	9,982 $\pm$ 25%	5,145 $\pm$ 1,286
AMITRYPTILINE	96 $\pm$ 41%	9 $\pm$ 4
DOXEPINE	199 $\pm$ 48%	15 $\pm$ 7
IMIPRAMINE	331 $\pm$ 51%	33 $\pm$ 17
CARBAZ.	1,064 $\pm$ 9%	107 $\pm$ 10
DIAZEPAM	505 $\pm$ 36%	72 $\pm$ 26
ASPIRIN	309 $\pm$ 47%	1,546 $\pm$ 1,144
IBUPROFEN	932 $\pm$ 11%	388 $\pm$ 43
PARACETAMOL	2,923 $\pm$ 30%	4,871 $\pm$ 1,471
GEMFIBROZIL	293 $\pm$ 64%	217 $\pm$ 139
NAPROXEN	387 $\pm$ 15%	108 $\pm$ 16
DICLOFENAC	928 $\pm$ 6%	223 $\pm$ 13
KETOPROFEN	593 $\pm$ 43%	83 $\pm$ 36

In the Meuse River, as mentioned above, there has been a sudden modification of the flow due to important load consecutively to a storm episode. In the controlled experiment, the Meuse River waters were stocked before being introduced in the system; the suspended matter level was also decreased by decantation and river flow variations were attenuated by the tank. Nevertheless, the estimated concentrations are still not those expected, especially for small molecules which are, as mentioned above, readily degradable. One explanation can be related to the fact that the Rs calculated in laboratory are not representative, even if there is a will to mimic as close as possible environmental conditions.

For APEOs, depending on the compound and the site, both under-estimation (p-NP in groundwater (ESU7)) and overestimation were observed (Figure 4); overestimation of water concentrations by POCIS was usually noticed and could reach maximal values in the effluents (430% for p-NP and 605% for p-NP1EO). It is interesting to note that the closer values for the less impacted medium: groundwater. One more time, physicochemical parameters can be incriminated; nevertheless the discrepancies in the methodology can also be highlighted as a significant parameter. In fact, it is difficult to simulate relevant parameters such as flow and turbidity. The presence of dissolved organic carbon has also been brought out by several authors (Vrana et al., 2006). It appeared that the use of POCIS as a quantitative tool would require a calibration sets in the field. Zhang et al. (2008) conducted a two times development for pharmaceuticals and endocrine disruptors: the first one under laboratory conditions and the second one under field conditions; they obtained good agreement between theoretical and measured concentrations for pharmaceutical compounds but some discrepancies still remain for endocrine disruptors.

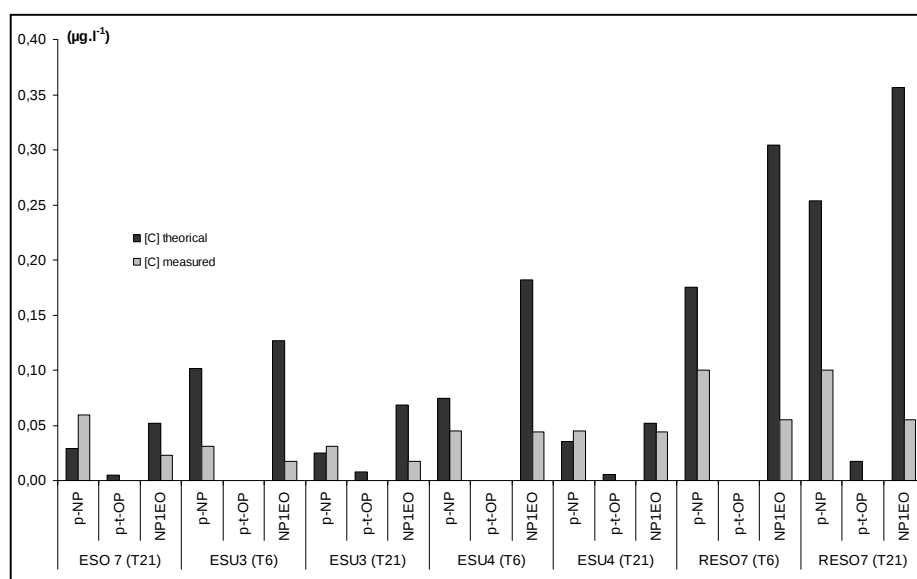


Figure 4: Comparison of the concentrations in APEOs compounds in water (ng.l⁻¹) given by discrete sampling and POCIS, during the Alsace field trial. Trends in various impacted systems

4- Conclusions and perspectives

This work is one of the first involving the laboratory development and field experiments of POCIS for a quantitative monitoring purpose. It highlights the fact that POCIS can become a powerful pre-monitoring tool under WFD directive. In fact, POCIS tools present 2 notable characteristics: the first one is their capability to integrate contaminants which are present in aquatic systems, at a wide range of concentrations; the second one, which is derived from the first one, is their specificity for screening purposes, as illustrated in this study by the identification of molecules that were not detected by spot sampling. Although, some care has to be taken; some degradation phenomena may occur in the sorbent. Nevertheless, this work highlighted the fact that, to date, POCIS cannot be considered as a quantitative monitoring tool. Crucial points have to be especially investigated. The first key point is the choice of the deployment period: some field deployments need to be carried out in order to find the appropriate duration. Secondly, the R_s values still need to be validated. By far, several key parameters need to be tested: flow, biofouling and suspended matter at least. Field calibration of the tool appears, now, inevitable. Meanwhile, recent works conducted by Mazzella et al. (2007) who found a PRC for POCIS tools allow us to think that some alternatives might be found to overcome such limitations.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the European Union's Sixth Framework Programme (SSPI-CT-2003-502492) SWIFT-WFD (Screening methods for Water data InFormaTion in support of the implementation of the Water Framework Directive) and from the "Région Aquitaine". The authors wish to thank the French Research Ministry for the PhD grant of S. Lardy-Fontan and NFS (National Funding for Science) for providing the PhD grant of A. Togola.

Bibliography

OECD, <http://stats.oecd.org/glossary/detail.asp?ID=1684>, 1997.

Ying, G.-G. (2006) Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International* 32(3), 417-431.

Ying, G.-G., Williams, B. and Kookana, R. (2002a) Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environment International* 28(3), 215-226.

Ternes, T.A. (2001a) Pharmaceuticals as new emerging environmental contaminant : a survey. National Groundwater Association (ed), Minneapolis.

Halling-Sorensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhof, H.C. and Jorgensen, S.E. (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment : a review. *Chemosphere* 36, 357-393.

Hilton, M.J. and Thomas, K.V. (2003) Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1015(1-2), 129-141.

- Ternes, T.A. (2001b) Pharmaceuticals and personal care products in the environment. Daughton, C.J. and Jones-Lepp, T.L. (eds), pp. 39-54, ACS symposium series 791.
- Ying, G.G., Kookona, R.S. and Ru, Y.J. (2002b) Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International* 28(6), 545-551.
- Jobling, S. and Sumpter, J.P. (1993) Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 27(3-4), 361-372.
- Ahel, M., Giger, W. and Koch, M. (1994a) Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment--I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Research* 28(5), 1131-1142.
- Ahel, M., Giger, W. and Schaffner, C. (1994b) Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment--II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Research* 28(5), 1143-1152.
- Crane, M., Watts, C. and Boucard, T. (2006) Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of the Total Environment* 367(1), 23-41.
- Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M. and La Point, T.W. (2003) Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicology Letters* 142(3), 169-183.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P. and Tyler, C.R. (2004) Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 66(2), 207-222.
- Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G.A., Knutsson, J., Holmberg, A., Guigues, N., Fouillac, A.-M. and Laschi, S. (2006) Strategic monitoring for the European Water Framework Directive. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 25(7), 704-715.
- Namiesnik, J., Bozdotena, Z., Kot-Wasik, A., Partyka, M. and Wasik, A. (2005) Passive sampling and/or extraction techniques in environmental analysis: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381(2), 279-301.
- Vrana, B., Allan, I.J., Greenwood, R., Mills, G.A., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J. and Morrison, G. (2005a) Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trends in Analytical Chemistry* 24(10), 845-868.
- Vermeirssen, E.L.M., Korner, O., Schonenberger, R., Sutter, M.J.F. and Burkhardt-Holm, P. (2005) Characterization of Environmental Estrogens in River Water Using a Three Pronged Approach: Active and Passive Water Sampling and the Analysis of Accumulated Estrogens in the Bile of Caged Fish. *Environmental Science and Technology* 39(21), 8191-8198.
- Zhang, Z., Hibberd, A. and Zhou, J.L. (2008) Analysis of emerging contaminants in sewage effluent and river water: Comparison between spot and passive sampling. *Analytica Chimica Acta* 607(1), 37-44.
- Arditsoglou, A. and Voutsas, D. (2008) Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers. *Environmental Pollution*.
- Jones-Lepp, T.L., Alvarez, D.A., Petty, J.D. and Huckins, J.N. (2004) Polar organic chemical integrative sampling and liquid chromatography- electrospray/ion-trap mass spectrometry for assessing selected prescription and illicit drugs in treated sewage effluents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47(4), 427-439.
- Petty, J.D., Huckins, J.N., Alvarez, D.A., Brumbaugh, W.G., Cranor, W.L., Gale, R.W., Rastall, A.C., Jones-Lepp, T.L., Leiker, T.J., Rostad, C.E. and Furlong, E.T. (2004) A holistic passive integrative sampling approach for assessing the presence and potential impacts of waterborne environmental contaminants. *Chemosphere* 54(6), 695-705.

MacLeod, S.L., McClure, E.L. and Wong, C.S. (2007) Laboratory calibration and field deployment of the polar organic chemical integrative sampler for pharmaceuticals and personal care products in wastewater and surface water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(12), 2517-2529.

Alvarez, D.A., Petty, J.D., Huckins, J.N., Jones-Lepp, T.L., Getting, D.T., Goddard, J.P. and Manahan, S.E. (2004) Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(7), 1640-1648.

Mills, G., A. , Vrana, B., Allan, I., Alvarez, D., Huckins, J.N. and Greenwood, R. (2007) Trends in monitoring pharmaceuticals and personal-care products in the aquatic environment by use of passive sampling devices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* V387(4), 1153-1157.

Robinson, I., Junqua, G., Coillie, R.V. and Thomas, O. (2007) Trends in the detection of pharmaceutical products, and their impact and mitigation in water and wastewater in North America. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* V387(4), 1143-1151.

Togola, A. and Budzinski, H. (2007) Development of polar organic integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems. *Analytical chemistry* 79(17), 6734-6741.

Togola, A. and Budzinski, H. (2008) Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A* 1177(1), 150-158.

Ternes, T. (2001c) Pharmaceuticals and metabolites as contaminants of the aquatic environment, pp. 39-54.

Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D., Koutsouba, V. and Hiskia, A. (2001) Occurrence of pharmaceutical residues in sewage, river, ground, and drinking water in Greece and Berlin (Germany), pp. 70-83.

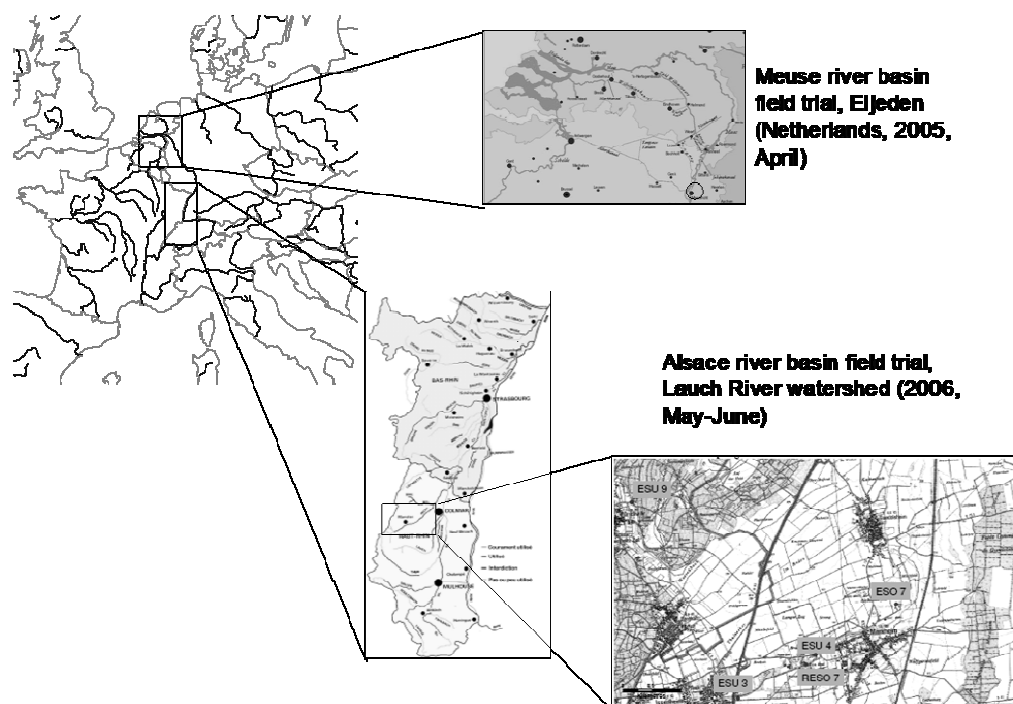
Taxe-Wuersch, A., De Alencastro, L.F., Grandjean, D. and Tarradellas, J. (2005) Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research* 39(9), 1761-1772.

Xu, J., Wang, P., Guo, W., Dong, J., Wang, L. and Dai, S. (2006) Seasonal and spatial distribution of nonylphenol in Lanzhou Reach of Yellow River in China. *Chemosphere* 65(9), 1445-1451.

Vrana, B., Allan, I.J., Greenwood, R., Mills, G.A., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J. and Morrison, G. (2005b) Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 24(10), 845-868.

Vrana, B., Paschke, A. and Popp, P. (2006) Calibration and field performance of membrane-enclosed sorptive coating for integrative passive sampling of persistent organic pollutants in water. *Environmental Pollution* 144(1), 296-307.

Mazzella, N., Dubernet, J.F. and Delmas, F. (2007) Determination of kinetic and equilibrium regimes in the operation of polar organic chemical integrative samplers. Application to the passive sampling of the polar herbicides in aquatic environments. *Journal of Chromatography A* 1154(1-2), 42-51.

Supplementary material IS1: Localization of the investigated sites.

Publication n°6**Présence et Devenir des métabolites de nonylphénol-polyéthoxylés dans l'estuaire de Seine : le bilan de 5 années de surveillance**

Sophie Lardy-Fontan ⁽¹⁾, Hélène Budzinski* ⁽¹⁾,
Sylvie Augagneur ⁽¹⁾, Karyn Le Menach ⁽¹⁾, Laurent Peluhet ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Institut des Sciences Moléculaires (ISM UMR 5255 CNRS) - Laboratoire de Physico & Toxico
Chimie de l'Environnement
Université Bordeaux I, 33405, Talence Cedex, France

* Auteur Correspondant. Tel.: 33 5 56 84 69 98 ; Fax: 33 5 56 84 69 98.

E-mail : h.budzinski@ism.u-bordeaux.fr

Résumé :

Cette étude décrit un travail de surveillance d'envergure effectué afin d'établir dans quelle ampleur l'estuaire de Seine : l'estuaire français le plus impacté par les activités anthropiques, peut être affecté par les composés alkylphénoliques. 5 années de suivi ont permis d'établir un état chronique de contamination de l'estuaire par les métabolites de biodégradation des NPEO, avec des concentrations en composés qui peuvent atteindre le $\mu\text{g.l}^{-1}$. La distribution des molécules entre les phases dissoutes et les phases en suspension a été tout particulièrement surveillée, confirmant la nécessité de considérer ces deux phases dans les études de surveillance du milieu aquatique. Les matières en suspension peuvent être considérées comme des puits temporaires pour les composés alkylphénoliques et par conséquent comme des sources secondaires jouant un rôle dans leur dispersion dans les systèmes. La dynamique intrinsèque de l'estuaire a également été précisée. Même si des apports significatifs vers l'estuaire marin ont été mis en évidence, des phénomènes de dilution, rapides, se produisent. Néanmoins, il apparaît que les niveaux de concentrations mesurées en estuaire sont proches ou supérieurs aux valeurs prédites sans effet, par conséquent un risque chimique lié à la présence des composés alkylphénoliques dans l'estuaire de Seine existe.

Mots clés: alkylphénol-polyéthoxylés, nonylphénols, estuaire, phase dissoute, matières en suspension, tendances temporelles, tendances saisonnières.

Pour soumission à Chemosphere

Fate and Occurrence of Nonylphenol Polyethoxylate metabolites in the Seine estuary: A fifth year monitoring survey.

Sophie Lardy-Fontan ⁽¹⁾, H       Budzinski* ⁽¹⁾,
Sylvie Augagneur ⁽¹⁾, Karyn Le Menach ⁽¹⁾, Laurent Peluhet ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Institut des Sciences Moléculaires (ISM UMR 5255 CNRS) - Laboratoire de Physico & Toxicologie
Chimie de l'Environnement
Université Bordeaux I, 33405, Talence Cedex, France

*Corresponding author. Tel.: 33 5 56 84 69 98; Fax: 33 5 56 84 69 98.

E-mail address: h.budzinski@ism.u-bordeaux.fr

Abstract

This work describes a large monitoring study made in order to establish to what extent the Seine estuary (the most anthropized French estuary), may be impacted by alkylphenolic compounds. The fifth year survey has highlighted a chronic state of contamination of the estuary with concentrations of compounds which can reach $\mu\text{g.l}^{-1}$. Partition between dissolved and particulate phases has been monitored, confirming the necessity to consider both phases in environmental monitoring. Suspended matter can be considered as a temporary sink for alkylphenolic compounds and in consequence as a secondary source for long term dispersion. The intrinsic dynamics of the estuary have also been pointed out. Even if significant loads in the marine estuary have been highlighted, rapid dilution phenomena occur. Nevertheless, it has to be considered that the measured levels of metabolites are closer or higher than the predicted no effect concentration, as a consequence a chemical risk due to the presence of alkylphenolic compounds exists in the Seine estuary.

Keywords: Alkylphenol polyethoxylates, nonylphenols, estuary, dissolved phase, suspended matter, temporal trends, seasonal trends

1-Introduction

Throughout the last 60s decades, there has been a great emerging concern about the potential dangers of anthropogenic chemicals in the environment; endocrine disruptors are by far of main concern. A combination of environmental and field studies shows the estrogenic effects of sewage effluents on fish species: trout and roach (in EDC, Harrison, 1999). Among well known or suspected endocrine disruptors, natural and synthetic hormones, phytoestrogens, polychlorinated biphenyls, dioxins, phthalates and alkylphenol polyethoxylates (APEOs) can be pointed out.

Alkylphenol polyethoxylates (APEOs) are one of the main non-ionic surfactant groups. 80% are nonylphenol polyethoxylates (NPEOs). They are largely used, worldwide, for their properties as detergents, emulsifiers, adjuvants and wetting agents in industrial, institutional and domestical applications: giving them a lot of entrance door towards the aquatic environment. In fact 60% of APEOs are estimated to be released in aquatic systems (Ying et al., 2002; Vazquez-Duhalt et al., 2006; Soares et al., 2008). Their physico-chemical properties and their biodegradation properties endow them with good dispersion capabilities in the aquatic environment, where APEOs are ubiquitous. Furthermore, the ultimate biodegradation products, nonylphenol (NP) in the case of NPEOs and octylphenol (OP) in the case of OPEOs are persistent and toxic at environmental measured concentrations (Ying et al., 2002; Vazquez-Duhalt et al., 2006; Soares et al., 2008). In fact, APEO metabolites are weak endocrine disruptors; they have been shown to display estrogeno-mimetic activities due to their agonist properties toward the estrogen receptor (R M Harrison, 1999; Lintelmann et al., 2003; Mills and Chichester, 2005). Although there are numerous environmental data of the state of contamination of aquatic systems by APEOs and their metabolites (Jonkers et al., 2003; Li et al., 2004a; Jonkers et al., 2005a; Jonkers et al., 2005b; Chen et al., 2005; Chen et al., 2006; Zoller, 2006; Xu et al., 2006; Pojana et al., 2007; Li et al., 2008; Ribeiro et al., 2008a; Ribeiro et al., 2008b), there is still a need for awareness about their fate and behaviour in estuarine systems.

The present work focuses on the understanding of the environmental fate of APEO metabolites in a complex ecosystem: the Seine estuary. The objective was at first to evaluate the state of contamination of the Seine estuary (dissolved phase, suspended matter (SPM)) and secondly to understand the intrinsic dynamics and specificity of the system. Numerous sampling campaigns have been held between years 2002-2006 focusing on both wastewater treatment plant effluents and surfacewater.

2-Material and methods

2-1-Study area

The Seine River, which flows out onto the north-western European continental shelf, has a macrotidal estuary, of which 120 km are under a dual marine-river influence (Guezennec et al., 1999). The watershed of the Seine estuary is 79,000 km²; it represents about 25% of the French population and 40% of the French economic activities. The river estuary is characterized by a turbidity maximum zone (TMS) which is a zone of maximum turbidity specific of estuaries, ranging between freshwaters which are heavily charged with suspended material and marine salt water Guezennec et al. (1999). For more than 10 years, screening programs have focused on the Seine hydrosystem (Programs “SEINE-AVAL” (<http://seine-aval.crihan.fr/webGIPSA>), “PIREN-SEINE” (<http://www.sisyphe.jussieu.fr/internet/piren>)). These works have pointed out a chronic state of contamination for a large scale of pollutants: PAHs (Cailleaud et al.,

2007), PCBs (Cailleaud et al., 2007; Bodin et al., 2007), steroids (Labadie and Budzinski, 2005) and more recently pharmaceutical compounds (Tamtam et al., 2007; Togola and Budzinski, 2007). Furthermore, several interdisciplinary studies have revealed that genotoxic effects (Cachot et al., 2006; Rocher et al., 2006; Rombke et al., 2007) and reprotoxic effects (Minier et al., 2000; Peck et al., 2007) occur in the Seine hydrosystem.

2-2-Sampling campaigns

Several campaigns were carried out during the years 2002-2006 and aimed to characterize effluents loads and surface waters. Semi-monthly follow-up was held throughout the year 2002-2003, they focused on 4 points the Seine estuary (Poses, Elbeuf, Rouen, Honfleur) and in the same time on the 3 main wastewater treatment plants (WWTP of Elbeuf, Rouen and Tancarville) (IS1). Further sampling campaigns were also carried out in May 2005 and February 2006. Moreover, sampling campaigns were especially conducted at Honfleur (Kp350). Besides these samplings, 2 sampling campaigns were carried out in a fixed point at Honfleur (Kp350) in May 2004 (tidal coefficients (71), (74)) and June 2004 (tidal coefficients (63), (64)) and had for objective to study the variation of concentrations and potential transfer mechanisms of APEO metabolites during a tidal cycle. 2 campaigns were also conducted in the marine estuary in June 2003 and November 2004 (IS1). At each point, 2 samples were taken: the first one in the sub-surface (0.1 m depth) and the second one in the bottom of the water column.

After sampling, the unfiltered water was stored, in amber glass bottles (which has been previously washed with acid reagents and heated at 450°C for 6 hours) in a cooler at 4°C until analysis. Sample treatment occurred in the first 48 hours following the sampling in order to prevent biodegradation phenomena.

2-3-Standards and Reagents

Unlabeled p-n-nonylphenol (98%+, p-n-NP), p-n-nonylphenol monoethoxylate (95%+, p-n-NP₁EO), nonylphenoxyacetic acid (ring chain isomers) (98%+, 4-NP₁EC) were purchased from Promochem. (Molsheim, France) (100 µg.ml⁻¹ in nonane, respectively). 4-nonylphenol (100%, 4-NP, technical), 4-nonylphenol-monoethoxylate (99.5%, 4-NP₁EO) and 4-nonylphenol-diethoxylate (99.5%, 4-NP₂EO) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). The spiked solutions were prepared in methanol at concentrations of 1µg.ml⁻¹ of each compound.

Methanol (MeOH) was for the analysis of pesticide residues from Merck (VWR international, Strasbourg, France). Dichloromethane (DCM) was for organic residue analysis from J.T.Baker; water used for LC/MS analysis was from JT Baker (Atlantic Labo, Bruges, France). All the above solvents were used without further purification. Water used for solid phase extraction was Evian™ water in glass bottles and has been tested for low level of NP before (<5 ng.l⁻¹) (France Boisson, France).

Hydrochloric acid (minimum purity 37%) was purchased from VWR international (Strasbourg, France). Ammonium acetate (minimum purity 98%) was purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). All the chemicals were tested for background levels for the compounds of interest.

Due to the ubiquitous occurrence of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates, materials in plastic and detergents, glassware was chosen to avoid contamination of the sample. Furthermore, all the glassware and sampling apparatus required special treatment prior to use. All the glassware was washed and then heated at 450°C for 6h prior to use. Whatman GF/F glass fibre filters (pore size 0.7 µm) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France) were also heated at 450°C for 6 h prior to use. 200 mg Bondelut® C18 cartridges were purchased from Varian (Courtabœuf, France).

2-4-Extraction procedures

The protocols have been published previously (Pan et al., submitted; Lardy-Fontan et al. submitted). Briefly, between 1 l and 4 l of water samples were filtered through GF/F glass fiber filters. The treatment of the dissolved phase occurred in the 48 hours following the sampling in order to prevent biodegradation phenomena. The extraction was made by solid phase extraction (SPE) on Bondelut® C₁₈ cartridges (200 mg, 3 cc, Varian). The elution was achieved with 5 ml of a mixture of methanol/dichloromethane (50/50; v/v). The extracts were evaporated under a nitrogen flux prior to LC-ESI-MS analysis (SIM) (100 µl to 300 µl final extracts).

The suspended matter materials were stored at -20°C until the analysis. After freeze-drying, the samples were extracted by microwave assisted extraction MAE with 40 ml of a mixture of methanol/dichloromethane (3/1; v/v). The raw extracts were then filtered and reconcentrated to a few millilitres using RapiVap® (Bioblock, Fontenay sous bois, France). They were then redissolved in 60 ml of Evian® water (pH 2) to undergo a purification step according to the same C₁₈ cartridge protocol as the dissolved phase. Identification and quantification were performed by reversed phase liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry, in SIM mode (Agilent technologies 1100 series LC-MSD, Palo alto, USA).

The HPLC separation was achieved on a 3.5 µm, 150 × 2.1 mm i.d. C18 reversed-phase column (Zorbax-SB, Agilent, USA) and the same kind of guard column with gradient elution procedure. The injection volume was set at 5 µl, and the flow rate was 0.15 ml.min⁻¹. Detection was carried out using an Agilent 1100 series LC/MSD mass selective detector equipped with an electrospray interface in Single Ion Monitoring (SIM) mode. NP, OP, NP₁EC were detected under negative ionization (NI) conditions as [M-H]⁻, m/z 219, 205, 277 respectively. NP₁EO and NP₂EO were detected under positive ionization (PI) conditions as [M+NH₄]⁺ and [M+Na]⁺, m/z 282 and 331 respectively (Pan et al., submitted).

2-5-Quality Assurance /Quality Control

All the chemicals and solvents were tested for background levels for the compounds of interest. Due to the ubiquitous occurrence of alkylphenols in plastics and detergents, glassware and sampling apparatus require special treatment prior to use. All the glassware was washed and then heated at 450°C for 6 h prior to use.

The quantification was performed by an external calibration. Each series of injection was preceded by the injection of an analyte mixture (at known concentrations) from which a 5 point quadratic calibration curve was established ($R^2 > 0.99$). Moreover, a pseudo-unknown standard solution was also injected during each sequence in order to make sure of the linearity and sensitivity of the LC-MS. To each extraction series a protocol blank was joined in order to show evidence of contamination during the different analytical steps. Small amounts of 4-NP has been quantified in some cases (< 30 ng), while for the other analytes blank signals were absent. Moreover, spiked water, which follows all the experimental procedure, was joined to each extraction series. Reported concentrations were corrected for the blank values and the recoveries. Developed analytical methodologies show recovery rates upper than 80% with relative standard deviation of 20%, satisfactory repeatability and reproducibility. Furthermore, optimized methodology displays good sensitivity 1-5 ng.l⁻¹ for the dissolved phase, tens ng.g⁻¹ for suspended solids (Pan et al., submitted; Lardy-Fontan et al., submitted).

3-Results and discussion

3-1-Occurrence of NPEOs in WWTP

3-1-1Temporal trends in the Occurrence of NPEO in WWTPs effluents

Concerning the dissolved phase, results show variations of the concentrations (ng.l⁻¹) according to the station, the period of sampling and the compound considered by a factor from 10 to 200 (IS2). The 4-NP₁EC is the major compound of the dissolved phase with maximum concentrations of 11,637 ng.l⁻¹ in July 2003 for the WWTP of Elbeuf, 6,138 ng.l⁻¹ in July 2002 for the WWTP of Rouen and 7,384 ng.l⁻¹ in July 2003 for the WWTP of Tancarville. It shows amplitudes equal to a factor of 10 between the concentrations of the hottest months (July) and those of the coldest months (February). The 4-NP₁EC results from the aerobic biological breakdown of NPEOs, which is thermo-dependent (Di Corcia et al., 1998). This seems to confirm the existence of intrinsic seasonal dynamics of WWTPs, which have been highlighted before (Ahel, 1994; Tanghe et al., 1998). The concentrations of other metabolites are weaker, between 8 and 768 ng.l⁻¹ for the 4-NP₁EO, between 2 and 437 ng.l⁻¹ for the 4-NP₂EO and between 39 and 627 ng.l⁻¹ for 4-NP. Concerning the suspended solids, the concentrations vary from several hundreds of ng.g⁻¹ to several tens of µg.g⁻¹ (2,070-20,599 ng.g⁻¹ at the WWTP of Elbeuf, 508-15,041 ng.g⁻¹ at the WWTP of Rouen and 2,100-23,047 ng.g⁻¹ at the WWTP of Tancarville). In May 2005, the dissolved phase is predominant and represents of effluent contamination,

depending on the compound. On the contrary, its part decreases to ,in February 2006 (Figure 1). It may be assumed that due to high flows arriving in the WWTP, the hydraulic residence time, which is a prevalent factor for the elimination rate of organic compounds as for APEOs in WWTPs (Langford et al., 2005; Bruchet and Janex-Habibi, 2007) was shorter. Consequently the efficiency of processes could be significantly lowered and allowed the loads of less purified water to the system (characterized by high levels of 4-NP).

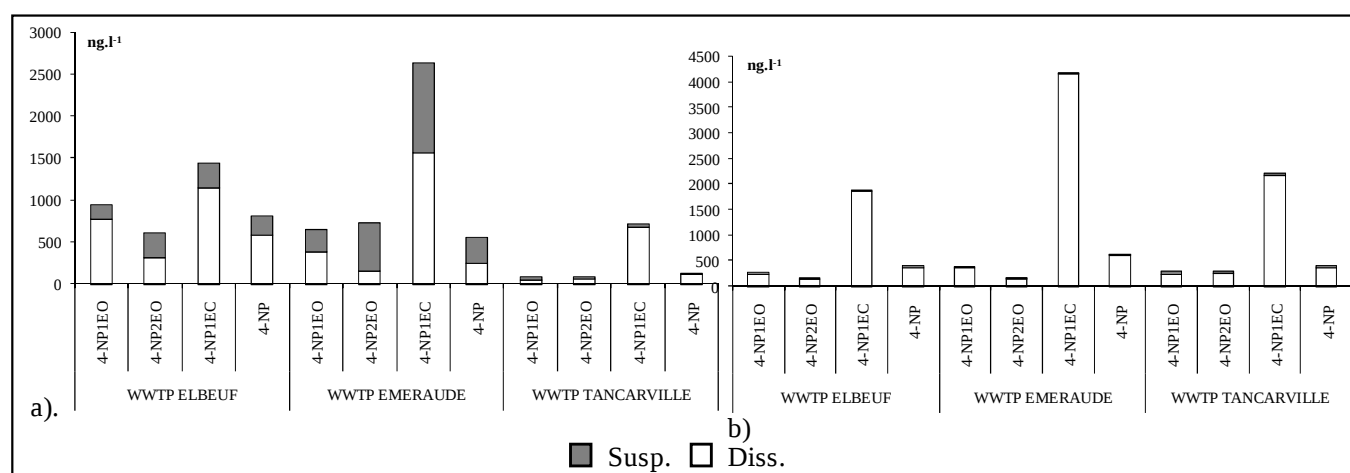


Figure 1: Distribution of NPEO in WWTP effluents: Part of each phase in the total concentration (expressed in ng.l^{-1}), in 2 seasons. a) Winter, February 2006 (wet conditions); b) Spring, May 2005 (dry conditions).

3-2-Fate and Occurrence of APEO metabolites in the Seine estuary

3-2-1 Fate and occurrence of APEO metabolites in the fluvial estuary

a) Temporal trends

As shown in IS3 the dissolved phase is dominated by 4-NP₁EC throughout the estuary and whatever the season (with the exception of February 2006 as discussed in the previous section) with concentrations of hundreds to thousands of ng.l^{-1} (IS3). The seasonal trends are significant for 4-NP₁EC with higher concentrations observed in the summer months, which is consistent with previous works (Li et al., 2004a; Li et al., 2004b) (IS3). Wang et al. (2006) concluded that the formation of 4-NP₁EC was due to both phenomena: biodegradation and photooxydation processes, clearly dependent on the season. 4-NP₁EO, 4-NP₂EO and 4-NP are quantified at all the stations during all the sampling periods. Their concentrations are lower by a factor of around ten than 4-NP₁EC concentrations, with concentrations ranging from tens to hundreds of ng.l^{-1} .

Concerning the suspended solid phase contamination, it can be ascertained that, in most cases, 4-NP is the predominant form in the solid phase with higher concentrations of more than $\mu\text{g.g}^{-1}$, followed by 4-NP₁EO and 4-NP₂EO with concentrations between tens to thousands of ng.g^{-1} . As stated

before and as shown in Figure 2, there is a variability in the occurrence of NPEOs in the Seine estuary. By adjusting the total concentration (expressed in ng.l^{-1}) by the flow (at Poses station), the quantity of NPEO metabolites which enter the estuary can be estimated (expressed in kg.d^{-1}) (Figure 2). Of course, the fact that longer chain ethoxymers have not been measured has to be taken into account. It leads to the underestimation of the quantity of NPEOs entering the system. It appears that the fluctuations of measured concentrations at Poses cannot be exclusively explained by flow (alternation of low water and swelling) but in a part by the variation of quantity of NPEOs and metabolites entering the system. The quantity fluctuates with an amplitude of 7 (Figure 2). Several hypotheses may be put forward: firstly, the fluctuation of uses (pesticide spreading, industrial production dynamics) which induces variations of the load to WWTPs and aquatic systems; secondly, the existence of punctual, sporadic loads to the system; thirdly, the seasonal dynamics of WWTPs upstream of the estuary (WWTPs of Achères and Colombes) and their dysfunctioning period.

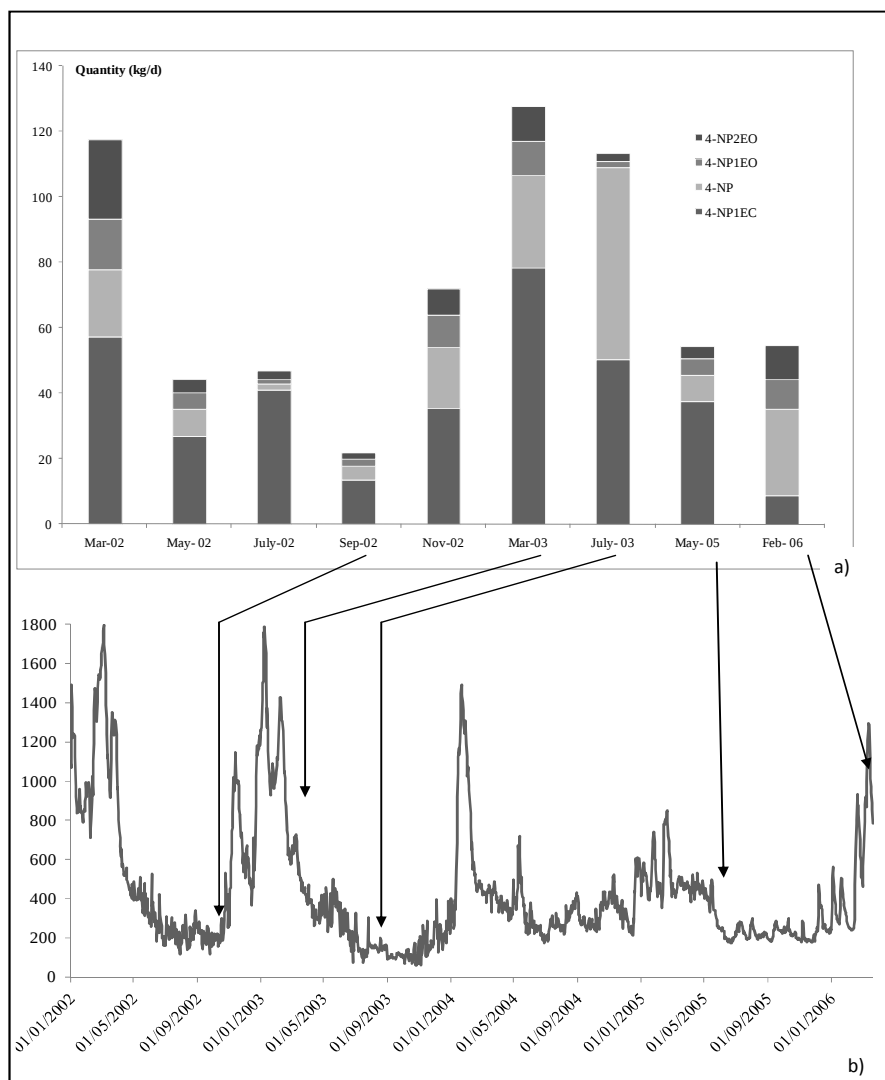


Figure 2: Quantity (kg.day^{-1}) of APEO entering the Seine estuary at Poses level, temporal trends (2002-2006) (a). Measured flow ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$) at Poses dam all through the studied period (b).

a) Fate in the estuary

The concentrations of NPEO metabolites in the dissolved phase fluctuate in function of the sampling period (Figure 3a). Firstly, it appears that global contamination of the dissolved phase is significantly upper in May 2005 than in February 2006. In May 2005, the dissolved phase is dominated by 4-NP₁EC (685 to 1,128 ng.l⁻¹), followed by 4-NP₁EO and 4-NP₂EO (59 to 200 ng.l⁻¹) and finally 4-NP (161 to 311 ng.l⁻¹). It appears that the amplitude of concentrations is around a factor of 2, the concentrations are constant throughout the estuary. In February 2006, the situation is very different. In this case, the dissolved phase is dominated by 4-NP (338 to 107 ng.l⁻¹), followed by 4-NP₁EC (123 to 181 ng.l⁻¹), 4-NP₁EO and 4-NP₂EO with concentrations around tens of ng.l⁻¹. Once more the concentrations are constant throughout the estuary with an amplitude of concentrations around a factor of 2. If we compare the contamination levels of both campaigns, it can be observed that the rules of dilution phenomena (decreasing in the concentrations for all the compounds) are not respected, the observations held in February are unusual in terms of distribution with 4-NP which is the predominant compound of the dissolved phase. In February 2006, the sampling campaign followed a swelling (flow value ~600 m³.s⁻¹). In consequence a further hypothesis can be put forward to explain such situation. Firstly, this swelling was the first since 2004, consecutively the swelling of the catchment area (spreading sludges, agricultural uses) should have been very efficient in bringing NPEO metabolites to the system, especially high levels of 4-NP. Secondly, it is well known that when WWTPs are confronted with high flows, the hydraulic residence time in the sewage is shorter, in consequence the removal rates are lowered. It can reasonably be assumed that the specific contamination profile of February's waters should be largely explained by such phenomena. In fact, upstream of Poses Dam, are located WWTPs which are in charge of the treatment of the raw waters of the Paris area (urban area of more than 15 millions inhabitants) among which the WWTP of Achères (2,100,000 Equivalent inhabitants) and the WWTP of Colombes (240,000 Equivalent inhabitants), it can be assumed that, during rainy seasons, they release untreated waters to the Seine River, which can explain the low level of 4-NP₁EC (which is a biodegradation product generated during WWTP processes). Thirdly, it can be assumed that both hypotheses have been emphasized by the season conditions (low temperatures (6°C), short spell of sunshine) which are not favorable for efficient degradation phenomena (Staples et al., 1999; Ahel et al., 2003).

In both campaigns, we can observe the predominance of 4-NP in the solid phase (2,015 to 832 ng.g⁻¹ in May 2005; 1,153 to 232 ng.g⁻¹ in February 2006), followed by 4-NP₁EO and NP₂EO (1,237 to 350 ng.g⁻¹ in May 2005; 1,079 to 180 ng.g⁻¹ in February 2006); 4-NP₁EC is below our detection limit in most cases (tens ng.g⁻¹). In both campaigns, we can observe a dilution phenomenon along the estuary (decrease of concentration in ng.g⁻¹ d.w) (IS3, Figure3b). Meanwhile, if we look at the part of each phase in the total concentration of 4-NP in the sampling campaign of May 2005 (Figure 3c), we can observe an increase of the contribution of the suspended solids phase: less than 10% to more than 30%

(less than 5% to more than 25% in February 2006) along the estuary with the increase of the total suspended solids (TSS).

To go further with the study of the fate of NPEOs in the estuary and especially the trends in the concentrations from the upstream part to the downstream part, some more hypotheses can be put forward. Even if the principal load is from the Paris area, it can be assumed that watershed contributions participate in the chronic state of contamination throughout the estuary and compensate the degradation phenomena which may occur in the estuary by continuous loads of “fresh” APEO metabolites. Furthermore, as suggested by several authors (Wang et al., 2006; Wang et al., 2007) degradation (biotic as well as abiotic) phenomena are reduced by the presence of TSS. As the load of TSS increases through the estuary, it can be assumed that the degradation rate decreases from Poses to Honfleur.

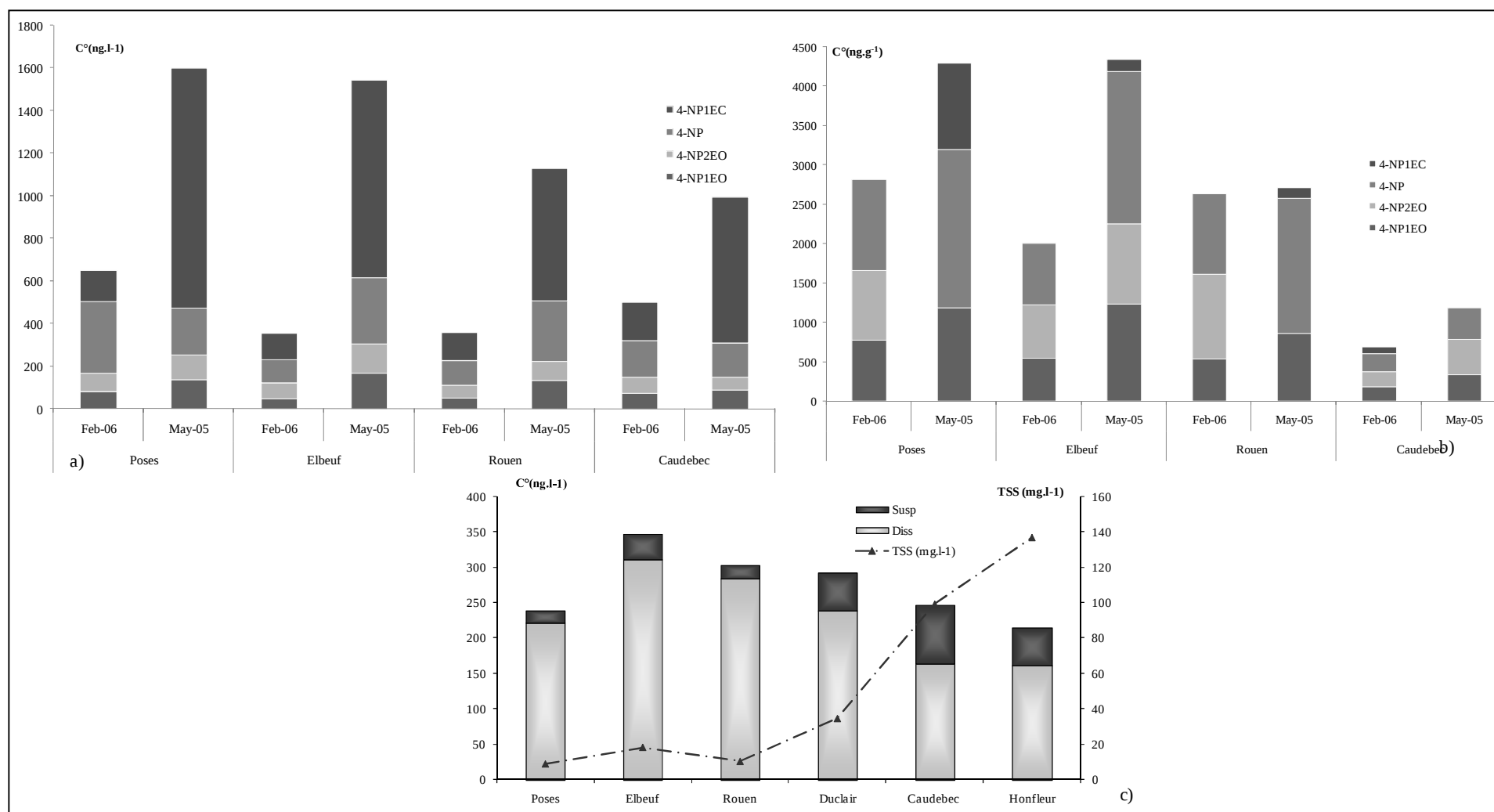


Figure 3: Occurrence and fate of NPEO metabolites throughout the Seine estuary in May 2005 and February 2006.

- a) Concentrations (expressed in ng.l^{-1}) of the dissolved phase in NPEO metabolites
 b) Concentrations (expressed in ng.g^{-1} d.w.) of the suspended matter phase in NPEO metabolites
 c) Part of each phase (dissolved and solid phases) to the total contamination of the water column by NPEO metabolites

3-2-2 Fate and occurrence of APEO metabolites: the key point of Honfleur

Because of its particular location in the estuary, the site of Honfleur has been more deeply investigated (in fact, it is a transition point from the fluvial estuary to the marine estuary).

a) Temporal trends

As said before, 4-NP₁EC is predominant with concentrations of more than hundreds of ng.l⁻¹ in any cases (sum of the dissolved phase and suspended solids). 4-NP is quantified at concentrations between 62 and more than 684 ng.l⁻¹, which represents a significant load to the marine system (Figure 4). A five-fold fluctuation of the concentrations can be observed (February 2003 compared to July 2003) which is not surprising considering the fluctuations of NPEOs entering the system and the seasonal trends that have been presented in the previous section (Figure 4). No decreasing in the contamination is observed in 2005.

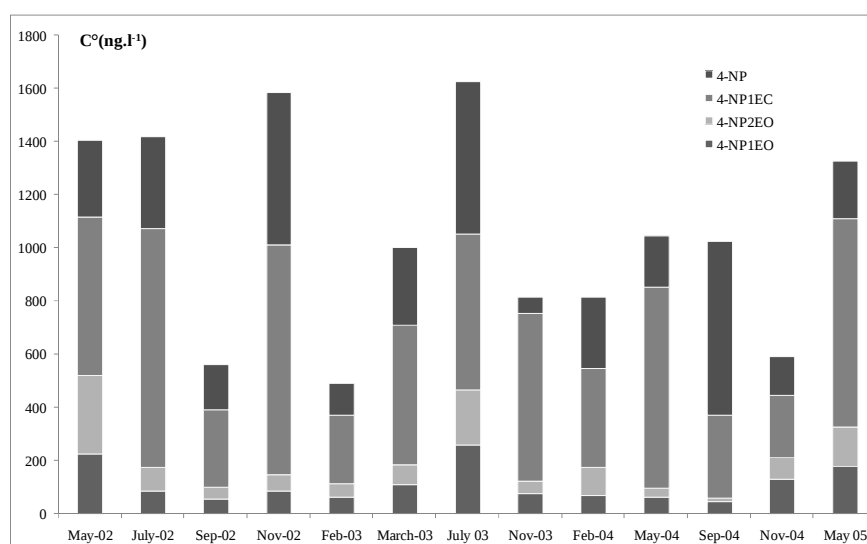


Figure 4: Concentrations (sum of suspended solid+dissolved phase, ng.l⁻¹) of nonylphenolic compounds at Honfleur level, temporal trends (2002-2005).

b) Tidal cycle

As it was difficult to highlight transfer phenomena, a focus on a small scale of time (a tidal cycle) was performed. First, it can be observed that the variations of concentrations follow the salinity gradient: highest concentrations are observed for the lowest salinity (Figure 5). It is interesting to note the two opposite tendencies observed in May 2004 and June 2004. In May, the highest concentrations were obtained for surface water with a maximum concentration of almost 2,500 ng.l⁻¹. On the contrary in June, bottom water seems to be more contaminated with a maximum concentration of 1,800 ng.l⁻¹. Here, we can notice, an abnormally contaminated marine point (June 2004), it can be assumed that it was a consequence of a handing-over in the suspension of sediments which can be related to biological

activities (bioturbation), frequent dredges occurring in the estuary. In May, the flow value was $508 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ and in June the flow was $243 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, in consequence the dilution phenomena cannot explain the observed trends. In June the water temperature was higher than in May (20°C in June, 15°C in May), in consequence it can be assumed that biodegradation phenomena were more efficient in June; in fact biodegradation efficiency is controlled by temperature and thus affect biodegradation rates of NPEOs. Furthermore, in June the sunlight period is longer and the sunlight intensity stronger, in consequence it can be assumed that photodegradation phenomena, susceptible to occur in the superficial layer of the water column, were more efficient and explain the higher level of NPEO metabolites in the bottom water by comparison of the subsurface water.

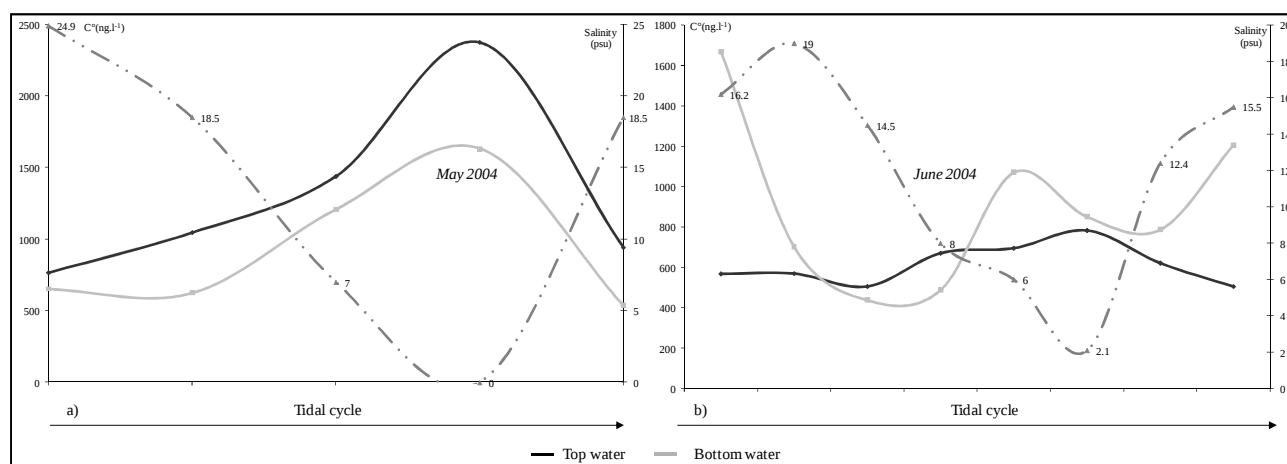


Figure 5: Occurrence and fate of nonylphenolic compounds during a tidal cycle, at 2 levels of the water column: subsurface water (0.1 m depth) and bottom water, at Honfleur.

a) Concentrations of NPEO metabolites in May 2004. Total concentrations (sum of all the quantified nonylphenolic compounds in both dissolved and suspended phases) are expressed in $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$. b) Concentrations of NPEO metabolites in June 2004. Total concentrations (sum of all the quantified nonylphenolic compounds in both dissolved and suspended phases) are expressed in $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$.

3-2-3 Fate of NPEO metabolites in the Seine marine estuary

In the marine estuary, the main phenomenon which proceeds is dilution (Figure 6). This phenomenon is more obvious for the 4-NP₁EC, with a correlation of more than 90% between the measured concentrations and salinity. For the other compounds, the correlations are less strong (such as for 4-NP with a correlation of 55%), which let think that the degradation phenomena initiated in the estuary continue, but in a less efficient way. Some studies showed that the rates of degradation NPEOs and their metabolites in the marine environment could be weaker than in brackish waters (Mann and Boddy, 2000). Moreover, it can be supposed that sedimentation phenomena occur at the mouth of the estuary.

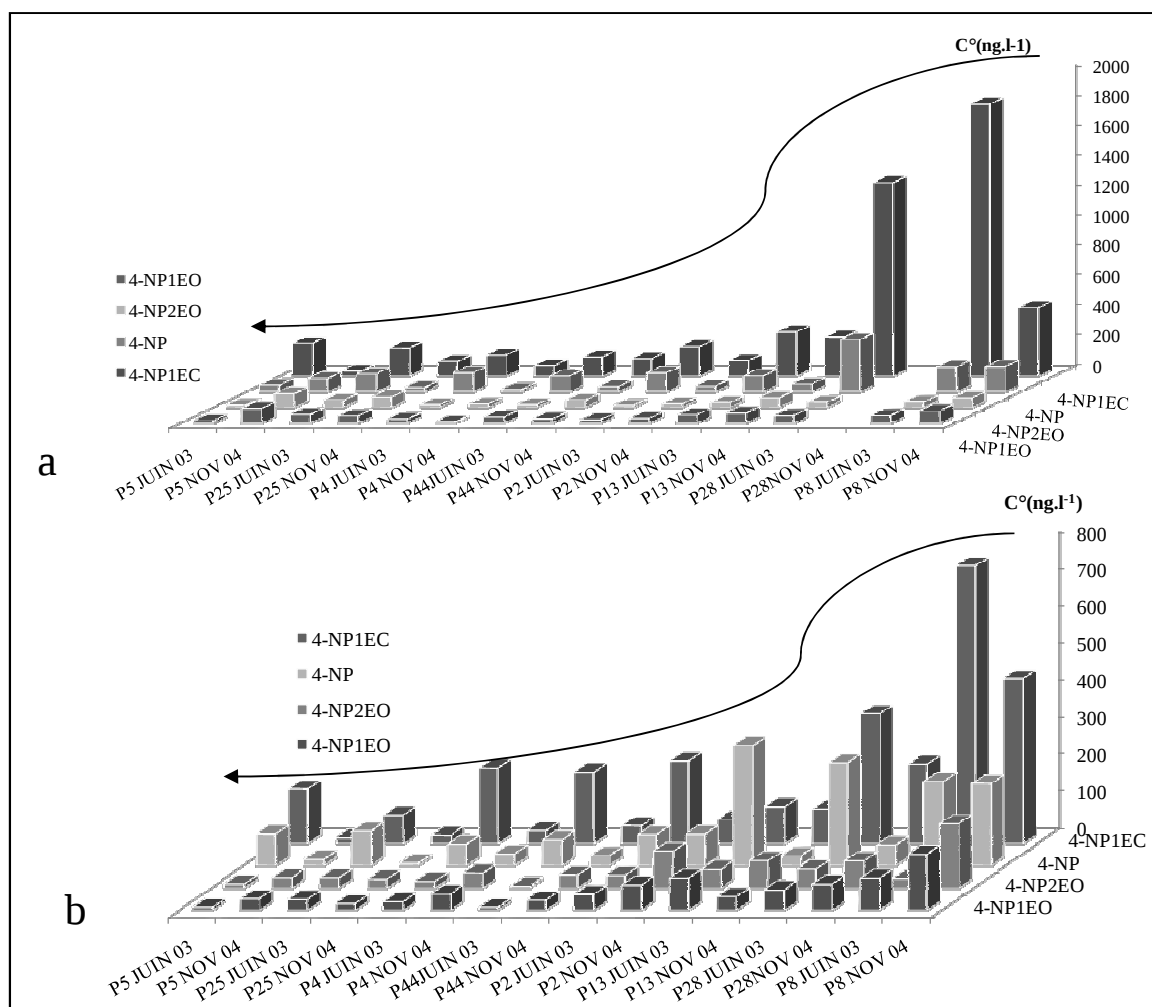


Figure 6: Fate and occurrence of the nonylphenolic compounds in the marine estuary in 2 seasons July 2003 and November 2004.

- a) Fate of NPEOs in the surface part of the water column. Concentrations (sum of suspended solids and dissolved phases) are expressed in ng.l^{-1} .
- b) Fate of NPEOs in the bottom part of the water column. Concentrations (sum of suspended solids and dissolved phases) are expressed in ng.l^{-1} .

4-Conclusions and perspectives

This research study presents 5 years of follow-up work on the state of contamination of the Seine estuary in NPEOs. This work makes it possible to conclude in favour of a chronic contamination of the Seine estuary by the degradation metabolites of NPEOs in both dissolved and suspended solids phases. If it is compared with the tendencies measured by other research studies carried out on European estuaries (Kvestak et al., 1994; Kvestak and Ahel, 1994; Blackburn et al., 1999; Jonkers et al., 2003; Jonkers et al., 2005a; Jonkers et al., 2005b; Weigel et al., 2005; Vethaak et al., 2005), it can be observed that this estuary presents the same profile of contamination in terms of distribution as well as of quantification. However, certain specificities should be noted. It appears there is an intrinsic dynamic of the Seine estuary strongly linked to the upstream part of the Seine. Indeed, works of

this extent (period of study, frequency of sampling) are not numerous. Even if a restriction of uses occurred in January 2005, it does not appear for the moment that it is reflected in the french natural environment. It is obvious that NPEOs are still very largely employed in France. In the Seine estuary, the average measured values are lower than the environmental quality standard (EQS-AA 0.3 $\mu\text{g.l}^{-1}$) come into effect with the adoption of the Water European Framework Directive. However, that does not mean that there are no chemical risks for organisms exposed to NPEOs and their metabolites in the Seine Estuary.

Aknowledgments

The authors wish to thank the Seine Aval program, the Region Aquitaine and the ORQUE project for research fundings. The authors are grateful to the Seine Navigation Service (Service de la Navigation de la Seine, île Lacroix, Rouen, France) for its technical support during the five years of sampling work in the Seine estuary. The authors want also to acknowledge the French Ministry of Research for the PhD grant of S. Lardy-Fontan.

Bibliography

Ying, G.-G., Williams, B. and Kookana, R. (2002) Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environment International* 28(3), 215-226.

Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A.F. and Viana, M.T. (2006) Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific review. *Applied Ecology and Environmental Research* 4(1), 1-25.

Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E. and Lester, J.N. (2008) Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*.

R M Harrison, R.E.H. (1999). *Chemistry*, R.S.o. (ed), p. 151 pages

Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L. and Wenzel, A. (2003) Endocrine disruptors in the environment-(IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 75, 631-681.

Mills, L.J. and Chichester, C. (2005) Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment* 343(1-3), 1-34.

Ribeiro, C., Pardal, M.A., Martinho, F., Margalho, R., Tiritan, M.E., Rocha, E. and Rocha, M.J. (2008a) Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*, 1-11.

Chen, B., Duan, J.C., Mai, B.x., Luo, X.J., Yang, Q.S., Sheng, G.Y. and Fu, J.M. (2006) Distribution of alkylphenols in the Pearl River Delta and adjacent northern South China Sea, China. *Chemosphere* 63(4), 652-661.

Jonkers, N., Laane, R.W.P.M., de Graaf, C. and de Voogt, P. (2005a) Fate modeling of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch Scheldt and Rhine estuaries: validation with new field data. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 62(1-2), 141-160.

- Jonkers, N., Laane, R.W.P.M. and De Voogt, P. (2003) Fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in two Dutch estuaries: Evidence of biodegradation in the field. *Environmental Science and Technology* 37(2), 321-327.
- Jonkers, N., Laane, R.W.P.M. and de Voogt, P. (2005b) Sources and fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch coastal zone of the North Sea. *Marine Chemistry* 96(1-2), 115-135.
- Chen, B., Mai, B.-X., Duan, J.-C., Luo, X.-J., Yang, Q.-S., Sheng, G.-Y. and Fu, J.-M. (2005) Concentrations of alkylphenols in sediments from the Pearl River estuary and South China Sea, South China. *Marine Pollution Bulletin* 50(9), 993-997.
- Zoller, U. (2006) Estuarine and coastal zone marine pollution by the nonionic alkylphenol ethoxylates endocrine disrupters: Is there a potential ecotoxicological problem? *Environment International* 32(2), 269-272.
- Li, D., Kim, M., Oh, J.-R. and Park, J. (2004a) Distribution characteristics of nonylphenols in the artificial Lake Shihwa, and surrounding creeks in Korea. *Chemosphere* 56(8), 783-790.
- Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H. and Kannan, N. (2008) Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea. *Chemosphere* 71(6), 1162-1172.
- Ribeiro, C., Tiritan, M.E., Rocha, E. and Rocha, M.J. (2008b) Seasonal and Spatial Distribution of Several Endocrine-Disrupting Compounds in the Douro River Estuary, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1-11.
- Xu, J., Wang, P., Guo, W., Dong, J., Wang, L. and Dai, S. (2006) Seasonal and spatial distribution of nonylphenol in Lanzhou Reach of Yellow River in China. *Chemosphere* 65(9), 1445-1451.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N. and Marcomini, A. (2007) Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International* 33(7), 929-936.
- Guezennec, L., Lafite, R., Dupont, J.P., Meyer, R. and Boust, D. (1999) Hydrodynamics of suspended particulate matter in the tidal freshwater zone of a macrotidal estuary (the Seine Estuary, France). *Estuaries* 22(3 A), 717-727.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K. and Budzinski, H. (2007) Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoida, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70(2), 270-280.
- Bodin, N., Abarnou, A., Fraisse, D., Defour, S., Loizeau, V., Le Guellec, A.M. and Philippon, X. (2007) PCB, PCDD/F and PBDE levels and profiles in crustaceans from the coastal waters of Brittany and Normandy (France). *Marine Pollution Bulletin* 54(6), 657-668.
- Labadie, P. and Budzinski, H. (2005) Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381(6), 1199-1205.
- Tamtam, F., Lebot, B., Eurin, J., Mercier, F., Tiphagne-Larcher, K., Desportes, A. and Chevreuil, M. (2007) Sources and fate of two antibiotics in the river Seine: Oxolinic acid and sulfamethoxazole. Etude des sources et du devenir de deux antibiotiques dans les eaux de la Seine: L'acide oxolinique et le sulfamethoxazole 38(2), 155-167.
- Togola, A. and Budzinski, H. (2007) Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388(3), 627-635.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D. and Budzinski, H. (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79(3), 257-267.

- Rombke, J., Hempel, H., Scheffczyk, A., Schallnass, H., Alvinerie, M., Lumaret, J.P. and Koschorrek, J. (2007) Development and application of a standardized test system for the dung beetle species (*Aphodius constans*) to assess the ecotoxicity of veterinary pharmaceuticals. *Entwicklung und Einsatz eines standardisierten Labortests für Dungkafer (Aphodius constans) zur Prüfung der Ökotoxizität von Veterinärpharmaka* 19(3), 197-205.
- Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M.H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., Budzinski, H., Pottier, D., Andre, V., Lebailly, P. and Cachot, J. (2006) Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquatic Toxicology* 79(1), 65-77.
- Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquené, G., Godefroy, D., Burgeot, T. and Leboulenger, F. (2000) Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research* 50(1-5), 373-377.
- Peck, M.R., Labadie, P., Minier, C. and Hill, E.M. (2007) Profiles of environmental and endogenous estrogens in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere* 69(1), 1-8.
- Pan.X., Lardy-Fontan S., Budzinski H. Determination of nonylphenol ethoxylate metabolites in river water and sewage treatment plant effluents by solid-phase extraction, high performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. submitted to *Analytical Bioanalytical Chemistry*.
- Lardy-Fontan S., Pan.X., Budzinski H. Analysis of alkylphenol polyethoxylates metabolites in suspended solids from the Seine estuary by focused microwave-assisted extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography- electrospray mass spectrometry. submitted to *Analytical Bioanalytical Chemistry*.
- Di Corcia, A., Costantino, A., Crescenzi, C., Marinoni, E. and Samperi, R. (1998) Characterization of recalcitrant intermediates from biotransformation of the branched alkyl side chain of nonylphenol ethoxylate surfactants. *Environmental Science and Technology* 32(16), 2401-2409.
- Ahel, M.G., W. and Koch, M. (1994) Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment — I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat. Res.* 28(5), 1131-1142.
- Tanghe, T., Devriese, G. and Verstraete, W. (1998) Nonylphenol degradation in lab scale activated sludge units is temperature dependent. *Water Research* 32(10), 2889-2896.
- Bruchet, A. and Janex-Habibi, M.L. (2007) Fate of anthropogenic micropollutants during wastewater treatment and influence on receiving surface water, pp. 387-397.
- Langford, K.H., Scrimshaw, M.D., Birkett, J.W. and Lester, J.N. (2005) Degradation of nonylphenolic surfactants in activated sludge batch tests. *Water Research* 39(5), 870-876.
- Li, Z., Li, D., Oh, J.R. and Je, J.G. (2004b) Seasonal and spatial distribution of nonylphenol in Shihwa Lake, Korea. *Chemosphere* 56(6), 611-618.
- Wang, L., Wu, Y., Sun, H., Xu, J. and Dai, S. (2006) Distribution and dissipation pathways of nonylphenol polyethoxylates in the Yellow River: Site investigation and lab-scale studies. *Environment International* 32(7), 907-914.
- Wang, L., Xin, Y., Sun, H.W., Huang, G.L. and Dai, S.G. (2007) Photodegradation of nonylphenol polyethoxylates in aqueous solution. *Huanjing Kexue/Environmental Science* 28(5), 969-974.
- Mann, R.M. and Boddy, M.R. (2000) Biodegradation of a nonylphenol ethoxylate by the autochthonous microflora in lake water with observations on the influence of light. *Chemosphere* 41(9), 1361-1369.
- Kvestak, R. and Ahel, M. (1994) Occurrence of toxic metabolites from nonionic surfactants in the Krka River estuary. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 28(1), 25-34.

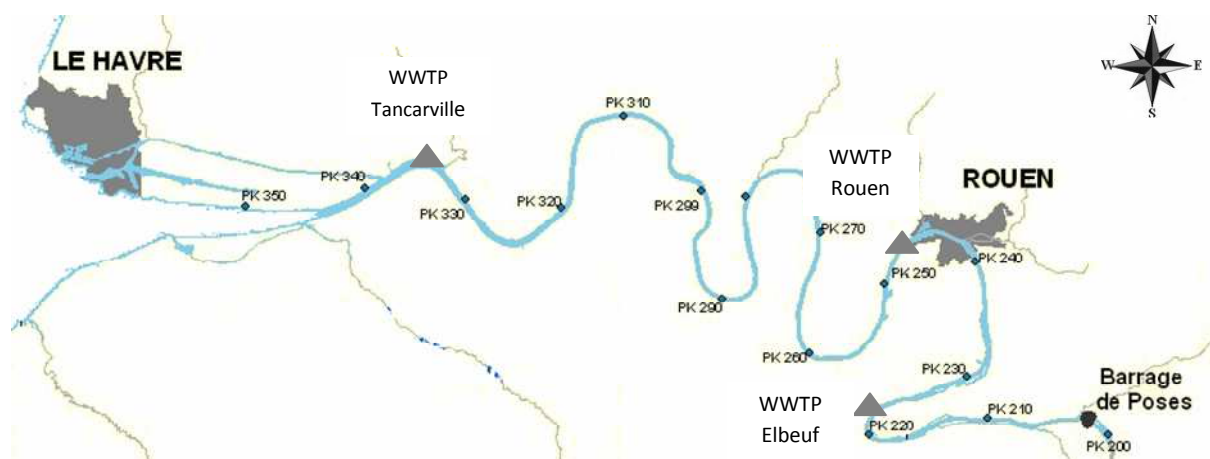
Weigel, S., Bester, K. and Huhnerfuss, H. (2005) Identification and quantification of pesticides, industrial chemicals, and organobromine compounds of medium to high polarity in the North Sea. *Marine Pollution Bulletin* 50(3), 252-263.

Kvestak, R., Terzic, S. and Ahel, M. (1994) Input and distribution of alkylphenol polyethoxylates in a stratified estuary. *Marine Chemistry* 46(1-2), 89-100.

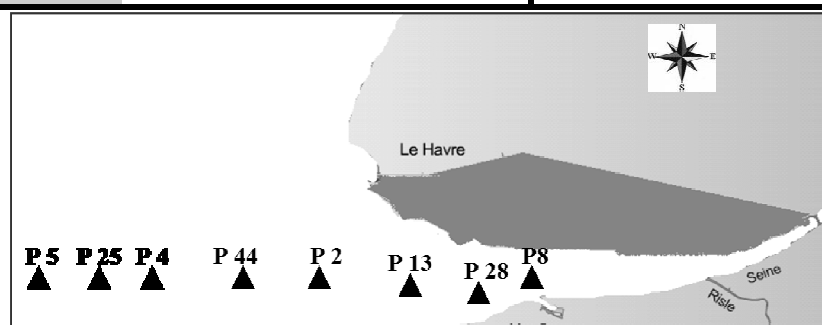
Blackburn, M.A., Kirby, S.J. and Waldock, M.J. (1999) Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 38(2), 109-118.

Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M. and Kuiper, R.V. (2005) An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 59(4), 511-524.

IS1: Presentation of the investigated sites on the Seine estuary over the period 2002-2006.



Sampling points Characteristics				Sampling periods
Poses	Kp 202	-	-	March 2002, May 2002, July 2002, September 2002, November 2002, March 2003, July 2003, May 2005, February 2006
Elbeuf	Kp 235	-	-	March 2002, May 2002, July 2002, September 2002, November 2002, May 2005, February 2006
Rouen	Kp 250	-	-	March 2002, May 2002, July 2002, September 2002, November 2002, March 2003, July 2003, May 2005, February 2006
Duclair	Kp 280	-	-	March 2002, May 2002, July 2002, September 2002, March 2003, May 2005, February 2006
Caudebec	Kp 310	-	-	March 2002, May 2002, July 2002, September 2002, November 2002, March 2003, July 2003, May 2005, February 2006
Tancarville	Kp 340	-	-	May 2002, July 2002, September 2002, November 2002, February 2006
Honfleur	Kp 350	-	-	March 2002, May 2002, July 2002, September 2002, November 2002, February 2003, March 2003, July 2003, November 2003, February 2004, May 2004, September 2004, November 2004, May 2005
WWTP Elbeuf	-	110,000 EI	Activated sludges (average load)	May 2002, July 2002, September 2002, November 2002, March 2003, July 2003, May 2005, February 2006
WWTP Rouen	-	550,000 EI	Activated sludges (under prolonged ventilation)	May 2002, July 2002, September 2002, November 2002, March 2003, July 2003, May 2005, February 2006
WWTP Tancarville	-	1800 EI	Activated sludges (under prolonged ventilation)	May 2002, July 2002, September 2002, November 2002, March 2003, July 2003, May 2005, February 2006



Points in the Marine Estuary.

: 2003, November 2004

IS2: APnEO metabolites in WWTP: Temporal trends in WWTP effluent contamination in the dissolved phase (expressed in ng.l⁻¹) and in the suspended matter phase (expressed in ng.l⁻¹). A five year survey.

		WWTP ELBEUF				WWTP ROUEN				WWTP TANCARVILLE			
		4-NP1EO	4-NP2EO	4-NP1EC	4-NP	4-NP1EO	4-NP2EO	4-NP1EC	4-NP	4-NP1EO	4-NP2EO	4-NP1EC	4-NP
May-02	Diss ng.l ⁻¹	136	400	862	81	306	172	800	176	<lod	<lod	307	59
	Susp ng.l ⁻¹	561	428	<lod	495	188	92	197	48	29	52	68	29
July-02	Diss ng.l ⁻¹	107	118	4,589	196	348	437	6138	461	31	22	3,943	211
	Susp ng.l ⁻¹	44	65	54	46	na	na	na	na	16	16	15	41,8
Sept-02	Diss ng.l ⁻¹	48	5	1,233	144	172	116	2,827	271	<lod	<lod	484	180
	Susp ng.l ⁻¹	29	11	102	79	38	7	19	28	6,2	10,7	27,2	29,3
Nov-02	Diss ng.l ⁻¹	45	2	886	142	193	28	2,937	195	8	8	1,01	121
	Susp ng.l ⁻¹	48	23	30	126	52	26	61	107	8	5,5	29	92
March-03	Diss ng.l ⁻¹	334	117	580	95	684	87	2,322	39	33	25	649	83
	Susp ng.l ⁻¹	30	5	42	64	36	5	48	113	42	36	66	68
July-03	Diss ng.l ⁻¹	114	31	11,637	439	422	104	6,07	395	61	23	7,384	480
	Susp ng.l ⁻¹	86	29	19	62	40	14	7	18	4	7	58	49
May-05	Diss ng.l ⁻¹	232	142	1,861	369	377	176	4,171	627	238	259	2,166	367
	Susp ng.l ⁻¹	40	20	37	36	9	3	6	6	62	44	44	57
Feb-06	Diss ng.l ⁻¹	768	311	1,137	576	379	152	1,555	244	46	48	677	102
	Susp ng.l ⁻¹	175	296	300	234	258	577	1,078	305	34	29	38	19

IS3 APEO metabolites in the Seine estuary: fate and occurrence.

Contamination in the dissolved phase (expressed in ng.l⁻¹) and in the suspended matter phase (expressed in ng.g⁻¹ d.w. and in ng.l⁻¹). A five year survey.

		March-02			May- 02			July-02			Sept-02			Nov-02			March-03			July-03			May-05			Feb-06		
		Diss. ng.l ⁻¹	Susp . ng.g ⁻¹	Susp . ng.l ⁻¹	Diss . ng.l ⁻¹	Susp. ng.g ⁻¹	Susp . ng.l ⁻¹	Diss. ng.l ⁻¹	Susp . ng.g ⁻¹	Susp . ng.l ⁻¹	Diss . ng.l ⁻¹	Susp . ng.g ⁻¹	Susp . ng.l ⁻¹	Diss . ng.l ⁻¹	Susp . ng.g ⁻¹	Susp . ng.l ⁻¹	Diss. ng.l ⁻¹	Susp . ng.g ⁻¹	Susp . ng.l ⁻¹	Diss. ng.l ⁻¹	Susp . ng.g ⁻¹	Susp . ng.l ⁻¹	Diss. ng.l ⁻¹	Susp . ng.g ⁻¹	Susp . ng.l ⁻¹	Diss . ng.l ⁻¹	Susp . ng.g ⁻¹	Susp . ng.l ⁻¹
POSES' DAM	NP1EO	155	1,320	39	100	1,720	42	61	1,560	13	117	28	1	141	490	20	167	520	22	60	2,367	56	136	1,181	18	80	773	76
	NP2EO	267	1,360	40	73	1,610	40	119	2,100	18	109	696	14	122	180	7	177	493	21	102	1,683	40	116	<lod	<lod	87	892	88
	NP1EC	718	<lod	<lod	745	<lod	<lod	2,072	4,130	35	766	2,653	52	538	1,000	40	1,441	<lod	<lod	2,913	<lod	<lod	1,128	1,102	10	146	<lod	<lod
	NP	203	1,960	57	121	4,220	104	14	9,770	82	195	4,083	80	205	2,520	101	288	5,453	232	3,264	4,922	122	221	2,015	18	338	1,153	113
	TSS mg.l ⁻¹	-	29.5		-	24.5		-	8.5		-	20.0		-	40.0		-	43.0		-	25.0		-	9.0		-	98.0	
ELBEUF	NP1EO	157	740	17	110	1,580	34	81	1,990	25	109	309	4	151	430	17	ns	ns	ns	ns	ns	ns	168	1,237	23	47	541	25
	NP2EO	254	840	20	72	1,070	23	163	3,420	42	135	479	7	114	240	9	ns	ns	ns	ns	ns	ns	138	1,013	19	75	682	32
	NP1EC	719	<lod	<lod	719	<lod	<lod	2,035	3,960	49	435	2,130	31	661	880	34	ns	ns	ns	ns	ns	ns	925	150	1	123	<lod	<lod
	NP	181	1,260	29	129	4,270	91	148	8,400	104	162	2,627	38	174	2,740	106	ns	ns	ns	ns	ns	ns	311	1,943	36	107	782	36
	TSS mg.l ⁻¹	-	23.5		-	21.5		-	12.5		-	14.0		-	39.0		-	-		-	-		-	18.0		-	47.0	
ROUEN	NP1EO	114	930	9	101	1,320	36	70	2,02	22	108	523	22	ns	ns	ns	145	1,14	24	ns	ns	ns	131	863	0	50	532	55

	NP2EO							0									7											
		200	1,310	12	62	98	27	136	2,880	32	145	706	30	ns	ns	ns	156	1,245	26	ns	ns	ns	90	<lod	<lod	61	1,079	111
		768	<lod	<lod	721	<lod	<lod	1,882	3,160	35	457	1,551	65	ns	ns	ns	1,549	<lod	<lod	ns	ns	ns	622	136	1	130	<lod	<lod
		167	3,410	32	116	1,020	28	132	7,100	78	206	1,602	67	ns	ns	ns	367	6,766	141	ns	ns	ns	285	1,714	18	115	1,028	106
		TSS mg.l-1	-	9.5	-	27.0	-	-	11.0	-	42.0	-	-	-	-	-	21.0	-	-	-	-	-	11.0	-	-	103.0	-	-
CAUD-EBEC	NP1EO	174	2,720	49	81	2,210	29	40,3	1,050	44	62	173	4	96	430	13	93	519	14	99	380	44	87	489	49	73	180	43
	NP2EO	255	3,280	59	36	520	15	55	1,230	51	64	114	2	74	190	6	102	250	7	37	283	35	59	350	35	76	193	46
	NP1EC	1,051	<lod	<lod	728	<lod	<lod	1531	1,860	77	651	986	20	473	1,040	31	1,403	<lod	0	1,397	<lod	<lod	685	<lod	<lod	181	83	20
	NP	241	4,330	78	108	1,340	26	94	2,820	117	113	1,370	28	159	4,560	135	221	5,182	143	24	1,572	189	164	832	83	170	232	56
	TSS mg.l-1	-	18.0	-	-	16.0	-	-	41.5	-	20.0	-	-	30.0	-	-	28.0	-	-	121.0	-	-	99.0	-	-	239.0	-	-
TANCA R-VILLE	NP1EO	ns	ns	ns	91	1,29	109	46	560	36	38	42	14	93	250	11	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	na	70	39
	NP2EO	ns	ns	ns	38	650	55	45	390	25	45	68	24	79	280	12	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	na	45	25
	NP1EC	ns	ns	ns	777	<lod	<lod	1168	1,010	65	506	<lod	<lod	592	640	27	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	na	15	8
	NP	ns	ns	ns	90	2,340	198	89	1,660	108	93	<lod	<lod	144	2,320	99	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	na	56	31
	TSS mg.l-1	-	-	-	-	84.6	-	-	64.8	-	-	347.0	-	-	43.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	558.0	-
HONF-LEUR	NP1EO	87	130	103	87	140	143	32	170	54	38	35	21	52	190	36	83	96	27	47	396	213	131	339	46	ns	ns	ns
	NP2EO	106	180	143	106	190	195	26	200	64	45	32	20	26	190	36	63	44	12	72	255	135	90	449	64	ns	ns	ns
	NP1EC	580	<lod	<lod	580	<lod	<lod	815	260	83	506	18	107	393	2,51	471	526	<lod	<lod	588	<lod	<lod	782	<lod	<lod	ns	ns	ns

[illegible]

Diss.: Dissolved phase ($<0.7 \mu\text{m}$); Susp.: Suspended solids phase ($>0.7 \mu\text{m}$); ns not sampled

Publication n° 7

**Sources des métabolites d'alkylphénol-polyéthoxylés en estuaire de Seine:
Identification and Caractérisation**

Sophie Lardy-Fontan, Hélène Budzinski*

Université Bordeaux 1, ISM-LPTC UMR 5255 CNRS
351 crs de la libération 33405 Talence Cedex

*Corresponding author. Tel.: 33 5 56 84 69 98 ; Fax: 33 5 56 84 69 98.

E-mail address: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Résumé :

Neuf tributaires, les trois principaux effluents de stations d'épuration et la Seine ont été examinés pour examiner la présence des métabolites d'APEO (4-NP1EO, 4-NP2EO, 4-NP et 4-NP1EC). Les APEO sont omniprésents dans les phases dissoutes et les phases solides en suspension. Bien que les tributaires et les effluents de stations d'épuration montrent une contamination significative par les APEO. La Seine est la source principale d'APEO pour l'estuaire de Seine avec plus de 95% des apports en APEO au système estuarien. Les pressions chimiques liées aux NPEO et à leurs métabolites ne semblent pas être liées à des tendances saisonnières. Selon les standards de qualité environnementale (EQS) fixés par la commission européenne, les eaux de la Seine présentent une qualité globalement satisfaisante. Néanmoins, un risque chimique lié à la présence d'APEO et de leurs métabolites dans l'estuaire de seine ne peut pas être totalement écarté.

Pour soumission à Environmental Science and Technology

Sources of Alkylphenol Polyethoxylates metabolites in the Seine estuary: Identification and Characterization

Sophie Lardy-Fontan, H       Budzinski*

Université Bordeaux 1, ISM-LPTC UMR 5255 CNRS
351 crs de la libération 33405 Talence Cedex

*Corresponding author. Tel.: 33 5 56 84 69 98; Fax: 33 5 56 84 69 98.

E-mail address: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Abstract

Nine tributaries, three main WWTP effluents and the Seine River have been checked for the presence of APEO metabolites (4-NP1EO, 4-NP2EO, 4-NP, 4-t-OP and 4-NP1EC). APEOs are ubiquitous in both dissolved phase and suspended solids. Although the tributaries and WWTP effluents display a significant contamination by APEOs; the Seine River is the principal source of APEOs in the Seine estuary with more than 95% of APEOs loads to the estuarine system. Chemical pressures linked with NPEOs and their metabolites do not seem to be seasonal dependent. The Seine River displayed a quality which appeared to be on the whole satisfactory, according to average annual environmental quality standard. Nevertheless, a chemical risk related to the presence of APEOs and their metabolites in the Seine Estuary cannot be totally discarded.

1-Introduction

Alkylphenol polyethoxylates (APEOs) are a widely used family of surfactants among which 80% are nonylphenol polyethoxylates (NPEOs). APEOs are used in complex mixtures for a wide range of applications: industrial, institutional and domestic ones (Renner, 1997); giving them lots of dispersion possibilities through the environment, especially the aquatic system where more than 70% of them are expected to be released (Renner, 1997). APEOs display complex biodegradation schemes which lead to the formation of: parent compound nonylphenol (NP) and octylphenol (4-t-OP); shorter chain ethoxymers (alkylphenol monoethoxylate (AP1EO), alkylphenol diethoxylate (AP2EO)) and carboxylated derivatives (alkylphenoxycetic acid (APEC) and carboxyalkylphenoxyacetic acid (CAPEC)). Furthermore, their physicochemical properties suggest broad dispersion capabilities (Ying et al., 2002). APEOs are widespread contaminants of aquatic systems as they have been found from groundwater to marine water at concentrations ranging from ppt to ppb as well as in suspended solids and sediments (Ying et al., 2002; Soares et al., 2008). Several of the by-products are persistent and of

ecotoxicological concern, considering their potential for endocrine disruption (Soares et al., 2008). Because of this ecotoxicological concern, they have been banned or are under restriction in European countries (Soares et al., 2008).

The goal of this work was to establish an assessment of the loads of APEOs entering the Seine estuary system, to characterize the contribution of sources from a qualitative and quantitative point of view; for this purpose both dissolved phase and suspended solids were considered. Furthermore, one aim was to study the seasonal dynamics of the Seine estuary catchment area.

2-Material and Methods

2-1-Sampling area

The Seine estuary is the natural discharge system of the Seine River which flows through the north-west of France. It runs on a catchment area of more than 72,000 km², characterized by high demographic pressure (more than 17 million inhabitants, thus 25% of the French population), high industrial pressure (more than 14,000 registered industries) and high agricultural pressure (more than 104,000 agricultural exploitations, 34 % of the French production of cereals). The catchment area of the Seine estuary (Figure1) is drained by 9 major tributaries which display various anthropogenic pressures (IS1).

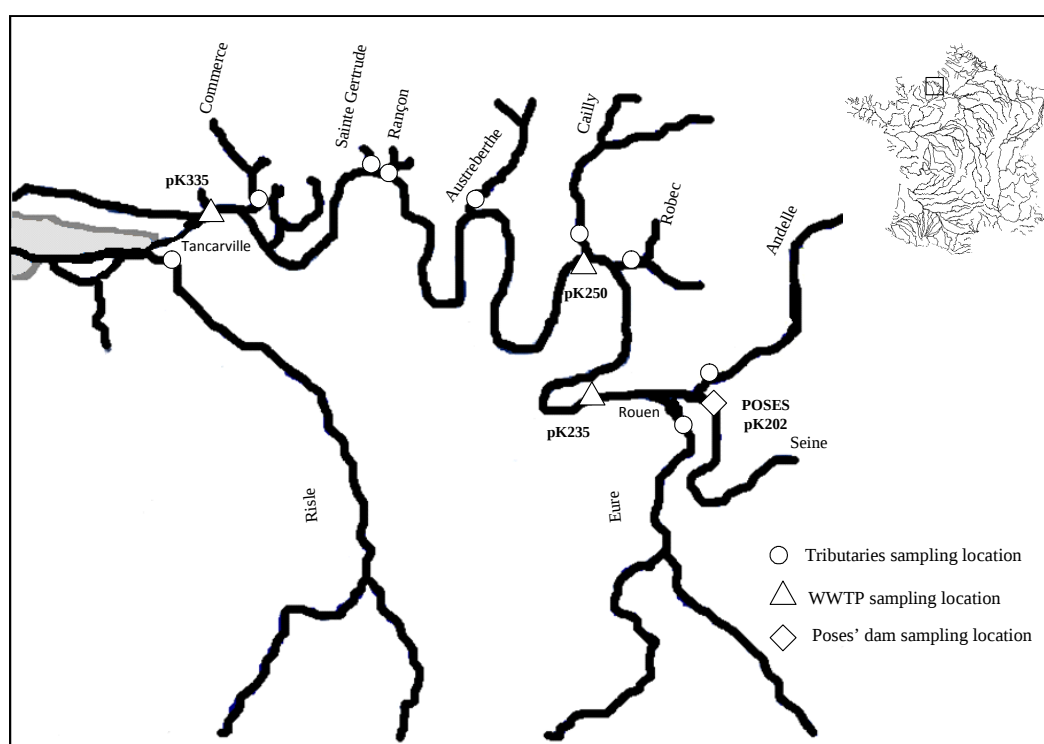


Figure 1: Studied area and sampling locations.

2-2-Sampling strategy

3 sampling campaigns were held: in May 2005 under springlike conditions, in February 2006 under winter conditions (after a rise in the water level) and in July 2006 under summer conditions (lowest water flows). During each campaign, samplings were conducted and were related to: 1) the 9 principal tributaries of the Seine estuary at their junction with the Seine (Figure 1 and IS 1); 2) the Seine at Poses' dam (entrance point of the estuarine system), 3) the effluents of the 3 principal wastewater treatment plants of the Seine estuary, namely the WWTPs of Tancarville (1,800 equivalent inhabitants), Rouen (550,000 equivalent inhabitants) and Elbeuf (110,000 equivalent inhabitants). Spot samplings were performed, manually, from bridges and banks. Samples were kept, in glass amber bottles (previously washed and heated at 450°C, 6 hours), then stored in a cooler at 4°C until analytical treatment.

2-3-Standards and Reagents

Unlabeled p-n-nonylphenol (98%+, p-n-NP), p-n-nonylphenol monoethoxylate (95%+, p-n-NP₁EO), nonylphenoxyacetic acid (ring chain isomers) (98%+, 4-NP₁EC) were purchased from Promochem (Molsheim, France) (100 µg.ml⁻¹ in nonane, respectively). 4-nonylphenol (100%, 4-NP, technical), 4-nonylphenol-monoethoxylate (99.5%, 4-NP₁EO) and 4-nonylphenol-diethoxylate (99.5%, 4-NP₂EO) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The spiked solutions were prepared in methanol at concentrations of 1 µg.ml⁻¹ of each compound. Methanol (MeOH) was used for the analysis of pesticide residues and was purchased from Merck (VWR international, Strasbourg, France). Dichloromethane (DCM) was for organic residue analysis and came from J.T.Baker; water used for LC/MS analysis was from JT Baker (Atlantic Labo, Bruges, France). All the above solvents were used without further purification. Water used for solid phase extraction was Evian® water in glass bottles (France Boisson, France). Hydrochloric acid (purity 37%) was purchased from VWR international (Strasbourg, France). Ammonium acetate (minimum purity 98%) was purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France); trifluoroacetic acid (ACS, minimum purity 99%) was purchased from Acros (Noisy le grand, France). All the chemicals were tested for background levels for the compounds of interest.

Due to the ubiquitous occurrence of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates (in plastic materials and detergents), glassware was chosen to avoid contamination of the sample. Furthermore, all the glassware and sampling apparatus required special treatment prior to use. All the glassware was washed and then heated at 450°C for 6 hours prior to use. Whatman GF/F glass fibre filters (pore size 0.7 µm) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France) and were also heated at 450°C for 6 hours prior to use. 200 mg Bondelut® C18 cartridges and 500 mg HF-Bondelut® PSA were purchased from Varian (Courtabœuf, France).

2-4 Analytical methodologies

The protocols have been published previously (Pan et al., submitted; Lardy-Fontan et al., submitted). Briefly, between 1 l and 4 l of water samples were filtered through GF/F glass fiber filters. The treatment of the dissolved phase occurred in the 48 hours' following the sampling in order to prevent biodegradation phenomena. After acidification (pH 2, HCl), water was passed through Bondelut® C₁₈ cartridges (200 mg, 3 cc, Varian). The elution was achieved by 5 ml of a mixture of methanol/dichloromethane (50/50; v/v). Solid materials were stored at -20°C until freeze-drying. Extraction was carried out by microwave assisted extraction MAE with a mixture of methanol/dichloromethane (40 ml; 3/1; v/v). The extracts were then filtered, evaporated to less than 500 µl and redissolved in 60 ml of water (pH 2) to undergo a purification step on C₁₈ cartridges. The extracts were evaporated and redissolved in methanol to a final volume of 100-200 µl.

Identification and quantification were performed with reversed phase liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry LC-ESI-MS, in Single Ion Monitoring mode (Pan et al., submitted).

2-5 Quality control

The quantification was performed by an internal calibration. To each extraction series a protocol blank was joined in order to show evidence of contamination during the different analytical steps. Small amounts of 4-NP has been quantified in some cases (<30 ng), while for the other analytes blank signals were absent. Moreover, spiked water (100 ng.l⁻¹, individual compound), which follows all the experimental procedure, was joined to each extraction series. Reported concentrations have been corrected for the blank value and the method recovery. Developed analytical methodologies show recovery rates upper than 80% with relative standard deviation of 20%, satisfactory repeatability and reproducibility. Furthermore, optimized methodology displays good sensitivity 1-5 ng.l⁻¹ for the dissolved phase, tens ng.g⁻¹ for suspended solids (Pan et al., submitted; Lardy-Fontan et al., submitted)

3-Results and discussion

3-1-WWTPs contamination

Table 1 sums up measured contamination of both dissolved and suspended solid phases by APEO metabolites (minimal and maximal values) in the 3 investigated WWTPs, in the course of the season. It highlights that dissolved phase contamination are dominated by 4-NP1EC which are the major NPEO metabolite whatever the season with concentrations of up to µg.l⁻¹; followed by 4-NP (average values up to hundreds of ng.l⁻¹). The suspended solid phase displays significant contamination between tens of ng.g⁻¹ to tens of µg.g⁻¹ depending on the WWTP and the season. By considering the TSS, the proportion of suspended solids in the global contamination varies between tens of ng.l⁻¹ for 4-NP1EO or 4-NP2EO to more than hundreds of ng.l⁻¹ for 4-NP1EC and 4-NP,

which can get to represent 50% of the global contamination of WWTP effluents, whatever the metabolites and the seasons. The increase of 4-NP1EC at the hottest time has to be noted. Such results are in accordance with bibliographic data which argue that seasonal trends in biodegradation phenomena affect both distribution and efficiency of WWTP processes (Ahel, 1994; Soares et al., 2008).

Table 1: Occurrence of NPEO metabolites in the dissolved phase and the suspended solid phase of the Seine estuary WWTP effluents.

	May 05		Feb 06		July 06	
	diss. ng.l ⁻¹	part. ng.l ⁻¹	diss. ng.l ⁻¹	part. ng.l ⁻¹	diss. ng.l ⁻¹	part. ng.l ⁻¹
4-NP1EO	232-377	62-9	46-258	34-258	56-1,417	24-1,048
4-NP2EO	142-259	3-44	48-311	29-377	<lod-129	18-103
4-NP1EC	1,861-4,171	6-54	677-1,555	38-1,078	2,558-4,851	<lod-32
4-NP	367-627	6-57	102-576	19-305	116-205	9-96

3-2-Tributaries contamination

In order to simplify the general scheme, the Seine River at Poses' dam was considered as a tributary of the Seine estuary. Table 2 shows the measured concentrations of APEO metabolites (dissolved phase, expressed in ng.l⁻¹) for each tributary at each season. There is a generalised contamination of the Seine catchment area by APEOs and their metabolites which emphasize the idea of a chronic state of contamination of the system although some restrictions in APEOs uses have taken place since 2005 (Soares et al., 2008).

The Seine River displays the highest contamination. 4-NP1EC is the major metabolite during the hottest season (with concentrations between 1,128 to 1,279 ng.l⁻¹), it could represent up to 90% of the contamination. On the contrary, its part decreases to less than 25% in February when 4-NP is the principal form with concentrations of up to 300 ng.l⁻¹. Such trends are in accordance with the fact that the Seine River is one of the most anthropized rivers in Europe and is the receptacle of around 25% of French industrial activities. Its contamination is in the same order of magnitude as those found in Asian, American and European Rivers (Ferguson et al., 2001; Jonkers et al., 2005a; Jonkers et al., 2005b; Chen et al., 2005; Peng et al., 2006; Benotti and Brownawell, 2007; Ribeiro et al., 2008; Soares et al., 2008).

The Eure River, the Commerce stream, the Cailly stream, the Austreberthe stream and the Risle River display moderate contamination profiles. The dissolved phase is dominated by 4-NP1EC (measured concentrations of 108 to 432 ng.l⁻¹, except 2 points at 6 and 36 ng.l⁻¹) which usually represents more than 50% of the contamination. They also exhibit 4-NP at concentrations closed or up to hundreds of ng.l⁻¹. Those systems are the ultimate gathering place of moderately impacted

catchment areas which exhibit some industrial and domestic influenced areas. Once more contamination profiles are in good agreement with catchment area specificities (IS1).

The Andelle River, the Rançon stream, the Sainte-Gertrude stream and the Robec stream display lowest contamination profiles. Although 4-NP1EC is quantified in some moderate extent (concentrations above 100 ng.l⁻¹), 4-NP is the predominant form with concentrations from 34 to 170 ng.l⁻¹. Compared to previous observations, the proportion of 4-NP1EO and 4-NP2EO also increases to get 50% of the contamination. These systems flow on small catchments areas which display weak anthropization, the hypothesis of various upstream sources of contamination may be put forward.

Table 2: Contamination profiles (dissolved phase < 0.7 µm) of the 9 tributaries and the Seine River.

Temporal trends of the distribution of APEO metabolites.

Seine River (Poses)					Eure				Commerce				Cailly				Austreberthe			
ng.l ⁻¹	May 05	Feb06	July06	Min-Max*	May05	Feb06	July06	Min-Max*	May05	Feb06	July06	Min-Max*	May05	Feb06	July06	Min-Max*	May05	Feb06	July06	Min-Max*
4-NP1EO	136	80	24	2 - 12 %	73	19	18	9 – 13 %	80	36	64	8 -13 %	30	9	181	4 – 28 %	10	2	21	3 – 10 %
4-NP2EO	116	87	8	1 - 13 %	43	16	3	2 – 8 %	42	18	18	3 – 7 %	35	8	83	4 – 18 %	30	1	3	1 – 9 %
4-NP1EC	1,128	146	1,279	22 - 95 %	250	108	121	46 – 71 %	392	233	417	53 – 73 %	69	86	252	35 – 39 %	268	6	432	30 – 87 %
4-NP	221	338	30	2 -52 %	178	75	28	16 – 34 %	122	151	77	13 – 34 %	63	117	128	20 – 53 %	41	11	40	8 – 55 %
4-t-OP	NA	26	<lod	-	NA	7	2	-	NA	36	25	-	NA	9	13	-	NA	1	<lod	-

Risle					Andelle				Rançon				Sainte Gertrude				Robec			
ng.l ⁻¹	May05	Feb06	July06	Min-Max*	May05	Feb06	July06	Min-Max*	May05	Feb06	July06	Min-Max*	May05	Feb06	July06	Min-Max*	May05	Feb06	July06	Min-Max*
4-NP1EO	69	15	40	3 -16 %	46	19	22	10 – 34 %	8	20	21	10 – 20 %	5	13	38	3 – 20 %	53	24	96	10 – 41 %
4-NP2EO	115	13	16	6 -27 %	48	9	1	2 -18 %	45	26	5	4 -57 %	11	10	12	5 – 6 %	94	16	29	6 – 48 %
4-NP1EC	155	36	115	30 – 45 %	86	24	8	13 – 32 %	<lod	<lod	6	0 – 5 %	15	<lod	37	0 -19 %	14	39	32	7 – 16 %
4-NP	85	58	84	20 – 48 %	93	136	34	34 – 72 %	26	59	77	33 – 71 %	149	159	105	55 – 87 %	35	170	78	18 – 68 %
4-t-OP	NA	9	<lod	-	NA	14	<lod	-	NA	11	3	-	NA	12	6	-	NA	9	<lod	-

Min-Max*: minimal and maximal contribution of each metabolite to the global contamination of dissolved phase

3-3-Partition between suspended solids and liquid phases

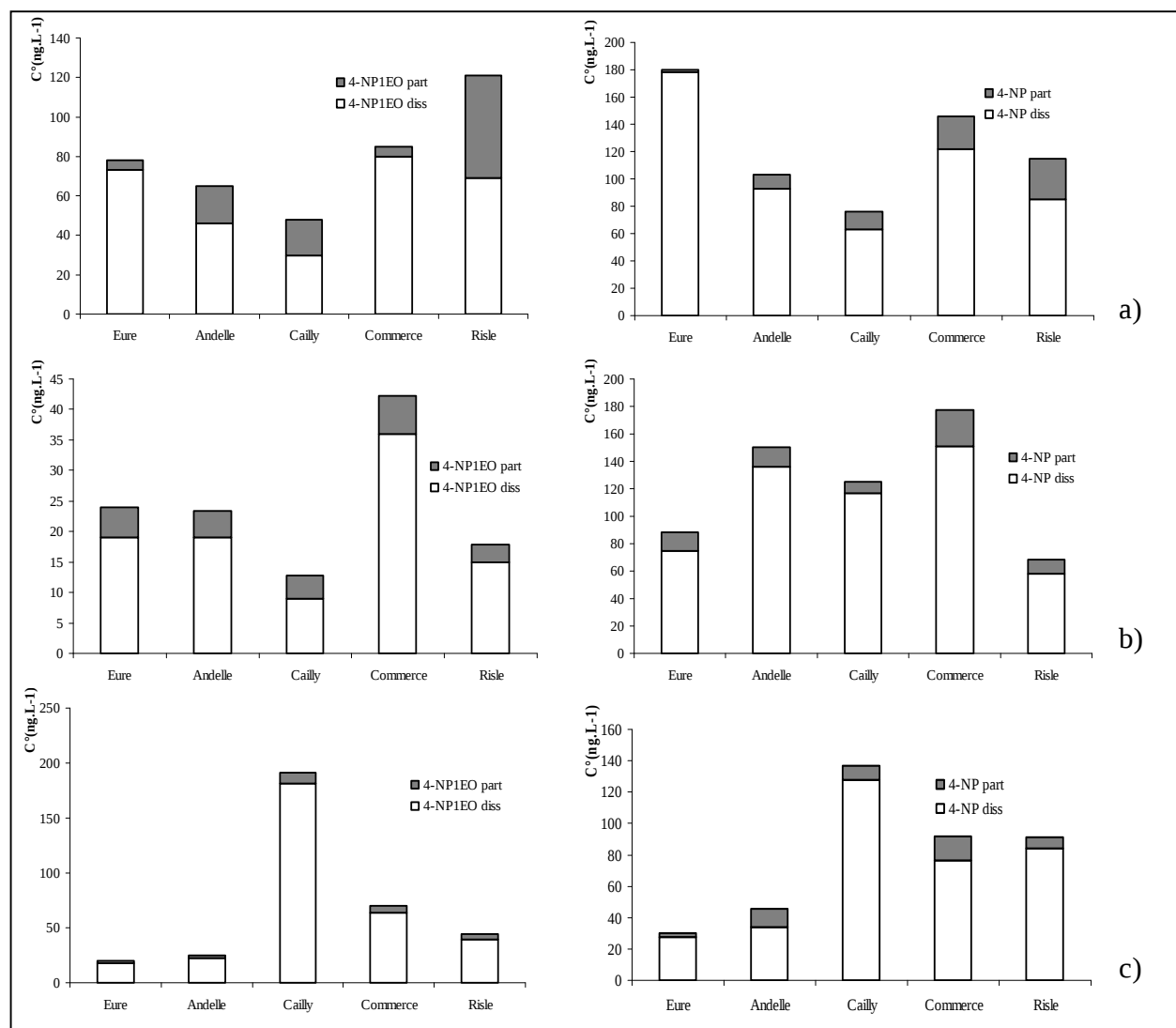


Figure 2: Part of each phase (dissolved phase and suspended matter phase) in the global contamination (expressed in ng.l^{-1}) of 5 tributaries of the Seine estuary by 4-NP1EO and 4-NP.

a) May 2005, b) February 2006, c) July 2006

In the past, the study of APEOs was restricted to the dissolved part of the aqueous phase. As highlighted in a previous section, significant loads of APEO metabolites *via* suspended solids are found in WWTP effluents. The issue of the role played by the suspended solid phase in natural systems obviously must be raised. Figure 2 presents the contribution of each phase to the global contamination of 5 tributaries (for 4 of them, insufficient suspended solid materials were obtained despite a sampling volume of 4 l; consequently the extraction could not be done) in the course of season (May 2005, February 2006, July 2006). Depending on the site and the season, particulate phase contamination is between 3 and 52 ng.l^{-1} for 4-NP1EO and 3 to 30 ng.l^{-1} for 4-NP. In most streams 4-NP1EO is the predominant form of NPEO metabolites before 4-NP. Contrary to effluents, 4-NP1EC is

under the limit of detection ($< \text{to tens ng.g}^{-1}$) whereas it is the predominant form in WWTPs. These results are in accordance with previous ones (Lardy-Fontan S.) which hypothesizes a punctual trapping of acidic forms. In fact, as it has been shown for acidic pharmaceuticals, acidic compounds did not adsorb to suspended solids due to the existence of negative charges at environmental pH (Ra et al., 2008). For NPEOs, suspended solids can represent up to 50% of the global contamination (Commerce stream, May 2005) even if average measures highlight values ranging from 10 to 30%. Isobe et al. (2001); Li et al. (2004), Patrolecco et al. (2006) highlighted the proportion of APEO metabolites sorbed to suspended solids which ranged from 2 to 60% depending on the compound and the season. In May 2005, the particulate organic carbon levels are comprised between $649 \mu\text{g.l}^{-1}$ at Poses dam to $4,309 \mu\text{g.l}^{-1}$ in the Risle stream, in February the POC levels are comprised between $1,950 \mu\text{g.l}^{-1}$ in the Risle stream to $5,250 \mu\text{g.l}^{-1}$ at Poses dam. At Poses dam (Seine River), the POC level increases by a factor of 8 between May and February, in the same manner the concentration of 4-NP (expressed in ng.l^{-1}) increase by a factor 6.5. In the same time, in the Risle stream the POC level decrease by a factor of 2 as well as the concentration of 4-NP. The highest contamination levels could be correlated with the highest organic carbon contents (Hou et al., 2006; Chen et al., 2006). In fact, it has been assumed that interaction with organic matter could play a significant role in sorption phenomena, especially for shorter chain ethoxymers. As it has been shown, suspended solids could play a significant role in the dispersion of APEOs in aquatic systems (Ra et al., 2008), and may be considered as a temporary well for the compounds. Furthermore, as it has been demonstrated, the sorption to suspended solids might affect bioavailability and toxicity: the toxicity of organic compounds could be reduced by sinking suspended solids or increased by serving as sources of contaminated food for aquatic species. Thus, Ra et al. (2008) has demonstrated that the toxicity of substituted phenols (octylphenol, pentachlorophenol) to *Daphnia magna* decreases by 36% and 22%, respectively, in the presence of suspended solids.

3-4-Seasonal trends

One of the aims of this work was to evaluate seasonal trends in the occurrence of NPEOs in the Seine estuary system. This work put forward a ratio based on the concentration of aerobic biodegradation metabolites of NPEO (4-NP1EC) divided by the sum of anaerobic metabolite of NPEOs (4-NP1EO+4-NP2EO) to assess trends in the degradation efficiency of the system ($R = [4\text{-NP1EC}] / [4\text{-NP1EO} + 4\text{-NP2EO}]$).

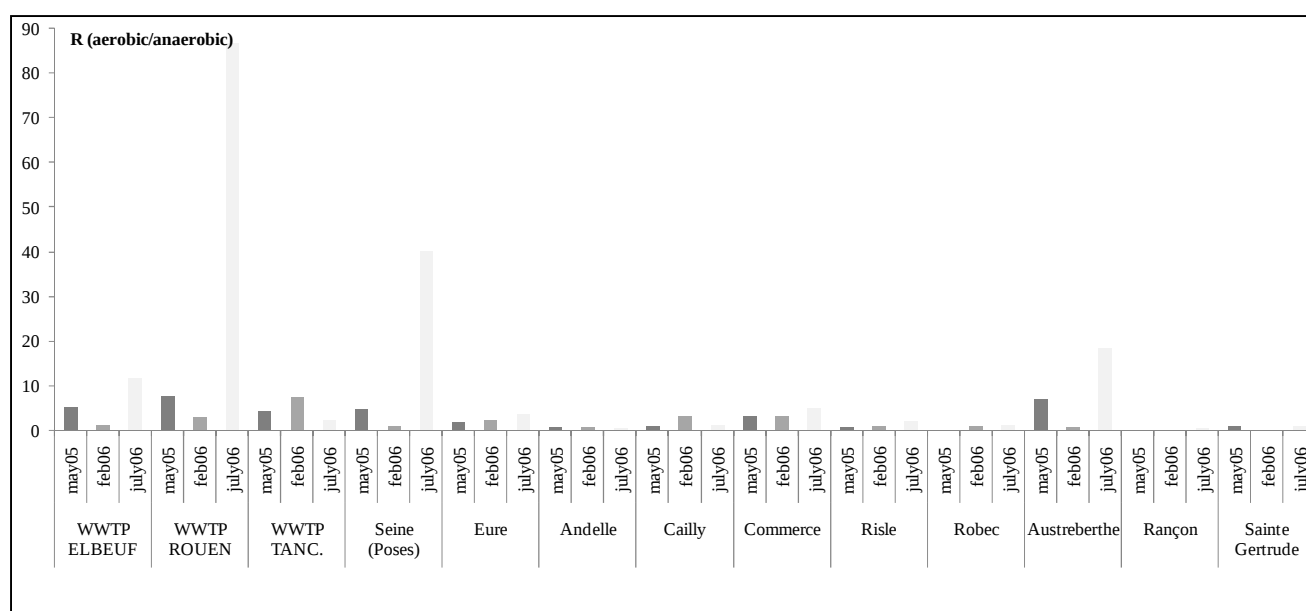


Figure 3: Seasonal trends in the contamination of the Seine catchment area. Proposition of a ratio aimed to estimate degradation scheme, $R = [4\text{-NP1EC}] / [4\text{-NP1EO} + 4\text{-NP2EO}]$.

Figure 3 presents the calculated ratio for the studied sources in the course of seasons. Whatever the sources, higher ratios are obtained in July, the hottest month (water temperature between 20 to 26°C, intensive sunshine period; TSS comprised between 3 to 50 mg.l⁻¹) and a lower ratio is observed in February (water temperature between 5 to 9°C, weak sunshine period, TSS comprised between 20 to 100 mg.l⁻¹); highlighting seasonal trends in the distribution of NPEO metabolites in the system. APECs formation occurred in both biological and abiological conditions Wang et al. (2007) and has been shown to be strongly dependent of physico-chemistry. Water temperature had been put in evidence as predominant parameter (Hayashi et al., 2005; Xu et al., 2006; Fu et al., 2007), highest temperature favours APEC formation as well as highest light intensity (Hayashi et al., 2005). Furthermore, the presence of dissolved organic matter and its quality, which led to the oxidation of terminal alcoholic group, improves the formation of carboxylated metabolites (Hayashi et al., 2005). On the contrary, the presence of high contents of suspended solids (as it was observed in February) has been shown to decrease APEO degradation and APEC formation. Seasonal trends in the distribution of NPEO metabolites exist in the Seine river catchments area.

3-5-Loads to the Seine estuary system

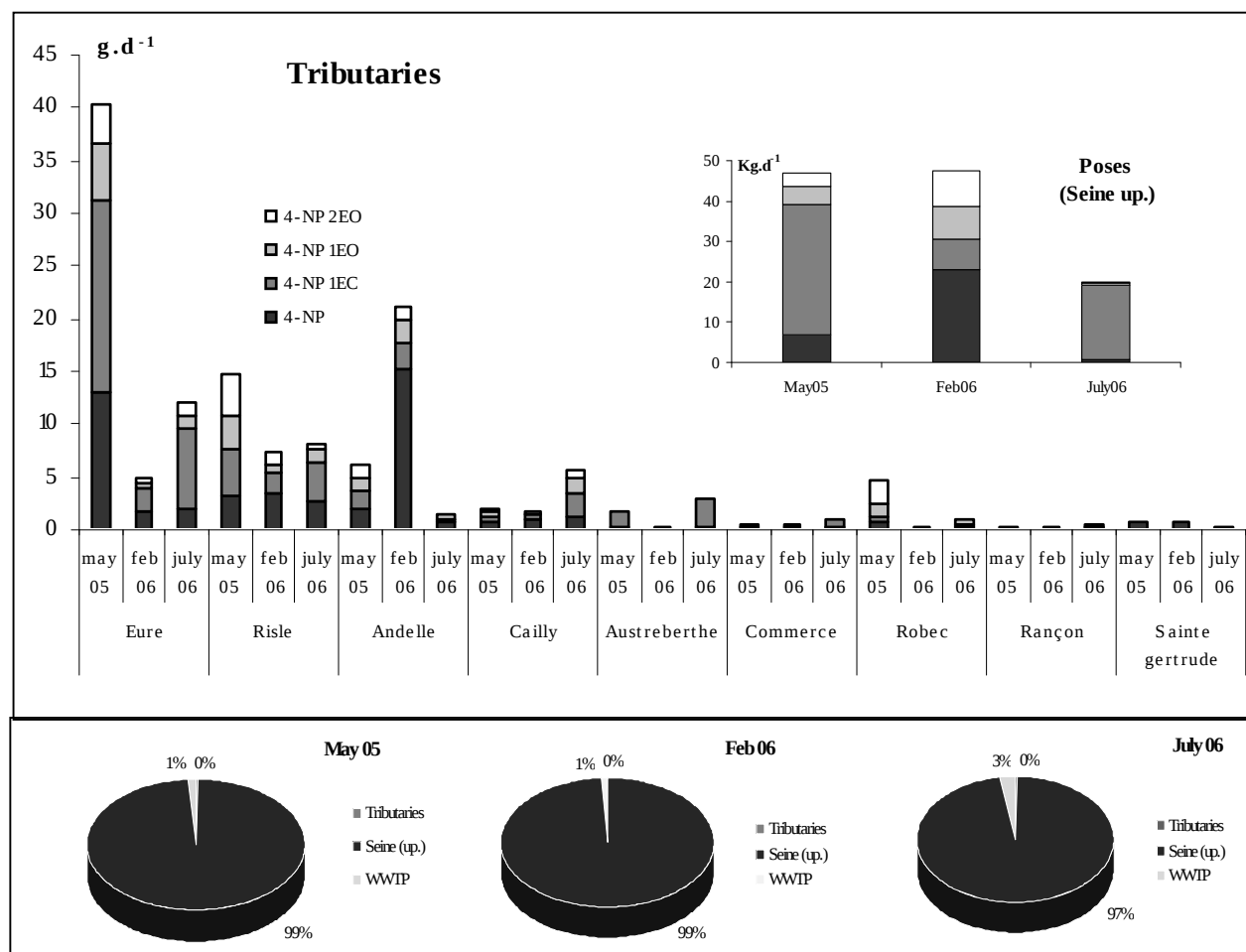


Figure 4: Loads of APEO in the Seine estuary in the course of seasons. Relative proportions of tributaries, WWTPs and the Seine River.

Another aim of this study was to evaluate the proportion of each source (The Seine River, the tributaries and the WWTPs) in the global contamination of the Seine estuary by NPEOs and their metabolites. Whereas taking into consideration water concentrations, it could be reliable to consider the flux of compounds (the quantity of the compound per unit of time), which takes into account flow variations. Figure 4 presents the loads of NPEO metabolites (the sum of the quantified metabolites) by the 9 tributaries and by the Seine at the Poses'dam, over the course of time. The Seine (upstream) is, by far, the principal contributor of the Seine estuary contamination with average loads of compounds ranging from 47.47 kg.d⁻¹ in February 2006 to 20.5 kg.d⁻¹ in July 2006. Regarding the tributaries, values are comprised between low g.d⁻¹ and 5 g.d⁻¹ for the smaller streams (namely Sainte-Gertrude, Rançon, Commerce, Robec, Cailly and Austreberthe streams) and between 3 g.d⁻¹ and 40 g.d⁻¹ for the Eure, Risle and Andelle Rivers. Whatever the season, the Seine represents from 97% (July 2006) to 99% (May 2005 and February 2006) of the global contamination entering the Seine estuary.

Surprisingly, WWTPs represent no more than 3% (maximum value, July 2006) of the contamination and the tributaries less than 1%.

Table 3: Flux of NPEO metabolites in the Seine Estuary, in the course of seasons.

g.d ⁻¹	Tributaries	Seine (up.)	WWTP
May 2005	71	46,959	487
February 2006	38	47,471	429
July 2006	33	19,870	515

Tributaries: Sum of the flux of the 9 tributaries

Table 3 presents the flux of NPEO metabolites in the Seine estuary by the 3 identified main sources. Inputs by the tributaries and the Seine River decrease by a factor of 2 between the first 2 campaigns (May 2005 and February 2006) and the last one (July 2006). On the contrary they are constant in WWTP effluents, with average values of 500 g.d⁻¹. As shown by previous works (Lardy-Fontan S., submitted), temporal trends exist in the Seine system (inter annual variations of a factor of 2 have been highlighted); as a consequence the trends observed in this work could be related to the intrinsic variability of the Seine basin. As it has been demonstrated by Quednow and Puttmann (2008) in the Hesse basin, trends to a decrease of the occurrence of APEOs and metabolites in European natural systems exist. It is assumed to be a consequence of the implementation of European Directive 2003/53/EG which restricts both the marketing and uses of nonylphenols. But as no decrease in WWTP loads, at the level of the Seine estuary, is observed, this hypothesis does not seem sufficient to explain observed trends. WWTPs located upstream of the sampling area might have been improved. In fact the improvement of processes could lead to an increase of WWTP efficiency and by way of consequence to a decrease of the loads of compounds through the system. The WWTP of Achères (2,100,000 Equivalent inhabitants), which is in charge of the treatment of 80% of Parisian waste water, had been under renovation works between November 2005 and April 2006 (which led to direct releases into the Seine River). By consequence, the hypothesis of abnormal loads to the system might be advanced and explained the trends to a decrease in contamination observed in February.

4-Conclusion

The Seine estuary, a natural discharge of the Seine River, displays a chronic state of contamination predominantly linked to the pressure of the Paris basin; the catchment areas of the Seine estuary show widespread contamination which do not impact the Seine estuary to a great extent. Chemical pressure linked to NPEOs and their metabolites does not seem to be seasonal dependent, in fact whatever the season, significant loads of NPEOs occur in the system. By comparing the levels measured during this study with the maximum average values fixed by the Water Framework

Directive for these molecules, it appears that, on the level of the catchment area of the Seine estuary, the surface water seemed to show a satisfactory quality in comparison with the reference level. The Seine River displays a quality which appears to be satisfactory even if it seems that in certain periods (whose cyclicity and duration were unspecified) the measured concentrations are higher than the average value fixed by the European Commission (330 ng.l⁻¹) as well as the predicted no effect concentrations (fresh waters). Nevertheless, a chemical risk related to the presence of APEOs and their metabolites in the Seine Estuary cannot be clearly highlighted.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support of the Seine Aval program and the the Region Aquitaine. The authors also want to thank the “Cellule Antipollution de Rouen” for their help in sampling achievement and Dr Henri Etcheber (DGO, Université Bordeaux1) for POC and DOC analysis. The authors wish to thank the French Research Ministry for the PhD grant of S. Lardy-Fontan.

Bibliography

- Renner, R. (1997) European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environ. Sci. Technol.* 31, 316A-320A.
- Ying, G.-G., Williams, B. and Kookana, R. (2002) Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environment International* 28(3), 215-226.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E. and Lester, J.N. (2008) Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*.
- Lardy-Fontan S. , P.X., Budzinski H. Analysis of alkylphenol polyethoxylates metabolites in suspended solids from the Seine estuary by focused microwave-assisted extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography- electrospray mass spectrometry. submitted to *Analytical Bioanalytical Chemistry*.
- Lardy-Fontan S. , P.X., Budzinski H. Determination of nonylphenol ethoxylate metabolites in river water and sewage treatment plant effluents by solid-phase extraction, high performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. submitted to *Analytical Bioanalytical Chemistry*.
- Ahel, M.G., W. and Koch, M. (1994) Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment — I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat. Res.* 28(5), 1131-1142.
- Lardy-Fontan S., A.S., Le Menach K., Peluhet L., Budzinski H. Fate and Occurence of Nonylphenol Polyethoxylates Metabolites in The Seine Estuary: A Fifth Year Monitoring Survey. submitted to *Chemosphere*
- Benotti, M.J. and Brownawell, B.J. (2007) Distributions of pharmaceuticals in an urban estuary during both dry- and wet-weather conditions. *Environmental Science and Technology* 41(16), 5795-5802.
- Jonkers, N., Laane, R.W.P.M., de Graaf, C. and de Voogt, P. (2005a) Fate modeling of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch Scheldt and Rhine estuaries: validation with new field data. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 62(1-2), 141-160.

- Jonkers, N., Laane, R.W.P.M. and de Voogt, P. (2005b) Sources and fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch coastal zone of the North Sea. *Marine Chemistry* 96(1-2), 115-135.
- Ribeiro, C., Pardal, M.A., Martinho, F., Margalho, R., Tiritan, M.E., Rocha, E. and Rocha, M.J. (2008) Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*, 1-11.
- Ferguson, P.L., Iden, C.R. and Brownawell, B.J. (2001) Distribution and fate of neutral alkylphenol ethoxylate metabolites in a sewage-impacted urban estuary. *Environmental Science and Technology* 35(12), 2428-2435.
- Chen, B., Mai, B.-X., Duan, J.-C., Luo, X.-J., Yang, Q.-S., Sheng, G.-Y. and Fu, J.-M. (2005) Concentrations of alkylphenols in sediments from the Pearl River estuary and South China Sea, South China. *Marine Pollution Bulletin* 50(9), 993-997.
- Peng, X., Wang, Z., Yang, C., Chen, F. and Mai, B. (2006) Simultaneous determination of endocrine-disrupting phenols and steroid estrogens in sediment by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1116(1-2), 51-56.
- Ra, J.S., Oh, S.Y., Lee, B.C. and Kim, S.D. (2008) The effect of suspended particles coated by humic acid on the toxicity of pharmaceuticals, estrogens, and phenolic compounds. *Environment International* 34(2), 184-192.
- Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A. and Takada, H. (2001) Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1041-1049.
- Li, D., Kim, M., Oh, J.R. and Park, J. (2004) Distribution characteristics of nonylphenols in the artificial Lake Shihwa, and surrounding creeks in Korea. *Chemosphere* 56(8), 783-790.
- Patrolecco, L., Capri, S., De Angelis, S., Pagnotta, R., Polesello, S. and Valsecchi, S. (2006) Partition of nonylphenol and related compounds among different aquatic compartments in Tiber river (central Italy). *Water, Air, and Soil Pollution* 172(1-4), 151-166.
- Hou, S.G., Sun, H.W. and Gao, Y. (2006) Sorption of small metabolites of nonylphenol polyethoxylates in single and complex systems on aquatic suspended particulate matter. *Chemosphere* 63(1), 31-38.
- Chen, B., Duan, J.C., Mai, B.x., Luo, X.J., Yang, Q.S., Sheng, G.Y. and Fu, J.M. (2006) Distribution of alkylphenols in the Pearl River Delta and adjacent northern South China Sea, China. *Chemosphere* 63(4), 652-661.
- Wang, L., Xin, Y., Sun, H.W., Huang, G.L. and Dai, S.G. (2007) Photodegradation of nonylphenol polyethoxylates in aqueous solution. *Huanjing Kexue/Environmental Science* 28(5), 969-974.
- Hayashi, S., Saito, S., Kim, J.H., Nishimura, O. and Sudo, R. (2005) Aerobic Biodegradation Behavior of Nonylphenol Polyethoxylates and Their Metabolites in the Presence of Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 39(15), 5626-5633.
- Xu, J., Wang, P., Guo, W., Dong, J., Wang, L. and Dai, S. (2006) Seasonal and spatial distribution of nonylphenol in Lanzhou Reach of Yellow River in China. *Chemosphere* 65(9), 1445-1451.
- Fu, M., Li, Z. and Gao, H. (2007) Distribution characteristics of nonylphenol in Jiaozhou Bay of Qingdao and its adjacent rivers. *Chemosphere* 69(7), 1009-1016.
- Quednow, K. and Puttmann, W. (2008) Endocrine disruptors in freshwater streams of Hesse, Germany: Changes in concentration levels in the time span from 2003 to 2005. *Environmental Pollution* 152(2), 476-483.

Supplementary information 1: Presentation of the pressure occurring at the Seine estuary level and principal characteristics of the catchment areas and tributaries.

	Andelle	Eure (downstream)	Risle	Commerce	Seine (Upstream)	Rançon	Austreberthe	Cailly	Robec	Ste- Gertrude
Domestic Pressure	++	++	++	+	+++	+	++	++	+++	+
Industrial Pressure	+	++	+	++	+++	+	+	+++	+	+
Agricultural pressure	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+
Number of Wastewater treatment plant effluents	3	14	13	2	-	1	3	3	-	1
Flow May 2005 (m ³ .s ⁻¹)	5.4	20.1	7.6	0.2	330	1.1	1.4	2.3	0.3	1.2
Flow February 2006 (m ³ .s ⁻¹)	28	5.5	14.2	0.3	592	0.4	1.6	2	0.3	1.1
Flow July 2006 (m ³ .s ⁻¹)	5.5	17.1	8.8	0.5	166	1.2	1.7	2.4	1.2	0.5

+: minimal pressure; ++: moderate pressure; +++: high pressure (arbitrary)

Publication n°8

**Tendances dans la présence et le devenir des détergents, alkylphénol-polyéthoxylés,
dans les estuaires macrotidaux français**

Sophie Lardy-Fontan, Laurent Peluhet, Karyn Le Menach, Sylvie Augagneur, Hélène Budzinski*

Université Bordeaux 1, ISM-LPTC UMR 5255 CNRS

351 crs de la libération 33405 Talence Cedex

* auteur correspondant : Tel.: 33 5 56 84 69 98 ; Fax: 33 5 56 84 69 98.

adresse e-mail: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Résumé:

Quatre années d'investigation au niveau de 5 estuaires français ont mis en évidence un état de contamination chronique par les métabolites d'APEO. Chacun des systèmes semble présenter une dynamique de fonctionnement propre. En dépit de leur restriction d'usages pour une large gamme d'applications, les tendances temporelles ne semblent pas refléter une diminution dans la présence des métabolites d'APEO. Ce travail met également en évidence une contamination significative des phases solides en suspension par les métabolites d'APEO. De plus, les concentrations environnementales mesurées sont proches des concentrations prédites sans effets ; en conséquence, des effets toxiques liés à la présence des métabolites d'APEO sont susceptibles d'être détectés dans les estuaires français et les zones côtières sous influence, si l'on prend en compte la contribution des systèmes estuariens pour les écosystèmes marins.

Mot-clés: alkylphénols, alkylphénol-polyéthoxylés, acide alkylphénoxyacétique, matières en suspension, estuaire, France.

Pour soumission à Environmental Science and Technology

Trends in the Occurrence and Fate of detergents, Alkylphenol-polyethoxylates, in French Macrotidal Estuaries

Sophie Lardy-Fontan, Laurent Peluhet, Karyn Le Menach, Sylvie Augagneur, H       Budzinski*

Université Bordeaux 1, ISM-LPTC UMR 5255 CNRS
351 crs de la libération 33405 Talence Cedex

*Corresponding author. Tel.: 33 5 56 84 69 98; Fax: 33 5 56 84 69 98.

E-mail address: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Abstract

Four years of investigation on five French estuaries highlight a chronic state of contamination by APEO metabolites. Each system seems to display an intrinsic dynamic of functioning. Despite their prohibition in a wide range of uses, temporal trends did not reflect a decrease in their occurrence. This work highlights significant contamination of suspended solids by APEO metabolites. Furthermore, measured environmental concentrations (MECs) are near the predicted no effect concentrations values; thus, some toxic effects related to the presence of the degradation metabolites of APEOs are likely to be detected in the French estuaries as well as in the coastal zones under influence, taking into consideration the contributions of estuarine systems to the marine environment.

***Keywords:** alkylphenols, alkylphenol polyethoxylates, acid alkylphenoxyacetic, suspended solids, estuary, France*

1-Introduction

An estuary consists of a confined water mass having a free connection with the open sea and inside which the sea water is diluted in a measurable way with fresh water resulting from the drainage of the catchment area (Allain et al., 2006). There are three main ideas around the notion of estuaries: - they display specific characteristics; - they are under the strong influence of river flows; - their state of degradation is very often the reflection of the health status of their catchment area. They are referred to by the Water Framework Directive (WFD) as waters of transition near the mouths of rivers, which are partially salted because of their proximity to coastal water, but which are influenced by fresh water. Analyses, led on a Community scale, reveal that estuarine areas are not made up in clearly identified territories and that there is a gap in the law with their definition; what raises problems for their

management. France has on its western coasts, the Atlantic and the Channel, no less than 57 estuaries. A certain number of stakes and environmental problems are attached to them: - environmental protection and prevention of risks; - development of plans of prevention; - control of the water quality and protection of the aquatic environments. The estuaries are the receptacles of all anthropic activities. Although they display important purification capacities through their mudholes and reed beds; their water are seldom of good quality. The inventory of fixtures drawn up within the WFD lets us predict that, for the majority of the identified water masses, it will be difficult to obtain their “good state” label in 2015. Among the 33 priority substances of the WFD: heavy metals, pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and alkylphenol-polyethoxylates (APEOs). APEOs are non-ionic surfactants whose applications range from the agricultural to the industrial domains; 80% are nonylphenol-polyethoxylates (NPEOs) and 20% are octylphenol-polyethoxylates (OPEOs) (review by Ying et al., 2002; Vazquez-Duhalt et al., 2006; Soares et al., 2008). Their fate, sources and occurrence have been studied for more than 20 years and have been reviewed by Ying et al. (2002), Vazquez-Duhalt et al. (2006), Soares et al. (2008). Although they present moderate bioaccumulation and bioamplification properties (Servos, 1999; Vazquez-Duhalt et al., 2006; Soares et al., 2008); they are of first ecotoxicological interest because they are displaying endocrine disruption properties *in vivo* and *in vitro* (Mills and Chichester, 2005) and are suspected of participating in endocrine disruption occurring in natural ecosystems.

The objective of this work was to establish a state of contamination of five of the main important French estuaries by APEO metabolites. As they display specific characteristics, one aim of this work was to try to compare them and to understand their intrinsic dynamics in the course of seasons and time. Moreover, this work took interest in the role played by suspended solids in the dispersion of APEOs in those highly complex systems. Finally, a discussion of the ecotoxicological risks linked with the occurrence of APEOs in French estuaries will be provided.

2-Material and methods

2-1-Investigated sites

Among the 57 French macrotidal estuaries (Allain et al., 2006), 5 have been selected and investigated between 2002 and 2005, namely: The Seine estuary, The Gironde estuary, the Adour estuary, The Vilaine bay and the Authie bay. All the investigated sites are briefly presented in Figure 1; their pertinent characteristics are summed in Table 1.

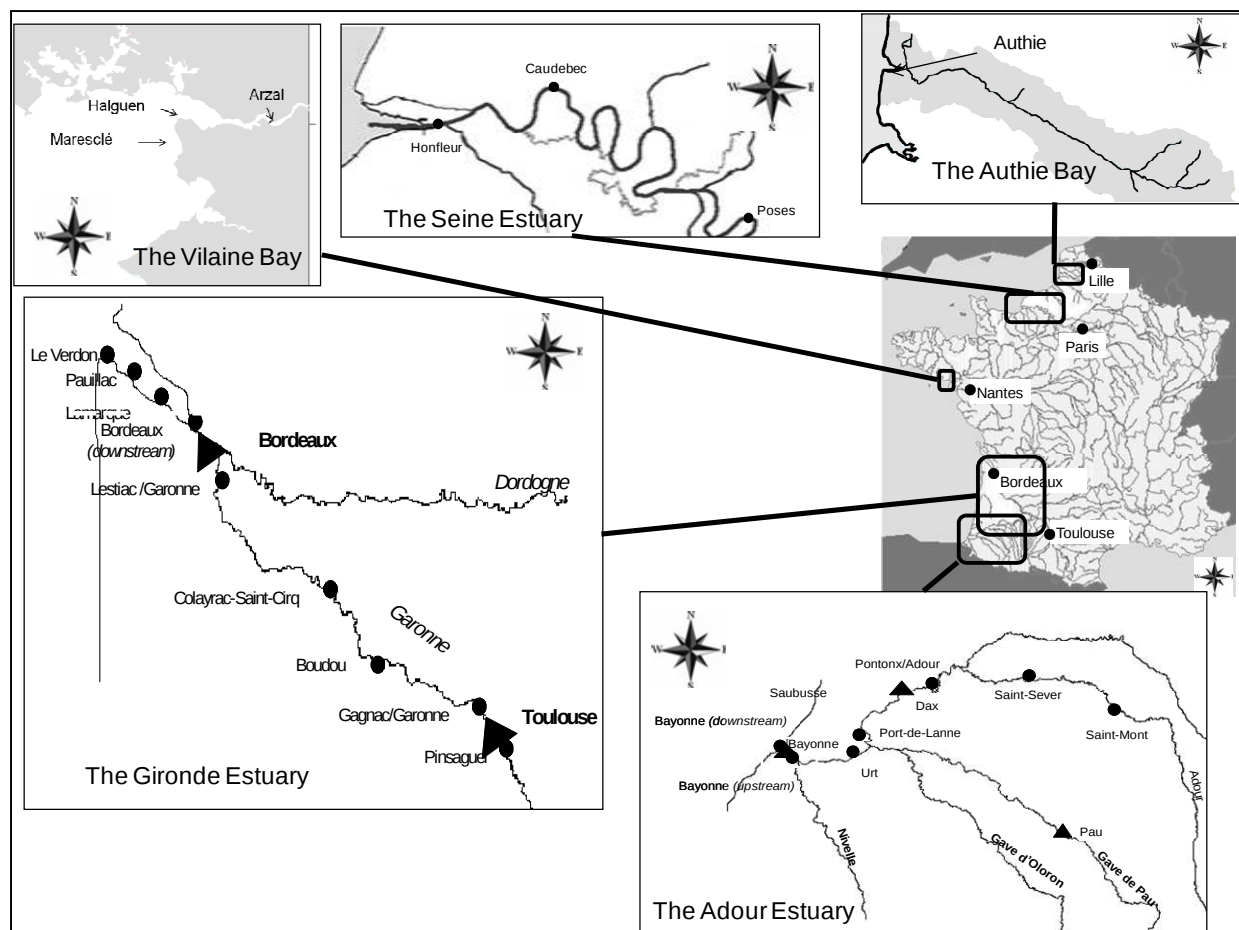


Figure 1: Localization of the five investigated estuaries. Localization of the sampling points in each of the five sites.

Table 1: Relevant characteristics of the 5 investigated estuaries.

	Seine estuary (a)	Gironde estuary (b)	Adour estuary (b)	Vilaine estuary (c)	Authie Bay (d)
Catchment area (km ²)	79,000	29,500	16,880	10,400	1,305
Density of population (inhabitants/km ²)	35-2000	84	54	NR	57
Domestic pressure	+++	++	+	+	+
Industrial pressure	+++	++	+	+	+
Agricultural pressure	+++	++	++	++	+
Inorganic contamination	Multi components	Cadmium	Moderate	Moderate	pristine
Organic contamination	Multi components	Moderate	Pesticides	Pesticides	pristine

+, ++, +++: increasing level of pressures; NR: no reference; <http://www.eau-seine-normandie.fr/>; (b) <http://www.eau-adour-garonne.fr/>; (c) <http://www.lavilaine.com/>; (d) <http://www.eau-artois-picardie.fr/>.

The Seine estuary was investigated at three sites (Poses dam, Caudebec, Honfleur) in September and November 2002, March and July 2003, May 2005.

The Gironde estuary was investigated in February 2002 downstream from Bordeaux to the mouth at Le Verdon. A second campaign was held in November 2005 upstream of the Gironde estuary (Garonne River from upstream of Toulouse to upstream of Bordeaux) and in the Gironde estuary (downstream from Bordeaux to the mouth at Le Verdon).

The Adour estuary was investigated in July 2002 on the level of the estuary (downstream from Bayonne to the mouth). A second campaign was held in November 2005: upstream of the Adour estuary (Adour River from upstream of Saint Mont to upstream of Bayonne) and in the Adour estuary (downstream from Bayonne to the mouth). In order to ensure comparability of data, all samplings were made at low tide.

In the Vilaine bay, sampling campaigns were carried out in 3 points: the site of the Arzal dam, point of entrance of the estuary, was the subject of weekly samplings (controlled by the flow) during the period from 04/18/06 to 07/24/06 (12 weeks). The sites of Halguen (47°30.05 N, 2°29.63 W) and Maresclé (47°27.83 N, 2°29.75 W) located in the zone of influence of the mouth of the Vilaine were the subject of semi-monthly samplings during the period from 04/18/06 to 07/24/06.

In the Authie Bay, sampling campaigns were held in the intertidal zone on the level of the northern mudhole (50.22.2170 NR; 1.36.4840 E) in February and November 2003, February, May, September and November 2004. In order to be able to ensure the comparison of data, the samplings were carried out at low tide.

All the samples were collected in 4l glass bottles, which were previously washed and heated at 450°C for 6 h, and transported to the laboratory in a cooler (4°C).

2-2 Reagents and chemicals

Nonylphenoxyacetic acid (ring chain isomers) (98%+, 4-NP₁EC) was purchased from Promochem. (Molsheim, France) (100 µg.ml⁻¹ in nonane, respectively). 4-nonylphenol (100%, 4-NP, technical), 4-nonylphenol-monoethoxylate (99.5%, 4-NP₁EO) and 4-nonylphenol-diethoxylate (99.5%, 4-NP₂EO) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). The spiked solutions were prepared in methanol at concentrations of 1 µg.ml⁻¹ of each compound.

Methanol (MeOH) was for the analysis of pesticide residues from Merck (VWR international, Strasbourg, France). Dichloromethane (DCM) was for organic residue analysis from J.T.Baker; water used for LC/MS analysis was from JT Baker (Atlantic Labo, Bruges, France). All the above solvents were used without further purification. Water used for solid phase extraction was Evian™ water in glass bottles (France Boisson, France). Hydrochloric acid (purity 37%) was purchased from VWR international (Strasbourg, France). Ammonium acetate (minimum purity 98%) was purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). All the chemicals were tested

for background levels for the compounds of interest. 200 mg Bondelut® C18 cartridges were purchased from Varian (Courtabœuf, France).

Due to the ubiquitous occurrence of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates, materials in plastic and detergents, glassware was chosen to avoid contamination of the sample. Furthermore, all the glassware and sampling apparatus required special treatment prior to use. All the glassware was washed and then heated at 450°C for 6 h prior to use. Whatman GFF glass fibre filters (pore size 0.7 µm) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France) and were also heated at 450°C for 6h prior to use.

2-3-Analytical methodologies

Briefly, between 1 l and 4 l of water were filtered through GF/F glass fiber filters. Between 0.5 to 1 l of acidified water (pH 2, hydrochloric acid) were passed through Bondelut® C₁₈ cartridges (200 mg, 3 cc, Varian). After one hour of drying (under vacuum; 5 mmHg) the cartridges were eluted with a mixture of 5 ml of MeOH/DCM (50/50; v/v). The extracts were evaporated under a gentle stream of nitrogen, transferred to MeOH prior to LC-ESI-MS analysis (SIM) (100 µl to 300 µl final extracts). The treatment of the dissolved phase occurred in the 48 hours following the sampling in order to prevent biodegradation phenomena (Pan et al., submitted). The suspended matters were stored at -20°C until analysis. After freeze-drying, the samples were extracted by microwave assisted extraction (MAE) with 40 ml of a mixture of methanol/dichloromethane (3/1; v/v). The raw extracts were then filtered and redissolved in 60 ml of Evian® water (pH 2) to undergo a purification step according to the same C₁₈ cartridge protocol as previously described (Lardy-Fontan S. et al., submitted).

2-4-Quality control/Quality assurance

Due to the ubiquitous occurrence of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates in materials in plastic and in detergents; glassware and sampling apparatus required special treatment prior to use. All the glassware was washed and then heated at 450°C for 6 hours prior to use. Glass microfiber filters were also heated at 450°C for 6 hours prior to use. Moreover, to each extraction series a protocol blank was joined in order to show evidence of contamination during the different analytical steps. A small amount of 4-NP has been quantified in some cases (<30 ng), while for the other analytes blank signals were absent. Additionally, spiked water (100 ng.l⁻¹, individual compound basis), which follows all the experimental procedure, was joined to each extraction series. Reported concentrations were corrected for the blank value and the recovery.

The quantification was performed by an external calibration. Each series of injections was preceded by the injection of an analyte mixture (at known concentrations) from which a 5 point

quadratic calibration curve was established ($R^2 > 0.99$). Moreover, a pseudo-unknown sample was also injected during each run in order to make sure of the linearity, accuracy and sensitivity of the LC-MS. All the preparation steps were performed under gravimetric control. The overall methodologies show satisfactory recovery rates (upper than 80%), repeatability and reproducibility. Typical limit of detection are of $1\text{--}5\text{ ng l}^{-1}$ for dissolved phase, tens ng.g^{-1} for solid samples (Pan et al., submitted; Lardy-Fontan et al.; submitted).

3-Results and discussion

3-1-Comparison of the contamination profiles of the 5 estuaries

Table 2: Contamination of the dissolved phase of the 5 investigated estuaries by APEO metabolites.

Diss Phase ng.l ⁻¹	Vilaine Bay						Authie Bay			Gironde Estuary			Adour Estuary			Seine Estuary		
	Halguen			Maresclé			min	max	% Det.	min	max	% Det.	min	max	% Det.	min	max	% Det.
	min	max	% Det.	min	max	% Det.												
4-NP ₁ EO	6	83	100%	10	248	100%	12	64	100%	14	89	100%	12	53	100%	87	136	100%
4-NP ₂ EO	3	38	75%	4	22	88%	3	49	100%	12	83	100%	6	36	100%	59	116	100%
4-NP ₁ EC	7	74	88%	16	62	75%	<2	47	50%	5	88	100%	57	99	100%	685	1128	100%
4-NP	14	50	100%	5	39	100%	14	76	100%	21	125	100%	11	35	100%	161	221	100%
4-t-OP	7	7	13%	2	4	50%	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA not analyzed; Diss. Phase Dissolved phase; % Det % detection

Vilaine Bay: min-max-frequency of detection over the period 18/04/06 to 24/07/06

Authie Bay: min-max-frequency of detection over the period February and November 2003; February, May, September and November 2004

Gironde Estuary: min-max-frequency of detection during the sampling campaign of 2005

Adour Estuary: min-max-frequency of detection during the sampling campaign of 2005

Seine Estuary: min-max-frequency of detection over the period September and November 2002, March and July 2003; May 2005

Table 2 sums the contamination of the dissolved phases of the five investigated estuaries by APEOS compounds. It presents the minimal and maximum measured concentrations (ng.l^{-1}) as well as percentages of detection for all investigated compounds. By looking at the results, a widespread contamination of French estuaries by APEO metabolites can be assumed. 4-NP and 4-NP₁EO, the more persistent metabolites, are quantified at each site and at all sampling campaign; 4-NP₁EC, an aerobic degradation metabolite of APEOs, is quantified at a frequency ranging from 50% (Authie Bay) to 100% (Gironde estuary, Adour estuary and Seine estuary). 4-t-OP is quantified in no more than 50%, which is coherent with the fact that it is produced and used less. Contamination profiles seem to classify estuaries as following: Authie bay < Vilaine estuary < Gironde estuary ≤ Adour estuary << Seine estuary; which appears consistent with the anthropic pressures they undergo (Table 1). As expected, the Authie Bay appears poorly contaminated with average concentrations, for all compounds, lower than 80 ng.l^{-1} . Interestingly the Vilaine estuary displays a low impacted profile with concentrations lower than 100 ng.l^{-1} (except 4-NP₁EO with a maximal value of 246 ng.l^{-1}). Both results seem to highlight a background environmental level in APEO metabolites on the French Atlantic and the Channel coasts of tens ng.l^{-1} for 4-NP, 4-NP₁EO. The Adour estuary and the Gironde

estuary present maximum measured concentrations which can reach: 125 ng.l⁻¹ for 4-NP in the Gironde estuary; 99 ng.l⁻¹ for 4-NP₁EC in the Adour estuary; but in any case they display moderately impacted profiles. Both estuaries do not seem highly impacted by APEO metabolites although their catchment areas display significant anthropic pressures. The case of the Seine estuary is obviously dissimilar; results highlight contaminations 2-fold (4-NP₁EO and 4-NP₂EO) to 10-fold (4-NP, 4-NP₁EC) higher than those of other French estuaries.

The Seine estuary displays a contamination profile in terms of occurrence and distribution of compounds which is similar to those of major European estuaries: the Scheldt and Rhine Estuaries (Jonkers et al., 2003; Jonkers et al., 2005); the Krka estuary (Kvestak and Ahel, 1994). The Authie and Vilaine bays, the Adour and Gironde estuaries, for their part, present contamination profiles in the range of the Dutch (Bester et al., 2001) and German coastal areas (Vethaak et al., 2005); the Modego and the Douro estuaries (Ribeiro et al., 2008a; Ribeiro et al., 2008b) as well as the Venice lagoon (Pojana et al., 2007). As highlighted by Soares et al. (2008), significant differences in the management of production and use of APEOs between European countries and Asiatic or American countries exist; thus no comparisons were drawn with those countries although numerous works have been recently published which highlighted significant contamination by APEO metabolites.

3-2-Seasonal trends

APEO metabolites are byproducts of both photodegradation and biodegradation of longer chain APEOs whose efficiencies have been linked to physico-chemistry (Hayashi et al., 2005; Corvini et al., 2006). As water systems present natural variability particularly concerning flow conditions; the comparison of concentrations can be tricky and lead to misinterpretation.

Figure 2 sums up the 15 week survey at the Arzal dam (concentrations expressed in ng.l⁻¹, dissolved phase). Figure 2a presents the Vilaine River flow and highlights the fact that except for 2 weeks before the beginning of the survey (which were characterized by a high flow), the Vilaine River flow appears to be constant over the studied period (and in any case lower than the reference flow); thus the variations observed in Figure 2b cannot be linked to variations of the flows.

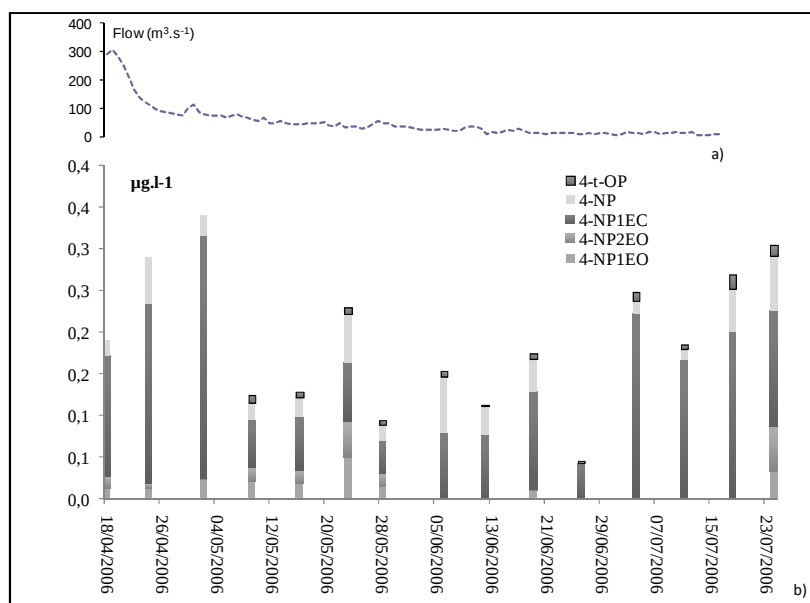


Figure 2: Seasonal trends in the occurrence of APEO metabolites in the dissolved phase of Vilaine Bay at the Arzal Dam.

a) Flow ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$) on the Vilaine River during the studied period (from <http://www.hydro.eaufrance.fr/>).

b) Measured concentrations in APEO metabolites from 18-04-2008 to 23-07-2008 (weekly reconstituted samples).

All through the studied period, the distribution and occurrence of APEO metabolites appears to be highly variable. Total contamination (sum of the five APEO metabolites $\mu\text{g.l}^{-1}$) varies from less than 50 ng.l^{-1} at the end of June to close to 350 ng.l^{-1} at the end of April and July, thus a 7-times variation. 4-NP1EC, the predominant compound, represents from 31% (end of May) to 90% (end of June) of the global contamination, 1% to 42% for 4-NP. To sum up, this 12 week survey does not highlight any clear seasonal trends in the Vilaine Bay. The exceptional dry weather (low precipitations, high temperatures) that occurred during the monitoring survey might have affected the natural intrinsic dynamics of the system.

Figure 3 presents the total flux (g.j^{-1} , sum of dissolved phase+ suspended solids) of each of the compounds of interest in the Authie Bay all through the studied period (years 2003 to 2004). Fluxes are affected by a two-fold variation in the course of seasons. Maximum loads occur in February 2003 and 2004 as well in August 2004. August was a stormy period in the Authie Bay, consequently some resuspension or reload phenomena may have occurred from the sediment to the water column increasing the occurrence of 4-NP. Biodegradation phenomena are thermo-dependent; in February, low temperatures might have decreased the purification efficiency of the system and thus led to an increased occurrence in 4-NP.

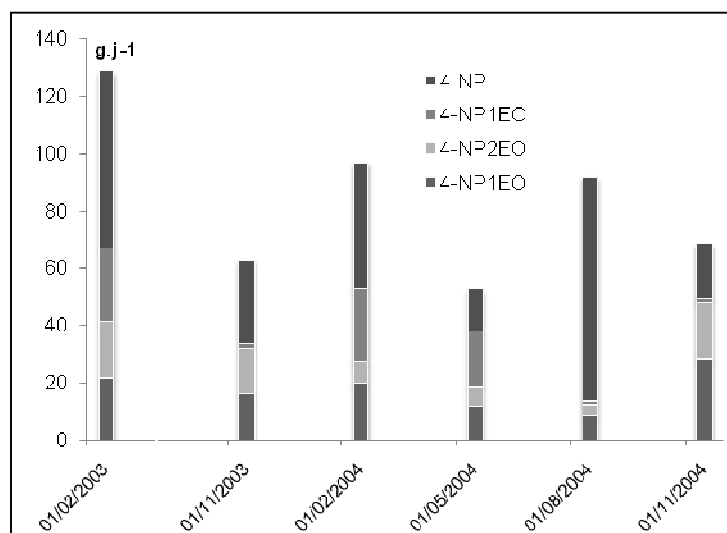


Figure 3: Seasonal trends in the occurrence of APEO metabolites in the Authie Bay.

To sum up, should you consider the Vilaine and Authie bays, variability in the occurrence and distribution of APEOs was observed and appeared to be linked to the dynamics of the system. No clear seasonal trends were highlighted.

3-3-Temporal trends

The European Union has subjected 4-NP to the risk assessment procedure and furthermore added the substance to the list of 33 priority substances of the European Framework Directive (WFD). It has led to a restriction of uses for a wide range of applications, it has been transposed in the French right and thus came into application as from 17 January 2005. Figure 4 presents temporal trends in the occurrence of APEO metabolites: 4-NP and 4-NP₁EC in the Gironde, Adour and Seine estuaries between years 2002 and 2005. As flows were in the same range of values, comparability of data seems valid. For the three estuaries, measured concentrations of the dissolved phase in 4-NP are similar (ranging from tens to hundreds ng.l⁻¹). In the Seine estuary, although trends in the fate of compound in the estuary are dissimilar (decrease of the concentrations from Poses to Honfleur in 2002, whereas the concentrations increase in 2005), 4-NP₁EC concentrations are in the same range in 2005 as in 2002. On the contrary, in the Adour estuary they are 8-fold lower in 2005 than in 2002 and 2-fold lower in the Gironde estuary. In the Adour estuary, the 2005 campaign occurred in November whereas the previous one occurred in July 2002; the formation of 4-NP₁EC has been shown to be strongly dependent on physico-chemistry, especially temperature and photoactivity which are strongest in July (Hayashi et al., 2005; Wang et al., 2007). Moreover, as previously explained in this paper, natural systems seem to display intrinsic dynamics resulting in variations of concentrations, which can reach a factor of two. Finally, the Adour-Garonne water Agency reports that strong improvement of the purification networks occurred during the last 5 years leading to more than 65% of depuration rate on

catchment areas of the Adour and Gironde estuaries. Globally, trends do not demonstrate any significant declining in occurrence of APEOs in France. On the contrary, Quednow and Puttmann (2008) observed a significant decrease in the occurrence of 4-NP in the water system of the city of Halle (Germany) between years 2003 and 2006, and concluded it was the consequence of restrictions of uses.

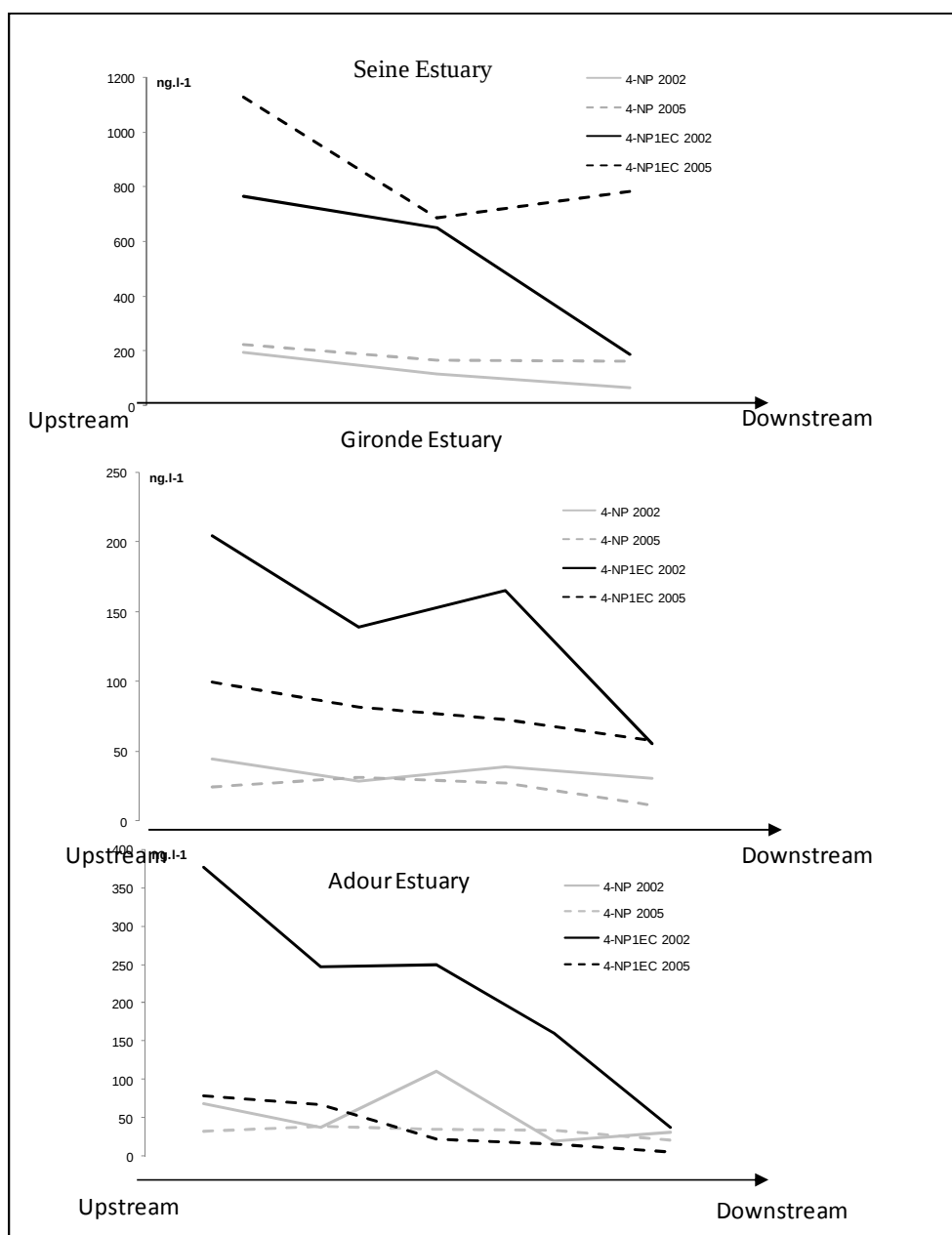


Figure 4: Temporal trends (2002-2005) in the occurrence and fate of APEO metabolites in the Seine, Adour and Gironde estuary.

3-4-Role of the Total Suspended Solids (TSS) on macrotidal estuaries

When talking about estuaries, especially macrotidal estuaries, which are characterized by the presence of Turbidity Maximum Zones (TMZ), the question of the role played by suspended solids appeared to be prevalent to understand the biogeochemistry of pollutants.

Table 3: APEO metabolites in the suspended solids of estuaries.

Occurrence (ng.g^{-1}) in the suspended solids of the Adour, Gironde and Seine estuaries and in the Authie Bay.

Part of the suspended solids in the global contamination of the water column.

Seine estuary					Seine estuary				
C ng.g^{-1} in SPM		min	max	mean	Part of SPM in contamination (%)		min	max	mean
Honfleur	4-NP1EO	35	396	211	Honfleur	4-NP1EO	26%	82%	46%
	4-NP2EO	32	449	194		4-NP2EO	33%	65%	49%
	4-NP	177	2510	906		4-NP	25%	85%	65%
Caudebec	4-NP1EO	173	519	398	Caudebec	4-NP1EO	5%	97%	36%
	4-NP2EO	986	1040	1013		4-NP2EO	4%	93%	38%
	4-NP	832	5182	2703		4-NP	20%	99%	57%
Poses	4-NP1EO	28	2367	917	Poses	4-NP1EO	0%	94%	33%
	4-NP2EO	180	1683	763		4-NP2EO	0%	94%	28%
	4-NP	2015	5453	3799		4-NP	4%	99%	34%
Adour estuary					Adour estuary				
C ng.g^{-1} in SPM		min	max	mean	Part of SPM in contamination (%)		min	max	mean
Transect	4-NP1EO	114	179	135	Transect	4-NP1EO	22%	26%	24%
	4-NP2EO	30	86	66		4-NP2EO	4%	27%	15%
	4-NP	211	357	304		4-NP	33%	52%	43%
Gironde estuary					Gironde estuary				
C ng.g^{-1} in SPM		min	max	mean	Part of SPM in contamination (%)		min	max	mean
Transect	4-NP1EO	11	139	62	Transect	4-NP1EO	16%	26%	21%
	4-NP2EO	9	113	60		4-NP2EO	13%	21%	19%
	4-NP	37	567	223		4-NP	30%	56%	40%
Authie Bay					Authie Bay				
C ng.g^{-1} in SPM		min	max	mean	Part of SPM in contamination (%)		min	max	mean
Interseason	4-NP1EO	21	177	102	Interseason	4-NP1EO	0%	37%	15%
	4-NP2EO	25	89	66		4-NP2EO	0%	67%	20%
	4-NP	51	1337	517		4-NP	7%	92%	46%

Vilaine Bay: min-max-mean concentration over the period 18/04/06 to the 24/07/06,

Authie Bay: min-max-mean concentration over the period February and November 2003; February, May, September and November 2004,

Gironde Estuary: min-max-mean concentration during the sampling campaign of 2005,

Adour Estuary: min-max-mean concentration during the sampling campaign of 2005,

Seine Estuary: min-max-mean concentration over during the sampling campaign of May 2005.

Trends observed in TSS are the same as those of the dissolved phase, with suspended solids of the Seine estuary significantly more contaminated with average concentrations between $3,799 \text{ ng.g}^{-1}$ to 906 ng.g^{-1} for 4-NP, between hundreds ng.g^{-1} to one hundred ng.g^{-1} for 4-NP₁₋₂EO from Poses to Honfleur (Table 3). By comparison the of the 3 other estuaries: the Adour estuary, the Gironde estuary

and the Authie bay which present lower levels of contamination all through the system, maximum 4-NP concentrations of 357 ng.g^{-1} in the Adour estuary, 567 ng.g^{-1} in the Gironde estuary and $1,337 \text{ ng.g}^{-1}$ in the Authie bay. Etcheber et al. (2007) have shown that in the Garonne River, soil and litter are the major (90%) Particulate Organic Compounds (POC) sources; on the contrary, in the Seine River, soil and litter contribute to 70% of POC and 10% is from human origin. Average contamination of estuarine suspended solids vary between few ng.g^{-1} to few $\mu\text{g.g}^{-1}$ depending of the compound and the site. 4-NP is the predominant metabolite before 4-NP₁EO; 4-NP₁EC was usually below detection limit ($<30 \text{ ng.g}^{-1}$, depending on the matrix).

It appears relevant to consider the part of TSS in the global contamination (which takes into account the TSS concentrations). First of all, a huge intrasite variability is observed in the Seine estuary where parts of SPM in the total contamination range from 4% (July 2003) to 99% (March 2003) for 4-NP, 0% (September 2002) to 97% (March 2003) for 4-NP₁EO and 0% (May 2005) to 94% (March 2003) for 4-NP₂EO (5 sampling campaigns) and in the Authie Bay where parts of SPM in the total contamination range from 7% (May 2004) to 92% (August 2004) for 4-NP, 0% (May 2004) to 37% (August 2004) for 4-NP₁EO and 0% (May 2004) to 67% (August 2004) for 4-NP₂EO (6 sampling campaigns). The part of the suspended solids in the global contamination is lower for the 2 other estuaries: 52-56% for the 4-NP, 21-37 % for the 4-NP₁EO.

In the Authie Bay or in the Seine estuary, no clear seasonal trends are observed. It is assumed that it is intrinsic dynamics of the system. In the Authie Bay, maximum values for 4-NP are observed in November 2003 (71%) and in August 2004 (92%) which were stormy periods. By consequence some resuspension phenomena may have occurred from sediment to the water column, as highlighted by measured TSS: 79 mg.l^{-1} in November 2003 and 98 mg.l^{-1} in August 2004, values significantly upper than those measured in other seasons (lower than 40 mg.l^{-1}).

In the Seine estuary, the winter season in 2003 was characterised by high flows (maximum of $1,400 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$) which may have brought some erosion material from agricultural areas to the Seine estuary. In fact, sludge spreads are very common procedure in France, sludge have been shown to be very contaminated by APEO metabolites and especially 4-NP (Soares et al., 2008). The scrubbing phenomenon could bring organic materials with high levels of 4-NP and induced an enhancement in the contamination of the suspended matter and thus of their part in the contamination of the water column. It can also be explained by the impact of the wastewater treatment loads upstream from the estuary. Indeed, when strong pluviometric contributions occurred, hydraulic residence time in the plants are shortened, consequently the effluents could be characterized by high levels of strongly contaminated suspended matter (Lardy-Fontan et al., submitted).

In the Seine estuary, from the upstream area to the mouth, a significant increase of the part of the suspended solids to the global contamination, e.g. 34-65% for 4-NP (Table 3). In the Adour and Gironde estuaries; the part of the SPM in the contamination remained constant along the estuary.

Although the 3 estuaries are macrotidal estuaries, these results seemed to highlight specific trends in the fate of APEO metabolites; one hypothesis could be the influence of the Turbidity Maximum Zone.

The partitioning of organic compounds between water and organic matter is generally controlled by hydrophobicity. The *in situ* organic carbon-normalized particle-water partition coefficient (K'_{oc}) was calculated using the AP concentration in dissolved phase and particulate phase and organic carbon contents in the particles as mentioned in the equation (1)

$$K'_{oc} = C_s / C_{aq} / f_{oc} \quad (1)$$

Where C_s is the solid-phase concentration on a unit weight basis (ng.kg^{-1}), C_{aq} is the aqueous phase concentration on a unit volume basis (ng.l^{-1}), and f_{oc} is the mass fraction of organic carbon on the particles.

Schwarzenbach et al. (1993) found that there is a linear correlation between K_{ow} and K_{oc} (i.e., organic carbon-normalized particle-water partition coefficient) in a laboratory sorption experiment using natural sediments as mentioned in equation (2)

$$\text{Log } K_{oc} = 0.82 \times \text{log } K_{ow} + 0.14 \quad (2)$$

The $\text{log } K'_{oc}$ values determined (eq 1) in the Adour Estuary, the Gironde estuary and the Seine estuary water samples are: 5.8 ± 0.3 , 5.4 ± 0.4 and 5.1 ± 0.1 for 4-NP; 5.5 ± 0.2 , 5.1 ± 0.4 and 5.11 ± 0.13 for 4-NP₁EO, respectively. They are 1 order of magnitude higher than the predicted $\text{log } K_{oc}$: 3.81 for 4-NP and 3.55 for 4-NP₁EO (eq 2); meaning that APEOs partition more to particulate phase than expected from their hydrophobicity. Furthermore they are in the same order of magnitude than previous published data which brought back average values of 6.0 ± 0.6 for 4-NP in the Rhine estuary and 5.9 ± 0.6 for 4-NP in the Scheldt estuary (Jonkers et al., 2003). The average $\text{log } K'_{oc}$ are similar in the 3 estuaries and remain constant along each one of them. It implies that the particulate APEO metabolites could play a significant role in their transport in the aquatic environments especially in the context of the transfer from estuarine to marine systems.

3-5-Chemical risk linked to the presence of APEOs among French estuaries

Estuaries are ecosystems of high productivity, crucial in the life of many fish, invertebrates (Mc Lusky, 1989). French estuaries show a widespread contamination by APEO metabolites. The values of Predicted No Effect Concentrations (PNEC) for 4-NP and 4-t-OP have been established starting from chronic toxicity data (INERIS) and are equal to 330 ng.l^{-1} and 61 ng.l^{-1} in fresh waters, respectively (33 ng.l^{-1} and 6.1 ng.l^{-1} in marine water, by correction). By comparing the values of $\text{PNEC}_{\text{fresh water}}$ with those measured in the Seine, the Adour and the Gironde Estuaries; it appears that

except for the Seine estuary, which presents ratios between Measured Environmental concentrations (MEC) and PNEC higher than 1 in some points, the estuaries of the Gironde and the Adour showed, for their part, ratios MEC/PNEC lower than 1. In the same way, if one compares the values measured in the Vilaine Bay and Authie Bay with the values of $PNEC_{\text{marine water}}$, the ratios MEC/PNEC are higher than 1 concerning 4-NP and also for the 4-t-OP (Vilaine Bay). Thus, it appears that the toxic effects related to the presence of the degradation metabolites of APEOs are likely to occur in the Seine estuary as well as on the level of the coastal zones.

APEOs are well known endocrine disruptors towards aquatic species (Lintelmann et al., 2003; review by Mills and Chichester, 2005). Although no studies succeeded in linking APEOs occurrence to observed effects in natural systems, nevertheless it can be assumed that APEOs metabolites can be involved in global disruption phenomena. Verslycke et al. (2005), in a multi thematic survey in the Scheldt estuary, showed evidence of the estrogenic potencies of both water and sediments; interestingly APEO metabolites were quantified in significant amounts in the system (Water, Sediments and Mysids shrimps). Peck et al. (2007) have recently put in evidence the potential for accumulation of exogenous 17- β -estradiol and nonylphenol in *Dreissena polymorpha* tissues (sampled in various Rivers: the Darrent River, the Deule River and the Seine River), they concluded that bivalves could be susceptible to estrogenic compounds. In the same manner, Minier et al. (2000) revealed that 8% of male European flounder (*Platichthys flesus*) sampled in the Seine estuary had intersex. Mouneyrac et al. (2008) in a multisite study on *Scrobicularia plana* observed higher levels of 17- β -estradiol in the Seine estuary than in the pristine site of the Authie Bay.

A chemical risks linked to the ubiquity of APEO metabolites exist especially in the Seine estuary. It is important to consider that it is not because measured concentrations are lower than the PNEC values that adverse effects do not occur.

The estuaries play a crucial part in the history of life of a great number of species, in particular by their role of nursery. Arslan and Parlak (2007) concluded that 4-NP and 4-t-OP can cause the normal sea urchin and that of other invertebrates' development, to be inhibited at low environmental concentrations as these compounds represent an ecological hazard for the population level given the cumulative effects of other environmental pollutants. Bistodeau et al. (2006) recently demonstrated that larvae exposure to 4-NP or effluent reconstituted APEO mixture can affect competitive behavior. They conclude that APEO mixtures have an effect on the reproductive competence of previously exposed male fathead minnows. In addition, 4-nonylphenol concentrations utilized in all exposures were below EPA regulatory guidelines, suggesting that the evaluation of 4-NP alone may not be sufficient to identify potentially adverse effects usually found as mixtures in the aquatic environment. Canesi et al. (2007, 2008) exposed mussels *Mytilus galloprovincialis* to a mixture of endocrine disruptors (17- β -estradiol, Ethynilestradiol, 4-NP, 4-NP1EC and benzophenone) and highlighted that it can affect their immune system by interfering with their lysosomal function, redox related enzyme activities and gene transcription of digestive glands. Guerit et al. (2008) have

recently conducted a work which faced the European TGD to an in situ application focusing on pesticides. They concluded that as the accuracy of PNEC derivation is the decisive criterion when applying the TGD approach to in situ data, there is a need of prioritization of ecotoxicological data on target species endemic in the place of study, especially regarding the high complexity and specificity of estuarine ecosystems.

These considerations let us assume that the consideration of 4-NP, alone, allows an underestimation of the risks linked to the ubiquity of some biodegradation metabolites, especially 4-NP1EC which is, in most cases, the dominant metabolite of the aqueous phase. Furthermore, it highlight than even if the average measured concentrations are lower than the predicted no effect concentrations, for individual compound; some toxic effects are susceptible to occur in the estuarine system, especially by consequence of exposure, to highly complex mixtures of compounds, at some crucial key time of the development.

4-Conclusion

Four years of investigations on five French estuaries highlight a chronic state of contamination by APEO metabolites, especially by aerobic biodegradation products. By far, the Seine estuary is the most impacted system with average concentrations between hundreds ng.l^{-1} to $\mu\text{g.l}^{-1}$. The Adour estuary, the Gironde estuary, the Authie bay and the Vilaine bay also display a chronic state of contamination by APEO metabolites but in less extent. Each system seems to show intrinsic dynamic of functioning. Interseason and interannual studies do not highlight any seasonal trends. Despite their prohibition of a wide range of uses, temporal trends do not reflect a decrease in their occurrence in French aquatic systems. This work highlights significant contamination of the suspended solids by APEO metabolites (between tens ng.g^{-1} to more than $\mu\text{g.g}^{-1}$ depending of the compound, the localization and the system), thus future work should focus on their role in the fate and occurrence in the marine environment, especially in the dispersion of compounds through marine water. Furthermore, MECs are near the PNEC values, thus, some toxic effects related to the presence of degradation metabolites of APEOs are likely to occur in the French estuaries as well as in the level of the coastal zones under influence, taking into consideration the contributions of estuarine systems to marine environment.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support of the Seine Aval program; the ECOBAG program (Environment, Ecology and Economy of the Adour-Garonne Basin); the PNETOX program (National program in ecotoxicology), the ECCODYN program (Ecotoxicology and Ecodynamic of contaminants) and the Region Aquitaine. The authors also want to thank the “Cellule Antipollution de

Rouen” for their help in sampling achievement and Dr Henri Etcheber (DGO, Université Bordeaux1) for POC and DOC analysis.

Bibliography

Allain Y.-M., Helias A. , Ribiere G., Genevois R. and F., L.D. (2006) La Gestion des estuaires dans une approche communautaire.

Ying, G.-G., Williams, B. and Kookana, R. (2002) Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environment International* 28(3), 215-226.

Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E. and Lester, J.N. (2008) Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*.

Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A.F. and Viana, M.T. (2006) Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific review. *Applied Ecology and Environmental Research* 4(1), 1-25.

Servos, M.R. (1999) Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual. Res. J. Canada*. 34(1), 123-177.

Mills, L.J. and Chichester, C. (2005) Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment* 343(1-3), 1-34.

Lardy-Fontan S. , Pan.X., Budzinski H. Determination of nonylphenol ethoxylate metabolites in river water and sewage treatment plant effluents by solid-phase extraction, high performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. submitted to *Analytical Bioanalytical Chemistry*.

Lardy-Fontan S. , Pan.X., Budzinski H. Analysis of alkylphenol polyethoxylates metabolites in suspended solids from the Seine estuary by focused microwave-assisted extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography- electrospray mass spectrometry. submitted to *Analytical Bioanalytical Chemistry*.

Jonkers, N., Laane, R.W.P.M. and De Voogt, P. (2003) Fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in two Dutch estuaries: Evidence of biodegradation in the field. *Environmental Science and Technology* 37(2), 321-327.

Jonkers, N., Laane, R.W.P.M. and de Voogt, P. (2005) Sources and fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch coastal zone of the North Sea. *Marine Chemistry* 96(1-2), 115-135.

Kvestak, R. and Ahel, M. (1994) Occurrence of toxic metabolites from nonionic surfactants in the Krka River estuary. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 28(1), 25-34.

Bester, K., Theobald, N. and Schroder, H.F. (2001) Nonylphenols, nonylphenol-ethoxylates, linear alkylbenzenesulfonates (LAS) and bis (4-chlorophenyl)-sulfone in the German Bight of the North Sea. *Chemosphere* 45(6-7), 817-826.

Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M. and Kuiper, R.V. (2005) An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 59(4), 511-524.

Ribeiro, C., Pardal, M.A., Martinho, F., Margalho, R., Tiritan, M.E., Rocha, E. and Rocha, M.J. (2008a) Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*, 1-11.

- Ribeiro, C., Tiritan, M.E., Rocha, E. and Rocha, M.J. (2008b) Seasonal and Spatial Distribution of Several Endocrine-Disrupting Compounds in the Douro River Estuary, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1-11.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N. and Marcomini, A. (2007) Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International* 33(7), 929-936.
- Corvini, P.F.X., Schäffer, A. and Schlosser, D. (2006) Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols—our evolving view. *Applied Microbiology and Biotechnology* V72(2), 223-243.
- Hayashi, S., Saito, S., Kim, J.H., Nishimura, O. and Sudo, R. (2005) Aerobic Biodegradation Behavior of Nonylphenol Polyethoxylates and Their Metabolites in the Presence of Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 39(15), 5626-5633.
- Wang, L., Xin, Y., Sun, H.W., Huang, G.L. and Dai, S.G. (2007) Photodegradation of nonylphenol polyethoxylates in aqueous solution. *Huanjing Kexue/Environmental Science* 28(5), 969-974.
- Quednow, K. and Puttmann, W. (2008) Endocrine disruptors in freshwater streams of Hesse, Germany: Changes in concentration levels in the time span from 2003 to 2005. *Environmental Pollution* 152(2), 476-483.
- Etcheber, H., Taillez, A., Abril, G., Garnier, J., Servais, P., Moatar, F. and Commarieu, M.V. (2007) Particulate organic carbon in the estuarine turbidity maxima of the Gironde, Loire and Seine estuaries: Origin and lability. *Hydrobiologia* 588(1), 245-259.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M. and Imboden, D.M. (1993) Organic solvent-water partitioning: The octanol-water partition constant. *Environmental Organic Chemistry*.
- Mc Lusk, D.S. (1989) *The Estuarine Ecosystem*. 2nd Ed.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L. and Wenzel, A. (2003) Endocrine disrupters in the environment-(IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 75, 631-681.
- Verslycke, T.A., Vethaak, A.D., Arijs, K. and Janssen, C.R. (2005) Flame retardants, surfactants and organotins in sediment and mysid shrimp of the Scheldt estuary (The Netherlands). *Environmental Pollution* 136(1), 19-31.
- Peck, M.R., Labadie, P., Minier, C. and Hill, E.M. (2007) Profiles of environmental and endogenous estrogens in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere* 69(1), 1-8.
- Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquené, G., Godefroy, D., Burgeot, T. and Leboulenger, F. (2000) Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research* 50(1-5), 373-377.
- Mouneyrac, C., Linot, S., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Metais, I., Durou, C., Minier, C. and Pellerin, J. (2008) Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination. *General and Comparative Endocrinology*.
- Arslan, O.C. and Parlak, H. (2007) Embryotoxic effects of nonylphenol and octylphenol in sea urchin *Arbacia lixula*. *Ecotoxicology* 16(6), 439-444.
- Bistodeau, T.J., Barber, L.B., Bartell, S.E., Cediell, R.A., Grove, K.J., Klaustermeier, J., Woodard, J.C., Lee, K.E. and Schoenfuss, H.L. (2006) Larval exposure to environmentally relevant mixtures of alkylphenolethoxylates reduces reproductive competence in male fathead minnows. *Aquatic Toxicology* 79(3), 268-277.
- Canesi, L., Lorusso, L.C., Ciacci, C., Betti, M., Rocchi, M., Pojana, G. and Marcomini, A. (2007) Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: In vitro and in vivo studies. *Aquatic Toxicology* 81(1), 36-44.

Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Lorusso, L.C., Vergani, L., Marcomini, A. and Poiana, G. (2008) Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Aquatic Toxicology*.

Guerit, I., Bocquene, G., James, A., Thybaud, E. and Minier, C. (2008) Environmental risk assessment: A critical approach of the European TGD in an in situ application. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Publication n°9

**Caractérisation de la contamination de la côte méditerranéenne (NO) française par les
métabolites d'alkylphénol-polyéthoxylés. Distribution, présence et devenir**

Sophie Lardy-Fontan, Hélène Budzinski*

Université Bordeaux 1, ISM-LPTC UMR 5255 CNRS

351, crs de la libération 33405 Talence Cedex

* auteur correspondant. Tel.: 33 5 56 84 69 98; Fax: 33 5 56 84 69 98.

E-mail adresse: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Résumé :

A notre connaissance, cette étude met en évidence les premières données sur la présence et le devenir des métabolites d'APEO sur la côte méditerranéenne française. Elle montre que la côte méditerranéenne française présente une contamination chronique des eaux et des sédiments, qui laissent penser que des effets néfastes sont susceptibles de se dérouler. Cette hypothèse a été confirmée par la quantification des merlus qui met en évidence une contamination chronique et répandue des espèces aquatiques. D'un point de vue « mécanistique », ces résultats prouvent que les phases solides en suspension sont un vecteur important de la contamination dans les systèmes marins par les métabolites d'APEO et jouent un rôle significatif dans les phénomènes de dispersion. De futures études devraient se concentrer sur ce point spécifique.

Pour soumission à Environment International

Characterization of the Contamination of the French NW Mediterranean coast by Alkylphenol-polyethoxylate metabolites.

Distribution, Occurrence and Fate

Sophie Lardy-Fontan, H       Budzinski*

Université Bordeaux 1, ISM-LPTC UMR 5255 CNRS

351, crs de la libération 33405 Talence Cedex

*Corresponding author. Tel.: 33 5 56 84 69 98; Fax: 33 5 56 84 69 98.

E-mail address: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Abstract

To the best of our knowledge, this study highlights the first data on the occurrence and fate of APEO metabolites on the French Mediterranean coast. It shows that the French Mediterranean coast shows a widespread contamination of waters and sediments, which allows us to think that some adverse effects might occur. This idea has been emphasized by the quantification of European hake, which shows a chronic and widespread contamination of aquatic species. From a “mechanistic” point of view, these results show that suspended solids are a major contributor to the contamination of the marine system by APEO metabolites and play a significant role in dispersion phenomena. Further studies should focus on this specific point

1-Introduction

The Mediterranean Sea is a large semi-enclosed sea with a total surface area of approximately 2.5 millions km² and an 80 year water renewal time. It is shared by 20 states, and one projection suggests that the population in the Mediterranean area can be expected to increase from 323 million in 1980 to 547 million by 2025 (UNEP, 1989). In addition, the Mediterranean attracts some 200 million tourists every year. Many human activities result in environmental stresses and human health problems, such as high nutrient concentrations and eutrophication, increasing incidences of algal blooms, as well as high levels of hazardous substances (Stanners and Bourdeau, 1995; EEA, 1998). Conscious of the pressure on the Mediterranean Sea, 16 Mediterranean countries adopted the Mediterranean Action Plan (MAP) in 1975 and The Barcelona Convention in 1976. Although its aim was firstly focused on marine pollution, over the years, its activities gradually widened to coastal

management leading to the adoption and amendment of the Barcelona Convention, renamed Convention For the Protection of The Marine Environment and the Coastal Regions of the Mediterranean. Its strength lies in the close interactions among countries' organizations and actions. Faced with a widespread deterioration of waters, European countries decided to implement the Water Framework Directive WFD (2001) whose objectives are the achieving of a good ecological and chemical status by the year 2015. For more than half a century a general awareness has emerged about the contamination of natural systems by pollutants called emerging pollutants, whose uses or abuses are linked with our way of life. Numerous monitoring surveys whose purpose was to screen the ubiquity and occurrence of pollutants have been held (Lopez de Alda et al., 2003; Vethaak et al., 2005a; Cespedes et al., 2006; Ko et al., 2007). Among the most prevalent ones: alkylphenol-polyethoxylates (APEOs) are found. APEOs are a class of non-ionic surfactants that have been largely produced and used since the 1960's for a wide range of applications (Renner, 1997). Their noteworthy characteristics are their biodegradation properties which lead to the formation of persistent metabolites and the loss of amphiphilic properties through a complex scheme (Ahel, 1994; Di Corcia et al., 1998; Hayashi et al., 2005); their ubiquity, APEOs especially octylphenol-polyethoxylates (OPEOs) and nonylphenol-polyethoxylates (NPEOs) have been detected and quantified in various ecosystems (atmosphere, groundwater, freshwater, marine water, sediments, soils, fauna and flora) from ppt to ppm (Soares et al., 2008). Metabolites (alkylphenols: nonylphenol (NP) and octylphenol (OP); alkylphenol-mono and di-ethoxylates; alkylphenoxypolyethoxyacetic acid (APEC)) have been shown to display moderate bioamplification and bioaccumulation properties (Vazquez-Duhalt et al., 2006; Soares et al., 2008) as well as huge metabolisation (Servos, 1999; Vazquez-Duhalt et al., 2006; Soares et al., 2008). Thus, APEO metabolites have become of first interest since they have been shown to display endocrine disruption properties, both *in vitro* and *in vivo*, and that at realistic environmental concentrations (Soares et al., 2008; Vazquez-Duhalt et al., 2006; Mills and Chichester, 2005).

2-Material and methods

2-1-Investigated sites

The North western Mediterranean Sea is the recipient of extensive urban, industrial water from bordering countries as well as a natural discharge for major European Rivers. At the French level, 2 main areas can be pointed out as representative of pressures: The Gulf of Lion and the Rade of Marseilles.

2-1-1 The Rade of Marseilles

The Marseilles shore is strongly urbanized and industrialized; various sources of chemical contaminations have been identified (domestic activities, agricultural activities, harbor, maritime and industrial activities). The Rade of Marseilles is the receptacle of several cleansing networks one of the

most important of France. The Wastewater Treatment Plant, whose capacity is of 1,600,000 equivalent-inhabitants and uses a physicochemical process (primary decantation and lamellar decantation). The effluent load flows towards the Rocky Inlet of Cortiou. 2 sampling campaigns (coastal oceanic ship Europe, IFREMER) were carried out. The first campaign was held in November 2004; its goal was to study the local influence of the effluent of the WWTP of Marseilles in a semi closed semi medium: the Rocky Inlet of Cortiou. Sampling waters were taken out in sub-surface (depth 0.1m) in the plume of dilution of the effluent (Figure 1). In parallel, surface sediments were sampled in the rocky inlet periphery using a Reineck bucket (Figure 1).

The second sampling campaign was held in November 2006. Its aim was first to supplement data from the first sampling campaign in the Rocky Inlet of Cortiou (Figure 1). For this purpose, sampling waters were taken out in sub-surface (depth 0.1m) in the plume of dilution of the effluent. Moreover some surface sediments were drawn out of the plume using a Reineck bucket. Secondly, some samples were taken out to characterize the contamination profile of the Rade of Marseilles (Figure1); 3 sites were investigated for both water and sediment according to the same methodology as previously described, namely: the Planier (marine site without direct anthropic influences), the sites of Huveaune and Chantier (sites under direct anthropic impacts).

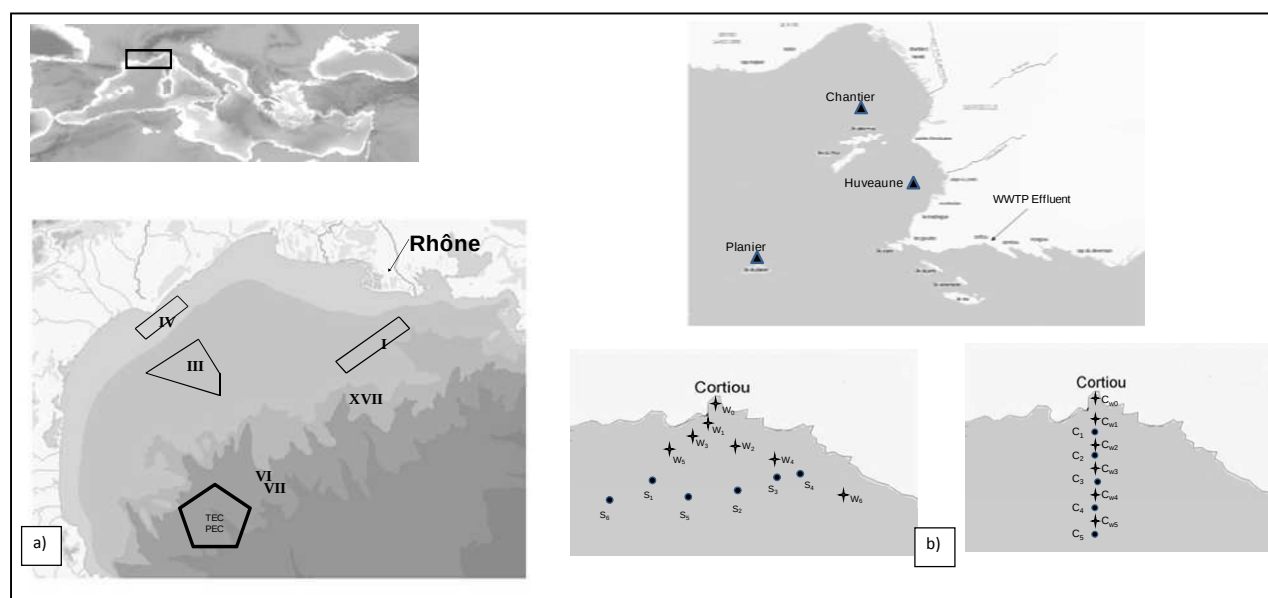


Figure 1: Location of the sampling sites in the Rade of Marseilles

- a) Localisation of the sampling sites of European hake. Sites I, III, IV and TECPEC (2005), sites VI, VII, XVII (2006).
- b) Location of the sampling sites in the Rade of Marseilles. Sampling points in the Rocky inlet of Cortiou in 2004 (left one) and 2006 (right one).

2-1-2 The Gulf of Lion

The Gulf of Lion (42–44°N, 3–6°E) has a large crescent shaped continental shelf. More than 10 rivers with a total watershed area of about 125,000 km² deliver significant water discharges into the gulf. The Rhone River on the northwestern part of the gulf delivers about 90% of the total riverine water inputs. The shoreline is heavily urbanized (1.5 million inhabitants), with one of the largest French cities, Marseilles, at the northeastern tip of the shelf. Terrestrial sources of nutrients from sewage treatment waters, runoff and rivers bring a significant supply of nutrients to the Gulf in the form of nitrate and phosphate (Durrieu, 2003), leading to an extensive productive area.

The european hake (*Merluccius merluccius*) is a very common demersal marine fish in the Mediterranean Sea (30-1,075 m depth) and of particular interest due to its high commercial value. 2 sampling campaigns have been held: the first campaign occurred in May 2005 in the continental margin (30-100m depth): sampling areas were located near the mouth of the Rhone River and in the central part of the Gulf of Lion (Stations I, III, IV, TEC PEC; Figure 1). The second sampling campaign occurred in October 2006 in the deep part of the Gulf of Lion (200-400 m depth, Stations VI, VII, XVII; Figure 1). After collection, fish was immediately dissected; fish bile was extracted from gall bladders, immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C.

2-2-Standards and Reagents

The compounds were selected taking into their ubiquity, their persistence and toxic potential. Unlabeled p-n-nonylphenol (98%+, p-n-NP), p-n-nonylphenol monoethoxylate (95%+, p-n-NP₁EO), nonylphenoxyacetic acid (ring chain isomers) (98%+, 4-NP₁EC) were purchased from Promochem. (Molsheim, France) (100 µg.ml⁻¹ in nonane, respectively). 4-nonylphenol (100%, 4-NP, technical), 4-tert-octylphenol (4-t-OP; 98%), 4-nonylphenol-monoethoxylate (99.5%, 4-NP₁EO) and 4-nonylphenol-diethoxylate (99.5%, 4-NP₂EO) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). The spiked solutions were prepared in methanol at concentrations of 1 µg.ml⁻¹ of each compound.

Methanol (MeOH) for the analysis of pesticide residues was from Merck (VWR international, Strasbourg, France). Dichloromethane (DCM) for organic residue analysis was from J.T.Baker; water used for LC/MS analysis was from J.T. Baker (Atlantic Labo, Bruges, France). All the above solvents were used without further purification. Water used for solid phase extraction was Evian™ water in glass bottles and has been tested for low level of NP before (<5 ng.l⁻¹) (France Boisson, France). Hydrochloric acid (purity 37%) was purchased from VWR international (Strasbourg, France). Ammonium acetate (minimum purity 98%) was purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). All the chemicals were tested for background levels for the compounds of interest.

Due to the ubiquitous occurrence of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates (materials in plastics and detergents), glassware was chosen to avoid contamination of the sample. Furthermore, all the glassware and sampling apparatus required special treatment prior to use. All the glassware was washed and then heated at 450°C for 6 h prior to use. Whatman GF/F glass fibre filters (pore size 0.7 µm) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France) and were also heated at 450°C for 6 h prior to use. 200 mg Bondelut® C18 cartridges and 500 mg HF-Bondelut® PSA cartridges were purchased from Varian (Courtabœuf, France).

2-3 Analytical methodologies for abiotic matrices

The protocols have been published previously (Pan et al., submitted). Briefly, between 1 l and 4 l of water samples were filtered through GF/F glass fiber filters (which was heated at 450°C, 6 hours)(0.7 µm). The treatment of the dissolved phase occurred in the 24 hours following the sampling in order to prevent biodegradation phenomena. After acidification (pH 2, HCl), between 0.5 to 1 l of water was passed through Bondelut® C₁₈ cartridges (200 mg, 3 cc, Varian). The elution was achieved by 5ml of a mixture of methanol/dichloromethane (50/50; v/v). Solid materials were stored at -20°C until freeze-drying. Sediments were then passed through a sieve (0.2 mm) and homogenized before being stored in a glass amber vial, at room temperature. Extraction (0.1 g of sediment, d.w.; Total Suspended Solids: equivalent of 2 l to 4 l of water filtrate) was carried out by microwave assisted extraction MAE (Prolabo, france) with a mixture of methanol/dichloromethane (40 ml; 3/1; v/v). The extracts were then filtered, evaporated to less than 500 µl and redissolved in 60 ml of water (pH 2) to undergo a purification step on C₁₈ cartridges (Lardy-Fontan et al., submitted). The extracts were evaporated and redissolved in methanol to a final volume of 100-200 µl.

Identification and quantification were performed with reversed phase liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry (LC-MS) (Agilent 1100 series, Palo Alto), in Single Ion Monitoring mode (Pan et al., submitted).

2-4-Analytical methodologies for biotic matrices

Samples (100 µl) were first treated with 20 µl of a β-glucuronidase-aryl-sulfatase mixture (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 100000 and 7500 units.ml⁻¹ respectively, for enzymatic deconjugation. To this purpose, samples were buffered to pH 5 (acetate buffer made up of sodium acetate and acetic acid in water) and were then placed in an oven at 40°C for 2h according to Martin-Skilton et al. (2006). The samples were then acidified to pH 2 (HCl) to undergo the C18 extraction. The extracts were then reconcentrated under a nitrogen stream, transferred into methanol (100-200 µl) and characterized by LC-MS.

2-5-Quality assurance-Quality control

All chemicals were tested for background levels for the compounds of interest. Due to the ubiquitous occurrence of alkylphenol materials in plastics and detergents, glassware and sampling apparatus required special treatment prior to use. All the glassware was washed and then heated at 450°C for 6 h prior to use.

The quantification was performed by an internal calibration (p-n-NP; p-n-NP1EO). To each extraction series a protocol blank was joined in order to show evidence of contamination during the different analytical steps. Small amounts of 4-NP have been quantified in some cases, while for the other analytes blank signals were absent. Moreover, spiked water (100ng.l⁻¹, individual compound), which follows all the experimental procedures, was joined to each extraction series. Reported concentrations were corrected for the blank value and the method recovery. Developed analytical methodologies show recovery rates higher than 80% with relative standard deviations of 20%. Furthermore, optimized methodology displays good sensitivity 1-5 ng.l⁻¹ for the dissolved phase, tens of ng.g⁻¹ for suspended solids (Pan et al., submitted; Lardy-Fontan S. et al., submitted)

3-Results and Discussion

3-1 Occurrence and fate of APEO metabolites in the rocky inlet of Cortiou

Table 1 sums the occurrence of APEO metabolites in the rocky inlet of Cortiou during the two sampling campaigns of 2004 and 2006. It presents minimal, maximal and median measured concentrations as well as frequency of detection of the investigated compounds. Firstly, the ubiquity of anaerobic metabolites of biodegradation (4-NP₁EO, 4-NP₂EO) as well as ultimate biodegradation products (NP) of NPEOs with 100% of detection can be assumed. Interestingly, 4-NP₁EC is under the limit of detection (frequency of detection of 0%, for detection limits of the range of ng.l⁻¹). NP₁EC is the ultimate biodegradation product of NPECs which are aerobic biodegradation metabolites of NPEOs. NPECs have been shown to be the predominant aqueous metabolites of WWTP secondary effluents and their receiving waters. Furthermore, previous works highlighted the fact that shorter chain APECs were persistent in the aquatic environment (Ahel, 1994; Di Corcia et al., 1998; Hayashi et al., 2005). The WWTP of Marseilles has a primary treatment of raw waters, thus the non detection of 4-NP₁EC in the effluents appeared to be consistent. Nevertheless, what is relevant here is the fact that natural systems do not seem to show adaptation capabilities to ensure aerobic biodegradation of APEOs. As most environmental monitoring focused on NP and OP, few are the data reporting the occurrence and the fate of APECs in marine waters. Monitoring works which have focused on these metabolites were held in coastal areas impacted by biological wastewater treatment plant loads, thus the comparability of observed trends did not appeared to be relevant. In the Rocky Inlet of Cortiou, 4-NP₁EO and 4-NP₂EO are the prevalent forms in the dissolved phase with median concentrations of

141 ng.l⁻¹ and 94 ng.l⁻¹ in 2004 and 283 and 233 ng.l⁻¹ in 2006, respectively; 4-NP at hundreds of ng.l⁻¹.

Table 1: Concentrations of APEO metabolites in the dissolved phase of the rocky inlet of Cortiou

ng.l ⁻¹	Sampling campaign 2004				Sampling campaign 2006			
	Min	Max	Median	Frequency of detection	Min	Max	Median	Frequency of detection
4-NP1EC	<1-2	<1-2	<1-2	-	<1-2	<1-2	<1-2	-
4-NP	42	489	165	100%	182	17	109	100%
4-NP1EO	49	287	141	100%	471	21	283	100%
4-NP2EO	64	141	94	100%	452	26	233	100%
4-t-OP	NA	NA	NA	NA	<5	<5	<5	-

The Table sums the minimal (min), maximal (max), median-measured concentrations as well as the frequency of detection of each compound; NA : not analyzed

APEO metabolites are quantified in suspended solids: <lod to 1.88µg.g⁻¹ for 4-NP, <lod to 1.78 µg.g⁻¹ for 4-NP1EO; no clear distribution pattern is observed in the plume. The fact that places which have got marine characteristics do not show any 4-NP, 4-NP₁EO and 4-NP₂EO in their suspended solid phase can be pointed out. By far, previous monitoring studies have highlighted the occurrence of APEO metabolites in marine TSS (Isobe et al., 2001; Wang et al., 2006; Xu et al., 2006; Li et al., 2008). Further explanations can be put forward: a punctual desorption of compounds linked with a modification of water physico-chemistry due to the changeover from brackish water to marine water (salinity, pH, conductivity) can be put forward. In fact, the sorption/desorption phenomena of pollutants have been shown to be dependent on physico-chemistry; Xu et al. (2008) highlighted the fact that sorption of BPA to marine sediments was linked with physico-chemistry, an increase of salinity results in the desorption of BPA. Furthermore the sorption of short chain ethoxymers has been shown to be strongly dependent on organic carbon contents (Hou et al., 2006).

Figure 2 shows the fate of APEOs in the plume of Marseilles effluents in the Rocky Inlet of Cortiou. The part of each phase in the global contamination is shown in ng.l⁻¹ as a function of the salinity (psu) (Sampling campaign of November 2006). First, we can observe a general decrease in measured concentrations as a function of salinity; meaning that the first phenomenon which occurs in the rocky inlet is dilution. Interestingly, by looking at the correlation between global aqueous contamination and salinity (e.g. dilution), it appears that it is sturdier for 4-NP ($R^2=0.935$) than for 4-NP₁EO ($R^2=0.8182$) and 4-NP₂EO ($R^2=0.6993$). Higher biodegradation rates for short chain ethoxylates (NP₂EO, NP₁EO) than for 4-NP can be put forward as one hypothesis. In fact, the longer the ethoxy chain, the faster the biodegradation (Ahel, 1994; Di Corcia et al., 1998; Hayashi et al., 2005; Soares et al., 2008).

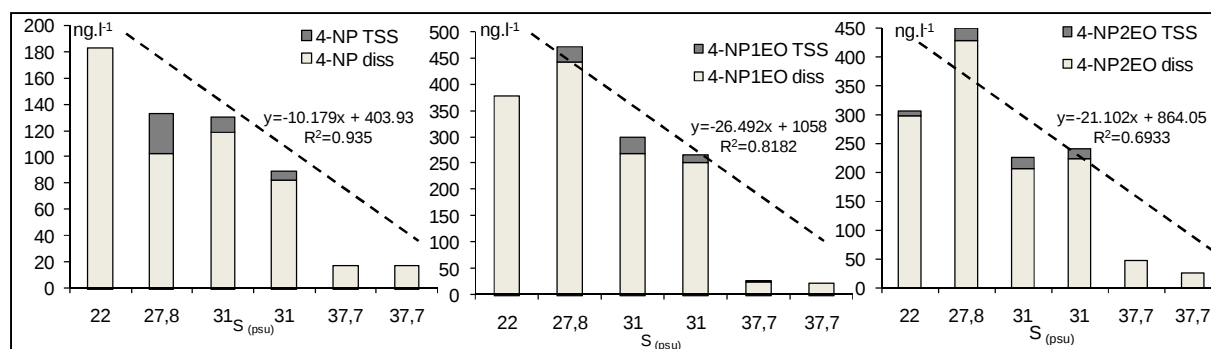


Figure 2: Fate of APEO metabolites in the Rocky Inlet of Cortiou.

Concentrations of each phase are expressed in ng.l⁻¹ as a function of salinity (sampling campaign of November 2006). Diss: dissolved phase (<0.7μm); TSS: Total suspended solids (>0.7μm).

The sediments of the Rocky Inlet (S1 to S6 November 2004, C1 to C5 November 2006) reveal significant contamination by APEO metabolites which is very heterogeneous in term occurrence and distribution: from < lod to 2,713 μg.kg⁻¹ for 4-NP, < lod to 2,840 μg.kg⁻¹ for 4-NP₁EO, < lod to 2,091 μg.kg⁻¹ for 4-NP₂EO. Subjected to various influences, continental as well as marine, the coastal sediments present characteristics and thus capacities to retain the contaminants which are highly variable. The particles of continental origin brought by freshwaters are mainly charged with manganese and iron oxyhydroxydes, conferring them new properties for the sorption of chemicals; once at sea, these particles undergo modifications, in particular they are impoverished in organic carbon. The particles of marine origin (various organic refuses, tests, minerals *in situ*) generally give way to deposits richer in silica and carbonates. Among the properties of the sediments, granulometry is a parameter usually associated because it is usual to partly explain the natural variability in the sediments. Indeed, the more the percentage in fine particles is important, the more the capacity of the sediment has to absorb the contaminants is strong. From the point of view of granulometry, the marine sediments are divided into two categories: - The fine sediments (lutites), made up of lower particles (<63 μm of diameter: clays, silts). - The coarse sediments (arenites and rudites), made up of elements whose granulometry is higher than 63 μm (sands (> 63 μm to 2 mm) and gravels (>2 mm)). Generally low in organic matter, these sediments display poor sorption properties. The sorption of short chain APEOs and APs has been shown to rely on both hydrophobic interactions with organic matter and hydrophilic interactions with mineral components (John et al.,2000) which lead to the ubiquity and heterogeneity of the distribution of APEOs in the sediments.

As it is observed for the aqueous phase, a general decrease in sediment contaminations (Figure 3) can be observed from the outfall to the open sea (maximum distance of 1 km). Sarrazin et al. (2005) published similar trends for linear alkybenzene sulfonate (LAS) whose concentrations ranged from 12.19 μg.g⁻¹ to 0.47 μg.g⁻¹ in sediments from the Cortiou area and were strongly influenced by the liguro-provençal current. They concluded to a significant contamination as far as 2.5

km from the outfall. Similarly, Wafo et al. (2006)) reported a five zone sub-division based on the sediment contamination profile in polychlorinated biphenyls and DDT residues.

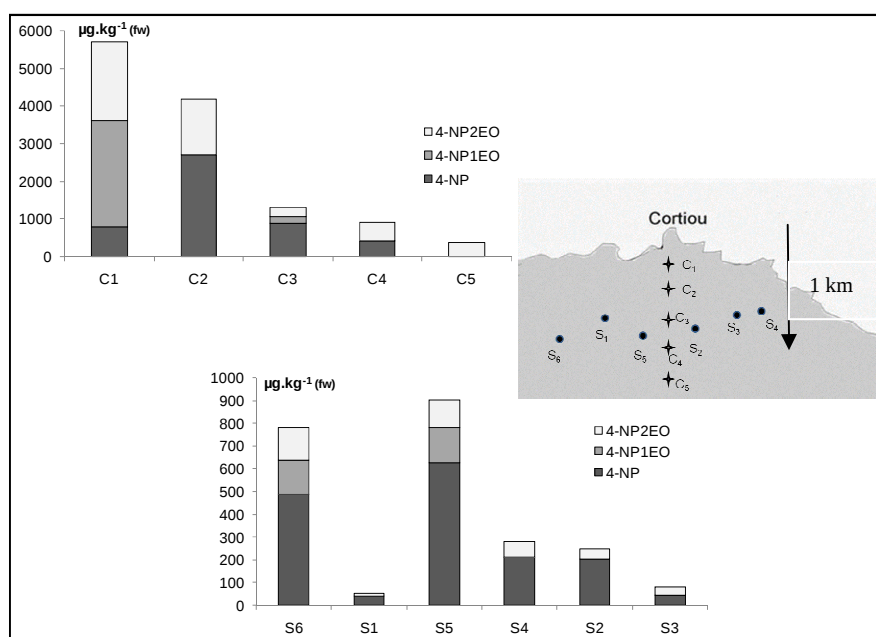


Figure 3: Fate and occurrence of APEOs in the sediments of the Rocky Inlet of Cortiou. Concentrations are expressed in μg.kg⁻¹ (fresh weight) (S1 –S6: November 2004; C1-C5: November 2006)

3-2-Occurrence and fate of APEO metabolites in the Rade of Marseilles

Table 2: Occurrence of APEO metabolites in the Rade of Marseilles.

	Huveaune			Chantier			Planier		
	Dissolved phase (ng.l ⁻¹)	TSS (μg.g ⁻¹)	Sediment (μg.g ⁻¹)	Dissolved phase (ng.l ⁻¹)	TSS (μg.g ⁻¹)	Sediment (μg.g ⁻¹)	Dissolved phase (ng.l ⁻¹)	TSS (μg.g ⁻¹)	Sediment (μg.g ⁻¹)
4-NP1EC	<1-2	<0.03	<0.03	<1-2	<0.03	<0.03	<1-2	<0.03	<0.03
4-NP	11	18.88	0.85	34	8.27	0.82	8	3.48	1.74
4-t-OP	< 5	0.32	<0.1	< 5	4.52	<0.1	< 5	1.91	<0.1
4-NP1EO	7	0.57	0.33	13	0.84	<0.1	5	1.09	<0.1
4-NP2EO	12	0.06	0.27	20	0.55	0.143	11	0.41	0.43
TSS (mg.l ⁻¹)	-	2.50	-	-	2.29	-	-	1.95	-

The Rade of Marseilles is under direct and indirect anthropogenic releases, leading to the ubiquity of APEO metabolites in the Rade of Marseilles as highlighted by the Table 2 which presents the contamination in metabolites in the dissolved phase (ng.l⁻¹), suspended solids (μg.g⁻¹) and sediments (μg.g⁻¹). The contamination of the dissolved phase appears to be homogenous in terms of

occurrence and distribution with concentrations ranging from few ng.l^{-1} to tens of ng.l^{-1} . As in Cortiou, 4-t-OP and 4-NP1EC are below detection limits ($1\text{--}2 \text{ ng.l}^{-1}$). On the contrary, the contamination of suspended solids appears to be discriminated. The site of Huveaune presents the highest contamination in 4-NP with a value of $18.9 \mu\text{g.g}^{-1}$ and the lowest value of NP₁₋₂EO. This site is located near the outfall of the Huveaune stream which flows on a 500 km^2 catchment area. For ten years, the major part of the river has been deviated towards the WWTP of Marseilles because it polluted the beaches of the city located near its mouth. When strong precipitations occur, the excesses which cannot be absorbed by the WWTP are evacuated by the old natural bed. Thus relevant amounts of compounds can be linked with the loads of highly charged suspended matter. The site of Chantier also displays a high proportion of 4-NP with concentration of $8,277 \mu\text{g.g}^{-1}$ and high concentration of 4-t-OP of $4,518 \mu\text{g.g}^{-1}$. The occurrence of these compounds at high concentrations seems to show the existence of different sources of contamination. In fact, the site of Chantier is located near industrial areas and harbor activities which may release APs. A significant decrease of the contamination profile of TSS is observed from the coast to the open sea; on the contrary to sediments whose concentrations are higher in the site of Planier than in the sites of Huveaune and Chantier, in any case lower than those of TSS (Table 2). Sedimentation processes may occur in the Rade of Marseilles leading to the deposits of highly charged solids. 4-NP has been shown to be poorly biodegraded in sediments with half-life which can reach more than ten years (Shang et al., 1999). Furthermore, degradation rates have been shown to be dependent on the distance from sources, organic matter contents (Li et al., 2008); the site of Planier is located in the open-sea. As it has been discussed in previous section, the sorption of APEOs is a function of the nature and structure of solids. Thus, the hypothesis of heterogenic materials can be assumed to display variable sorption capabilities towards APEO metabolites.

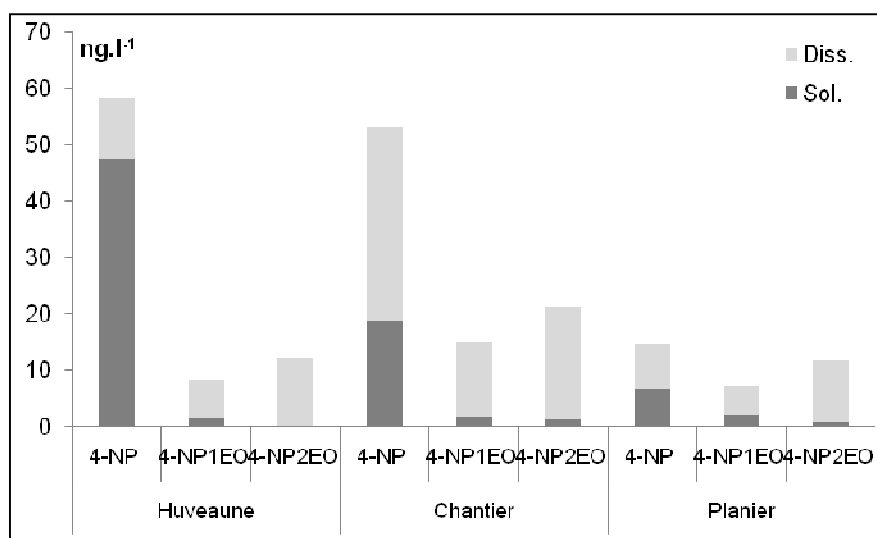


Figure 4: Global contamination expressed in ng.l^{-1} in the Rade of Marseilles. Weight of each phase, dissolved phase and suspended solids, in the global contamination (Diss: Dissolved phase ($<0.7 \mu\text{m}$); Sol: Solid phase ($>0.7 \mu\text{m}$)).

3-3-French NW costal Mediterranean contamination by APEO metabolites in a global context

When replacing the observed trends from the French Mediterranean to the general Mediterranean Sea contamination by APEOs and their metabolites. It can be assumed that there is nothing to compare with the Israelian context reported by Zöller since numerous years (Zoller et al., 2004; Zoller, 2006a; Zoller, 2006b; Zoller, 2008) which highlight huge contamination of all the water systems with concentrations reaching more than tens of $\mu\text{g.l}^{-1}$. Petrovic et al. (2002) reported concentrations which can attempt $\mu\text{g.l}^{-1}$ in the dissolved phase and mg.kg^{-1} in harbor sediments. Gonzalez et al. (2004) studied the contamination profiles of the Barcelona and Tarragona coasts: they found significant concentrations with maximum values of $9.2 \mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-NP1EO, $0.21 \mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-NP, $0.22 \mu\text{g.l}^{-1}$ for 4-NP1EC for the dissolved phase. Pojana et al. (2007) evaluated the contamination of the Venice lagoon; they reported concentrations ranging from <0.5 to 211 ng.l^{-1} for 4-NP and <0.1 to 82 ng.l^{-1} for 4-NP1EC in the dissolved phase; 47 to $192 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for 4-NP in sediments. Thus, the concentrations reported in this study were significantly lower in the dissolved phase, with the exception of the plume of the WWTP of Marseilles; and in the same order of magnitude regarding sediments. The profile of contamination was significantly different from those described by studies focusing on north and west European estuaries (Bester et al., 2001; Jonkers et al., 2005; Vethaak et al., 2005b; Cailleaud et al., 2007) which highlighted significant levels of 4-NPEC in the dissolved phase.

In Europe, the implementation of the WFD leads to the determination of Environmental Quality Standards expressed as an annual average value (EQS-AA); for 4-NP this value has been fixed at 330 ng.l^{-1} , which is the value of Predicted Non- effect Concentration PNEC in freshwater (INERIS). In the Rade of Marseilles, 4-NP was quantified at levels of tens of ng.l^{-1} , tenfold lower than the PNEC, with the exception of the plume where concentrations were found to be higher than hundreds of ng.l^{-1} . Thus, it appeared that the adverse effects which might be linked with the presence of 4-NP were limited to the area close to the outfall. The situation appeared to be drastically different for sediments. In fact, a chronic PNEC for sediments based on partition coefficients has been estimated at $39 \mu\text{g.kg}^{-1}(\text{f.w.})$ (INERIS)). In the Rade of Marseilles, the ratios MEC/PNEC were higher than 1, suggesting that adverse effects linked with the presence of NP might happen in the sediments of the Rade of Marseilles and that the risks were worse for the Rocky Inlet of Cortiou.

3-4-Occurrence of free APEO metabolites in the bile of the European hake (*Merluscus merluscus*)

5 samples of bile were divided into two aliquots of $100 \mu\text{l}$. One set underwent the deconjugation protocol before the C18 extraction; on the contrary the second set of samples only underwent the C18 extraction. It leads to the determination of free alkylphenolic compounds and conjugated forms of alkylphenolic compounds. As presented in Table 3, only 4-NP and 4-NP2EO were detected and quantified in the bile ($\mu\text{g.g}^{-1}$ of bile) whatever the conditions (with or without

deconjugation). The quantities of measured compounds were significantly higher when deconjugation was achieved ($0.08 \pm 0.06 \mu\text{g.g}^{-1}$ by comparison to $0.34 \pm 0.19 \mu\text{g.g}^{-1}$ for 4-NP) showing that more than 75% of 4-NP were conjugated in the bile which is in agreement with previous works on atlantic salmon (Arukwe et al., 2000). The successful methodology was applied to the determination of free and conjugated forms of alkylphenolic compounds in the bile of mediterranean *Merluccius merluccius*.

Table 3: Alkylphenolic compound in the bile of *Merluscus merluscus*

$\mu\text{g.g}^{-1}$	Free metabolite	Conjugate. metabolite
4-NP	0.08 ± 0.06	0.34 ± 0.19
4-t-OP	<0.01	<0.01
4-NP1EC	<0.01	<0.01
4-NP1EO	<0.01	<0.01
4-NP2EO	0.91 ± 0.89	1.11 ± 0.66

Mean $\pm$ standard deviation, n=5

The obtained results were applied to a significant set of samples in different locations on the Gulf of Lion. The results are presented in Figure 5 and focus on 4-NP. These results demonstrate a significant contamination of biles by 4-NP with total measured concentrations (sum of free and conjugated forms) from hundreds $\mu\text{g.g}^{-1}$ to more than $5 \mu\text{g.g}^{-1}$. A chronic exposition of aquatic species and thus a widespread state of contamination of the Mediterranean Sea can be assumed. In this study, the results highlighted high inter-individual variability, which were also observed by Martin-Skilton et al. (2006) in a study of the Red mullet (*Mullet barbatus*) in the north western Mediterranean Sea. Variability could be linked to variability of exposure and metabolism efficiency. Furthermore, inter-site variability can be observed; maximum concentrations are measured in sites II, XVII and I (maximum values higher than $\mu\text{g.g}^{-1}$); these sites are located near the mouth of the Rhone River and are under direct anthropic pressures; on the contrary, individuals from the sites V, VI and TECPEC show lower levels of contamination with concentrations tenfold lower which was consistent with the fact that those areas are located in the open sea and at high depth.

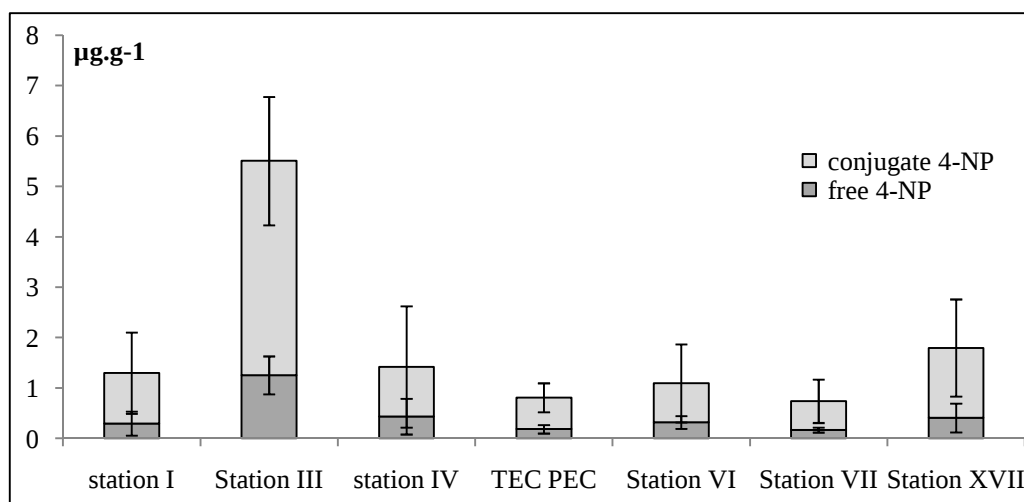


Figure 5: Contamination of the bile of *Merluscius merluscius* by 4-NP.

(Concentrations are expressed in µg.g⁻¹ of bile).

4-Conclusion and Perspectives

To the best of our knowledge, this study highlights the first data on the occurrence and fate of APEO metabolites on French Mediterranean coasts. It shows that the French Mediterranean coast show a widespread contamination of waters and sediments; which allows us to think that some adverse effects might occur. This idea has been emphasized by the quantification of the European hake, which showed a chronic and widespread contamination of aquatic species. From a “mechanistic” point of view; these results show that suspended solids are the major contributor to the contamination of marine systems by APEO metabolites and play a significant role in dispersion phenomena. Further studies should focus on this specific point.

Furthermore, since February, the new cleansing unit “Geolide” has been implemented. Now, the WWTP of Marseilles is equipped with the last generation processes of biological treatment. Thus, future works should concentrate on the impact of this new tool at a local scale: the Rocky inlet of Cortiou, and on a large scale; the Rade of Marseilles.

Acknowledgments

The authors wish to thank the MEDICIS program and the SCOPE program for research funding, IFREMER (French Research Institute for the Exploitation of the Sea) for technical support and sampling campaigns. The “Région Aquitaine” is also thanked for research funding in the framework of ORQUE program.

Bibliography

- Cespedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A. and Barcelo, D. (2006) Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N. E. Spain). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385(6), 992-1000.
- Ko, E.J., Kim, K.W., Kang, S.Y., Kim, S.D., Bang, S.B., Hamm, S.Y. and Kim, D.W. (2007) Monitoring of environmental phenolic endocrine disrupting compounds in treatment effluents and river waters, Korea. *Talanta* 73(4), 674-683.
- Lopez de Alda, M.J., Diaz-Cruz, S., Petrovic, M. and Barcelo, D. (2003) Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A* 1000(1-2), 503-526.
- Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M. and Kuiper, R.V. (2005a) An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 59(4), 511-524.
- Renner, R. (1997) European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environ. Sci. Technol.* 31, 316A-320A.
- Ahel, M.G., W. and Koch, M. (1994) Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment — I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat. Res.* 28(5), 1131-1142.
- Hayashi, S., Saito, S., Kim, J.H., Nishimura, O. and Sudo, R. (2005) Aerobic Biodegradation Behavior of Nonylphenol Polyethoxylates and Their Metabolites in the Presence of Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 39(15), 5626-5633.
- Corcia, A.D., Costantino, A., Crescenzi, C. and Samperi, R. (1998) Characterization of recalcitrant intermediates from biotransformation of the Branched alkyl side chain of nonylphenol ethoxylate surfactants. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2401-2409.
- Di Corcia, A., Costantino, A., Crescenzi, C., Marinoni, E. and Samperi, R. (1998) Characterization of recalcitrant intermediates from biotransformation of the branched alkyl side chain of nonylphenol ethoxylate surfactants. *Environmental Science and Technology* 32(16), 2401-2409.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E. and Lester, J.N. (2008) Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*.
- Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A.F. and Viana, M.T. (2006) Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Scientific review. Applied Ecology and Environmental Research* 4(1), 1-25.
- Servos, M.R. (1999) Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual. Res. J. Canada.* 34(1), 123-177.
- Mills, L.J. and Chichester, C. (2005) Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment* 343(1-3), 1-34.
- Pan.X., Lardy-Fontan S., Budzinski H. Determination of nonylphenol ethoxylate metabolites in river water and sewage treatment plant effluents by solid-phase extraction, high performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. submitted to *Analytical Bioanalytical Chemistry*.
- Lardy-Fontan S., Pan.X., Budzinski H. Analysis of alkylphenol polyethoxylates metabolites in suspended solids from the Seine estuary by focused microwave-assisted extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography- electrospray mass spectrometry. submitted to *Analytical Bioanalytical Chemistry*.

- Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A. and Takada, H. (2001) Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1041-1049.
- Wang, L., Wu, Y., Sun, H., Xu, J. and Dai, S. (2006) Distribution and dissipation pathways of nonylphenol polyethoxylates in the Yellow River: Site investigation and lab-scale studies. *Environment International* 32(7), 907-914.
- Xu, J., Wang, P., Guo, W., Dong, J., Wang, L. and Dai, S. (2006) Seasonal and spatial distribution of nonylphenol in Lanzhou Reach of Yellow River in China. *Chemosphere* 65(9), 1445-1451.
- Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H. and Kannan, N. (2008) Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea. *Chemosphere* 71(6), 1162-1172.
- Xu, X., Wang, Y. and Li, X. (2008) Sorption behavior of bisphenol A on marine sediments. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 43(3), 239-246.
- Hou, S.G., Sun, H.W. and Gao, Y. (2006) Sorption of small metabolites of nonylphenol polyethoxylates in single and complex systems on aquatic suspended particulate matter. *Chemosphere* 63(1), 31-38.
- John, D.M., House, W.A. and White, G.F. (2000) Environmental fate of nonylphenol ethoxylates: Differential adsorption of homologs to components of river sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(2), 293-300.
- Sarrazin, L., Diana, C., Wafo, E., Schembri, T., Pichard-Lagadec, V. and Rebouillon, P. (2005) HPLC detection of linear alkylbenzenesulfonates surfactants (LAS) in marine sediments of the urban sewage area of Cortiou (Marseille, France). *International Journal of Environmental Studies* 62(3), 301-312.
- Wafo, E., Sarrazin, L., Diana, C., Schembri, T., Lagadec, V. and Monod, J.L. (2006) Polychlorinated biphenyls and DDT residues distribution in sediments of Cortiou (Marseille, France). *Marine Pollution Bulletin* 52(1), 104-107.
- Shang, D.Y., Macdonald, R.W. and Ikononou, M.G. (1999) Persistence of nonylphenol ethoxylates surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the Strait of Georgia, British Columbia, Canada. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1366-1372.
- Zoller, U., Plaut, I. and Hushan, M. (2004) The case of the nonionic alkylphenol ethoxylates in the Mediterranean Sea region: Is there a problem?, pp. 79-84.
- Zoller, U. (2006a) Estuarine and coastal zone marine pollution by the nonionic alkylphenol ethoxylates endocrine disruptors: Is there a potential ecotoxicological problem? *Environment International* 32(2), 269-272.
- Zoller, U. (2006b) Water reuse/recycling and reclamation in semiarid zones: The Israeli case of salination and "Hard" surfactants pollution of aquifers. *Journal of Environmental Engineering* 132(6), 683-688.
- Zoller, U. (2008) Distribution profiles of endocrine disrupting PAHS/APEOs in river sediments: Is there a potential ecotoxicological problem?, pp. 237-242.
- Petrovic, M., Rodriguez Fernandez-Alba, A., Borrell, F., Maria Marce, R., Gonzalez Mazo, E. and Barcelo, D. (2002) Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(1), 37-46.
- Gonzalez, S., Petrovic, M. and Barcelo, D. (2004) Simultaneous extraction and fate of linear alkylbenzene sulfonates, coconut diethanol amides, nonylphenol ethoxylates and their degradation products in wastewater treatment plants, receiving coastal waters and sediments in the Catalanian area (NE Spain). *Journal of Chromatography A* 1052(1-2), 111-120.

Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N. and Marcomini, A. (2007) Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International* 33(7), 929-936.

Bester, K., Theobald, N. and Schroder, H.F. (2001) Nonylphenols, nonylphenol-ethoxylates, linear alkylbenzenesulfonates (LAS) and bis (4-chlorophenyl)-sulfone in the German Bight of the North Sea. *Chemosphere* 45(6-7), 817-826.

Jonkers, N., Laane, R.W.P.M. and de Voogt, P. (2005) Sources and fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch coastal zone of the North Sea. *Marine Chemistry* 96(1-2), 115-135.

Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., De Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M., Kuiper, R.V., Legler, J., Murk, T.A.J., Peijnenburg, W., Verhaar, H.J.M. and De Voogt, P. (2005b) An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 59(4), 511-524.

Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K. and Budzinski, H. (2007) Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoida, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70(2), 270-280.

INERIS Nonylphenols.

Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M. and Funari, E. (2005) Alkylphenols and alkylphenol ethoxylates contamination of crustaceans and fishes from the Adriatic Sea (Italy). *Chemosphere* 59(8), 1145-1150.

Ferrara, F., Ademollo, N., Delise, M., Fabietti, F. and Funari, E. (2008) Alkylphenols and their ethoxylates in seafood from the Tyrrhenian Sea. *Chemosphere*.

Martin-Skilton, R., Lavado, R., Thibaut, R., Minier, C. and Porte, C. (2006) Evidence of endocrine alteration in the red mullet, *Mullus barbatus* from the NW Mediterranean. *Environmental Pollution* 141(1), 60-68.

Publication n°10

Présence et devenir de 16 composés pharmaceutiques au niveau de la côte méditerranéenne (nord-ouest)

Une étude de cas dans la calanque de Cortiou.

Sophie Lardy-Fontan ⁽¹⁾, Anne Togola ⁽²⁾, Karyn Le Menach ⁽¹⁾, Hélène Budzinski* ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Institut des Sciences Moléculaires (ISM UMR 5255 CNRS) - Laboratoire de Physico & Toxicologie
Chimie de l'Environnement

Université Bordeaux I, 33405, Talence Cedex, France

⁽²⁾ BRGM- 3 avenue Claude Guillemin – BP 6009 45060 Orléans Cedex 2

*auteur correspondant. Tel.: 33 5 56 84 69 98; Fax: 33 5 56 84 69 98.

e-mail adresse: h.budzinski@ism.u-bordeaux.fr

Résumé:

Seize composés pharmaceutiques à usage humain ont été étudiés pour leur présence et leur devenir dans la phase dissoute, les matières en suspension et les sédiments dans la région de Marseille. Une contamination généralisée de tous les sites étudiés a été mise en évidence, principalement dominée par les anti-inflammatoires non stéroïdiens, le gemfibrozil et la caféine qui sont présents partout. Une contamination significative des phases dissoutes (valeur maximale supérieure au $\mu\text{g.l}^{-1}$) et des sédiments (valeur maximale supérieure au $\mu\text{g.g}^{-1}$, poids sec) a été mise en évidence, mais reste cependant insuffisante pour exercer des effets toxiques sur les organismes aquatiques. Néanmoins, cela ne signifie pas qu'il n'y ait aucun risque toxique lié à la présence de substances pharmaceutiques associées à d'autres molécules organiques, particulièrement dans la calanque de Cortiou. Par ailleurs, les résultats ont mis en évidence que les phases solides en suspension pouvaient être d'importants vecteurs pour la dispersion des molécules pharmaceutiques dans les écosystèmes marins.

Pour soumission à Marine Chemistry

Occurrence and Fate of 16 Pharmaceutical compounds on the North Western Mediterranean coast.

A case study on the Rade of Marseilles.

Sophie Lardy-Fontan ⁽¹⁾, Anne Togola ⁽²⁾, Karyn Le Menach ⁽¹⁾, Hélène Budzinski* ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Institut des Sciences Moléculaires (ISM UMR 5255 CNRS) - Laboratoire de Physico & Toxico
Chimie de l'Environnement

Université Bordeaux I, 33405, Talence Cedex, France

(2) BRGM- 3 avenue Claude Guillemin – BP 6009 45060 Orléans Cedex 2

*Corresponding author. Tel.: 33 5 56 84 69 98; Fax: 33 5 56 84 69 98.

E-mail address: h.budzinski@ism.u-bordeaux.fr

Abstract

16 human pharmaceutical compounds were studied for their occurrence and fate in the dissolved phase, suspended matter and sediments in the Marseilles area. A widespread contamination of all investigated sites was highlighted, mainly dominated by Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, gemfibrozil and caffeine which were present everywhere. Significant contamination of water (maximum value more than $\mu\text{g.l}^{-1}$) and sediments (maximum value more than $\mu\text{g.g}^{-1}$, d.w.) was highlighted but nevertheless lower than expected to exert toxic effects on aquatic organisms. Nevertheless, it did not mean that there was no toxic concern linked with the presence of pharmaceuticals mixed with other organic compounds, especially in the rocky inlet of Cortiou. Moreover, the findings highlighted suspended solids as significant vectors for dispersion of pharmaceutical compounds in marine water.

1-Introduction

The Mediterranean Sea is a large semi-enclosed sea with a total surface area of approximately 2.5 million km^2 and an 80 year water renewal time. Many human activities result in environmental stresses and human health problems, such as high nutrient concentrations and eutrophication, increasing incidences of algal blooms, as well as high levels of hazardous substances (Stanners and Bourdeau, 1995; EEA, 1998). Aware of the pressure on the Mediterranean Sea, 16 Mediterranean countries adopted on Mediterranean Action Plan (MAP) in 1975 and The Barcelona Convention in 1976. Although its aim was first focused on marine pollution, over the years, its activities gradually widened to coastal management, leading to the adoption and amendment of the Barcelona Convention, renamed Convention For the Protection of The Marine Environment and the Coastal Region of the Mediterranean. It is shared by 20 states and one projection suggests that the

population in the Mediterranean area can be expected to increase from 323 million in 1980 to 547 million by 2025 (UNEP, 1989). In addition, the Mediterranean attracts some 200 million tourists every year, leading to the release of a cocktail of more than 3,000 pharmaceutical compounds (among the most prescribed in European countries) through wastewater treatment loads or direct release into aquatic systems. For more than five years an exponential interest has been taken in the study of the occurrence and fate of PhACs in various treatment schemes and receiving environments. PhACs are regarded as potential hazardous compounds because of their: **1) Ubiquity**- In fact, a wide range of PhAC compounds has been identified and quantified in drinking water, surface waters and marine waters in concentrations ranging from low ng.l^{-1} to a few $\mu\text{g.l}^{-1}$ (reviews Enick and Moore, 2007; Khetan and Collins, 2007). Nevertheless, one should note that data dealing with the occurrence and fate of PhACs in marine water are scarce (Heemken et al., 2001; Weigel et al., 2002; Weigel et al., 2004; Kasprzyk-Hordern et al., 2008; Comeau et al., 2008; Togola and Budzinski, 2008); **2) Persistence**- In fact, PhACs display various degradation properties. In WWTP, some compounds like acetaminophen, caffeine, present average removal of more than 90% in any case, contrary to carbamazepine, diazepam, nordiazepam or diclofenac (<10%) which are poorly removed by conventional treatment (Garric and Ferrari, 2005). In natural waters, the fate of pharmaceuticals is controlled by biotic (biodegradation) and abiotic (mainly photolysis) processes (Garric and Ferrari, 2005). Consequently, PhACs display a wide range of stability: low stability for ibuprofen, caffeine or bezafibrate (with half-life less than 1 week), moderate stability for ciprofloxacin, atenolol (with half-life of more than ten days), prolonged stability for erythromycin or carbamazepine (with half-life of a hundred days to more than a year) (Zuccato et al., 2005); **3) Biological activity**- Although maximum measured concentrations in the environment are one or two orders of magnitude lower than those expected to exert chronic toxic effects. Nevertheless, this does not preclude the possibility of other biological effects on marine organisms such as endocrine disruption and synergetic or additive toxicity effects from the multitude of other PhAC/metabolites and pollutants possibly present in the area (Fent et al., 2006).

The main aim of the undertaken work was to determine the occurrence of 16 PhACs in the Rade of Marseilles and in a smaller scale on the Plume of the WWTP of the City in the inlet rock of Cortiou. It will lead to the generation of among the first data referring to the fate and occurrence of PhACs in French marine water. Furthermore this work took a specific interest in 3 abiotic compartments: dissolved phase, suspended solids and sediments

2-Material and methods

2-1 Sites of investigation

The Northern west Mediterranean Sea is the recipient of extensive urban, industrial water from bordering countries as well as natural discharges of major European Rivers. At the French level, the area of the Rade of Marseilles can be pointed out as representative of pressures.

The Marseilles' coastline is heavily urbanized and industrialized; various sources of chemical contamination have been identified (domestic activities, agricultural activities, harbor, maritime and industrial activities). The Rade of Marseilles is the receptacle of several cleaning networks and industrial and agricultural wastes. The Wastewater Treatment Plant of Marseilles displays a capacity of 1,600,000 equivalent-inhabitants and applies a physicochemical process (primary decantation and lamellar decantation). Effluent loads are found towards the rocky inlet of Cortiou.

A sampling campaign (coastal oceanic ship Europe, IFREMER) was carried out in November 2006. Its aim was first to supplement data from the first sampling campaign in the rocky inlet of Cortiou (Togola and Budzinski, 2008). For this purpose, sampling waters were taken out in the sub-surface (depth 0.1 m) in the plume of dilution of the effluent (C_{w0} - C_{w5}), moreover some surface sediment were found in the plume using a Reineck bucket (C_1 - C_5). Secondly, some samples were led to characterize the contamination profile of the Rade of Marseilles (Figure 1); the 3 sites were investigated for both waters and sediments following the same methodology as previously discribed, namely: the Planier (marine site without direct anthropic influences), the sites of Huveaune and Chantier (sites under direct anthropic impacts).

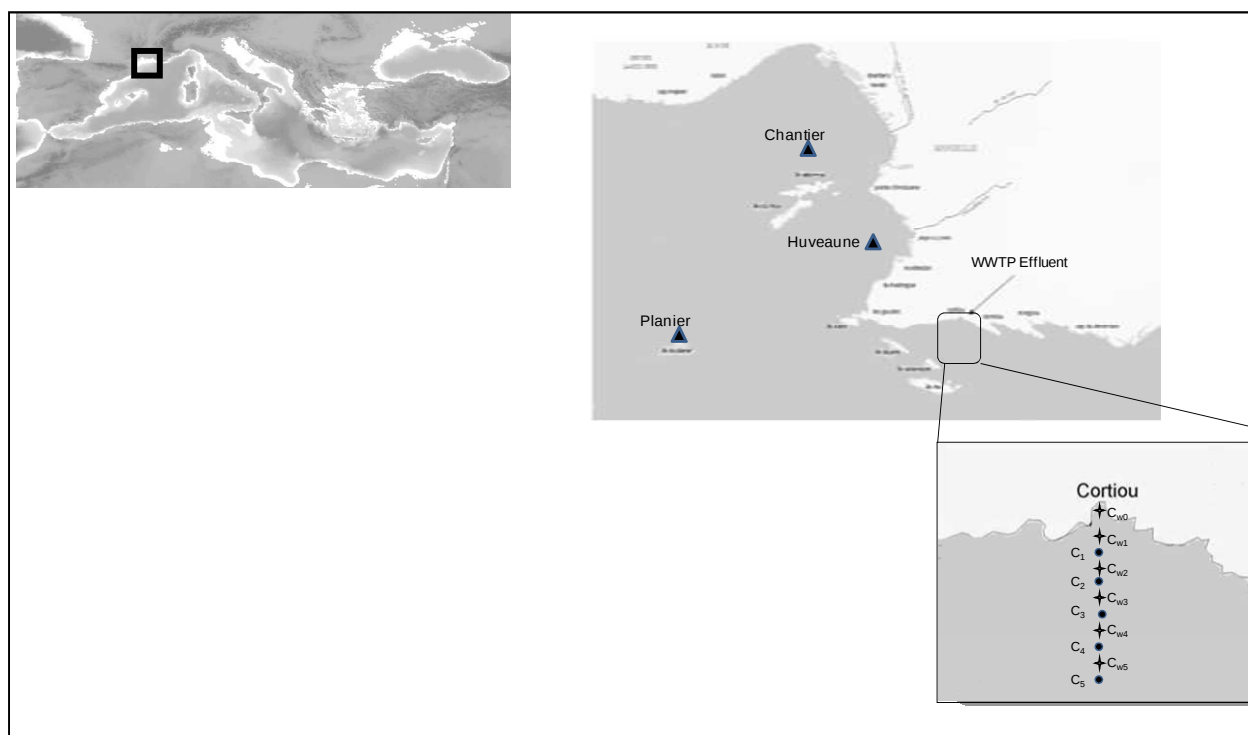


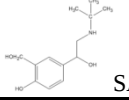
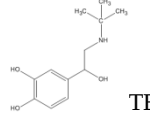
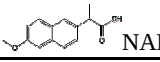
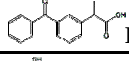
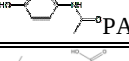
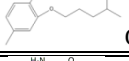
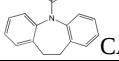
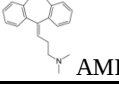
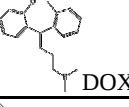
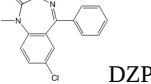
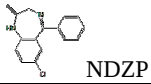
Figure 1: Location of the sampling sites in the Marseilles area.

Sampling points in the Rocky inlet of Cortiou in 2006.

2-2 Chemical and reagents

The 16 pharmaceutical compounds were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France; purity > 98%) and are presented with their chemical structures in Table 1.

Table 1: Presentation of the 16 selected pharmaceutical compounds.

Therapeutic Class		Molecules		Analysis
Stimulant		Caffeine	 CAFF	GC-EI-MS
Bronchodilators	β -stimulants	Salbutamol	 SALBU	GC-EI-MS (derivatization MSTFA)
	β -stimulants	Terbutaline	 TERBU	GC-EI-MS (derivatization MSTFA)
NSAID		Ibuprofen	 IBU	GC-EI-MS (derivatization MSTFA)
		Naproxen	 NAPROX	GC-EI-MS (derivatization MSTFA)
		Ketoprofen	 KETO	GC-EI-MS (derivatization MSTFA)
		Diclofenac	 DICLO	GC-EI-MS (derivatization MSTFA)
Analgesics		Aspirin	 ASP	GC-EI-MS (derivatization MSTFA)
		Paracetamol	 PARA	GC-EI-MS (derivatization MSTFA)
Lipid regulator agent		Gemfibrozil	 GEMF	GC-EI-MS (derivatization MSTFA)
Antidepressants/ Anxiolytics	Normothymic	Carbamazepine	 CARBA	GC-EI-MS
	Antidepressants imipraminics	Imipramine	 IMI	GC-EI-MS
		Amitriptyline	 AMI	GC-EI-MS
		Doxepine	 DOX	GC-EI-MS
	Anxiolytics (Benzodiazepines)	Diazepam	 DZP	GC-EI-MS
		Nordiazepam	 NDZP	GC-EI-MS

Deuterated products (diazepam^{d5}, amitriptyline^{d6}, nordiazepam^{d5}) used for pharmaceutical quantification were purchased from Euriso-Top (St Aubin, France; purity > 98%). Surrogate standards

Pyrene and 1-hydroxypyrene, used as recovery determination standards, were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France; purity > 98%). Acetone, acetonitrile, ethyl acetate (HPLC reagent grade, Scharlau) were purchased from ICS (Belin-Beliet, France); ammonium hydroxide (ACS Reagent, Sigma Aldrich) was purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Hydrochloric acid 37% (reagent grade) was obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Ultrapure deionised water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). 60 mg Oasis MCX[®] cartridges were purchased from Waters (St Quentin en Yvelines, France). MSTFA (n-methyl-n(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, purity > 97%; Acros Organics, Noisy-le-Grand, France) was used as the silylation agent for GC-MS analysis. GF/F glass fibre filters (pore size 0.7 µm) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France).

2-3 Analytical treatment of dissolved phases

The protocol previously described (Togola and Budzinski, 2008) was used for pharmaceutical compound extraction. Briefly, the filtered water (GF-F) was acidified at pH 2 and between 0.5 and 1 l was loaded on an OASIS MCX[®] cartridge. The cartridges were then dried under vacuum and successively eluted with 3ml of ethyl acetate, 3 ml of an ethyl acetate/acetone mixture (50/50; v/v) and 3 ml of an ethyl acetate/acetone/NH₄OH mixture (49/49/2; v/v/v). The extracts were evaporated under a nitrogen flux to a final volume of 100 µl prior to GC-EI-MS analysis (SIM mode) for neutral compound analysis. After a derivatization step (30 µl of MSTFA, incubation 35 min at 65°C) the extracts were analysed (GC-EI-MS analysis in SIM mode) for acidic drug analysis.

2-4 Analytical treatment of solid phases

Suspended solids and sediments were freeze-dried in order to remove water. Sediments were then sieved (<0.2 mm) and homogenized before being stored in an amber glass bottle, at ambient temperature. SPM (equivalent of 2 to 4.5 l of filtered water) or sediments (0.1 g dw) were extracted using microwave assisted extraction (MAE, Prolabo, Fontenay sous bois, France) with a mixture of acetonitrile/water pH 2 (70/30, v/v). After filtration, the extracts were evaporated (Rapidvap, Bioblock, Fontenay sous bois, France) before being redissolved in 60 ml water pH 2 to undergo SPE extraction as previously explained.

2-5 Quality assurance and quality control

All the chemicals were tested for background levels of compounds of interest. All the glassware was washed and then heated at 450°C for 6 h prior to use. Glass microfiber filters (GF/F, 0.7 µm nominal, Ø 47mm, Whatman) were also heated at 450°C for 6 h prior to use.

A two step quantification was held: The quantification was performed by internal calibration (diazepam d5, amitryptiline d6, nordiazepam d5) added before the extraction (50 to 200 ng, individual compound: methanolic solution 1 $\mu\text{g.g}^{-1}$). Furthermore, the recovery of the internal standard was checked by syringe standards, added before the chromatographic analysis. Average recovery rates of the compounds ranged from 75% to 97 % except for salbutamol and Terbutaline which show lower recovery rates, standard deviation is lower than 15%, thus the methodologies show good repeatability and good within-laboratory reproducibility. All additions were gravimetrically controlled. To highlight contaminations which might occur during analytical procedures, a protocol blank was added to each extraction series as well as spiked samples.

3- Results and discussion

3-1 Occurrence of PhACs in the rocky inlet of Cortiou

Table 2 presents the measured concentrations of PhACs in the dissolved phase, expressed in ng.l^{-1} (Table 2) and in sediments, expressed in $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Table 2), and sums up frequency of detection and minimal and maximal concentrations.

Table 2: Occurrence of Pharmaceutical compounds in the rocky inlet of Cortiou

	Dissolved phase			Suspended solids			Sediments		
	Min (ng.l^{-1})	Max (ng.l^{-1})	% detection	Min ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ dw)	Max ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ dw)	% detection	Min ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ dw)	Max ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ dw)	% detection
CAFF	1.1	912	100%	10	532	100%	40	6,222	100%
CARBA	<Lod	<Lod	100%	<Lod	<Lod	0%	<Lod	36	40%
AMI	<Lod	138	100%	<Lod	80	83%	<Lod	3	20%
IMI	<Lod	<Lod	0%	<Lod	<Lod	0%	<Lod	<Lod	0%
DOX	<Lod	1	67%	<Lod	<Lod	0%	<Lod	<Lod	0%
NDZP	0.6	2	100%	<Lod	<Lod	0%	<Lod	43	20%
DZP	<Lod	1	17%	<Lod	8	17%	<Lod	<Lod	0%
ASP	16.1	1,989	100%	506	6,463	100%	182	1,87	100%
IBU	0.8	433	100%	<Lod	21	33%	11	64	100%
PARA	1.3	541	100%	3	9	100%	14	28	100%
GEMF	0.5	39	100%	<Lod	15	83%	<Lod	12	60%
NAPRO	0.6	133	100%	<Lod	86	83%	61	279	100%
DICLO	0.9	107	100%	<Lod	167	33%	<Lod	<Lod	0%
TERBU	0.4	3	100%	<Lod	7	67%	<Lod	7	40%
SALBU	<Lod	2	67%	<Lod	7	33%	<Lod	3	20%
KETO	1.5	461	100%	52	318	100%	<Lod	611	40%

Table 2 presents minimal and maximal measured concentrations and frequency of detection in the dissolved phase (ng.l^{-1}) and the sediment ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) from the plume of the WWTP effluent of Marseille in the rocky inlet of Cortiou. Abbreviations' are given in Table 1.

In the dissolved phase, out of the 16 investigated PhACs, 12 are detected at a frequency of 100%, thanks to the method very low detection limit (under ng.l^{-1}), with the exception of imipramine (0%), diazepam (17%), salbutamol and doxepine (67%). The distribution is consistent with the prescriptions, pharmacokinetics, physicochemical properties and the treatment processes implemented in the WWTP of Marseilles. NSAID and caffeine are by far the prevalent PhACs in the plume, which is in agreement with the fact that they are largely consumed in France and poorly removed by primary treatment. Nevertheless, by comparing the results of this study to those previously reported by Togola and Budzinski (2008), the maximal measured concentrations are a ten-fold lower, higher than 100 ng.l^{-1} (912 ng.l^{-1} for caffeine, $1,989 \text{ ng.l}^{-1}$ for aspirin, 432 ng.l^{-1} for ibuprofen). One can note the significantly lower concentrations in paracetamol in this study by comparison with the $200 \text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$ previously reported. Antidepressants, lipid regulators are quantified in the range of ng.l^{-1} . In a first time carbamazepine has been identified and quantified, nevertheless the chromatogram appeared interfered (in GC-EI-MS, in SIM mode). Consequently, in a second time, all the extracts have been analyzed in SCAN mode (m/z range from 50 to 500). Unfortunately, the interference has not been determined. Each time carbamazepine was detected, each time the interference was present. Thus, a reliable quantification was not possible in some points of the Rocky inlet of Cortiou (near the outfall).

Such variations in occurrence can be explained by further hypotheses. Firstly, the effluent load was found in a semi-enclosed environment, thus dilution phenomena are important; samples were not done in the same locations which may explain some of the trends (Salinity 14.7‰ (Togola and Budzinski, 2008) Salinity 22‰ , this study). Secondly, it is now well documented that the efficiency of WWTP processes towards PhACs are hugely affected by various parameters: physico-chemistry (Urase and Kikuta, 2005), temperature (Vieno et al., 2005; Castiglioni et al., 2006); age of sludge (Federle et al., 2002; Ternes et al., 2004; Clara et al., 2005a; Clara et al., 2005b). Moreover, Carballa et al. (2005) reported that the efficiency of primary treatment is strongly dependent on lipid contents but in any case lower than 25%. Considering the fact the WWTP treats more than 1,600,000 inhabitants pollution, it may be assumed that even a 1% variation in removal efficiency can significantly affect the measured concentrations. Such phenomena can explain the temporal trends observed for paracetamol (one of the most prescribed and sold compounds in French pharmacies). Thirdly, one cannot ignore that the consumption of more than 1 million people can be highly variable.

The occurrence of PhACs in SPM is also observed with concentrations ranging from $<\text{Lod}$ to more than a few hundreds of ng.g^{-1} (for some compounds the maximal measured concentrations were higher than $\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$), meaning that for some compounds more than half of the contamination is associated with SPM. Even if hydrophilic, PhACs can be sorbed to SPM which can represent a significant well for PhACs and participate in the dispersion of molecules in marine water.

In sediments, 5 PhACs belonging to NSAID are detected at 100% frequency (caffeine, ibuprofen, naproxen, aspirin, paracetamol). Maximal measured concentrations were as high as $6,222 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$ for

caffeine, $1,870 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for aspirin, only $279 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for paracetamol. As expected, compounds which are below detection limit in the dissolved phase are not detected in sediments (diazepam, imipramine, doxepine). The distribution of PhACs appears to be very heterogeneous in the rocky inlet of Cortiou. As reviewed by Delle Site (2001) the sorption of organic compounds to solids is linked with hydrophobic interactions and strongly dependent on pH for ionizable molecules. Lorphensri reported that sorption of neutral compounds such as 17- β -ethinyloestradiol and acetaminophen is controlled by the hydrophobicity of the compounds, contrary to those of acidic compounds where ion exchange to oppositely-charged surfaces appeared to be the dominant sorption mechanism. That was emphasized by Suntisukaseam et al. (2007) who studied the sorption of PhACs to polar and non polar sorbents. The sorption of PhACs appeared to rely on both molecular structures and surface properties. Subjected to various influences, continental as well as marine, the coastal sediments present characteristics and thus capacities to retain contaminants which are highly variable. The particles of continental origin brought by freshwaters are mainly charged with manganese and iron oxyhydroxydes, conferring them new properties for the sorption of chemicals; once at sea, these particles undergo modifications, in particular they are impoverished out of organic carbon. The particles of marine origin (various organic refuses, tests, minerals form in situ) which, generally, give place to deposits richer in silica and carbonates. Among the properties of the sediments, granulometry is a parameter usually associated because it is useful to partly explain the natural variability in sediments. Indeed, the more important the percentage in fine particles, the more the capacity of the sediment to absorb the contaminants stronger. From the point of view of granulometry, the marine sediments are divided into two categories: -1) The fine sediments (lutites), composed of lower particles ($<63 \mu\text{m}$ of diameter: clays, silts). 2) The coarse sediments (arenites and rudites), constituted by elements whose granulometry is higher than $63 \mu\text{m}$ (sands ($>63 \mu\text{m}$ to 2 mm) and gravels ($>2 \text{ mm}$)). Generally poor in organic matter, these sediments display poor sorption properties. Moreover, a gradient in physico-chemical components exists in the plume and can also explain some of its heterogeneity. As data reporting the occurrence of PhACs in sediments are scarce, comparison appeared tricky. Antonic and Heath (2007) studied the occurrence of some NSAID in river sediments along a river impacted by the pharmaceutical industry; they found maximum levels of $0.06 \mu\text{g.g}^{-1}$ for naproxen and $0.32 \mu\text{g.g}^{-1}$ for ketoprofen. Rice and Mitra (2007) studied sediments from Lake Erie and found detectable levels (up to 10^4 ng.g^{-1}) of ibuprofen, naproxen and ketoprofen discharged from the WWTP which may result from the widespread use of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in numerous medical situations.

3-2-Fate in the plume in the rocky inlet of Cortiou

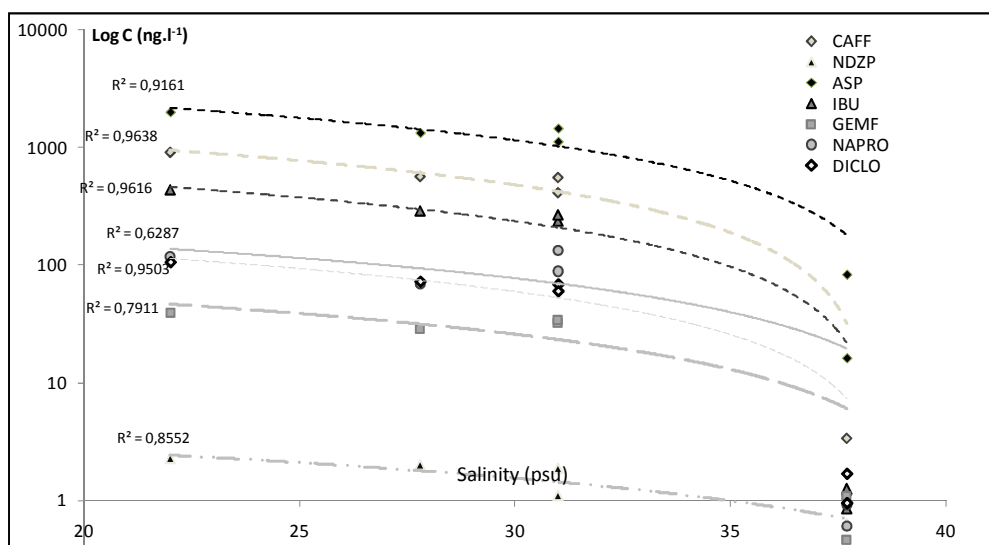


Figure 2: Fate of Pharmaceutical compounds in the plume of the WWTP of Marseilles, in the rocky inlet of Cortiou. Concentrations are expressed in ng.l^{-1} as a function of salinity ($^{\circ}\text{oo}$)

In the dissolved phase, the main phenomenon to occur in the Rocky inlet of Cortiou was dilution. Figure presents the concentrations of some of the 16 PhACs (focus on the PhACs with 100% detection frequency) as a function of salinity (which was assumed to represent dilution). Caffeine (0.96), aspirin (0.91), ibuprofen (0.96), diclofenac (0.95), nordiazepam (0.85) displayed strong correlation, on the contrary to naproxen (0.63) and gemfibrozil (0.79). Naproxen is known to be photolabile through direct photolysis. Lin et al. (2006) reported that 40% of the daytime removal of naproxen should be attributed to photolysis; Lin and Reinhard (2005) reported the degradation rates of PhACs in river water and estimated a half-life of 4.1 hours for ketoprofen, 1.4 hours naproxen and 15 hours for ibuprofen. In the rocky inlet of Cortiou, even if brackish water displayed significant turbidity, photolytic phenomena occurred especially in the context of this sampling campaign which was held under sunny conditions. As for the dissolved phase, the concentrations of PhACs in suspended solids (expressed in ng.g^{-1}) decreased from the outfall to the open sea. Nevertheless, it is interesting to note that the farer the site, the more significant the SPM part in the contamination (1% to 53% for caffeine, 1% to 72% for aspirin). Comeau et al. (2008) studied the plume of various WWTPs in Atlantic coastal receiving waters (Canada). The prevalent PhACs were caffeine, salicylic acid (metabolites of aspirin), naproxen, ibuprofen and gemfibrozil with concentrations of tens ng.l^{-1} , they were found in one or two order of magnitude lower concentrations than those found in the effluent. They assumed that dilution was the prevalent parameter to control their fate in marine water. Compared to our study, the distribution and occurrence appeared to be similar; although the phenomena of dilution seemed to be faster in the case study reported by Comeau et al. due to the existence of tidal phenomena.

As highlighted by Figure 3, it was surprising to note that no decreasing trends in the contamination of sediments from the outfall to the open sea occurred. Alkylphenols were examined in the same study (Lardy-Fontan et al., submitted) and presented a significant decrease in concentrations as one moves away from the outfall (Figure 3a). Sarrazin et al. (2005) published same trends for linear alkybenzene sulfonate (LAS) whom concentrations ranged from $12.19 \mu\text{g.g}^{-1}$ to $0.47 \mu\text{g.g}^{-1}$ in sediments from Cortiou area and were strongly influenced by the “liguro-provençal” current; they concluded there was a significant contamination as far as 2.5 km from the outfall. Similarly, Wafo et al. (2006) reported a five zone sub-division based on the sediment contamination profile in polychlorinated biphenyls and DDT residues. These 3 classes of organic compounds are from midpolar to apolar compounds for which sorption can be assumed to be hydrophobically controlled. In the present study, the occurrence of PhACs, especially polar ones (caffeine and aspirin) was quite surprising. One clue should be the fact that the presence of such compounds in solids could be artefactual. But, in fact, the freeze drying process engenders a loss of water by sublation; consequently compounds which were located in the interstitial water could be found in the solids. Moreover as it has been shown in sludge by Joss et al. (2005), the sorption of polar and ionizable pharmaceuticals to solids cannot be predicted by considering log Kow and thus could be significantly affected by physico-chemistry.

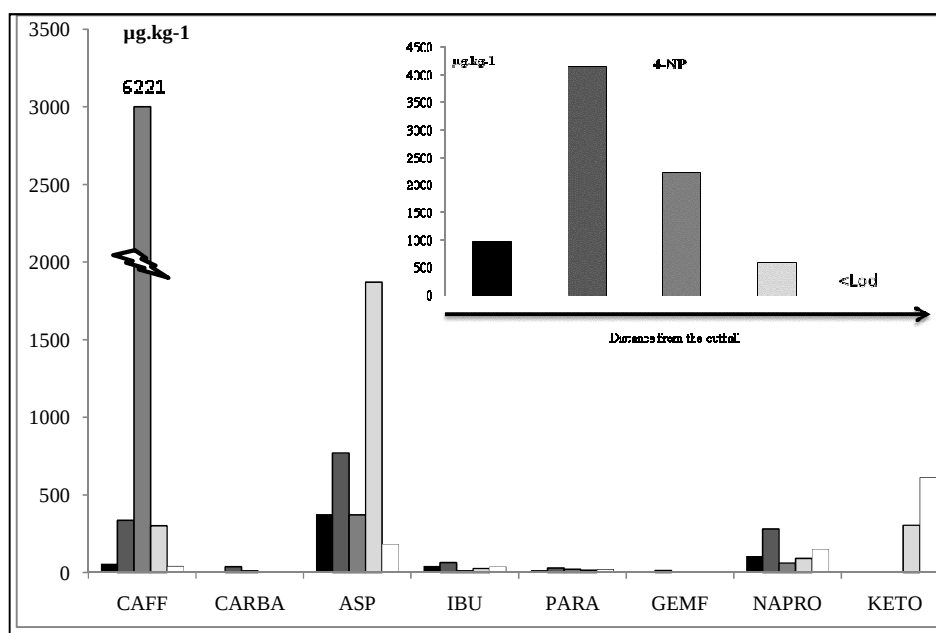


Figure 3: Trends in the occurrence of PhACs in the sediments in the rocky inlet of Cortiou
a) Fate and Occurrence of 4-NP in the rocky inlet of Cortiou (extract from Lardy-Fontan et al., submitted).

To sum up, the occurrence of PhAC compounds in the rocky inlet of Cortiou was highlighted in all the compartments: dissolved phase, suspended solids and sediments. The context in the rocky inlet appeared to be harmful in the plume of dilution of the WWTP because of the presence of

compounds in mixtures and significant amounts; nevertheless this worrying situation appeared to be confined near the effluent load, thanks to dilution phenomenon, photolytic and biodegradation phenomena. The contamination of the solid phase appeared to be highly heterogeneous but nevertheless can be considered as a significant well and carrier for PhACs in marine environment.

3-2-Fate and Occurrence of PhACs in the Rade of Marseilles

PhACs have been quantified in three sites of the Rade of Marseilles; the measured concentrations in the dissolved phase and SPM (expressed in ng.l^{-1}) are presented in Table 3. In the dissolved phase, except for aspirin which was quantified at a maximum level of 63 ng.l^{-1} in the site of the river Huveaune, all compounds presented maximum concentrations lower than 10 ng.l^{-1} ; most of them were below detection limit. Trends in the distribution did not appear to be unequivocal; although the site of Huveaune appeared as the most impacted (closer to the coast) in front of Chantier (closer to harbor activity) and Planier (open sea). The occurrence of PhACs in the SPM was limited to caffeine, aspirin, ketoprofen, paracetamol whose concentrations are lower than 10 ng.l^{-1} . As for the dissolved phase, SPM from the site of Huveaune appeared to be more contaminated than those of Chantier and Planier. As in the inlet of Cortiou, SPM can be the vector of no less than 50% of the contamination. As in the SPM, the occurrence of PhACs in sediments is limited to caffeine, aspirin, naproxen, ketoprofen and gemfibrozil (Figure 4). The site of Chantier appears to be more contaminated with concentrations of $4,772 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ of ketoprofen, $1,026 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ for naproxen; even more impacted than in the inlet of Cortiou (as shown in Figure 4). The Rade of Marseilles appeared to be chronically contaminated by PhAC compounds; such trends are in accordance with the work held in parallel focusing on alkylphenol-polyethoxylates and highlighting a widespread contamination of the Rade of Marseilles by persistent metabolites 4-NP, 4-NP₁EO and 4-NP₂EO (Lardy-Fontan et al., submitted).

The widespread occurrence of caffeine and aspirin in the marine environment reported by Comeau et al. (2008) on the Canadian Atlantic coast was assumed to be linked with defective septic systems and direct releases of untreated waters. It can also occur in the Marseilles area, because the all raw waters are not collected via cleansing networks. Verenitch and Mazumder (2008) focused on the occurrence of caffeine in various systems and measured concentrations ranging from 4.5 to 149 ng.l^{-1} . Carrara et al. (2008) reported the fate of some PhACs in three septic plumes and observed that naproxen, gemfibrozil and ibuprofen were the compounds which were transported at the highest concentrations and over longer distances, especially under anoxic conditions. The outfall of the Huveaune Stream which flows on a 500 km^2 catchment area occurs in the Rade of Marseilles. For ten years, the major part of the river has been deviated towards the WWTP of Marseilles because it polluted the beaches of the city located near its mouth. When strong precipitations occurred, the overflow which cannot be absorbed by the WWTP is evacuated by the old natural bed. Although the

study took place in dry conditions, the fall season characterized by extensive precipitations which may have occurred before our sampling campaign leading to the load of raw waters into the system (highly contaminated). Moreover, Marseilles is located at the northeastern tip of the Gulf of Lions into which the Rhône River delivers about 90% of the total riverine water inputs. Although French data are scarce, some of them have reported environmental occurrence in WWTP effluents and the receiving streams and rivers of the South East of France: - Comoretto and Chiron (2005) studied the occurrence of ibuprofen, carbamazepine and bezafibrate in the Arc River basin (near the city of Aix-en-Provence) and concluded to continuous loads of molecules in the aquatic system; - Togola and Budzinski (2008), in addition of the preliminary study in the Rocky inlet of Cortiou, reported a widespread contamination of the Hérault watershed (Rabiet et al., 2006), the western side of the Gulf of Lions, by PhACs (mainly caffeine, paracetamol, ketoprofen, naproxen, carbamazepine); - Feitosa-Felizzola et al. (2007) applied a powerful SPE-LC-MS-MS methodology to the study of a wide range of antibiotics in various effluents (domestic, hospital, etc...) in the Marseilles area and obtained positive matches. Moreover, upstream of the Rhône River, significant loads of various classes of PhACs have been highlighted to occur by Andreozzi et al. (2003)). They described that effluent (WWTP of Pierre Benite, Lyons) was dominated by NSAID, carbamazepine, gemfibrozil with concentrations ranging from ng.l^{-1} to $\mu\text{g.l}^{-1}$ ($1.62 \mu\text{g.l}^{-1}$ for ketoprofen, $1.2 \mu\text{g.l}^{-1}$ carbamazepine, $0.06 \mu\text{g.l}^{-1}$ gemfibrozil, etc....). Miege et al. (2006) investigated the occurrence of 5 betablockers in the area of Lyons; although they highlighted widespread loads to the environment they concluded to negligible risks for the receiving waters (Rhône and Saône rivers).

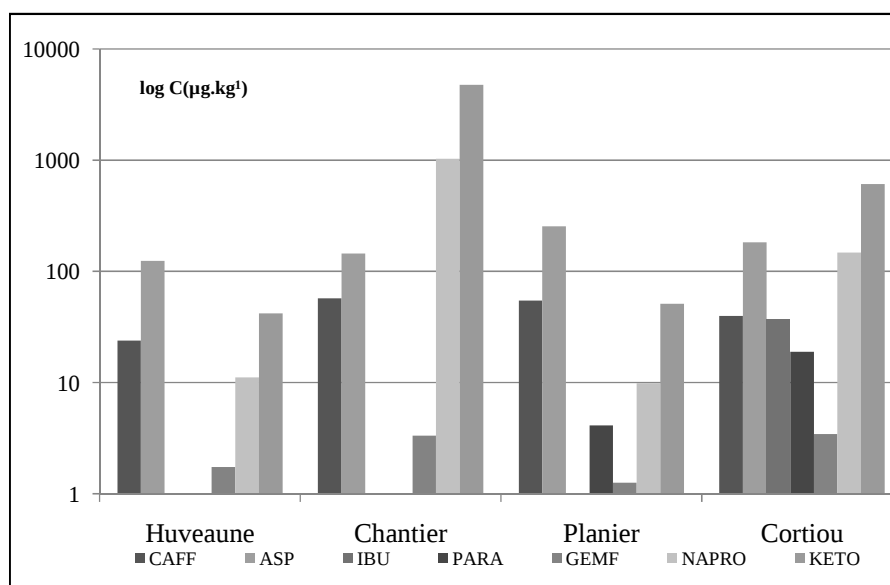


Figure 4: Occurrence of PhAC compounds in the sediments of the 3 sites of the Rade of Marseilles.

Comparison with the site of Cortiou (expressed in $\mu\text{g.kg}^{-1}$)

Cortiou: occurrence of PhACs at point C5, referring to the more distant ones (true marine environment)

4-Conclusions

To sum up, a widespread occurrence of PhACs in the French Mediterranean coast has been highlighted. As it has been reported by previous works in Spain (Kuster et al., 2006; Gomez et al., 2007), Greece (Koutsouba et al., 2003; Botitsi et al., 2007) or Italy (Zuccato et al., 2005; Zuccato et al., 2006; Zuccato et al., 2008), continuous loads of PhACs occur in catchment areas whose final receiving system is the Mediterranean sea or under direct release of PhAC compounds into the system, as shown in the Rocky inlet of Cortiou. Non-Steroidal Anti Inflammatory Drugs and caffeine were by far the prevalent compounds in terms of frequency of detection and concentrations. Interestingly, this work highlighted their occurrence in solid phases: SPM and sediments. Both appeared as significant vectors and wells for PhACs; some more works should focus on this specific point to understand the fate of PhACs in the environment especially in marine water.

Although the reported data in this work are once or twice fold lower, this does not preclude the possibility of other biological effects on marine organisms such as endocrine disruption and synergetic or additive toxicity effects from the multitude of other PhACs/metabolites and pollutants possibly present in the area. Although ppt–ppb concentrations may not induce adverse effects or represent ecological risks, it is not well documented whether other receptors in non-target organisms are sensitive. On the other hand, it is also recognized that even though individual concentrations of any drug might be low, the combined concentrations of drugs sharing a common mechanism of action could induce additive or synergetic effects (Besse and Garric, 2008). In this sense, there is an increasing demand for information on the potential toxicity of drug residues. However, there is a lack of data concerning their effects on terrestrial or aquatic fauna (Besse and Garric, 2008).

Since February 2008, the new cleaning unit of the city of Marseilles “Geolide” has been implemented. Now, the WWTP of Marseilles displays the latest generation processes of biological treatment. Thus, future works should concentrate on the impact of this new tool at a local scale; the Rocky inlet of Cortiou, and on a large scale; the Rade of Marseilles.

Acknowledgments

The authors wish to thank the MEDICIS program for research funding, IFREMER (French Research Institute for the Exploitation of the Sea) for technical support and sampling campaigns. The “Région Aquitaine” is also thanked for research funding in the framework of ORQUE project.

Bibliography

Enick, O.V. and Moore, M.M. (2007) Assessing the assessments: Pharmaceuticals in the environment. *Environmental Impact Assessment Review* 27(8), 707-729.

- Khetan, S.K. and Collins, T.J. (2007) Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemistry. *Chemical Reviews* 107(6), 2319-2364.
- Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H. and Huhnerfuss, H. (2004) Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere* 56(6), 583-592.
- Weigel, S., Kuhlmann, J. and Huhnerfuss, H. (2002) Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: Occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Science of The Total Environment* 295(1-3), 131-141.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M. and Guwy, A.J. (2008) The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*.
- Comeau, F., Surette, C., Brun, G.L. and Losier, R. (2008) The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. *Science of The Total Environment*.
- Togola, A. and Budzinski, H. (2008) Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A* 1177(1), 150-158.
- Heemken, O.P., Reincke, H., Stachel, B. and Theobald, N. (2001) The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere* 45(3), 245-259.
- Garric, J. and Ferrari, B. (2005) Pharmaceuticals in aquatic ecosystems. Levels of exposure and biological effects: A review. Les substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques. Niveaux d'exposition et effet biologique: Que savons-nous? 18(3), 307-330.
- Zuccato, E., Castiglioni, S. and Fanelli, R. (2005) Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 122(3), 205-209.
- Fent, K., Weston, A.A. and Caminada, D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76(2), 122-159.
- Urase, T. and Kikuta, T. (2005) Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Research* 39(7), 1289-1300.
- Vieno, N.M., Tuhkanen, T. and Kronberg, L. (2005) Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. *Environmental Science and Technology* 39(21), 8220-8226.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D. and Zuccato, E. (2006) Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental Science and Technology* 40(1), 357-363.
- Federle, T.W., Kaiser, S.K. and Nuck, B.A. (2002) Fate and effects of triclosan in activated sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(7), 1330-1337.
- Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O. and Kroiss, H. (2005a) The solids retention time - A suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Research* 39(1), 97-106.
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N. and Kroiss, H. (2005b) Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research* 39(19), 4797-4807.
- Ternes, T.A., Joss, A. and Siegrist, H. (2004) Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environmental Science and Technology* 38(20), 392A-399A.

Carballa, M., Omil, F. and Lema, J.M. (2005) Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. *Water Research* 39(19), 4790-4796.

Delle Site, A. (2001) Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbent/water systems and sorption coefficients for selected pollutants. A review. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 30(1), 187-439.

Suntisukaseam, U., Weschayanwiwat, P. and Sabatini, D.A. (2007) Sorption of amphiphile pharmaceutical compounds onto polar and nonpolar adsorbents. *Environmental Engineering Science* 24(10), 1457-1465.

Antonic, J. and Heath, E. (2007) Determination of NSAIDs in river sediment samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(4), 1337-1342.

Rice, S.L. and Mitra, S. (2007) Microwave-assisted solvent extraction of solid matrices and subsequent detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) using gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 589(1), 125-132.

Lin, A.Y.C., Plumlee, M.H. and Reinhard, M. (2006) Natural attenuation of pharmaceuticals and alkylphenol polyethoxylate metabolites during river transport: Photochemical and biological transformation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(6), 1458-1464.

Lin, A.Y.C. and Reinhard, M. (2005) Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(6), 1303-1309.

Sarrazin, L., Diana, C., Wafo, E., Schembri, T., Pichard-Lagadec, V. and Rebouillon, P. (2005) HPLC detection of linear alkylbenzenesulfonates surfactants (LAS) in marine sediments of the urban sewage area of Cortiou (Marseille, France). *International Journal of Environmental Studies* 62(3), 301-312.

Wafo, E., Sarrazin, L., Diana, C., Schembri, T., Lagadec, V. and Monod, J.L. (2006) Polychlorinated biphenyls and DDT residues distribution in sediments of Cortiou (Marseille, France). *Marine Pollution Bulletin* 52(1), 104-107.

Lardy-Fontan S. and Budzinski H. Characterization of the Contamination of the French NW Mediterranean coast by Alkylphenol-polyethoxylate metabolites. Distribution, Occurrence and Fate Submitted to *Science of the Total Environment*

Verenitch, S.S. and Mazumder, A. (2008) Development of a methodology utilizing gas chromatography ion-trap tandem mass spectrometry for the determination of low levels of caffeine in surface marine and freshwater samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-12.

Carrara, C., Ptacek, C.J., Robertson, W.D., Blowes, D.W., Moncur, M.C., Sverko, E. and Backus, S. (2008) Fate of pharmaceutical and trace organic compounds in three septic system plumes, Ontario, Canada. *Environmental Science and Technology* 42(8), 2805-2811.

Comoretto, L. and Chiron, S. (2005) Comparing pharmaceutical and pesticide loads into a small Mediterranean river. *Science of The Total Environment* 349(1-3), 201-210.

Rabiet, M., Togola, A., Brissaud, F., Seidel, J.L., Budzinski, H. and Elbaz-Poulichet, F. (2006) Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized mediterranean catchment. *Environmental Science and Technology* 40(17), 5282-5288.

Feitosa-Felizzola, J., Temime, B. and Chiron, S. (2007) Evaluating on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of several classes of antibiotics in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1164(1-2), 95-104.

Andreozzi, R., Raffaele, M. and Nicklas, P. (2003) Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50(10), 1319-1330.

Miege, C., Favier, M., Brosse, C., Canler, J.P. and Coquery, M. (2006) Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers. *Talanta* 70(4), 739-744.

Gomez, M.J., Martinez Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernandez-Alba, A.R. and Aguera, A. (2007) Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* 66(6), 993-1002.

Botitsi, E., Frosyni, C. and Tsipi, D. (2007) Determination of pharmaceuticals from different therapeutic classes in wastewaters by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(4), 1317-1327.

Koutsouba, V., Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D. and Hiskia, A. (2003) Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* 51(2), 69-75.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Fanelli, R., Reitano, G., Bagnati, R., Chiabrando, C., Pomati, F., Rossetti, C. and Calamari, D. (2006) Pharmaceuticals in the environment in Italy: Causes, occurrence, effects and control. *Environmental Science and Pollution Research* 13(1), 15-21.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Chiabrando, C., Grassi, P. and Fanelli, R. (2008) Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants. *Water Research* 42(4-5), 961-968.

Besse, J.P. and Garric, J. (2008) Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicology Letters* 176(2), 104-123.

ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I GLOSSAIRE

ANNEXE II ASSAINISSEMENT-CONTEXTE NATIONAL

ANNEXE III ANNEXE CONFIDENTIELLE AMPERES

ANNEXE IV LE BASSIN VERSANT DE LA SEINE

ANNEXE V LE BASSIN VERSANT DE LA GARONNE

ANNEXE VI LE BASSIN VERSANT DE L'ADOUR

ANNEXE VII ANALYSE DES APEO PAR CL-SM

ANNEXE VIII ANALYSE DES SUBSTANCES PHARMACEUTIQUES PAR CG-SM

ANNEXE IX ANALYSE DES SUBSTANCES PHARMACEUTIQUES PAR CL-SM-SM

ANNEXE I Glossaire

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

Bassin d'aération : Ouvrage dans lequel les eaux brutes et les boues activées sont mélangées et aérées

Bioaccumulation : capacité des organismes aquatiques à concentrer et à accumuler les substances chimiques à des concentrations supérieures à celles où elles sont présentes dans l'eau qui les environne.

Bioamplification (ou biomagnification) : augmentation des concentrations lorsque l'on passe d'un maillon trophique inférieur à un maillon trophique supérieur ou bien au sein d'une même espèce.

Biodisponibilité : la concentration totale d'un contaminant dans le milieu est rarement suffisante pour évaluer son effet sur les organismes vivants. Ce ne sont que certaines formes (c.f. Spéciation) qui pourront être assimilées par les organismes.

Bouchon vaseux : zone de turbidité maximale particulière aux estuaires, comprise entre des eaux douces peu chargées en matières de suspension à l'amont et les eaux salées marines. Sa situation n'est pas stable car il évolue au gré des conditions hydrologiques (débits, cycles de marée).

Boues activées (dans une station d'épuration des eaux usées) : ce traitement consiste à mélanger, agiter, aérer les eaux usées et des boues riches en bactéries dans le bassin d'aération. A la sortie de cet ouvrage, le mélange est séparé par décantation dans le clarificateur. L'eau épurée est dirigée vers le milieu récepteur ou vers un traitement complémentaire. Les boues décantées sont éliminées ou remises en circulation dans le bassin.

Clarificateur (Ou décanteur secondaire) : Ouvrage de station d'épuration où l'on sépare l'eau des boues activées par l'effet de la gravité (les boues, étant plus denses que l'eau, se retrouvent au fond de l'ouvrage).

DBO : Consommation en oxygène des micro-organismes leur permettant d'assimiler les substances organiques présentes. La DBO constitue en une mesure de la pollution des eaux usées par les matières organiques.

DCO : consommation en oxygène par les oxydants chimiques forts pour oxyder les substances organiques et minérales de l'eau. Elle permet d'évaluer la charge polluante des eaux usées.

Carbone organique total ou **C.O.T.** : Dans un échantillon donné, il désigne le carbone total contenu ayant une origine organique (donc y compris le carbone des os, des tests ou des coquilles)

Equivalent habitant (ou Eq./Hab.) : c'est une unité d'évaluation de la pollution correspondant à celle d'un habitant réel, soit en moyenne : $DCO = 120 \text{ g par habitant.jour}^{-1}$, $DBO_5 = 60 \text{ g par habitant.jour}^{-1}$, $MES = 90 \text{ g par habitant.jour}^{-1}$, $NTK = 15 \text{ g par habitant.jour}^{-1}$ ($NTK = \text{azote total Kjeldahl}$), $PT = 4 \text{ g par habitant.jour}^{-1}$ ($PT = \text{phosphore total}$).

Estuaire : zone de transition à l'embouchure d'un fleuve entre les eaux douces (cours d'eau) et les eaux côtières (mer). Il présente une forme évasée de la terre vers la mer et une bathymétrie croissante vers la mer. En l'absence de marée, on parle de delta. La pénétration continentale de l'estuaire correspond à l'extension maximale vers l'amont de la zone d'inversion des courants des marées. Ces milieux de transition, dont la masse d'eau oscille entre terre et mer, se caractérise par une grande biodiversité et par des phénomènes hydrodynamiques comme par exemple le bouchon vaseux. La directive 2000/60/CE du 23/10/2000 de l'Union européenne précise les limites extérieures (vers la mer) des estuaires : elles sont définies en fonction des besoins par les Etats membres. La limite interne (vers l'amont) est la limite des eaux douces.

Filtration par membrane : la filtration par membrane consiste en une filtration tangentielle, c'est-à-dire que le liquide coule parallèlement aux membranes et non à travers. Mis à part cet élément, la filtration à membrane est très semblable à la filtration « traditionnelle », avec une membrane ayant une porosité de 1 à 100 nm.

Filtration par osmose inverse : la filtration par osmose inverse consiste à inverser le flux osmotique (d'un endroit plus concentré vers un moins concentré) en augmentant la pression du liquide le plus concentré.

Filtres à charbons actifs : les charbons actifs sont utilisés pour l'extraction des traces de contaminants dans l'eau. On distingue deux techniques : les charbons actifs fixes ou les charbons actifs disséminés dans l'eau sous forme de petites particules.

Fixation (ou l'adsorption) : fixe les substances à éliminer sur une substance plus grande. Ces substances, qui sont plus faciles à extraire de l'eau, emportent les polluants avec elles.

Floculation : le but de cette méthode est d'accélérer le processus de décantation gravitaire des substances présentes dans l'eau. Le principe de fonctionnement consiste en une neutralisation des forces électrostatiques et en une formation de composés plus grands. Ces deux principes ont pour effet d'augmenter la vitesse à laquelle les substances présentes dans l'eau se déposent au fond.

Lit Bactérien : Ouvrage rempli de matériau grossier dans lequel les eaux usées préalablement décantées percolent et sont épurées (grâce au film biologique implanté sur le matériau support).

Ozonation (ou Oxydation à l'aide d'ozone) : consiste à injecter de l'ozone dans les eaux à épurer. L'ozone se décompose en radicaux $\text{OH}^\cdot$ qui vont attaquer et oxyder les substances organiques. Les substances résultantes sont diverses.

Photocatalyse : méthode plus complète que celle des seuls ultraviolets, elle consiste à rajouter un catalyseur dans l'eau, comme par exemple, le dioxyde de Titane (TiO_2) ou l'oxyde de Fer. On peut aussi ajouter de l'ozone ou de l'eau lourde pour améliorer le procédé.

Prétraitements : Premiers procédés de traitement de l'eau dans une usine de traitements des eaux usées pour éliminer les éléments grossiers les plus faciles à retenir.

Toxicité aiguë : caractère d'un produit chimique qui va avoir des effets néfastes sur la santé de l'animal ou de l'homme après une seule exposition de courte durée à ce produit.

Toxicité chronique : caractère d'un produit chimique qui va avoir des effets néfastes sur la santé de l'animal ou de l'homme après plusieurs expositions et à long terme

ANNEXE II Assainissement-Contexte National

A/ LES STATIONS D'EPURATION : DONNEES DE FONCTIONNEMENT

L'établissement d'un réseau d'assainissement d'une agglomération doit répondre à 2 contraintes : assurer le transit vers l'épuration des eaux usées et le cas échéant des eaux résiduaires industrielles et assurer l'évacuation des eaux pluviales.

On distingue 3 grands systèmes :

- Le système unitaire : évacuation de l'ensemble des eaux pluviales et usées par un unique réseau ;
- Le système séparatif : un premier réseau est affecté à l'évacuation des eaux usées (domestiques et industrielles), l'évacuation de toutes les eaux pluviales est assurée par un deuxième réseau ;
- Les systèmes mixtes : ils sont constitués en partie en système unitaire et en partie en système séparatif, selon les zones d'habitation. Ce type de système est majoritaire en France (60%) (IFEN).
-

Les filières de traitements des eaux et des boues reposent sur la combinaison de différents mécanismes (Figure 1, Tableau 1) dont les principes sont détaillés ci après.

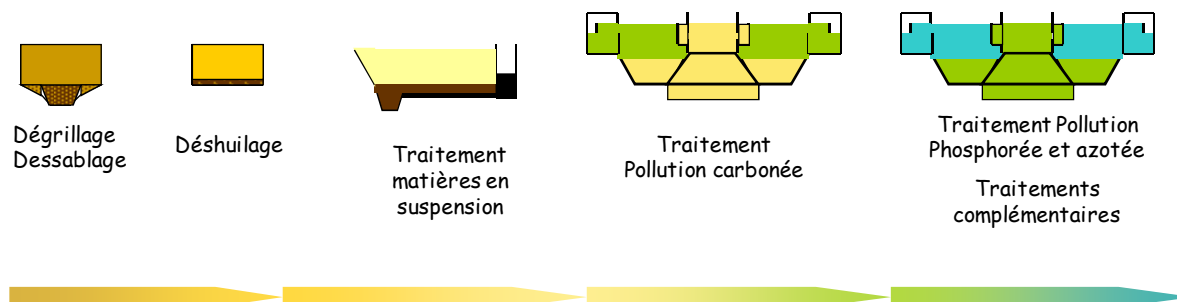


Figure 1 : Etapes de traitement des eaux usées.

Tableau 1 : Classification des traitements par leurs mécanismes (d'après Bruchet et al., 2006).

Mécanisme	Chimique - dégradation - adsorption	Biologique - absorption - dégradation	Mécanique - adsorption - cisaillement	Thermique -dégradation
Filière eau	Décantation φ - χ	<u>Boues activées :</u> ◊ Faible Charge ◊ Moyenne Charge ◊ Aération Prolongée		
	Traitement tertiaire	<u>Biofiltres :</u> ◊ Lits bactériens ◊ Cultures fixées	Décantation	
	Désinfection	Bioréacteurs à membrane	Agitation	
		Lagunage		
Filière boues	Chaulage	Digestion anaérobie	Déshydratation	Séchage
	Polymère	Digestion aérobie	Séchage thermique	Prétraitement
	Traitement acide	Compostage	Ultra sons	Hydrolyse
		Lagunage	Broyage	

Les différentes étapes du processus de traitements des eaux usées sont exposées ci-après.

I/ Le prétraitement

Le but est de séparer les matières les plus grossières et les éléments susceptibles de gêner les étapes ultérieures du traitement. Il comprend 3 étapes :

- Le dégrillage qui consiste en la rétention des déchets volumineux,
- Le dessablage qui consiste en l'abattement des particules dont la granulométrie est supérieure à 100 μm ,
- Le dégraissage-déshuilage qui consiste en la séparation des huiles et des graisses de l'effluent brut.

II/ Le traitement primaire

Les processus de traitement primaire sont physiques et physico-chimiques. Les objectifs sont d'une part d'éliminer 60 à 80 % des matières en suspension décantables dans l'eau et d'autre part de réduire les caractéristiques dimensionnelles avalées d'élimination de la pollution carbonée. On distingue :

- Les procédés de décantation physique : ce sont des procédés de séparation solide-liquide par la pesanteur,

-Les procédés de décantation chimique : coagulation-floculation, flottation.

III/ L'élimination de la pollution carbonée

Le schéma de fonctionnement des traitements secondaires obéit au processus suivant :

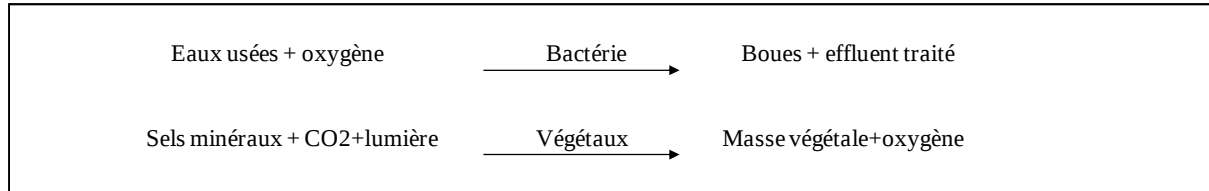
- Les micro-organismes des boues se développent et se nourrissent des matières organiques,
- Les micro-organismes sont contenus dans des bassins de stockage où ils forment des communautés,
- La masse biologique qui épure l'eau polluée trouve son substrat dans les boues provenant des clarificateurs.

Schématiquement l'épuration biologique des eaux usées urbaines repose sur 2 principes : la sédimentation partielle des matières en suspension et l'activité biologique des bactéries qui se multiplient en dégradant les matières organiques.

III-1/ Les procédés biologiques naturels

◆ Le lagunage naturel ou bassin de stabilisation

Ce procédé repose sur l'écoulement naturel des eaux usées au sein d'excavation qui ressortent, sans intervention extérieure, dans un état juger sans risques pour milieu récepteur. Le fonctionnement d'un lagunage naturel peut être résumé comme suit :



III-2/ Les procédés biologiques artificiels

◆ Les lits bactériens

Cela consiste à faire ruisseler les eaux usées sur une masse de matériaux (poreux ou caverneux) qui sert de support aux micro-organismes. Le film biologique ou mucilage comporte des bactéries aérobies en surface et des bactéries anaérobies près du fond (renouvellement en 3 semaines, température=25°C).

◆ Les boues activées

Ces systèmes fonctionnent comme des lagunes naturelles. L'aération est également artificielle. La différence se situe au niveau de la recirculation des organismes actifs = boues activées du décanteur secondaire vers le bassin d'aération. Ceci a pour conséquence : un temps de séjour des eaux plus court et un temps de séjour des organismes actifs plus élevé que le temps de séjour de l'eau (le contrôle du temps de séjour des boues est un paramètre important pour maîtriser la capacité nitrifiante et le degré d'oxydation des matières organiques solides).

La population bactérienne, présente en son sein, est sensible à de nombreux paramètres :

- Le rapport entre la nourriture et la population bactérienne,
- La nature de la biomasse,
- La teneur des eaux brutes en oxygène,
- La température et le pH des eaux,
- Les interactions entre populations bactériennes,

L'élimination de la charge polluante est maximale pendant les premières minutes de contact boues-rejets, elle correspond à l'initiation des phénomènes d'adsorption et de floculation des matières organiques.

◈ La biofiltration (cultures fixées)

Ce procédé repose sur l'action des micro-organismes aérobies fixés sur un support granulaire immergé dans un bassin. Le biofiltre comporte une zone biologique aérée qui est favorable à l'accrochage des micro-organismes. Cette zone est superposée à une zone d'anoxie. L'opération consiste à la fois à retenir les matières en suspension et à traiter biologiquement la pollution carbonée et azotée dans le même filtre.

IV/ L'élimination de l'azote et du phosphore- les traitements complémentaires

Les traitements complémentaires constituent un complément d'épuration des eaux usées. Les usages des eaux après traitement tertiaire sont variés : appoint pour les besoins d'une ville, restitution au milieu récepteur ou recharge des nappes d'eaux souterraines destinées à l'alimentation, irrigation agricole, alimentation des plans d'eaux, usage industriel, réduction de l'eutrophisation.

Les différents types de traitement sont les suivants :

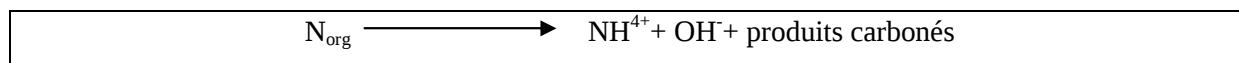
- les traitements physiques : décantation, filtration, tamisage, microfiltration ;
- les traitements chimiques: chaux, floculation, extraction de l'azote et du phosphore ;
- les traitements biologiques : lagunage, boues activées, rejet dans le sol ;
- les traitements bactériologiques : chlore, ozone, charbon actif, rayonnement UV, membranes.

IV/A Elimination de la pollution azotée

Les mécanismes d'élimination biologique de l'azote s'effectuent en 3 étapes qui suivent le cycle biogéochimique de l'azote :

✓ L'ammonification :

Le processus d'ammonification quit la règle suivante :



✓ L'assimilation :

Il s'agit de la transformation de la matière azotée minérale ou organique présente dans les eaux en matière vivante (biomasse épuratrice).

✓ La nitrification et la dénitrification :

La nitrification s'effectue en 2 étapes : l'étape 1 est l'étape de nitrification qui est l'étape d'oxydation des ions ammonium en nitrites, l'étape 2 est l'étape de la nitrification qui est l'étape d'oxydation des nitrites en nitrates.

La dénitrification, qui conduit à l'élimination totale de l'azote, est une réduction des nitrites et nitrates en azote gazeux.

Les cinétiques de ces 2 mécanismes sont dépendantes d'un certain nombre de paramètres : conditions extérieures (pH, température,...), les concentrations en substrats, l'âge des boues, l'oxygène dissous.

IV/B Elimination de la pollution phosphorée

Les mécanismes d'élimination biologique du phosphore reposent sur l'accumulation de phosphore à l'intérieur de bactéries qui seront évacuées par les boues.

IV/ C Les traitements complémentaires

- La désinfection : désinfection au chlore, désinfection au brome, ozonation, rayonnement UV ;
- Les traitements des odeurs.

V/ Le traitement et l'élimination des boues

Le traitement des boues a pour objectif de réduire la fraction organique afin de diminuer le pouvoir fermentescible des boues et les risques de contamination, et de diminuer le volume total des boues afin de réduire leur coût d'évacuation.

V/A Caractérisation des boues urbaines

On distingue :

- Les boues primaires obtenues au niveau du décanteur primaire après la séparation physique des matières en suspension ;
- Les boues physico-chimiques engendrées par la formation d'un complexe entre la quasi-totalité de la pollution particulaire et colloïdale de l'eau et le réactif injecté ;
- Les boues biologiques issues du métabolisme de la pollution organique biodégradable. Ces boues peuvent être classées en trois sous-classes : les boues fraîches mixtes issues d'un mélange entre boues primaires et boues biologiques, les boues activées issues d'une station fonctionnant en aération

prolongée, les boues digérées issues de la digestion, aérobie et anaérobie, des boues primaires et des boues fraîches mixtes.

V/B Nature et structure des boues urbaines

Les principales caractéristiques des boues sont les suivantes : la concentration en matières sèches, la teneur en matières volatiles, la teneur en matières minérales, la composition élémentaire pondérale, l'aptitude des boues à l'épaississement, la viscosité, la composition du liquide interstitiel (salinité, pH, DCO, DBO5, ...).

V/C Les filières de traitements et d'élimination des boues

Les principales étapes de traitement et destination des boues sont résumées dans la Figure 2.

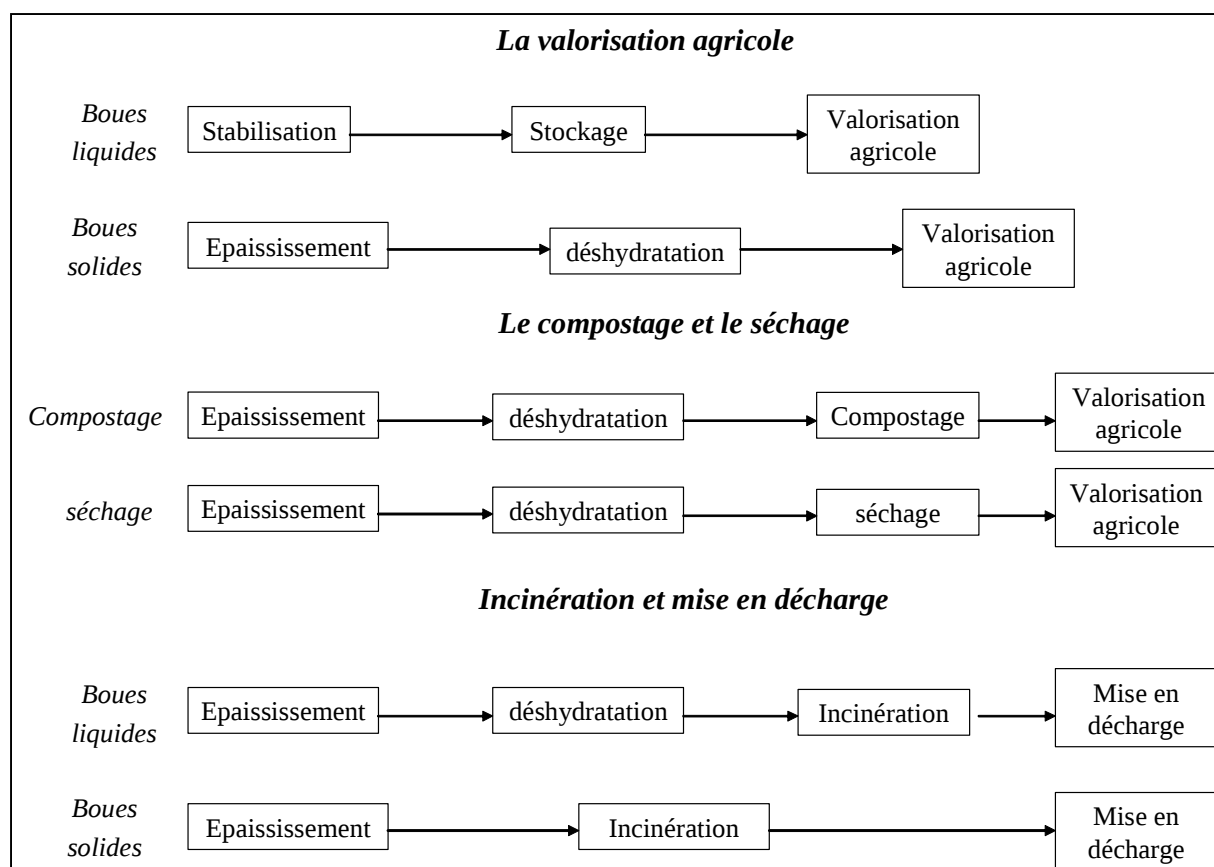


Figure 2 : Les principales étapes de traitement des boues et leur destination (D'après Satin, 2001)

B/ DONNEES GENERALES SUR LE PARC DE STATION D'EPURATION EN FRANCE (d'après IFEN, 2006)

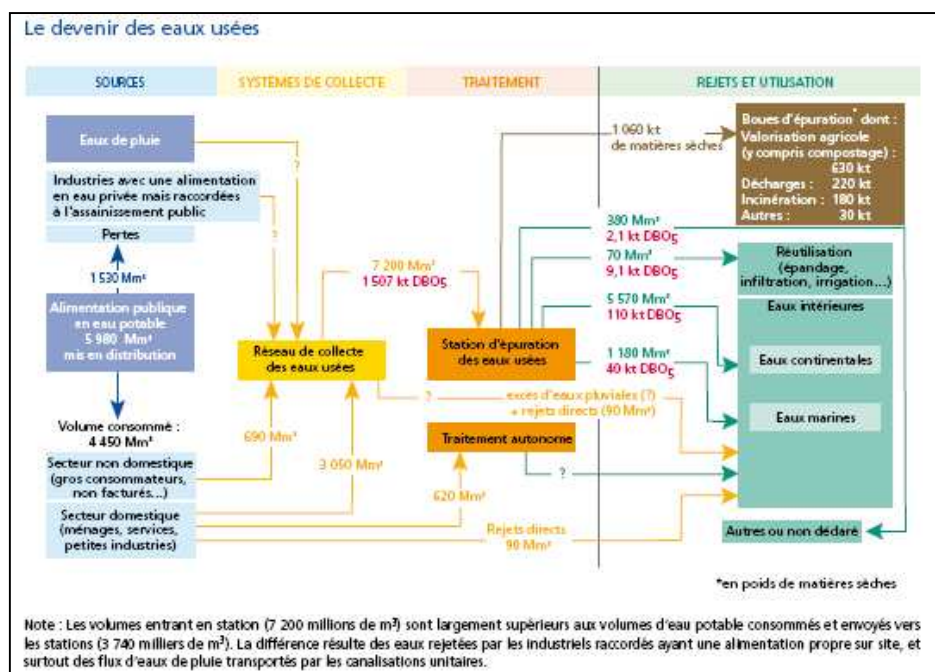


Figure 3 : Distribution des Processus de traitements dans les stations françaises

L'IFEN a réalisé en 2006, un bilan sur l'assainissement des eaux résiduares urbaines en France. Les principales données concernant les stations d'épuration en France (traitements et milieu récepteur) sont résumées dans la Figure 3. Le traitement des eaux résiduares est assuré par près de 17 300 stations d'épuration. En avril 2006, les performances de 68 % des stations d'épuration des grandes agglomérations (>10 000 habitants) et 72 % de leurs flux étaient conformes aux objectifs de la directive européenne sur les eaux résiduares urbaines (IFEN, 2006).

C/ CONTEXTE REGLEMENTAIRE

1/ Directive du conseil du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux usées urbaines résiduares (91/271/CEE)

Tableau 1 : Prescriptions relatives aux rejets provenant des stations d'épuration des eaux urbaines résiduares et soumises aux dispositions des articles 4 et 5 de la présente directive. On appliquera la valeur de la concentration ou le pourcentage de réduction.

Paramètres	Concentration	Pourcentage minimal de réduction ⁽¹⁾	Méthode de mesure de référence
Demande biochimique en oxygène (DB05 à 20°C) sans nitrification ⁽²⁾	25 mg.l ⁻¹ O ₂	70-90 40 aux termes de l'article 4 paragraphe 2	Echantillon homogénéisé, non filtré, non décanté. Détermination de l'oxygène dissous avant et après une incubation de 5 jours à 20° C ± 1°C, dans l'obscurité complète. Addition d'un inhibiteur de nitrification.

Demande chimique en oxygène (DCO)	125 mg.l ⁻¹ O ₂	75	Echantillon homogénéisé, non filtré, non décanté. Bichromate de potassium.
Total des matières solides en suspension	35 mg.l ⁻¹ ⁽³⁾ 35 aux termes de l'article 4 paragraphe 2 (plus de 10000 EH) 60 aux termes de l'article 4 paragraphe 2 (de 2000 à 10000 EH)	90 ⁽³⁾ 90 aux termes de l'article 4 paragraphe 2 (plus de 10000 EH) 70 aux termes de l'article 4 paragraphe 2 (de 2000 à 10000 EH)	- Filtration d'un échantillon représentatif sur une membrane de 0,45 µm, séchage à 105°C et pesée. - Centrifugation d'un échantillon représentatif (pendant 5 minutes au moins, avec accélération moyenne de 2800 à 3200g), séchage à 105°C, pesée.

(1) Réduction par rapport aux valeurs à l'entrée.

(2) Ce paramètre peut être remplacé par un autre : carbone organique total (COT) ou demande totale en oxygène (DTO), si une relation peut être établie entre la DB05 et le paramètre de substitution.

(3) Cette exigence est facultative.

Les analyses relatives aux rejets provenant du lagunage doivent être effectuées sur les échantillons filtrés ; toutefois, la concentration du total des matières solides en suspension dans les échantillons d'eau non filtrée ne doit pas dépasser 150 mg.l⁻¹.

Tableau 2 : Prescriptions relatives aux rejets provenant des stations d'épuration des eaux urbaines résiduaires et effectués dans des zones sensibles sujettes à eutrophisation, telles qu'identifiées à l'annexe II point A lettre a). En fonction des conditions locales, on appliquera un seul paramètre ou les deux. La valeur de la concentration ou le pourcentage de réduction seront appliqués.

Paramètres	Concentration	Pourcentage minimal de réduction (1)	Méthode de mesure de référence
Phosphore total	2 mg.l ⁻¹ P (EH compris entre 1000 et 100 000) 1 mg. l ⁻¹ P (EH de plus de 100 000)	80	Spectrophotométrie par absorption moléculaire
Azote total (2)	15 mg. l ⁻¹ N (EH compris entre 10 000 et 100 000) 10 mg. l ⁻¹ N (EH de plus de 100 000) (3)	70-80	Spectrophotométrie par absorption moléculaire

(1) Réduction par rapport aux valeurs à l'entrée.

(2) Azote total signifie le total de l'azote obtenu par la méthode de Kjeldahl (azote organique + NH₃), de l'azote contenu dans les nitrates (NO₃) et de l'azote contenu dans les nitrites (NO₂)

(3) Autre possibilité : la moyenne journalière ne doit pas dépasser 20 mg. l⁻¹ N. Cette exigence se réfère à une température de l'eau de 12° C au moins pendant le fonctionnement du réacteur biologique de la station d'épuration. La condition concernant

II/La Réglementation des boues d'épuration

Le régime juridique des boues est déterminé par le décret 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. Selon l'article 2 du décret, les boues

ont le caractère de déchet au sens de la loi du 15 juillet 1975, laquelle précisait « *est considéré comme un déchet tout résidu d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation (...) que son détenteur destine à l'abandon ou qu'il est tenu d'abandonner* ».

Les conditions d'épandage définies par le décret recouvrent cinq opérations : le stockage, les études préalables à l'épandage, le programme prévisionnel d'épandage qui consiste à planifier les périodes d'épandage, un registre d'épandage qui doit être tenu par l'agriculteur, un bilan annuel.

Des restrictions d'usages résultent de la directive du Conseil du 12 décembre 1991 relative à la protection des eaux contre la pollution par les nitrates d'origine agricole. Cette directive a été transposée par les décrets du 27 août 1993 et du 4 mars 1996. La directive et les décrets de transposition définissent des « zones vulnérables » associées à des restrictions d'épandage. Une restriction des périodes d'épandage en fonction du rapport carbone/azote des boues et du type de culture réceptrice. Concrètement pour les boues liquides et déshydratées qui présentent un rapport carbone/azote inférieur à 8, la période d'épandage se limite au printemps, ce qui entraîne des besoins de stockage conséquent.

Une restriction des surfaces d'épandage en interdisant l'épandage sur certaines productions et sur certains types de sol.

-Un accroissement des contraintes par le biais de programmes d'actions départementaux. Le décret 97-1133 ne s'applique cependant pas «aux produits composés en tout ou partie de boues qui, au titre de la loi du 13 juillet 1979, bénéficient d'une homologation ou à défaut, d'une autorisation provisoire de vente ou sont conformes à une norme rendue d'application obligatoire» Ainsi, il est explicitement prévu que les boues sont aussi des matières fertilisantes qui relèvent de la loi du 13 juillet 1979. Les matières fertilisantes, réalisées en tout ou partie à partir de boues, doivent être conformes à des normes (normes NFU 44-041 et 44-051) et faire l'objet d'une homologation ou d'une autorisation provisoire de vente. L'ambiguïté demeure sur la qualification de compost. Certains souhaiteraient qualifier de compost une boue simplement séchée qui aurait certaines qualités fertilisantes. D'autres souhaitent réserver la qualification de compost aux boues mélangées à des supports carbonés (bois ou déchets verts).

ANNEXE III ANNEXE AMPERES

La constitution d'un échantillon de stations d'épuration urbaines et rurales représentatif du parc français / européen actuel et des années à venir a été réalisée. L'échantillonnage a couvert aussi bien des stations de taille importante conçues pour les rejets en milieu sensible que des filières de traitement des eaux usées de petites collectivités (<2000 P.E), dont l'impact local sur le milieu récepteur est très important en milieu rural. Les critères de sélection des filières ont intégré : le type (en lien avec les mécanismes de traitement des composés cibles), la taille, la localisation (milieu récepteur), la qualité de l'exploitation, la possibilité de disposer d'un historique du fonctionnement de l'installation et d'effectuer des prélèvements et mesures complémentaires.

Sur chaque site des bilans massiques entrée / sortie de stations accompagnés de mesures dans les boues ont été réalisés. Les différentes étapes du traitement ont été différenciées et considérées.

Au total, un nombre de 16 stations d'épuration a été arrêté et étudié, seules 7 seront considérées dans ce manuscrit.

Les caractéristiques de fonctionnement ainsi que les plans d'échantillonnages sont présentés pour chacune des stations d'épuration considérées. Pour satisfaire à une clause de confidentialité, les noms et localisations des stations d'épuration ne seront pas spécifiés.

Station d'épuration SE-1

A-Présentation de la station

- ▲ Capacité (Equivalents Habitants) : 36 000 EH
- ▲ Type de réseau : pseudo séparatif
- ▲ Typologie des rejets traités :
 - Rejets industriels : oui, faible
 - Rejets hospitaliers : non
 - Rejets urbains : oui
- ▲ Type de traitement appliqué dans la filière eaux : boues activées (C, N, P)
- ▲ Type de traitement appliqué dans la filière boues : centrifugation directe
- ▲ Dates de la campagne : 26 février- 1 mars 2007

B-Campagne d'échantillonnage

Les données concernant la campagne de prélèvement sont résumées dans le Tableau 1 et la Figure 1.

Tableau 1: Campagnes d'échantillonnage sur le site de la station d'épuration SE1.

Filière eau	Entrée STEP (eaux brutes après dégrillage)	Retour de tête	Sortie STEP (eaux traitées)
J1	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	NR	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit
J2	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Echantillon moyen	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit
J3	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	NR	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit
Filière boue	Entrée filière boue		Sortie filière Boue
J2	Oui reconstitué		Oui reconstitué

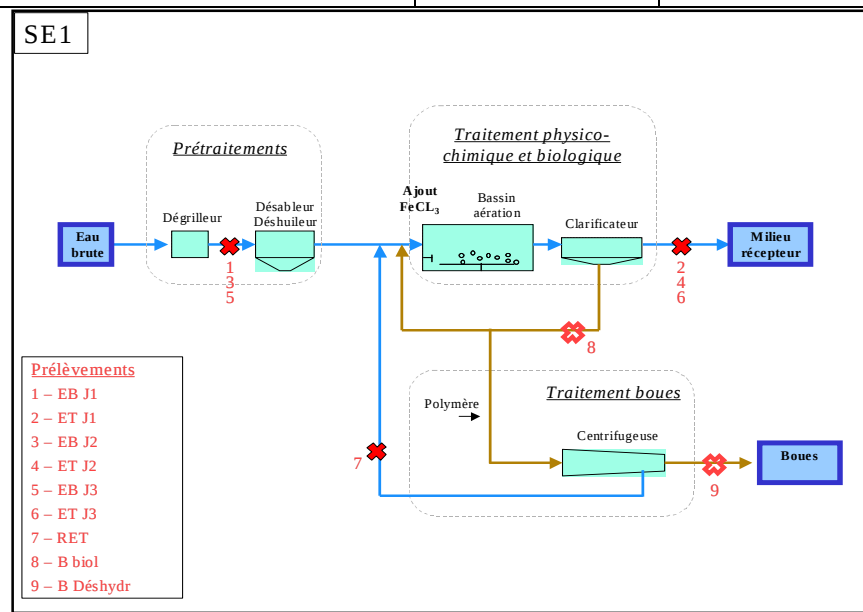


Figure 1 : Schéma de la station SE-1, localisation des points d'échantillonnage.

Station d'épuration SE-2

A- Présentation de la station

- ▲ Capacité (Equivalents Habitants) : 250 000 EH
- ▲ Type de réseau : faux séparatif
- ▲ Typologie des rejets traités :
 - Rejets industriels : oui, importants
 - Rejets hospitaliers : oui
 - Rejets urbains : oui
- ▲ Type de traitement appliqué dans la filière eaux : décantation primaire, boues activées (C, N, P)
- ▲ Type de traitement appliqué dans la filière boues : épaissement, digestion anaérobie, centrifugation, chaulage
- ▲ Dates de la campagne : 24-26 avril 2007.

B-Campagne d'échantillonnage

Les données concernant la campagne de prélèvement sont résumées dans le Tableau 2 et la Figure 2.

Tableau 2 : Campagnes d'échantillonnage sur le site de la station d'épuration SE 2.

Filière eau	Entrée STEP (eaux brutes après dégrillage)	Eau décantée	Sortie STEP (eaux traitées)	Retour de tête global	Retour de tête centrat	Retour de tête curage	Matières de vidange
J1	NR	NR	NR	oui reconstitué	oui reconstitué	oui reconstitué	oui reconstitué
J2	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit				
J3	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit				

Filière boue	Entrée filière	Boue intermédiaire (digérée)	Boue sortie
J1	OUI (2voies) reconstitué	OUI reconstitué	OUI reconstitué

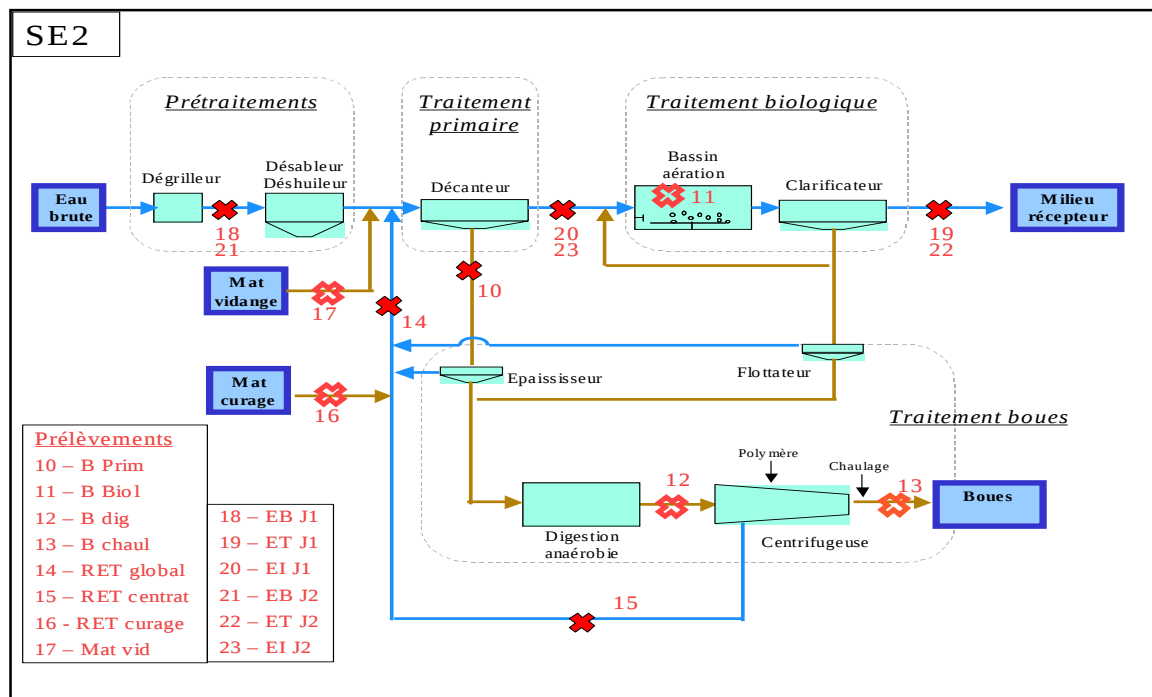


Figure 2 : Schéma de la station SE-2, localisation des points d'échantillonnage.

Station d'épuration SE-3

A-Présentation de la station

- ▲ Capacité (Equivalents Habitants) : 50 000 EH
- ▲ Type de réseau : pseudo séparatif
- ▲ Typologie des rejets traités :
 - Rejets industriels : oui, importants
 - Rejets hospitaliers : oui
 - Rejets urbains : oui
- ▲ Type de traitement appliqué dans la filière eaux : boues activées (C, N, P)
- ▲ Type de traitement appliqué dans la filière boues : flottation, centrifugation, séchage
- ▲ Dates de la campagne : 11-14 juin 2007

B-Campagne d'échantillonnage

Les données concernant la campagne de prélèvement sont résumées dans le Tableau 3 et la Figure 3.

Tableau 3 : Campagnes d'échantillonnage sur le site de la station d'épuration SE 3.

Filière eau	Entrée STEP (eaux brutes après dégrillage)	Eau intermédiaire	Sortie STEP (eaux traitées)	Retour de tête
J1	NR	NR	NR	oui reconstitué
J2	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	
J3	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	
indépendante				oui reconstitué

Filière boue	Entrée filière	Point intermédiaire	Boue sortie filière	Boues avant séchage	Boue après séchage
J1	OUI reconstitué	OUI reconstitué	OUI reconstitué		
indépendante				OUI reconstitué	OUI reconstitué

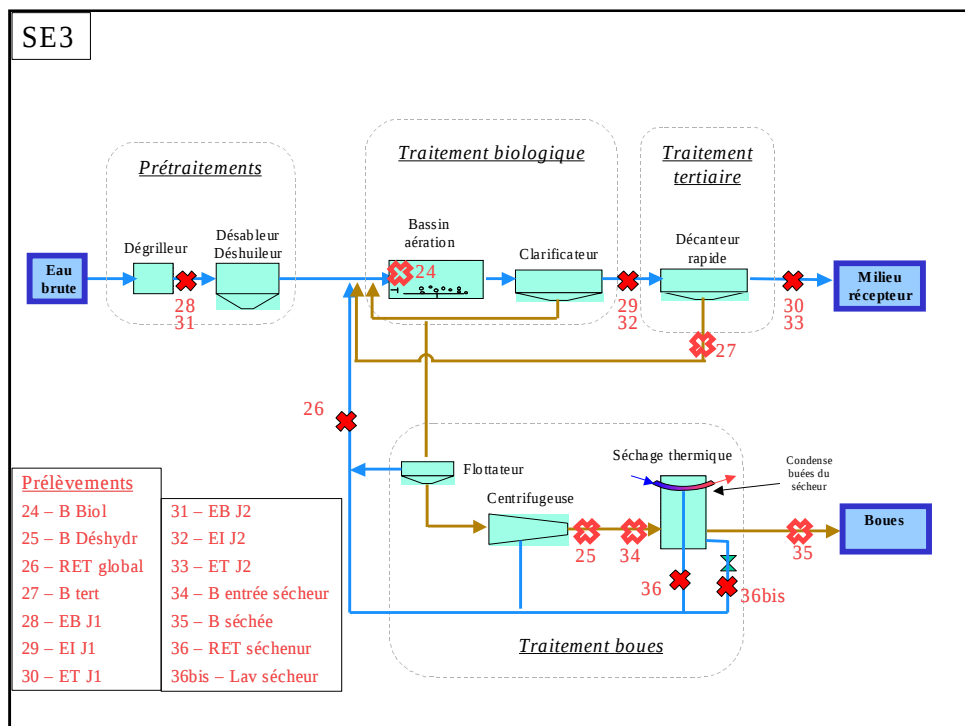


Figure 3 : Schéma de la station SE-3, localisation des points d'échantillonnage.

Station d'épuration SE-4

A-Présentation de la station

- ▲ Capacité (Equivalents Habitants) 110 000 EH
- ▲ Type de réseau : pseudo séparatif
- ▲ Typologie des rejets traités :
 - Rejets industriels : oui
 - Rejets hospitaliers : oui
 - Rejets urbains : oui
- ▲ Type de traitement appliqué dans la filière eaux : boues activées (C, N)
- ▲ Type de traitement appliqué dans la filière boues : centrifugation directe
- ▲ Dates de la campagne : 10-13 septembre 2007

B-Campagne d'échantillonnage

Les données concernant la campagne de prélèvement sont résumées dans le Tableau 4 et la Figure 4.

Tableau 4 : Campagnes d'échantillonnage sur le site de la station d'épuration SE 4.

Filière eau	Entrée STEP (eaux brutes après dégrillage)	Sortie STEP (eaux traitées)	Retour de tête fosse toutes eaux	Graisses traitées
J1	NR	NR	oui reconstitué	oui reconstitué
J2	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	NR	NR
J3	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	NR	NR
Filière boue	Entrée filière		Boue sortie	
J1	OUI reconstitué		OUI reconstitué	

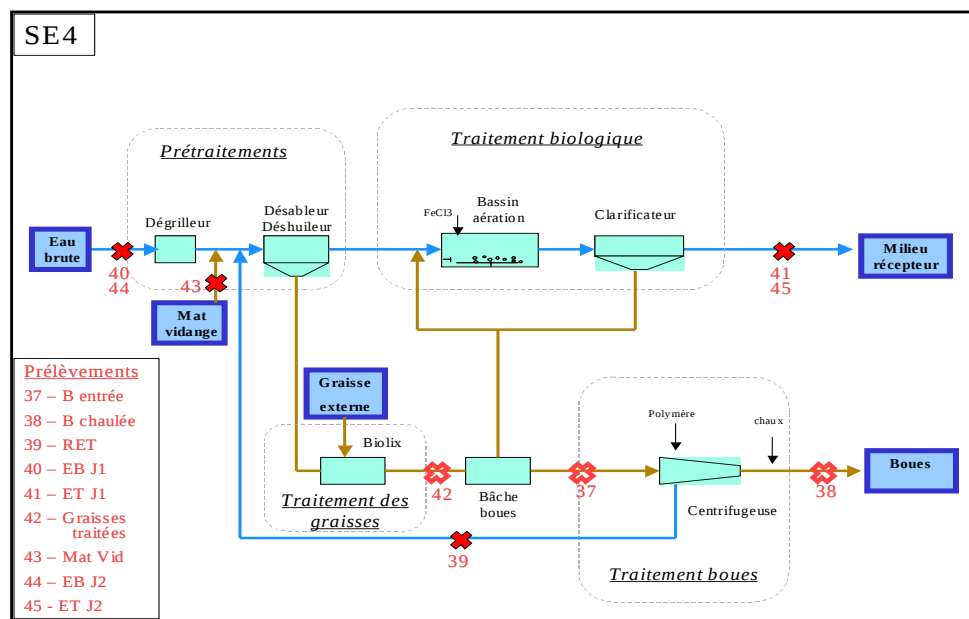


Figure 4 : Schéma de la station SE-4, localisation des points d'échantillonnage.

Station d'épuration CA-1

A-Présentation de la station

- ▲ Capacité (Equivalents Habitants) : 2 900 EH
- ▲ Type de réseau : unitaire
- ▲ Typologie des rejets traités :
 - Rejets industriels : oui
 - Rejets hospitaliers : oui
 - Rejets urbains : oui
- ▲ Type de traitement appliqué dans la filière eaux : boues en aération prolongée faible charge, décantation
- ▲ Type de traitement appliqué dans la filière boues : lit de séchage planté avec plancher aérant

▲ Dates de la campagne : 5-8 février 2007

B-Campagne d'échantillonnage

Les données concernant la campagne de prélèvement sont résumées dans le Tableau 5 et la Figure 5.

Tableau 5 : Campagnes d'échantillonnage sur le site de la station d'épuration CA 1.

Filière eau	Entrée STEP (eaux brutes après dégrillage)	Retour de tête	Sortie STEP (eaux traitées)
J1	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	NR	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit
J2	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Echantillon moyen	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit
J3	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	NR	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit
Filière boue	Entrée filière boue		Sortie filière Boue
J2	oui reconstitué		oui reconstitué

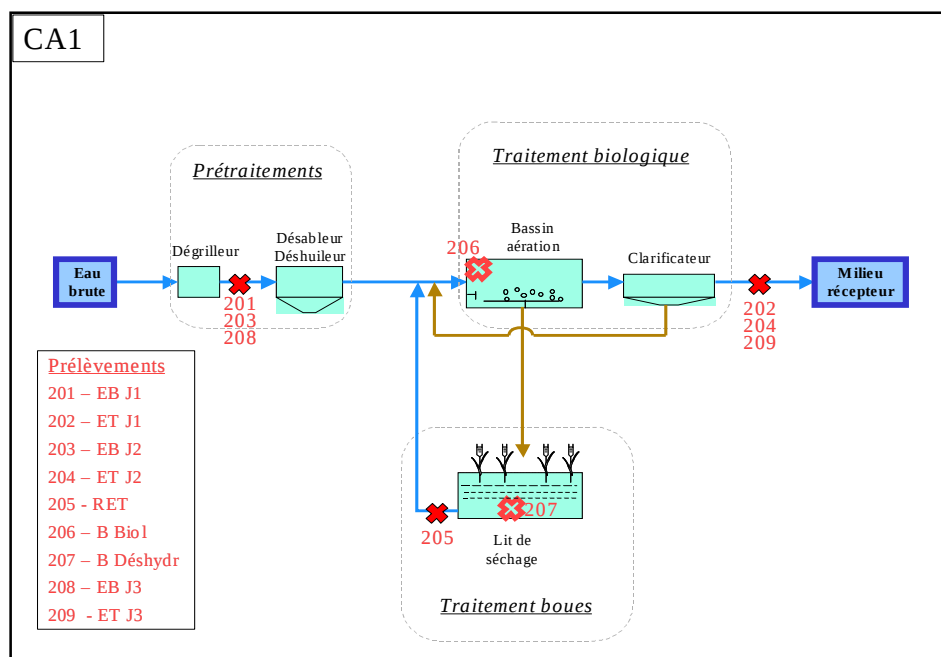


Figure 5 : Schéma de la station CA-1, localisation des points d'échantillonnage.

Station d'épuration CA-2

A-Présentation de la station

- ▲ Capacité (Equivalents Habitants) 13 000 EH
- ▲ Type de réseau : unitaire
- ▲ Typologie des rejets traités :

- Rejets industriels : NR
- Rejets hospitaliers : non
- Rejets urbains : oui

▲ Type de traitement appliqué dans la filière eaux : boues en aération prolongée faible charge (C, N), décantation

▲ Type de traitement appliqué dans la filière boues : lit de séchage planté (SINT)

▲ Dates de la campagne : 19-22 mars 2007

B-Campagne d'échantillonnage

Les données concernant la campagne de prélèvement sont résumées dans le Tableau 6 et la Figure 6.

Tableau 6 : Campagnes d'échantillonnage sur le site de la station d'épuration CA-2

Filière eau	Entrée STEP (eaux brutes après dégrillage)	Retour de tête	Sortie STEP (eaux traitées)
J1	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	NR	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit
J2	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Echantillon moyen	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit
J3	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	NR	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit
Filière boue	Entrée filière boue		Sortie filière Boue
J1	NR		Oui reconstitué
J2	Oui reconstitué		NR

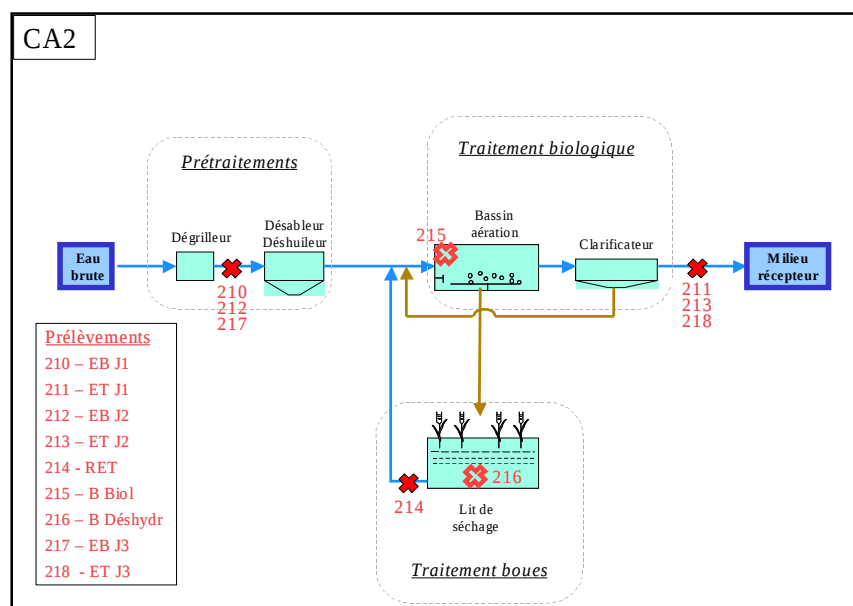


Figure 6 : Schéma de la station CA-2, localisation des points d'échantillonnage.

Station d'épuration CA-3

A-Présentation de la station

- ▲ Capacité (Equivalents Habitants) 700 000 EH
- ▲ Type de réseau : unitaire
- ▲ Typologie des rejets traités :
 - Rejets industriels : oui
 - Rejets hospitaliers : oui
 - Rejets urbains : oui
- ▲ Type de traitement appliqué dans la filière eaux : décantation primaire, boues activées moyenne charge, biofiltres (15%)
- ▲ Type de traitement appliqué dans la filière boues : centrifugation, polymères
- ▲ Dates de la campagne : 21-24 mai 2007

B-Campagne d'échantillonnage

Les données concernant la campagne de prélèvement sont résumées dans le Tableau 7 et la Figure 7.

Tableau 7 : Campagnes d'échantillonnage sur le site de la station d'épuration CA 3.

Filière eau	Entrée STEP (eaux brutes après dégrillage)	Point intermédiaire	Retour de tête	Sortie STEP (eaux traitées)
J1	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Echantillon moyen	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit
J2	NR	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	NR	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit
J3	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit	NR	Prélèvement moyenné 24 heures proportionnel au débit

Filière boue	Entrée filière	Point intermédiaire décanteur laire	Point intermédiaire Bassin biologique	Point intermédiaire Eau sale biofiltre	Sortie filière
J1	OUI reconstitué	OUI reconstitué	OUI reconstitué	OUI reconstitué	OUI reconstitué

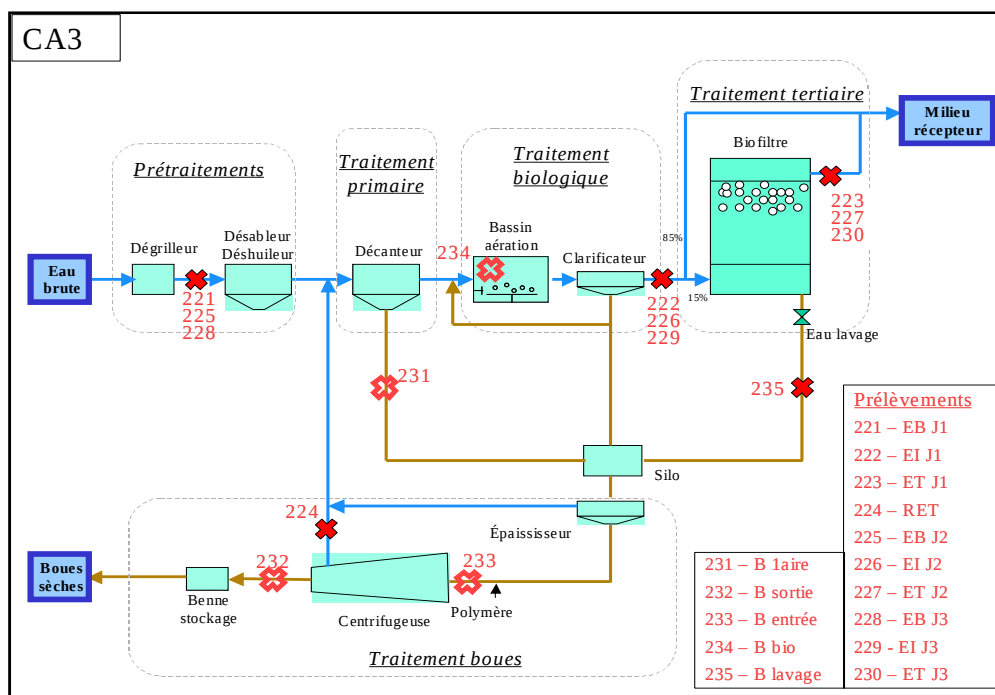


Figure 7 : Schéma de la station CA-3, localisation des points d'échantillonnage.

ANNEXE IV Le Bassin versant de la Seine

Tableau 1 : Principales caractéristiques du bassin versant de la Seine.

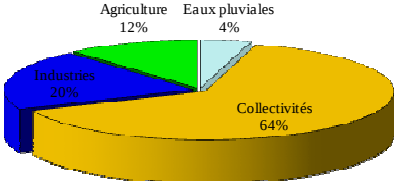
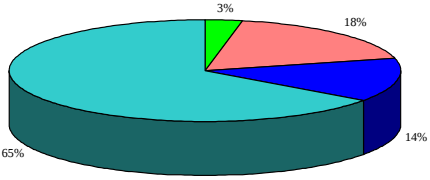
LE BASSIN DE LA SEINE	
Superficie totale	97 000 km ²
Population	17 250 000 habitants
Densité	35-20 000 habitants.km ⁻²
<i>Rejets nets en DCO dans les eaux de surface du bassin de la Seine</i>  Agriculture 12% Eaux pluviales 4% Industries 20% Collectivités 64%	<u>Pressions domestiques :</u> 84 % population raccordée au réseau d'assainissement collectif <u>Pressions industrielles</u> 14 000 industries (énergies, métaux lourds, chimie) <u>Pressions agricoles :</u> 104 000 exploitations 34 % production céréalière nationale 17 % cheptel ovin

Tableau 2: Caractéristiques des principaux affluents de l'estuaire de Seine.

Nom	Surface du Bassin versant (km ²)	Population (habitants)	Stations d'épuration (nombre de rejets dans le milieu)
L'Andelle	750	50 000	3
L'Eure (aval)	900	110 000	14
La Risle	147	-	13
Le Commerce	225	50 000	2
La Seine	2000	800 000	25
Le Rançon			1
L'Austreberthe			3
Le Cailly			3
Le Robec			-
La Sainte-Gertrude			1

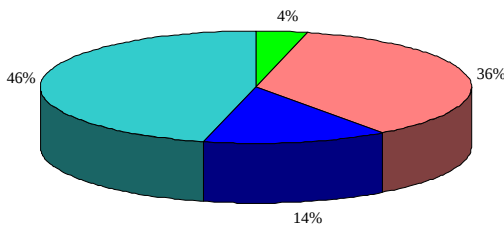
ANNEXE V Le Bassin versant de la Garonne

Tableau 1 : Principales caractéristiques du bassin versant de la Garonne et de ses affluents.

LE BASSIN DE LA GARONNE		
Superficie totale	29 500 km ²	
	Vallée de la Garonne	6050 km ²
	Rivières de Gascogne et Neste	7390 km ²
	Ariège	4170 km ²
Population	2 500 000 habitants	
Densité	84 habitants/ km ²	
<i>Pollution nette rejetée DBO5 dans les eaux de surface (hors pollution agricole) Garonne</i>  ■ Rejets des dispositifs d'assainissement autonome ■ Rejets industriels non raccordés ■ Rejets des stations d'épuration		
- <u>Pression domestique</u> : <u>Principales agglomérations (habitants, recensement 1999):</u> Toulouse 741 120 Bordeaux 735 337 Agen 69 488 Marmande 23 046 Auch 21 836 - <u>Pressions Industrielles</u> : Industrie chimique Industrie de pointe Aéronautique Agroalimentaire : valorisation des produits régionaux - <u>Pression agricole</u> oui		
55 % des masses d'eaux reconnues en bon état chimique		

ANNEXE VI Le Bassin versant de l'Adour

Tableau 1 : Principales caractéristiques du bassin versant de l'Adour et de ses affluents.

LE BASSIN DE L'ADOUR		
Superficie totale	16 880 km ²	
	Adour	5 780 km ²
	Midouze	3 590 km ²
	Gaves	5 400 km ²
	Nives	2 110 km ²
Population	944 700 habitants	
Densité	54 habitants/ km ²	
Pollution nette rejetée dans les eaux de surface (hors pollution agricole) Adour total  46% 36% 14% 4% ■ Rejets des dispositifs d'assainissement autonome ■ Rejets industriels non raccordés ■ Rejets des stations d'épuration ■ Pertes des réseaux d'assainissement collectifs (après transferts) - <u>Pressions domestiques</u> <u>Principales agglomérations (habitants, recensement 1999):</u> Pau : 181 413 Bayonne 178 965 Tarbes 77 414 Mont de Marsan 36 653 Dax 29 297 Lourdes 15 554 - <u>Pressions industrielles</u> 335 établissements industriels, dont 37 % agroalimentaires - <u>Pression agricole</u> 27 000 exploitations 704 000 hectares de surface agricole utilisable		
54 % des masses d'eaux reconnues en mauvais état chimique		

ANNEXE VII Analyse des APEO par CL-SM

Les analyses sont réalisées à l'aide d'une CLHP 1100 couplée à un spectromètre de masse GV 1946 VL (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Le système est alimenté en azote par un générateur d'azote UHPLCMS18E et un compresseur d'air Junair 2000-25M (Domnik Hunter, Gateshead, England).

I/Chromatographe en phase liquide :

- Injecteur : injecteur automatique
- Colonne : ZORBAX™ (SB-C₁₈) ; 150mm x 2,1mm ; diamètre de pores 3,5 µm
- Température de la colonne : 21°C
- Gradient de séparation :

	Ionisation Négative (NI)	Ionisation Positive (PI)
Solvant A	Water : MeOH (2 :1, v/v, 3,5 mM acétate ammonium)	
Solvant B	MeOH	
Débit (ml.min ⁻¹)	0.150	0.150
Gradient	0 min 60 % voie B	0 min 60 % voie B
	2 min 60 % voie B	2 min 60 % voie B
	7 min 80 % voie B	7 min 80 % voie B
	25 min 80 % voie B	35 min 80 % voie B
	26 min 60 % voie B	38 min 60 % voie B
	36 min 60 % voie B	52 min 60 % voie B

II/ Spectromètre de masse

- Mode d'ionisation : Electrospray (ESI)
- Nature du gaz séchant : Azote
- Débit du gaz séchant (L.h⁻¹) : 600
- Température du gaz séchant : 350 °C
- Température de la source : 120 °C
- Température du quadrupole : 150 °C
- Mode d'acquisition : sélection d'ions (SIM)

	Ionisation Négative (NI)	Ionisation Positive (PI)
Tension capillaire (kV)	3.5	4.0
Pression de nébulisation ()	30	30

Analyse des molécules en Ionisation Négative (NI)					
Composés			Quantification		
	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	m/z quantification	Etalon interne	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	m/z quantification
4-nonylphénol	220	219	p-n-nonylphénol	220	219
4-tert-octylphénol	206	205			
acide nonylphénoxyacétique	278	277			
Analyse des molécules en Ionisation Positive (PI)					
Composés			Quantification		
	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	m/z quantification	Etalon interne	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	m/z quantification
4-nonylphénol monoéthoxylé	264	282	p-n-nonylphénol monoéthoxylé	264	282
4-nonylphénol diéthoxylé	308	331			

ANNEXE VIII Analyse des substances pharmaceutiques par CG-SM

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe 6890 couplé à un spectromètre de masse 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)

I/ Chromatographe en phase gazeuse

- Injecteur : Injecteur automatique en mode splitless non pulsé
- Gaz vecteur : Hélium 6.0 (Linde gas)
- Débit du gaz vecteur : 1,3 ml.min⁻¹
- Température de l'interface : 280°C
- Colonne : HP-5MS Agilent technologies : 30m ; Ø interne 0,25mm ; 0,25µm épaisseur de phase stationnaire constituée de 5% de diphényle -95 % diméthyl-polysiloxane.
- Programme de température : 70°C pendant 2 min puis 70°C-250°C à 10°C.min⁻¹ puis isotherme pendant 5min.

II/Spectromètre de masse

- Mode d'ionisation : Impact électronique (EI), 70 eV
- Température de la source : 230 °C
- Température du quadrupole : 150 °C
- Mode d'acquisition : sélection d'ions (SIM)
- Nombre de cycles par seconde : 1,67

Analyse des molécules non dérivées								
Composés			Quantification			Traceur d'injection		
	Masse moléculaire (g.mol-1)	m/z quantification	Etalons internes	Masse moléculaire (g.mol-1)	m/z quantification		Masse moléculaire (g.mol-1)	m/z quantification
Caféine	194	194	Diazépam d5	286	261	Pyrène	202	202
Diazépam	284	256						
Carbamazépine	236	193						
Amitriptyline	277	58	Amitriptyline d6	287	64			
Imipramine	280	234, 58						
Doxépine	279	58						
Nordiazépam	270	242	Nordiazépam d5	276	247			
Analyse des molécules dérivées (MSTFA)								
Composés			Quantification			Traceur d'injection		
	Masse moléculaire (g.mol-1)	m/z quantification	Etalons internes	Masse moléculaire (g.mol-1)	m/z quantification		Masse moléculaire (g.mol-1)	m/z quantification
Aspirine	180	195	Diazépam d5	286	261	1-hydroxy-Pyrène	218	290
Ibuprofène	206	160						
Kétoprofène	254	282						
Naproxène	230	185						
Paracétamol	151	206						
Diclofénac	295	214						
Gemfibrozil	250	201						
Salbutamol	239	369						
Clenbutérol	276	335						
Terbutaline	225	356						

ANNEXE IX Analyse des substances pharmaceutiques par CL-SM-SM

I/Liste des molécules

Classe thérapeutique		Nom molécules	Mode ionisation
Stimulants		Caféine	ESI+
		Théophylline	ESI+
Bronchodilatateurs	β-stimulants	Salbutamol	ESI+
	β-stimulants	Clenbutérol	ESI+
	β-stimulants	Terbutaline	ESI+
AINS		Ibuprofène	ESI-
		Naproxène	ESI-
		Kétoprofène	ESI-
		Diclofénac	ESI-
Analgésiques		Aspirine	ESI-
		Paracétamol	ESI+
Hypolipémiants		Gemfibrozil	ESI-
Antidépresseurs/Anxiolytiques	Normothymique	Carbamazépine	ESI+
	Antidépresseurs imipraminiques	Imipramine	ESI+
		Amitriptyline	ESI+
		Doxépine	ESI+
		Antidépresseurs	Fluoxétine
	Anxiolytiques (Benzodiazépines)	Diazépam	ESI+
		Nordiazépam	ESI+
		Alprazolam	ESI+
		Bromazépam	ESI+
Etalons analytiques		Ibuprofène _{d3} Gemfibrozil _{d6}	ESI-
		Diazépam _{d5} Nordiazépam _{d5} Amitriptyline _{d6} Paracétamol _{d4} Caféine _{c13} Salbutamol _{d3} Imipramine _{d4}	ESI+

II/Paramètre de séparation

	Paramètres de la source	
	Mode ESI ⁻	Mode ESI ⁺
Colonne (L.min ⁻¹)	11	
Voie A	Eau	Eau+ 0,1% acide formique
Voie B	Acétonitrile	Acétonitrile+ 0,1% acide formique
Débit	0,6 ml.min ⁻¹	0,6 ml.min ⁻¹
T° C	30 °C	30 °C
Gradient	0 min 0% voie B 10 min 65 % voie B 11 min 100 % voie B 12 min 100 % voie B 13 min 0 % voie B 18 min 0 % voie B 36 min 60 % voie B	0 min 0% voie B 10 min 65 % voie B 11 min 100 % voie B 12 min 100 % voie B 13 min 0 % voie B 18 min 0 % voie B

III/Paramètre d'analyse de masse

	Paramètres de la source	
	Mode ESI ⁻	Mode ESI ⁺
Débit du gaz de désolvatation gaz (L.min ⁻¹)	11	11
Température du gaz séchant (°C)	300°C	300°C
Nébuliseur	30	30
Extracteur (kV)	3,0	3,0

IV/Paramètre de détection**✓Mode ESI**

	MRM	Energie de Cône	Energie Collision
DICLOFENAC	294.13>249.9	20	18
	294.13>214	20	20
NAPROXENE	229.07>169.9	15	16
	229.07>184.9	15	8
GEMFIBROZIL	249.22>120.8	20	14
	249.22>126.8	20	10
KETOPROFENE	253.16>209	15	8
ASPIRINE	136.8>92.6	25	16
	136.8>64.9	25	26
IBUPROFENE	205.16>160.9	15	8
IBUPROFENE-D ₃	208.17>163.9	15	8
GEMFIBROZIL-D ₆	255.36>120.8	20	20

✓Mode ESI⁺

	MRM	Energie de fragmentation (V)	Energie Collision (V)
DOXEPINE	280>107	120	24
	280>84,1	130	24
DIAZEPAM	285>154	120	28
	285>256,7	120	22
NORDIAZEPAM	271>140	130	27
	271>164,7	130	30
ALPRAZOLAM	309>281	120	26
	309>205	130	42
BROMAZEPAM	316,1>182	120	34
	316,1>209	130	28
FLUOXETINE	310,1>43,8	100	22
	310,1>148	110	8
CARBAMAZEPINE	237>194	130	20
	237>192	120	20
IMIPRAMINE	281>86	120	20
	281>57,6	110	30
AMITRYPTILINE	278>91	110	24
	278>232,4	130	20
SALBUTAMOL	240>148	100	18
	240>166	110	15
TERBUTALINE	226>152	100	14
	226>125	110	24
CLENBUTEROL	277>203	110	16
	277>259	110	12
CAFEINE	195>138	130	18
	195>41,7	130	30
THEOPHYLLINE	181>124	110	18
	181>96	120	26
PARACETAMOL	152>110	100	16
	152>93	110	26
CAFEINE- C ₁₃	196>139	130	20
PARACETAMOL- _{D4}	156>114	100	18
DIAZEPAM- _{D5}	290>154	120	30
NORDIAZEPAM- _{D5}	276>140	120	30
AMITRIPTYLINE- _{D6}	284.3>233	120	20
SALBUTAMOL- _{D3}	243>151	100	18
IMIPRAMINE- _{D4}	285>85,7	120	22

Liste des Figures

Figure 1: Molécule d'alkylphénol-polyéthoxylé.....	14
Figure 2 : Principaux usages des APEO (d'après Renner, 1997).....	16
Figure 3 : Cycle biogéochimique des APEO dans l'environnement.....	17
Figure 4 : Schéma de la biodégradation des APEO.....	19
Figure 5 : Complexité du devenir des APEO et de leurs métabolites de biodégradation. Exemple des changements de concentrations en métabolites durant la période de biodégradation au cours de processus de boues activées dénitrifiantes (d'après Lu et al., 2008b).....	20
Figure 6 : Distribution en homologues d'APEO et de leurs métabolites de biodégradation dans des effluents de STEP a) dans un effluent anaérobie ; b) dans un effluent aérobie (Zhang et al., 2008a). 21	21
Figure 7 : Evolution des concentrations en nonylphénols (NP+NP1EO+NP2EO) dans les boues de stations d'épuration danoises (d'après thèse Jensen J., 2001).	24
Figure 8 : Bioaccumulation du NP dans le réseau trophique de baie de Bohay (Hu et al., 2005).....	30
Figure 9 : Proposition de chemin de biotransformation du 4-NP chez la truite et dans les hépatocytes isolés (d'après Vazquez-Duhalt et al., 2006).....	32
Figure 10 : Schéma de la fixation de la 17- β -œstradiol et du 4-NP au niveau du récepteur ER (d'après Vazquez-Duhalt et al., 2006).....	34
Figure 11 : Molécule de bisphénol A.	40
Figure 12 : Evolution de la production de BPA de 1993 à 2005 (d'après rapport UE, 2004).....	41
Figure 13 : Cycle biogéochimique du BPA dans l'environnement.....	42
Figure 14 : Les principales sources de BPA dans l'environnement (d'après rapport UE, 2004).	42
Figure 15 : Une approche des voies de dégradation du BPA (d'après Staples et al., 2000).	45
Figure 16 : Figure récapitulative des concentrations en BPA aqueux ayant entraîné : A) des changements gonadiques et B) des synthèses de vitellogénine chez différentes espèces de poissons et mollusques (d'après Crain et al., 2007).....	50
Figure 17 : Principales classes de molécules quantifiées dans l'environnement (d'après D-1-1 KNAPPE).....	53
Figure 18 : Principaux modes d'action des antibiotiques.....	54
Figure 19 : Consommation annuelle (quantité, en kg) d'une liste non exhaustive de substances pharmaceutiques en France (d'après Besse et Garric, 2008).....	60

Figure 20 : Consommation des principaux médicaments de substitution et kits d'usages en France en 2005 (nombre de boîtes), évolution des consommations (par comparaison à l'année n-1).....	62
Figure 21 : Constante de sorption et part des composés piégés par sorption par les MES des eaux brutes, des boues primaires et boues secondaires (EAWAG, publications).....	67
Figure 22 : Cycle biogéochimique des substances pharmaceutiques.	74
Figure 23 : Schéma de photodégradation de la carbamazépine sous différentes conditions de photolyse (d'après Chiron et al., 2006).....	76
Figure 24 : Concentrations moyennes, exprimées en ng.l ⁻¹ , en composés pharmaceutiques dans les eaux de surface (phases dissoutes uniquement).	78
Figure 25 : Distribution des plus faibles valeurs de toxicité aigüe pour 3 taxons (algues n=38, invertébrés n=67, poissons n=51) suite à des expositions à des substances pharmaceutiques (d'après Cunningham et al., 2006).	80
Figure 26: Schéma d'évaluation des risques selon la méthodologie EMEA (Besse et Garric, 2008)...	87
Figure 27 : Approche DCE pour atteindre le bon état écologique et chimique des milieux.	91
Figure 28 : Mise en oeuvre du réseau de surveillance RINBIO (Réseau INTégrateurs BIOlogiques) (IFREMER).	93
Figure 29 : Domaines d'application des échantillonneurs intégratifs pour les composés organiques (Vrana et al., 2005).....	94
Figure 30 : Exercice d'intercomparaison mis en œuvre par le JRC pour le dosage des AKP dans les eaux en Europe.	105
Figure 31 : Présentation de l'estuaire de Seine	114
Figure 32 : Localisation des points d'échantillonnages en baie de Seine dans le cadre du programme de surveillance RNO (IFREMER).	115
Figure 33 : Localisation des points d'échantillonnages dans le cadre du suivi de l'estuaire de Seine et des 9 principaux affluents (Seine aval).	116
Figure 34 : Présentation de l'estuaire de la Gironde.	117
Figure 35 : Localisation des points d'échantillonnage suivis sur la Garonne.	118
Figure 36 : Bassin hydrographique de l'Adour.	118
Figure 37 : Localisation des points d'échantillonnage suivis sur l'Adour.	119
Figure 38 : Présentation du bassin versant de la Vilaine et des principales pressions anthropiques...	120
Figure 39 : Localisation des points d'échantillonnage dans le cadre du suivi de l'estuaire de la Vilaine.	120
Figure 40 : Présentation de l'estuaire de l'Authie.	121

Figure 41 : Schéma de principe des différents apports en contaminants chimiques au milieu marin de l'agglomération marseillaise.	122
Figure 42 : Localisation des points d'échantillonnage suivis au niveau du littoral marseillais.....	122
Figure 43 : Le merlu <i>Merluccius merluscus</i>	123
Figure 44 : Localisation des campagnes d'échantillonnages biologiques dans le Golf du Lion. (a) Campagne mai 2005, (b) Campagne octobre 2006.	124
Figure 45: Schéma du dispositif d'expérimentation en aquarium.	125
Figure 46 : Plan expérimental de l'expérience cinétique.	126
Figure 47 : Plan expérimental de l'expérience cinétique 2.	126
Figure 48 : Plan d'échantillonnage de la manipulation de validation <i>in situ</i> des POCIS au niveau du site de la Jalle d'Eysines.....	127
Figure 49 : Localisation des points de suivi au niveau du site de la Jalle d'Eysines.....	127
Figure 50 : Plan d'échantillonnage conduit lors du déploiement au niveau du système de la Lauch.	128
Figure 51 : Localisation des points d'échantillonnages au niveau du système de la Lauch (SWIFT).	128
Figure 52 : Méthodologies pour l'analyse des APEO et BPA dans les matrices environnementales.	129
Figure 53 : Chromatogrammes des APEO et BPA en CL-ESI-SM.	133
Figure 54 : Structure des molécules pharmaceutiques sélectionnées dans cette étude.....	134
Figure 55 : Méthodologies générales pour l'analyse des substances pharmaceutiques.	138
Figure 56: Chromatogrammes présentant la séparation des substances pharmaceutiques par CG-SM.	139
Figure 57 : Chromatogrammes présentant la séparation des substances pharmaceutiques par LC-SM-SM. a) séparation en mode ESI ⁺ ; b) séparation en mode ESI ⁻	140
Figure 58 : Méthodologies globales pour l'analyse des APEO dans les matrices environnementales.	145
Figure 59 : Une année de suivie des blancs de protocole en 4-NP (ng) (n=28, 2 opérateurs).....	146
Figure 60 : Résultats de la démarche de validation des matrices aqueuses.....	147
Figure 61 : Résultats de la démarche de validation pour les matrices solides.....	148
Figure 62 : Mise en évidence de l'effet positif de la mise en œuvre d'une étape de purification pour l'analyse des APEO dans les matrices complexes.....	149
Figure 63 : La variabilité dans l'environnement.	151

Figure 64 : Rendements d'extraction du protocole d'extraction combinée pour l'analyse des 28 molécules sélectionnées dans les phases HLB des POCIS (moyenne +/-RSD (n=3)).	152
Figure 65 : Distribution des métabolites d'APEO dans les POCIS. Part des métabolites d'APEO fixée dans la phase réceptrice (%).	153
Figure 66 : Données de présence en substances pharmaceutiques et en métabolites d'APEO dans l'environnement. Cas d'un piézomètre dans la région de Merxheim.	156
Figure 67 : Comparaison des données obtenues par prélèvements ponctuels et échantillonnages intégratifs lors d'une étude de 14 jours au niveau de la Jalles d'Eysines.	157
Figure 68 : Comparaison des données obtenues par prélèvements ponctuels et échantillonnages intégratifs lors d'une étude de 7 jours au niveau de la station d'épuration de Cantinolle (jalles d'Eysines).	158
Figure 69 : Concentrations en métabolites d'APEO et en substances pharmaceutiques dans les POCIS exposées à une eau traitée (pendant une période de 7 jours, n=3).	158
Figure 70 : Données de présence des métabolites d'APEO dans la phase dissoute des eaux brutes (phase dissoute, ng.l ⁻¹).	160
Figure 71 : Données de présence des substances pharmaceutiques dans la phase dissoute des eaux brutes (phase dissoute, µg.l ⁻¹).	162
Figure 72 : Efficacité des STEP quant à l'abattement d'APEO et des substances pharmaceutiques Cas des molécules abattues.	165
Figure 73 : Efficacité des STEP quant à l'abattement d'APEO et des substances pharmaceutiques. Cas des molécules réfractaires.	166
Figure 74 : Devenir de substances pharmaceutiques et des métabolites d'APEO au cours de processus de traitements I ^{aire} et II ^{aire} . Données de présence dans la phase dissoute (µg.l ⁻¹) et rendements d'abattement pour chaque étape de la filière de traitement des eaux. (Rendement de la phase de traitement I ^{aire} = $([entrée] - [T I^{aire}]) / [entrée]$; Rendement de la phase de traitement II ^{aire} = $([T I^{aire}] - [T II^{aire}]) / [T I^{aire}]$).	167
Figure 75 : Devenir de substances pharmaceutiques et des métabolites d'APEO au cours de processus de traitements des eaux usées. Données de présence dans la phase dissoute (µg.l ⁻¹) et rendements d'abattement pour chaque étape de la filière de traitement des eaux. (Rendement de la phase de traitement Biologique = $([entrée] - [T Bio]) / [entrée]$; Rendement de la phase de traitement III ^{aire} = $([T Bio] - [T III^{aire}]) / [T Bio]$).	168
Figure 76 : Part de chacune des phases (solides et dissoutes) dans la contamination des phases aqueuses, évolution au cours des processus de traitements des eaux.	170
Figure 77 : Données de présence des métabolites d'APEO et des substances pharmaceutiques dans les boues de station d'épuration (7 stations d'épuration, concentrations moyennes +/-RSD µg.l ⁻¹).	171
Figure 78 : Tendances saisonnières dans la distribution et la présence les principaux métabolites d'APEO au niveau de l'effluent de la station d'épuration de Rouen (2002-2006).	174

Figure 79 : Données de présence des métabolites d'APEO dans les affluents au cours des 3 campagnes.	174
Figure 80 : Flux en métabolites d'APEO amenés en estuaire de Seine par les 9 principaux tributaires.	176
Figure 81 : Concentrations en métabolites d'APEO mesurées à Poses dans les phases dissoutes (clair) et solides (foncé) au cours des 5 années de monitoring.	176
Figure 82 : Flux en métabolites d'APEO entrants dans l'estuaire durant la période d'étude 2002-2006.	177
Figure 83 : Part des différentes sources d'APEO dans la contamination de l'estuaire de Seine en fonction des saisons (kg.jour).....	178
Figure 84 : Devenir des métabolites d'APEO dans l'estuaire de Seine au cours de 2 campagnes a) mai 2005 ; b) juillet 2006. Part de la phase solide dans la contamination de la phase aqueuse.	179
Figure 85 : Evaluation du risque lié à la présence de métabolites d'APEO en estuaire de Seine. (Concentration totale exprimée en ng.l^{-1})	180
Figure 86 : Devenir des métabolites d'APEO dans l'estuaire de Seine marin a) Juillet 2003 ; b) Novembre 2004 ; c) corrélation entre salinité et concentrations en 4-NP1EC et 4-NP mesurées dans la phase aqueuse (phase dissoute + particulaire).....	181
Figure 87 : Devenir des substances pharmaceutiques et des métabolites d'APEO dans la phase aqueuse de la calanque de Cortiou, sous influence du rejet de la station d'épuration de Marseille.....	184
Figure 88 : Devenir des substances pharmaceutiques et des métabolites d'APEO dans la phase sédimentaire de la calanque de Cortiou, sous influence du rejet de la station d'épuration de Marseille.	185
Figure 89 : Tendances dans la contribution des phases solides à la contamination de la Baie de l'Authie par les APEO (% de la contamination aqueuse).	188
Figure 90 : Les APEO et leurs métabolites de dégradation. Contaminants ubiquistes des systèmes dulçaquicoles Français	189
Figure 91 : LES APEO et leurs métabolites de dégradation. Contaminants ubiquistes des systèmes marins côtiers Français.....	190
Figure 92: Les substances pharmaceutiques : Contaminants ubiquistes des systèmes marins côtiers Français.	191
Figure 93 : Présence de 4-NP dans les bile de poissons <i>Merluscus merluscis</i> dans le Golfe du Lion (concentrations exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ bile).	192

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les principales propriétés physiques et chimiques des APEO et des AP.....	15
Tableau 2 : Efficacité des traitements de STEP quant à l'abatement des APEO (Bruchet , 2006).....	20
Tableau 3 : Données de présence des APEO dans les effluents de STEP	23
Tableau 4 : Données de présence du NP dans les boues de STEP.	24
Tableau 5 : Données de présence des APEO et de leurs métabolites dans les milieux aquatiques (Concentrations exprimées en ng.l ⁻¹ , phase dissoute).....	28
Tableau 6 : Données de contamination des sédiments par les APEO, les AP et les APEC	29
Tableau 7 : Valeurs de BCF pour certains alkylphénols (d'après Staples et al., 2004).	30
Tableau 8 : Evolution de la toxicité aigüe (LC ₅₀) en fonction de la longueur de la chaîne éthoxylée des APEO, chez <i>Oryzias latipes</i> . (Servos, 1999).....	33
Tableau 9 : Pouvoir de compétition des APEO, AP et APEC vis-à-vis de l'hormone naturelle.....	35
Tableau 10 : Les principaux effets d'une exposition aux APEO en milieu contrôlé sur les poissons (d'après Mills et Chichester, 2005).	36
Tableau 11 Principales propriétés physico-chimiques du BPA (d'après rapport UE, 2004).	40
Tableau 12 : Usages du BPA à l'échelle européenne (d'après rapport UE, 2004).	41
Tableau 13 : Efficacité des différents types de traitements mis en œuvre dans les STEP pour l'abatement du BPA (D'après rapport UE, 2004).	43
Tableau 14 : Données de présence du bisphénol A dans les effluents de STEP (phase dissoute).	44
Tableau 15 : Données de présence du BPA dans différents systèmes aquatiques de par le monde.	46
Tableau 16 : Données de toxicité du BPA (INERIS).	48
Tableau 17 : Les principaux effets d'une exposition au BPA en milieu contrôlé sur les poissons.....	49
Tableau 18 : Principaux modes d'action des agents anticancéreux et antitumoraux.....	58
Tableau 19 : Les médicaments les plus vendus en officines (en quantité, nombre de boîtes) en France en 2006 (Source AFSSAPS).....	61
Tableau 20 : Consommation de caféine dans les produits d'usages courants (www.peidruginfo.ca). ..	62
Tableau 21 : Valeurs de F _{excreta} pour plusieurs substances actives de différentes classes thérapeutiques (Besse et Garric, 2008).....	64
Tableau 22 : Valeurs de Kd mesurées dans les boues au cours des processus de traitement.	67

Tableau 23 : Efficacité des processus quant à l'élimination des substances pharmaceutiques (d'après Rapport final Poseidon, 2004).....	70
Tableau 24 : Taux d'abattement de certaines substances pharmaceutiques dans les STEP	71
Tableau 25 : Concentrations maximales et moyennes (ng.l ⁻¹) en substances pharmaceutiques mesurées dans les phases dissoutes des eaux de sortie de stations d'épuration de par le monde.....	72
Tableau 26 : Données de toxicité chronique pour certains taxons exposés à des substances pharmaceutiques (d'après Crane et al., 2006).....	83
Tableau 27 : Revue des substances pharmaceutiques inductrices et inhibitrices des isoformes du cytochrome P450 (d'après Besse et Garric, 2008).	85
Tableau 28 : Valeurs de PNEC établies selon la méthode EMEA pour certaines molécules pharmaceutiques (d'après Besse et Garric, 2008).	88
Tableau 29 : Liste des substances pharmaceutiques et hormones de la liste OSPAR.	89
Tableau 30 : Description conceptuelle des étapes clés d'une méthode analytique	91
Tableau 31 : Discussion autour des techniques d'échantillonnage.	96
Tableau 32 : Principales méthodologies d'extraction pour l'analyse des matrices liquides.	98
Tableau 33 : Principales méthodologies pour l'analyse des matrices solides.	100
Tableau 34 : Méthodologies analytiques pour l'analyse des APEO et leurs métabolites dans les matrices environnements (liquides et solides).....	106
Tableau 35 : Méthodologies analytiques pour l'analyse du bisphénol A dans les matrices environnements (liquides et solides).	107
Tableau 36 : Méthodologies analytiques pour l'analyse des substances pharmaceutiques dans les matrices environnements (liquides et solides).....	108
Tableau 37 : Tableau récapitulatif des campagnes réalisées en Estuaire et Baie de Seine.....	115
Tableau 38 : Récapitulatif des agents industriels suivis dans cette étude.....	130
Tableau 39 : Substances pharmaceutiques sélectionnées dans cette étude.....	135
Tableau 40 : Effets matriciels en LC-ESI-MS	150
Tableau 41 : Valeurs de Rs (l.j ⁻¹) obtenues expérimentalement pour les 28 molécules sélectionnées.....	155
Tableau 42 : Données de présence des 25 molécules étudiées dans la phase dissoute des eaux brutes, au niveau de 7 stations d'épuration.	159
Tableau 43 : Données de présence des 25 molécules étudiées dans la phase dissoute des eaux traitées, au niveau de 7 stations d'épuration.	163

Tableau 44 : Données de présence en métabolites d'APEO dans les effluents de station d'épuration dans les phases dissoutes et les phases solides (2002-2006).	173
Tableau 45 : Données de présence en métabolites d'APEO et substances pharmaceutiques dans la phase dissoute et les sédiments de la calanque de Cortiou.....	182
Tableau 46 : Données de présence des métabolites d'APEO dans les phases dissoutes des principaux estuaires macrotidaux français.	186
Tableau 47 : Données de présence et rôle des matières en suspension dans la contamination des phases aqueuses des principaux estuaires macrotidaux français.....	187

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	7
CHAPITRE A.....	12
LES AGENTS INDUSTRIELS.....	12
LES ALKYLPHENOL-POLYETHOXYLES.....	13
I Généralités sur les alkylphénol-polyéthoxylés.....	14
I.1 Voies de synthèse et production des alkylphénol-polyéthoxylés.....	14
I.1.1 Voies de synthèse des alkylphénols.....	14
I.1.2 Voies de synthèse des alkylphénol-polyéthoxylés.....	14
I.2 Les propriétés physiques et chimiques des APEO.....	15
I.3 Domaines d'usages et applications.....	16
II Les sources.....	17
II.1 Le devenir des alkylphénol-polyéthoxylés dans les stations d'épuration.....	18
II.1.1 Les phénomènes de biodégradation.....	18
II.1.2 Efficacité des processus mis en œuvre dans les STEP.....	19
II.2 Présence dans les effluents de STEP.....	22
II.3 Présence dans les boues.....	23
III Devenir dans l'environnement, cas des écosystèmes aquatiques.....	24
III.1 Les phénomènes de dégradation en milieu naturel.....	25
III.1.1 Les phénomènes de photodégradation.....	25
III.1.2 Les phénomènes de biodégradation.....	25
III.2 Les phénomènes de sorption dans les milieux naturels.....	26
III.3 Effets des APEO sur le cycle biogéochimique d'autres contaminants organiques présents dans les systèmes aquatiques.....	27
III.4 Données de présence dans les phases aqueuses.....	27
III.5 Données de présence dans les sédiments.....	29
III.6 Devenir dans les organismes vivants.....	29
III.6.1 Les propriétés de bioconcentration et bioaccumulation.....	29
III.6.2 La Biotransformation.....	31
IV La toxicité.....	33
IV.1 La toxicité aigüe.....	33
IV.2 La toxicité chronique.....	33
IV.3 Les APEO en tant que perturbateurs endocriniens.....	34
IV.4 Autres effets toxiques des alkylphénol-polyéthoxylés.....	36
V Quelques aspects législatifs et réglementaires.....	37
LE BISPHEENOL A.....	39
I Généralités sur le Bisphénol A.....	40
I.1 Voies de synthèse et production du Bisphénol A.....	40
I.2 Principales propriétés caractéristiques du bisphénol A.....	40
I.3 Domaines d'usages et applications.....	40
II Les sources de bisphénol A dans l'environnement.....	42
II.1 Le devenir du bisphénol A dans les décharges.....	43
II.2 Le devenir du bisphénol A dans les stations d'épuration.....	43
II.3 Le bisphénol A dans les effluents de STEP : données de présence.....	44
III Le devenir du bisphénol A dans l'environnement, cas des écosystèmes aquatiques.....	44
III.1 Les phénomènes de dégradation en milieux naturels.....	44
III.1.1 Les phénomènes de photolyse.....	44
III.1.2 Les phénomènes de biodégradation.....	45
III.2 Les phénomènes de sorption en milieux naturels.....	46
III.3 Les données de présence du Bisphénol A dans les systèmes aquatiques.....	46
III.4 Les propriétés de bioconcentration et bioaccumulation.....	47
III.5 Les propriétés de biotransformation.....	47

IV	La toxicité	47
IV.1	La toxicité aigüe et chronique	47
IV.2	Le bisphénol A et la perturbation endocrinienne	48
IV.2.1	Effets <i>in vitro</i>	48
IV.2.2	Effets <i>in vivo</i>	49
V	Quelques aspects législatifs et réglementaires	50
CHAPITRE B		52
LES SUBSTANCES PHARMACEUTIQUES		52
I	Les produits de soins corporels et médicamenteux PCPPs (Personal Care Products and Pharmaceuticals)	53
I.1	PCPP : le cas des substances pharmaceutiques	53
I.1.1	Les grandes classes thérapeutiques de substances pharmaceutiques à usages humains	54
I.1.2	Les données de consommation en France	59
I.1.3	Pharmacocinétique: Devenir des substances pharmaceutiques dans l'organisme	63
I.1.4	La notion de fraction excrétée par l'organisme de la substance active ($F_{excreta}$)	64
II	Les sources de produits pharmaceutiques dans l'environnement	64
II.1	Les différentes sources de substances pharmaceutiques pour l'environnement (Kummerer, 2004)	64
II.2	Les stations d'épuration : Principales sources des substances pharmaceutiques dans l'environnement	65
II.2.1	Les technologies courantes	65
II.2.2	Les paramètres d'abattement des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration	66
II.2.3	Paramètres affectant l'abattement des substances pharmaceutiques au sein des stations d'épuration	68
II.2.4	Les traitements tertiaires	69
II.3	Synthèse de données de présence des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration	70
II.3.1	Données de présence dans les phases dissoutes des effluents de stations d'épuration	71
II.3.2	Données de présence dans les boues de stations d'épuration	73
III	Le devenir des substances pharmaceutiques dans les systèmes aquatiques	75
III.1	Les phénomènes de dégradation en milieux naturels	75
III.1.1	La photodégradation	75
III.1.2	La biodégradation	76
III.2	Distribution dans la phase aqueuse	77
III.3	Phénomènes de sorption	77
III.4	Données de présence dans l'environnement	77
III.5	Transferts aux organismes aquatiques	78
IV	La toxicité des substances pharmaceutiques au sein des systèmes aquatiques	79
IV.1	La toxicité aigüe	79
IV.2	La toxicité chronique	80
IV.3	Effets des mélanges	81
IV.4	Toxicité des produits de dégradation et des métabolites	82
IV.5	Substances pharmaceutiques en tant que perturbateurs endocriniens	84
IV.6	Evaluation des risques liés à la présence de substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques	85
IV.6.1	Présentation du modèle d'évaluation des risques proposé par l'Agence Européenne du Médicament (EMA)	85
IV.6.2	Valeurs de PNEC pour certaines molécules pharmaceutiques	87
IV.1	Contexte réglementaire	89
CHAPITRE C		90
METHODOLOGIES ANALYTIQUES		90
I	Description conceptuelle d'une méthode analytique	91
I.1	Introduction	91
I.2	Les nouvelles approches liées à la mise en œuvre de la Directive Cadre-Eau (DCE)	91

II Les techniques d'échantillonnages pour la mesure de la qualité chimique. Cas des matrices aqueuses.....	92
II.1 Les techniques d'échantillonnages in situ. Echantillonnages ponctuels	92
II.2 Les techniques de biomonitoring	92
II.3 Les nouvelles techniques d'échantillonnages : l'échantillonnage intégratif	93
II.3.1 Principes de l'échantillonnage passif.....	94
II.3.2 Outils d'échantillonnages intégratifs et composés polaires.....	95
III Les techniques d'extraction	96
III.1 Les techniques d'extraction des matrices liquides.....	96
III.2 Les méthodes d'extraction des matrices solides ou semi-solides : particules, sédiments, boues, matrices biologiques	99
IV Les techniques chromatographiques	101
IV.1 L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG)	101
IV.1.1 Les principaux couplages	101
IV.1.2 Les couplages de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse	101
IV.2 L'analyse par chromatographie en phase liquide (CL)	101
IV.2.1 Les principaux couplages	102
IV.2.2 Les couplages de chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse (CL-SM)	102
IV.3 Le problème des effets matriciels.....	103
IV.4 Réflexion d'harmonisation à l'échelle européenne.....	104
Bilan.....	109
Objectifs de thèse.....	110
MATERIEL ET METHODES	112
I Sites d'études et expérimentations.....	113
I.1 Etude du devenir dans les stations d'épuration.....	113
I.2 Etude du devenir dans les écosystèmes aquatiques	113
I.2.1 L'estuaire de la Seine et ses affluents	113
I.2.2 Le continuum Garonne -Estuaire de la Gironde (France).....	116
I.2.3 Le continuum Adour -Estuaire de l'Adour (France).....	118
I.2.4 L'Estuaire de la Vilaine.....	119
I.2.5 La baie d'Authie	121
I.2.6 La méditerranée orientale : la rade de Marseille et la calanque de Cortiou (France) ..	121
I.3 Développement des nouveaux outils d'échantillonnage intégratifs.....	124
I.3.1 Expérimentation en laboratoire	124
I.3.2 Expérimentations sur le terrain.....	126
II Les méthodologies analytiques mises en œuvre	129
II.1 Remarques générales	129
II.2 Dosage des alkylphénol-polyéthoxylés.....	129
II.2.1 Préparation des échantillons.....	130
II.2.2 Protocole d'extraction des matrices liquides.....	131
II.2.3 Protocole d'extraction des matrices solides.....	132
II.2.4 Protocole d'extraction des biles	132
II.2.5 Quantification des APEO et de leurs métabolites : Analyse par CL-SM	132
II.2.6 Méthode de quantification des APEO et de leurs métabolites	133
II.3 Dosage des substances pharmaceutiques.....	134
II.3.1 Préparation des échantillons.....	135
II.3.2 Protocole d'extraction des matrices liquides.....	136
II.3.3 Protocole d'extraction des matrices solides.....	137
II.3.4 Protocole de purification des matrices solides.....	137
II.3.5 Quantification des substances pharmaceutiques : Analyse par CPG-SM.....	138
II.3.6 Quantification des substances pharmaceutiques : Analyse par CL-SM-SM	139
II.3.7 Méthode de quantification des substances pharmaceutiques	140
II.4 Méthodologies d'analyse des POCIS	141
II.4.1 Protocole d'extraction de la phase HLB	141

II.4.2	Protocole d'extraction de membranes.....	141
SYNTHESE.....		144
I	Méthodologies analytiques pour l'étude des alkylphénol-polyéthoxylés dans les matrices environnementales.....	145
I.1	Méthodologies analytiques pour l'analyse des APEO dans les matrices environnementales.....	145
I.2	Démarches de validation des méthodes	146
I.2.1	Capacité du laboratoire à conduire des analyses traces.....	146
I.2.2	Validation des méthodologies de préparation de l'échantillon.....	147
La problématique de la validation et de la comparabilité des données concernant la présence des substances émergentes dans l'environnement est au cœur des préoccupations de notre communauté depuis la mise en œuvre de la DCE à l'échelle européenne.		147
I.2.2.1	Validation du protocole de traitement des échantillons d'eaux.....	147
I.2.2.2	Validation du protocole de traitement des échantillons solides.....	148
I.2.3	Validation de l'analyse par couplage CL-ESI-SM.....	148
II	Nouvelles méthodologies d'échantillonnages : développements et applications pour l'étude des écosystèmes aquatiques	150
II.1	Problématique- Contexte	150
II.2	Validation d'un protocole d'extraction combinée	152
II.3	Détermination des taux d'échantillonnage des POCIS.....	152
II.3.1	Distribution des métabolites au niveau des POCIS.....	152
II.4	Détermination des taux d'échantillonnage.....	153
II.5	Validation in situ	155
II.5.1	Les POCIS comme outils intégratifs	155
II.5.2	Les POCIS comme outils quantitatifs.....	156
II.5.3	Les POCIS comme outils quantitatifs, les limitations	157
III	Présence et devenir des alkylphénol-polyéthoxylés et des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration	159
III.1	Caractérisation des eaux brutes.....	159
III.1.1	Remarques générales.....	159
III.1.2	Tendances concernant la présence des métabolites d'APEO dans les eaux brutes	160
III.1.3	Tendances concernant la présence des substances pharmaceutiques dans les eaux brutes	161
III.2	Caractérisation des eaux traitées de station d'épuration.....	162
III.3	Devenir des APEO et des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration.....	163
III.3.1	Bilan d'abattement global	163
III.3.2	Description du devenir des métabolites d'APEO et des substances pharmaceutiques au cours des processus.....	167
III.3.2.1	Efficacité des traitements primaires et secondaires.....	167
III.3.2.2	Efficacité des traitements tertiaires	167
III.4	Rôle des phases solides en suspension.....	169
III.5	Données de présence des métabolites d'APEO et des substances pharmaceutiques dans les boues issues des processus de traitement des eaux usées.....	170
IV	L'estuaire de Seine : un écosystème sous pression, le bilan de 6 années d'étude	172
IV.1	Programme de recherche : le Programme SEINE AVAL	172
IV.2	Les Sources d'APEO en estuaire de Seine.....	172
IV.2.1	Les Stations d'épuration.....	172
IV.2.1.1	Données de présence dans les effluents.....	172
IV.2.1.2	Tendances dans la présence des métabolites d'APEO dans les effluents.....	173
IV.2.2	Les principaux tributaires	174
IV.2.2.1	Données de présence dans les phases dissoutes	174
IV.2.2.2	Flux en métabolites d'APEO amenés par les tributaires	175
IV.2.3	L'influence de la zone amont : la région parisienne	177
IV.2.4	Bilan des apports en Seine	177
IV.3	Le devenir des métabolites d'APEO en estuaire de Seine	178

IV.3.1	<i>Le devenir des métabolites d'APEO dans l'estuaire fluvial</i>	178
IV.3.2	<i>Risque chimique lié à la présence de métabolites d'APEO dans l'estuaire fluvial</i>	180
IV.4	Présence et devenir des métabolites d'APEO dans l'estuaire de Seine marin	181
V	Les APEO et les substances pharmaceutiques : contaminants ubiquistes du littoral français	182
V.1	Les sources de métabolites d'APEO et de substances pharmaceutiques en milieu marin	182
V.1.1	<i>Etude de cas : La calanque de Cortiou, Impact d'un rejet en milieu marin</i>	182
V.1.1.1	<i>Données de présence dans la calanque de Cortiou</i>	182
V.1.1.2	<i>Devenir dans la calanque de Cortiou</i>	183
V.1.2	<i>Les systèmes dulçaquicoles</i>	185
V.2	Présence et devenir des métabolites d'APEO dans les estuaires macrotidaux	186
V.2.1	<i>Données de présence dans la phase dissoute</i>	186
V.2.2	<i>Rôle des phases particulières dans la contamination des estuaires</i>	187
V.3	Présence et devenir des métabolites d'APEO et des substances pharmaceutiques dans les écosystèmes marins côtiers	188
V.4	Transferts aux organismes biologiques	192
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	193
	Références Bibliographiques ..	198
	PUBLICATIONS	232
	Publication n°1	234
	Publication n°2	262
	Publication n°3	282
	Publication n°4	300
	Publication n°5	323
	Publication n°6	341
	Publication n° 7	364
	Publication n°8	380
	Publication n°9	399
	Publication n°10	416
	ANNEXES	434
	ANNEXE I Glossaire	436
	ANNEXE II Assainissement-Contexte National.....	438
	ANNEXE III ANNEXE CONFIDENTIELLE AMPERES	447
	ANNEXE IV Le Bassin versant de la Seine	457
	ANNEXE V Le Bassin versant de la Garonne	458
	ANNEXE VI Le Bassin versant de l'Adour.....	459
	ANNEXE VII Analyse des APEO par CL-SM	460
	ANNEXE VIII Analyse des substances pharmaceutiques par CG-SM.....	462
	ANNEXE IX Analyse des substances pharmaceutiques CL-SM-SM.....	464
	Liste des Figures	467
	Liste des Tableaux	472