



N° ORDRE 05/2014



N° ORDRE 42545

UNIVERSITE DE CARTHAGE
FACULTE DES SCIENCES DE BIZERTE
UNIVERSITE DE LILLE
THESE EN COTUTELLE

Présentée pour l'obtention du titre

Docteur en chimie

par

Rafika BEN SGHAIER

**Perturbateurs endocriniens dans le milieu aquatique :
« Développement analytique et faisabilité de traitement »**

Soutenue le 27 Novembre 2017 devant le jury composé de :

Mme Malika TRABELSI-AYADI	Professeur, F.S. Bizerte	Présidente
M. Hatem MAJDOUB	Professeur, Université de Monastir	Rapporteur
M. Pascal WONG WAH CHUNG	Professeur, Université d'Aix Marseille	Rapporteur
M. Jalal HALWANI	Professeur, Université Libanaise	Examineur
Mme Ibtissem GHORBEL-ABID	Maitre-assistante, INRAP	Co-encadrant
Mme Sopheak NET-DAVID	Maitre de conférences, Université de Lille	Co-encadrant
Mme Dalila BEN HASSEN CHEHIMI	Professeur, F.S. Bizerte	Directeur de thèse
M. Baghdad OUDDANE	Professeur, Université de Lille	Directeur de thèse

DÉDICACES

À LA MEMOIRE DE MA GRANDE MÈRE FATIMA

J'aurais tant aimé que tu sois présente. Que Dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde

À MES TRÈS CHERS PARENTS MOHAMED ET YAMINA

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi et réalisé aujourd'hui l'un de vos rêves. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour. Vous résumez si bien le mot parents qu'il serait superflu d'y ajouter quelque chose.

Puisse DIEU, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À MON CHER MARI ABDELMONEM

Merci pour ton amour, ton soutien et tes encouragements qui ont toujours été pour moi d'un grand réconfort.

Merci pour ta gentillesse et ton sens du sacrifice.

À MES PETITES PERLES ELLA ET MARIEM

Vos sourires illuminent ma vie et la rendent plus joyeuse et pleine de sens

J'espère que ma thèse sera pour vous source de fierté et qu'elle sera un exemple à suivre.

Que DIEU vous garde et vous protège.

À MES FRÈRES JIHED, MOUADH ET OUSSEMA

Je ne peux exprimer à travers ces lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous mes chers frères. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais. Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler.

À MES BEAUX PARENTS JABALLAH ET KHADIJA

Merci pour toute votre aide durant ce parcours. Puisse DIEU le tout puissant vous garder pour vos enfants et vos petits-enfants.

À MA BELLE-SŒUR SARRA

Tu es pour moi une sœur et une amie plus qu'une belle sœur ; nous avons partagé ensemble beaucoup de moments de joie et de frustration qu'on a pu surmonter ensemble. Sois toujours comme je t'ai connu.

À TOUS MES ONCLES ET TANTES

À TOUS MES COUSINS ET COUSINES

Veillez accepter l'expression de ma profonde gratitude pour votre soutien, encouragements, et affection. J'espère que vous retrouvez dans la dédicace de ce travail, le témoignage de mes sentiments sincères et de mes vœux de santé et de bonheur.

À MON AMIE INES

En souvenir des moments merveilleux que nous avons passés et aux liens solides qui nous unissent. Un grand merci pour ton soutien, tes encouragements, ton aide.

À MES AMIES HEDIA, ARBIA, HAYET, HASNA, OUMAYMA...

Qui font partie de ces personnes rares par leur gentillesse, leur tendresse et leurs grands cœurs.

Qu'elles trouvent ici, le témoignage de tout mon amour et toute ma reconnaissance pour leur inlassable soutien. Je vous souhaite une vie pleine de réussite, de santé et de bonheur.

*Une dédicace spéciale à **BADII, EYA, HATEM, OLFA, RIADH ET BACHIR***
Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection
la plus sincère.

À TOUTES LES PERSONNES QUI ONT PARTICIPÉ À L'ÉLABORATION DE
CE TRAVAIL À TOUS CEUX QUE J'AI OMIS DE CITER.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une thèse en cotutelle entre la Faculté des Sciences de Bizerte au Laboratoire d'Application de la Chimie aux Ressources et Substances Naturelles et à l'Environnement (LACReSNE), équipe de chimie de l'environnement et l'Université de Lille, Sciences et Technologies au Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR), équipe de chimie analytique et marine sous les directions respectives des Professeurs Dalila BEN HASSEN CHEHIMI et Baghdad OUDDANE. Les co-encadrements ont été assurés par Madame Ibtissem GHORBEL-ABID, Maitre de conférence à l'Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-chimique (INRAP) et Madame Sopheak NET-DAVID, Maitre de conférences, HDR à l'Université de Lille, Sciences et Technologies.

Cette thèse est la récolte des travaux de plusieurs personnes dont j'ai eu l'honneur de faire connaissance dans les deux laboratoires.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement au Professeur Malika TRABELSI-AYADI pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire (LACReSNE) et qui m'a orientée vers les travaux de recherche sur l'environnement, sa confiance en moi et les discussions fructueuses m'ont permis de mener à bien ce projet de recherche.

Ma reconnaissance concerne spécialement Madame Dalila BEN HASSEN CHEHIMI et Madame Ibtissem GHORBEL-ABID pour m'avoir accepté dans l'équipe de recherche de l'environnement (LACReSNE) et pour avoir accepté de diriger mes travaux de recherche et pour votre apport scientifique dans le cadre de la thèse de doctorat. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, la confiance que vous m'avez constamment témoignée.

Pour ses qualités humaines, pour son soutien et sa confiance en moi, mes sincères remerciements et mon respect s'adressent à Monsieur Baghdad OUDDANE qui a accepté de m'accueillir et codiriger ma thèse au laboratoire (LASIR).

Je suis très reconnaissante à Madame SOPHEAK NET-DAVID, pour son accueil chaleureux, pour son encadrement, ses conseils judicieux, pour m'avoir apporté une compréhension plus approfondie des divers aspects du sujet de thèse, pour sa disponibilité, ses nombreux conseils et sa rigueur scientifique.

J'exprime des sincères remerciements à Monsieur Marc MARTEL, Responsable ATE de Chimie à l'Université de Lille1 Sciences et Technologies, pour ses conseils, et les différentes formations sur les systèmes HPLC dont il m'a fait profiter.

Mes remerciements s'adressent également à madame Latifa LATROUS EL ATRACHE, Maitre de conférence à l'Institut Préparatoire aux Etudes d'Ingénieurs El Manar (IPEIM), pour son assistance tant au point scientifique qu'humain, pour les encouragements, les discussions, la bonne humeur qu'elle m'a témoignés.

Je remercie vivement tous les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Pascal WONG WAH CHUNG, Professeur à l'Université Aix Marseille et à Monsieur Hatem MAJDOUB, Professeur la faculté des sciences de Monastir, pour avoir accepté la tâche de rapporteur de ce travail.

Je tiens à remercier Bochra, Shaza, Suzanah, Tudor, Oscar et toute la famille de l'équipe de la chimie analytique et marine du laboratoire (LASIR) pour leur bonne humeur et tous les bons moments que nous avons partagé ensemble.

Je n'oublierai pas de remercier de tout mon cœur la petite famille du laboratoire LACReSNE, avec qui j'ai partagé d'innombrables moments de complicité et de bonne humeur et l'assistante du laboratoire Rim DHIF, pour son aide précieuse dans les procédures administratives.

Sommaire

CHAPITRE I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 4

I. PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET ENVIRONNEMENT	6
I.1. DEFINITION	6
I.2. ORIGINE DES PES	6
I.2.1. Origine naturelle.....	6
I.2.2. Origine anthropique	8
I.3. MECANISME D'ACTION.....	10
I.4. CONSEQUENCES D'EXPOSITION	11
I.4.1. Effet des PE sur la faune	11
I.4.2. Effet des PE sur l'homme	11
I.5. PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES PES.....	12
I.6. REGLEMENTATION.....	15
I.7. DISTRIBUTION ENVIRONNEMENTALES DES PES	16
I.7.1. Voie d'introduction dans le milieu naturel.....	16
I.7.2. Etat de la contamination du milieu aquatique par les PES.....	17
II. METHODES ANALYTIQUES DE DETECTION DES PES DANS L'ENVIRONNEMENT.....	23
II.1. EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE OU LLE	25
II.2. EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE (SPE)	25
II.2.1. Procédure	25
II.3. OPTIMISATION PAR PLAN D'EXPERIENCES	29
II.4. METHODE D'ANALYSE	29
II.4.1. Chromatographie gazeuse.....	29
II.4.2. Chromatographie liquide	31
III. PROCEDES D'ELIMINATION DES PES DANS L'EAU	33
III.1. ADSORPTION	34
III.1.1. Adsorbants	36
III.1.2. Équilibre d'adsorption sur un solide	36
III.2. BIOREMEDIATION PAR ALGUES	38

CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES..... 40

I. DEMARCHE ANALYTIQUE POUR LA QUANTIFICATION DES PES	41
I.1. STANDARDS ANALYTIQUES ET REFERENCES.....	41
I.2. QUANTIFICATION DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS PAR GC/MS.....	42
I.2.1. Etalonnage interne	42
I.2.2. Extraction des perturbateurs endocriniens.....	43
I.2.3. Analyse par GC/MS.....	47
I.2.4. Validation de la méthode optimisée	51
II. CONCENTRATION DES PES DANS LES MILIEUX RECEPTEURS	52
I.1. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS.....	52
II.1. DESCRIPTION DES DIFFERENTS SITES D'ECHANTILLONNAGE	53
II.1.1. En France	53

II.1.2. En Tunisie	55
III. ELIMINATION DES PES.....	57
III.1. METHODE D'ANALYSE DES PES	58
III.2. ADSORPTION SUR BRIQUE.....	61
III.2.1. Adsorbant utilisé	61
III.2.2. Expérimentation.....	61
III.2.3. Cinétique d'adsorption.....	61
III.2.4. Isotherme d'adsorption.....	62
III.2.5. Etude thermodynamique	64
III.3. BIOREMEDIATION PAR ALGUE	66
III.3.1. Algue utilisée : <i>Spirulina platensis</i>	66
III.3.2. Culture de la <i>Spiruline</i>	67
III.3.3. Test de bioremédiation	68

CHAPITRE III QUANTIFICATION DES PES DANS LES MILIEUX AQUATIQUES..... 70

I. DEVELOPPEMENT DE LA METHODE ANALYTIQUE.....	71
I.1. ANALYSE PAR GC/MS.....	71
I.1.1. Optimisation de la température initiale.....	71
I.1.2. Dérivation.....	73
I.1.3. Méthodologie expérimentale.....	75
I.2. EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE OU LA SPE	76
I.2.1. Choix de l'adsorbant.....	76
I.2.2. Optimisation des conditions opératoires par plan d'expériences	77
II. PERFORMANCES DE LA METHODE ANALYTIQUE	82
III. CONCENTRATION DES PÉS DANS LES MILIEUX NATURELS	86
III.1. ETAT DE CONTAMINATION DES SITES SELECTIONNES EN FRANCE	86
III.1.1. Résidus des hormones.....	89
III.1.2. Résidus des contaminants phénoliques	93
III.2. ETAT DE CONTAMINATION DES SITES SELECTIONNES EN TUNISIE	96
III.2.1. Résidus des hormones.....	98
III.2.2. Résidus des contaminants phénoliques	101
III.3. RISQUE ENVIRONNEMENTAL.....	103

CHAPITRE IV PROCEDES D'ELIMINATION DES PES105

I. ADSORPTION SUR DES RESIDUS DE BRIQUE MODIFIEE	106
I.1. ETUDE CINETIQUE DU PROCESSUS D'ADSORPTION DES PÉS SUR LES RESIDUS DE BRIQUE	106
I.1.1. Effet de pH sur les isothermes d'adsorption.....	107
I.1.2. Effet température.....	107
I.1.3. Cinétique d'adsorption.....	110
I.1.4. Modèle de cinétique de pseudo premier ordre.....	110
I.1.1. Modèle de cinétique de pseudo second ordre	111
I.2. MODELES D'ISOTHERMES D'ADSORPTION	114
I.3. ETUDE THERMODYNAMIQUE	115
I.3.1. Energie d'activation.....	116
I.3.2. Détermination des paramètres thermodynamiques de la réaction d'adsorption.....	118

II. BIOREMEDIATION PAR LES ALGUES	122
II.1. TEST DE BIODEGRADATION.....	122
II.2. ETUDE DE FAISABILITE DE BIOREMEDIATION	123
CONCLUSION GENERALE.....	126
PERSPECTIVES	129
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	130
ANNEXE	148
ANNEXE 1 GENERALITES SUR LES PLANS D'EXPERIENCES	149
ANNEXE 2 MODES DE DETECTION MS	151
ANNEXE 3 STRUCTURE DES PRINCIPAUX MINERAUX ARGILEUX	152
ANNEXE 4 ADSORBANT UTILISE.....	155
ARTICLES.....	157
ARTICLE 1 SIMULTANEOUS DETECTION OF 13 ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS IN WATER BY A COMBINED OF SPE-BSTFA DERIVATIZATION AND GC-MS IN TRANSBOUNDARY RIVERS (FRANCE-BELGIUM).	157
ARTICLE 2 A COMBINE OF FACTORIAL DESIGN, OFF-LINE SPE AND GC-MS METHOD FOR QUANTIFYING 7 ENDOCRINE DISRUPTING COMPOUNDS IN WATER.	157

Liste des abréviations

Ac : Acétone	HPLC: Chromatographie liquide à haute performance
ACN : Acétonitrile	HQ : Hazard Quotion
AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail	LC: chromatographie liquide
AP : Alkylphénols	LLE: Extraction Liquide Liquide
BP : Bisphénols	LOD: Limite de détection
BPA : Bisphénol A	Log K _{ow} : coefficient de partage octanol/eau
BPC : Bisphénol C	LOQ: Limite de quantification
BPE : Bisphénol E	MEC : Measured Environmental Concentration
BPF : Bisphénol F	MeOH: Méthanol
BPG : Bisphénol G	MRM: Multiple Reaction Monitoring
BSTFA : N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide	MS/MS: Tandem Mass Spectrometry
Ce : Concentration à l'équilibre	MS: Mass Spectrometry
CI: Chemical Ionization	NP: 4-Nonylphenol
CV : Coefficient de Variation	OMS: Organisation mondiale de la santé
DAD : UV à barrette de diodes	P: pression
DCM : Dichlorométhane	PC : Composé phénolique
DREAL : Direction Régionale Environnement, Aménagement et Logement	PE: Perturbateur Endocrinien
DRX : diffraction rayon X	PG: Progestérone
E1: Estrone	PM: poids moléculaire
E2: 17β-estradiol	PNEC : Predicted no-effect concentration
E3: Estriol	REACH: Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques
EE2: 17α-éthynylestradiol	RQ : Quotion de risque
Ea: Energie d'activation	SIS: Selected Ion Storage
EI: Electron Ionization	SPE: Solid Phase Extraction
EP: eau potable	STEP: Station d'épuration
ESI: Electrospray Ionization	T°: Température
EtOAc : Acétate d'éthyle	TMS : Triméthylsilyle
EU : eau usée	TR: Temps de rétention
FS: Full Scan	TST: Testostérone
GC: Chromatographie en phase gazeuse	UE : Union Européenne
	UV: Ultraviolet

Liste des tableaux

tab. I-1 : Propriétés physico-chimiques des hormones, des bisphénols et de nonylphénol.	14
tab. I-2 Concentrations, PNEC (ng L^{-1}) et risque environnementale RQ des résidus de PE dans les eaux dans des différents pays.	21
tab. I-3 : Méthodes d'extraction et de détection des PE dans des matrices liquides.....	24
tab. II-1 : Référence et pureté des différents standards PE utilisés.	42
tab. II-2 Domaine expérimental	45
tab. II-3 : Conditions opératoires pour l'analyse des PE par GC-MS.....	49
tab. II-4 : Propriétés physico-chimiques des différents sites étudiés.	55
tab. II-5 : Caractéristiques des STEPs	56
tab. III-1 : Masse moléculaire (Mw), masse moléculaire de dérivé triméthylsilyle (Mw-TMS) correspondant, temps de rétention (TR) et les ions caractéristiques de chaque PE étudié.	75
tab. III-2 : Matrice d'expériences à 3 facteurs.....	78
tab. III-3 : plan d'expériences et taux de récupération.	79
tab. III-4 : Expériences répétées au centre du domaine choisi (Exp N°13)	80
tab. III-5 : Coefficients polynomiaux.....	80
tab. III-6 : Performances de la méthode analytique développée.....	85
tab. III-7 : Concentration individuelle des PE dans les quinze sites	87
tab. III-8: La comparaison des concentrations des PE détectées dans le Nord de la France-Belgique avec d'autres sites dans le monde.....	88
tab. III-9 : Concentration individuelle des PE dans les sept sites.....	97
tab. III-10 Risque Environnemental (RQ) de NP, BPA et E1.....	103
tab. IV-1 : Paramètres cinétiques des modèles pseudo-premier ordre et pseudo- second ordre.....	113
tab. IV-2 Constantes de Langmuir et de Freundlich pour l'absorption des PE sur les résidus de brique modifiée	115
tab. IV-3 : Paramètres thermodynamiques obtenus lors des études des cinétiques d'adsorption des PE sur les résidus de brique modifiée.	118
tab. IV-4 Paramètres thermodynamiques de la réaction d'adsorption.	120

Liste des figures

fig. I-1: Biosynthèse des hormones stéroïdes selon Boron et Boulpaep (2003).....	7
fig. I-2 : Sources d'émission, voies de transfert et rejets des PEs dans les milieux aquatiques	17
fig. I-3 : Protocole d'extraction Liquide-Liquide (LLE)	25
fig. I-4 : Protocole d'extraction sur phase solide.....	26
fig. I-5 : Schéma descriptif du fonctionnement de GC-MS.....	31
fig. I-6 : Principe de la HPLC/DAD.	32
fig. I-7: Exemple d'une interface d'un logiciel de traitement des données du HPLC/DAD.....	33
fig. I-8 : Etapes décrivant le phénomène d'adsorption	35
fig. I-9 : Isothermes d'adsorption en phase liquide (Sedira, 2013).....	37
fig. I-10 : Exemple des systèmes de traitement des eaux utilisant les algues.	39
fig. II-1 : PEs deutérés utilisés comme EI pour la quantification des PEs natifs.....	43
fig. II-2 : dispositif utilisé pour SPE.	44
fig. II-3 : Réaction de dérivation de l'estrone par le BSTFA.....	47
fig. II-4 : Un exemple de chromatogramme d'un mélange des standards de 13 PEs étudiés [de concentration 10 µg/mL.....	50
fig. II-5 : Carte des sites d'étude en France	54
fig. II-6 : Carte des sites d'études en Tunisie.....	57
fig. II-7 : UPLC Shimadzu model LC20A	58
fig. II-8 Chromatogramme UPLC de l'analyse des 5 PEs ciblée.	59
fig. II-9 : Courbes d'étalonnage de l'UPLC.....	60
fig. II-10 : <i>Spiruline platensis</i> (Nordst.) Geitl. CAUSM. 26.....	67
fig. II-11 Milieux d'étude de la bioremédiation par la <i>Spiruline</i>	69
fig. III-2 influence sur les intensités de pics de :.....	Error! Bookmark not defined.
fig. III-3 : rendement d'extraction des PEs	77
fig. III-4 : Courbes des isoréponses du rendement d'extraction.....	81

fig. III-5 : Chromatogramme de l'analyse des échantillons d'eau SPE /GC-MS	83
fig. III-6 : Niveaux de contamination des sites :	91
fig. III-7 : Niveaux de contamination des rivières :.....	92
fig. III-8: Niveaux de contamination des sites :	94
fig. III-9 : Contamination des rivières :	95
fig. III-10: Contamination des sites :.....	99
fig. IV-1 : Cinétique d'adsorption des PEs en fonction de pH.	108
fig. IV-2 : Cinétique d'adsorption des PEs en fonction de la température	109
fig. IV-3 Modèles cinétique de pseudo-premier ordre d'adsorption des PEs sur les résidus de brique modifiée.	111
fig. IV-4 : Modèles cinétique de pseudo-second ordre d'adsorption des PEs sur les résidus de brique modifiée.	112
fig. IV-5 : Isothermes d'adsorption de PEs sur la brique modifiée : modèles de Langmuir et de Freundlich.....	114
fig. IV-6 : Courbe de $\ln(k_2)$ en fonction de $1/T$ (K^{-1}), k_2 en $g/(mM.min)$	116
fig. IV-7 : Courbe de $\ln(k_{2/T})$ en fonction de $1/T$ (K^{-1}), k_2 en $g/(mM.min)$	117
fig. IV-8 : Courbe de $\ln(k_D)$ en fonction de $1/T$ (K^{-1}).	120
fig. IV-9 : Evolution en fonction du temps de la concentration des PEs sélectionnés en solution témoin.	123
fig. IV-10 : Evolution de la concentration des PEs sélectionnés dans les solutions contenant la Spirulina libre (Algue SP) et la Spirulina immobilisée (Algue B).	124
fig. IV-11 : la quantité dégradée des PEs par masse de la spiruline immobilisée en fonction de temps.....	125
fig. A-3-1 Diffractogramme de la fraction du sol inférieure à $2\mu m$ utilisée pour la fabrication des briques	155
fig. A-3-2 : A-Grains de brique brute et B-Grains de brique activés par HCl 6M	156
fig. A-3-3 : Représentation schématique de la structure de kaolinite	153
fig. A-3-4 : Représentation schématique de la structure de l'illite	154
fig. A-3-5 : Représentation schématique de la structure de smectite	154

Introduction

Le progrès scientifique et l'essor des nouvelles technologies ont permis des avancées considérables depuis le début du 20^{ème} siècle. Ce progrès a engendré un développement important des activités industrielles, humaines, et urbaines et par conséquent l'émergence de nombreuses substances chimiques. Ces substances sont susceptibles d'être transportées par les eaux usées industrielles, les eaux domestiques et les eaux de ruissellement urbain pour se retrouver ensuite dans le compartiment aquatique.

Les travaux de recherche ont démontré que certaines molécules peuvent induire des effets néfastes sur la reproduction et le développement de nombreuses espèces animales. En 1990, en Angleterre, des études sur la faune aquatique ont permis de constater des anomalies sur les organes reproducteurs de diverses espèces de poissons. Ces anomalies seraient dues aux rejets des stations d'épuration dans les rivières concernées. Ces études ont permis de déceler l'existence de substances chimiques capables de perturber l'équilibre hormonal et le système endocrinien des espèces vivantes. En 1995 et 1996, le concept de « **perturbateurs endocriniens (PE)** » prend forme.

Des méthodes globales ont permis de mesurer le potentiel PE d'une substance et de classer de nombreuses substances comme PE. Les alkylphénols, les hormones naturelles et de synthèse, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les phtalates, les bisphénols, et les pesticides, font partie de la liste établie. Cette liste des PEs augmente au fur et à mesure que la recherche dans ce domaine progresse.

La présence de PE dans l'environnement et le risque qu'ils représentent ont sensibilisé la communauté scientifique au réel besoin d'établir des stratégies permettant l'identification, la détection et la quantification de ces micropolluants dans l'environnement.

Le large panel de substances mises en cause rend leur suivi difficile. L'analyse chimique permet de détecter et quantifier des substances connues, mais pas à l'état de traces. Cependant, le développement des méthodes analytiques a permis de mettre en évidence la présence des PE dans les différents compartiments environnementaux ainsi que la détermination de leur niveau de contamination.

Le second problème qui se pose aux autorités scientifiques compétentes, concerne l'assainissement des eaux polluées, les techniques classiques de traitement sont nombreuses : notamment les techniques de filtration membranaire, la floculation, la flottation, l'oxydation et la co-précipitation, l'échange d'ions, (Chaturvedi and Dave, 2012; El Azher et al., 2008).

Toutes ces méthodes permettent d'obtenir une élimination partielle des perturbateurs endocriniens en tant que micropolluants. Cependant, ces techniques sont coûteuses et difficilement utilisables pour la production d'eau potable. D'autres techniques moins coûteuses tels que l'adsorption sur matériaux poreux, résidus de la brique modifiée (Allahdin, 2014), charbon actif (Messabeb, 2012), poudre d'os de sèche (Khazri et al., 2016), et la bio-sorption (Popescu, 2016) ont prouvé leur efficacité à traiter les ETM (éléments traces métalliques) et des molécules organiques dont les PPs (produits pharmaceutiques). Cependant, à ce jour, il y a peu de données disponibles dans la littérature sur l'efficacité de ces techniques dans l'élimination des PEs.

Cette étude s'est focalisée sur le développement des méthodes permettant de quantifier simultanément l'ensemble des PE sélectionnés. Après l'étape de la mise au point des méthodes analytiques, un autre volet concerne la quantification simultanée de 13 PEs dans les eaux naturelles, dans six rivières en zone frontalière franco-belge (France), dans les eaux de 3 STEPs, d'eau de puits et d'Oued en zone de grand Tunis (Tunisie). Un deuxième volet d'application a porté sur les différentes techniques d'élimination des PEs présents dans des eaux contaminées.

Concernant l'étude de faisabilité d'élimination, nos travaux ont porté sur l'adsorption des PEs sur les résidus de la brique modifiée et le bio-traitement de ces PEs avec l'emploi des algues bleu-vert (Spiruline) à la fois en culture libre et en dispersion immobilisée.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de :

- ✚ développer une méthode analytique qui permet la détection et la quantification de traces de PE dans des matrices liquides complexes,
- ✚ appliquer la méthode développée pour la détermination des niveaux de concentration de 13 PEs dans des différents milieux aquatiques,
- ✚ et tester la faisabilité d'élimination des PEs par les techniques d'adsorption sur les résidus de briques activées et par bio-remédiation par les algues (Spiruline).

Ce mémoire de thèse s'articule autour de quatre chapitres.

Le **Chapitre 1** est une synthèse bibliographique sur la problématique des perturbateurs endocriniens (PEs), leurs origines et leurs effets. Les diverses techniques disponibles pour leur mesure et leur présence dans le cycle de l'eau urbain sont répertoriées. Les procédés d'élimination des PEs font l'objet de la fin de ce chapitre ainsi que les techniques disponibles pour leurs suivis.

Dans le **Chapitre 2**, nous présentons les différentes techniques et méthodes utilisées dans ce travail. Nous décrivons les différents supports et organisme vivant qui ont été utilisés pour l'élimination des PEs. Le développement détaillé de la démarche analytique pour la détection des PE dans l'environnement ainsi que l'optimisation de la méthode de préparation et d'analyse des échantillons sont également présentés.

Le **Chapitre 3** est réservé à l'application de l'ensemble de la méthode développée sur diverses matrices d'eau. L'état de contamination de six rivières situées en zone frontalière franco-belge a été évalué. La même méthode a été appliquée sur divers échantillons d'eau : eau usée à l'entrée et à la sortie de trois STEP situées dans les zones urbaines et industrielles du grand Tunis (Tunisie).

Le **chapitre 4** est consacré à l'étude de la faisabilité de traitement des eaux contaminées par PEs à la fois par adsorption sur les résidus de brique modifiée et par bio-remédiation par des algues cultivées en laboratoire.

Ce mémoire est clos par une analyse critique des résultats obtenus et les démarches adoptées.

Chapitre I Synthèse bibliographique

- I- Perturbateurs endocriniens et environnement
- II- Méthodes analytiques de détection des PE dans l'environnement
- III- Procédés d'élimination des PE dans l'eau

De nos jours la liste des perturbateurs endocriniens est modifiée régulièrement en fonction de la production de nouvelles connaissances. La présence de ces contaminants de différentes origines, à l'état de traces et dans des différents milieux aquatiques, s'inscrit dans le cadre de la préoccupation actuelle à l'échelle nationale et mondiale sur la conservation des ressources en eau et leur qualité.

C'est sur cet axe de recherche que notre intérêt s'est porté : la détection et l'élimination des perturbateurs endocriniens présents dans les milieux aquatiques.

I. Perturbateurs endocriniens et environnement

Le système endocrinien est composé d'un ensemble de glandes (endocrines) qui sécrètent des hormones agissant à titre de messagers chimiques et qui sont libérées dans la circulation sanguine pour atteindre des récepteurs nucléaires (protéines ou glycoprotéines) localisés sur des cellules cibles. Ces hormones interviennent sur de nombreuses fonctions métaboliques telles que la reproduction, le développement, la croissance, et le comportement des espèces. Cet équilibre hormonal peut toutefois être perturbé par la présence de substances chimiques étrangères à un organisme vivant. Ces substances chimiques qui perturbent le système endocrinien sont appelées les perturbateurs endocriniens (PEs).

I.1. Définition

Depuis 1996, plusieurs définitions d'un PE ont été successivement proposées par différents groupes d'organisations gouvernementales et de sociétés savantes. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2002), un PE est « une substance ou un mélange exogène qui altère une ou des fonctions du système endocrinien et qui entraîne en conséquence des effets néfastes pour la santé d'un organisme, de sa descendance, ou d'une sous-population» (Damstra, 2002)..

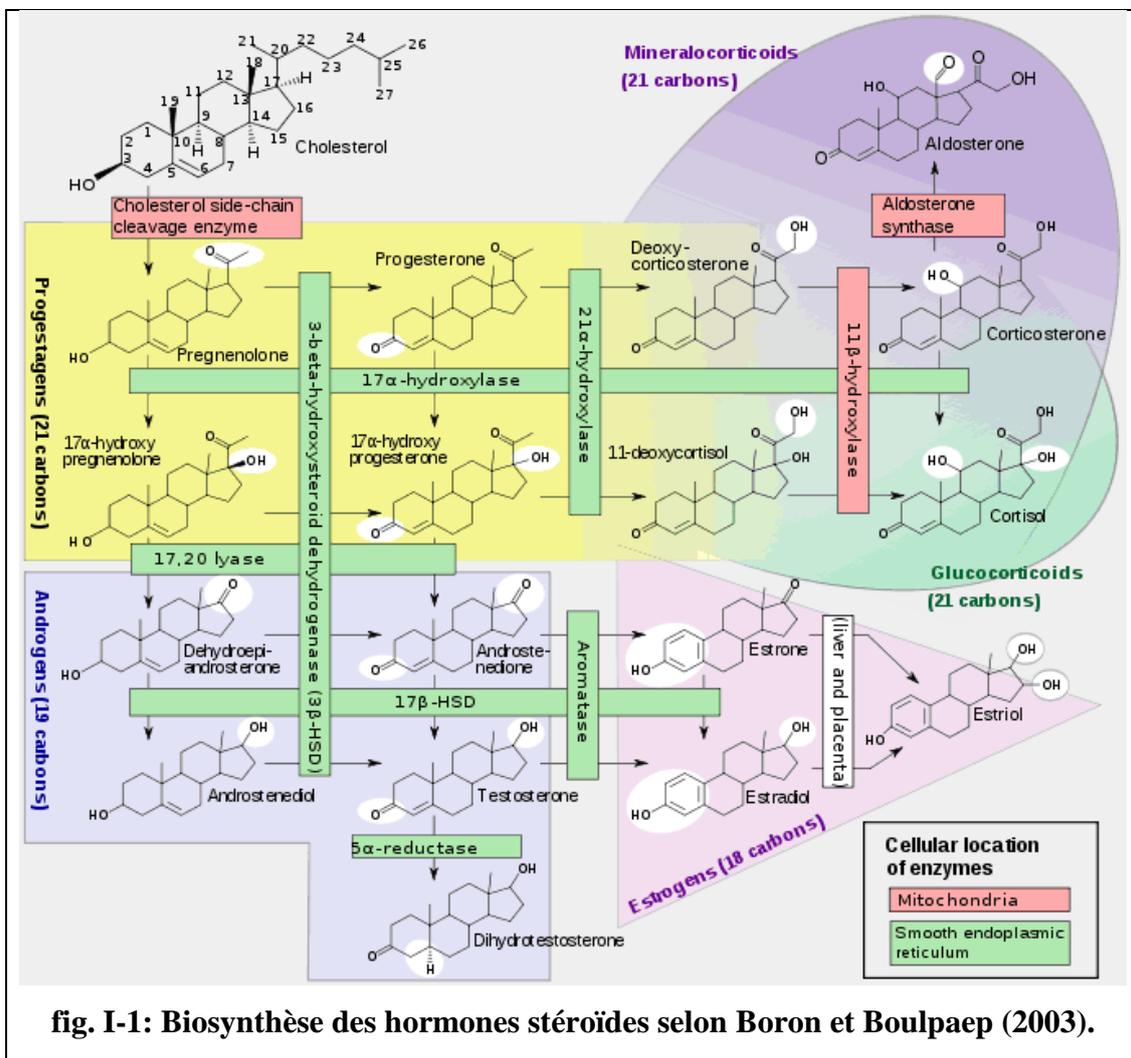
I.2. Origine des PEs

Les PEs peuvent être d'origine anthropique ou naturelle et ils sont omniprésents dans les chaînes alimentaires et dans l'environnement (Zoeller et al., 2012).

I.2.1. Origine naturelle

Les perturbateurs endocriniens d'origine naturelle comprennent les hormones androgènes, œstrogènes naturelles et les progestagènes naturellement présentes dans l'organisme humain et animal. Ces hormones sexuelles sont des stéroïdes dérivant du cholestérol, qui conduit à la biosynthèse de ces hormones dans les gonades (testicules et

ovaires) et les tissus périphériques tels que les glandes surrénales (Boron and Boulpaep, 2003)(fig. I-1).



I.2.1.1. Hormones Androgènes

La testostérone représente la principale hormone androgène circulante. Elle est généralement produite par les testicules, cependant de faibles quantités peuvent également être synthétisées par les glandes surrénales et les ovaires. La sécrétion globale de testostérone est de 5 à 7,5 mg / 24h chez l'homme adulte normal.

Les effets provoqués par les androgènes sont nombreux. La testostérone provoque le développement des conduits du système reproducteur et la descente des testicules chez le fœtus. Lors de la puberté, ces hormones favorisent la croissance des organes reproducteurs et le développement des caractères sexuels secondaires masculins. Les androgènes jouent également un rôle important dans le comportement sexuel et la spermatogénèse. Elles stimulent, par

ailleurs, la synthèse des protéines, qui augmentent la masse musculaire et osseuse (Tostain et al., 2004)

I.2.1.2. Hormones œstrogènes naturelles

Les hormones œstrogènes sont secrétées principalement par les ovaires dans les cellules de la thèque et de la granulosa du follicule ovarien. Chez la femme, trois types d'hormones naturelles sont présentes selon trois stades : l'estrone (E1), 17β -estradiol (E2), 17α -estradiol (α E2) et l'estriol (E3). E2 constitue l'hormone naturelle la plus active sécrétée par la femme. Elle est synthétisée dans l'ovaire par les cellules de la granulosa des ovaires dès les premiers mois de vie. Il diminue pendant l'enfance, et augmente à partir de la puberté. E2 est sécrété lors du cycle menstruel, avec un pic en pré-ovulatoire jusqu'à l'âge physiologique de ménopause. Il permet le maintien de la fertilité et des caractères sexuels secondaires féminins (Christin-Maitre et al., 2016). E2 est en équilibre avec E1 et E3; ce dernier s'avère la forme la moins active et peut être considéré comme un produit métabolique des autres œstrogènes. Lors de la fécondation de l'ovule, l'E3 sécrété majoritairement par les trophoblastes du placenta devient, au cours des mois, l'œstrogène le plus important. À la fin de la période de fertilité, E2 est remplacé par E1 qui devient alors le principal œstrogène produit par la transformation des androgènes d'origine surrénalienne (Wilson and Foster, 1985).

I.2.1.3. Hormones Progestagènes

La progestérone représente la principale hormone progestagène. Elle est sécrétée par les cellules du corps jaune, le placenta et, dans une moindre mesure, par le follicule ovarien. Lors de la phase folliculaire du cycle ovarien, la progestérone commence à être produite un jour ou deux avant l'ovulation par le follicule mûr. Après l'expulsion de l'ovule, le follicule se transforme en corps jaune qui sécrète une grande quantité de progestérone pour préparer l'endomètre à la nidification de l'ovule. Lorsque ce dernier n'est pas fécondé, les sécrétions de progestérone diminuent considérablement en raison de la dégénérescence du corps jaune. En plus d'assurer la régulation des cycles de la reproduction chez la femme, la progestérone maintient la grossesse et prépare les glandes mammaires pour la lactation (De Champlain, 2011).

I.2.2. Origine anthropique

Cette catégorie de substances comprend les hormones de synthèse, des produits chimiques à usage industriel, agricole, domestique et également certains produits pharmaceutiques

I.2.2.1. Hormones de synthèse

Les hormones de synthèse sont des substances ayant été sélectionnées pour leur bonne affinité avec les récepteurs aux œstrogènes et leur stabilité. Le 17α -éthinyloestradiol (EE2), dérivé d'E2, est le principal œstrogène de synthèse employé dans les contraceptifs oraux (pilules anticonceptionnelles). EE2 administré par voie orale est peu métabolisé au niveau hépatique. Il possède une très longue demi-vie plasmatique (15 à 25 jours) contrairement aux œstrogènes naturels qui sont rapidement dégradés par le foie lorsqu'ils sont ingérés. EE2 peut également être utilisé pour traiter une déficience œstrogénique (De Champlain, 2011). Plusieurs produits pharmaceutiques commerciaux disponibles contiennent de EE2.

I.2.2.2. Dérivés industriels

Les dérivés industriels des PE sont principalement les alkylphénols et les bisphénols.

I.2.2.2.1 Alkylphénols (APs)

Les alkylphénols sont des substances chimiques non-halogénées. Les principaux utilisateurs de ces produits sont les fabricants de nettoyeurs et de détergents industriels, l'industrie du textile et les fabriques de pâtes et papiers. Ces surfactants sont également utilisés dans de nombreux autres secteurs : traitement du charbon, des métaux, du cuir et des boissons; transformation des aliments; préparation de pesticides, de peintures au latex et d'enduits protecteurs; désencrage du papier à recycler; industrie du bâtiment et de la construction.

Cependant, cinq activités industrielles seraient responsables de la plus grande part des rejets d'alkylphénols dans l'environnement : la production de pâtes et papiers, le raffinage du pétrole, le nettoyage en milieu industriel, institutionnel et domestique, la production de textiles et la production du cuir (Berryman et al., 2003).

I.2.2.2.2 Bisphénols (BPs)

Le bisphénol, le plus connu et le plus utilisé est le bisphénol A (BPA). Le BPA entre dans la fabrication industrielle de matières plastiques de type polycarbonate et de résines époxy. Ils se retrouvent dans le revêtement intérieur de boîtes de conserves, les canettes de boissons et plusieurs emballages alimentaires en plastique, avec parfois un logo de recyclage entourant le chiffre 3, 7 ou polycarbonate. Il entre également dans la composition des CD, DVD, de certains produits électroniques et de l'industrie automobile, des téléphones portables, des lunettes et lentilles de contact, ainsi que les tickets de caisse à encre thermique. Les résines époxy contenant du BPA sont également utilisées dans des systèmes de stockage et de transport de l'eau et dans certains pansements dentaires (Vandenberg et al., 2012). Les dérivés halogénés

du BPA peuvent également contaminer l'air intérieur des logements en cas d'utilisation (Braun et al., 2011).

Outre le BPA, de nombreux analogues de bisphénol peuvent être obtenus par condensation d'une cétone ou d'un aldéhyde avec des phénols soit avec une variation dans le dérivé carbonylé, soit dans les substituants sur le cycle aromatique. Cependant, beaucoup sont trop coûteux pour une application industrielle. La toxicité de la plupart de ces composés n'est pas connue avec précision.

Le bisphénol-F ou BPF (bis (4-hydroxyphényl) -méthane) est de plus en plus utilisé, en raison de sa faible viscosité et sa meilleure résistance aux solvants par rapport à la résine époxy. Le bisphénol S ou BPS (4,4-dihydroxyphénylsulfone) est également utilisé comme monomère dans l'industrie du plastique (Danzl et al., 2009).

I.3. Mécanisme d'action

Les PEs peuvent être classés selon leur origine et ils peuvent être également répertoriés selon leur mécanisme d'action. Les perturbations de système endocrinien par ces substances chimiques résultent de diverses actions (Pinson et al., 2017) :

- ✚ **imitation de l'action des hormones endogènes** (effet agoniste) : la substance PE de structure similaire à celle de l'hormone peut interagir directement avec le récepteur cellulaire et l'activer, mimant l'action d'une hormone endogène et induisant des effets similaires, notamment par l'activation ou l'inhibition de transcription des gènes (exemple de PE à activité œstrogénique : nonylphénol, éthinylestrodiol) (Balaguer and Bourguet, 2017)
- ✚ **inhibition les interactions entre les hormones et leurs récepteurs** (effet antagoniste) : la substance PE se fixe sur le récepteur sans l'activer, en empêchant la liaison de l'hormone endogène à son récepteur. Il bloque le fonctionnement de récepteur qui affecte les fonctions cellulaires normales liées à l'hormone, en empêchant la fixation du complexe hormone/récepteur sur l'ADN, et donc l'activation des gènes cibles (exemple de PE à activité anti-androgénique : bisphénol A) (Beltrand et al., 2017)
- ✚ **action sur la synthèse, le transport, le métabolisme et l'excrétion des hormones** : la substance PE peut modifier le métabolisme intracellulaire des glandes sécrétrices, en perturbant la biosynthèse des hormones elles-mêmes par modification des concentrations d'hormones endogènes. En particulier, certains PE sont capables

d'affecter les enzymes de synthèse de la stéroïdogénèse, intervenant ainsi dans la synthèse des androgènes (Balaguer and Bourguet, 2017)

- ✚ **altération de développement des récepteurs hormonaux et leurs fonctions** : la substance PE peut altérer les activités hormonales en activant ou supprimant le développement d'un récepteur cellulaire. Le bisphénol A est par exemple capable d'altérer la régulation protéique du récepteur nucléaire et/ou de ses cofacteurs par la voie de dégradation du protéasome.
- ✚ **altération des fonctions par des interactions avec les hormones** : la substance PE peut interagir avec une hormone et modifier son message, et ainsi altérer les fonctions cellulaires.

I.4. Conséquences d'exposition

Pour la première fois le lien entre certains faits cliniques et la présence des PEs dans l'environnement a été réalisé à partir des observations des effets de PEs sur le monde animal (Duval and Simonot, 2010). La contamination de milieu naturel par les PEs a provoqué des effets dommageables chez l'homme et chez certaines espèces animales.

I.4.1. Effet des PEs sur la faune

Au début des années 90, Matthiessen et Sumpter (1998) ont signalé une intersexualité chez les poissons exposés aux effluents usés de l'industrie du papier et de l'industrie chimique. Aucune substance précise n'a été identifiée comme étant responsable de cette perturbation mais les hormones naturelles d'origine humaine et de synthèse comme l'estradiol, l'estrone et l'éthinylestradiol et les alkylphénols ont été fortement suspectés (Desbrow et al., 1998).

Les effets constatés sur la faune sont des malformations des organes génitaux, des anomalies du comportement sexuel, ainsi qu'une baisse de la fertilité pouvant conduire à la disparition de populations entières. Ces effets ont été confirmés expérimentalement par de nombreuses études. Par exemple, chez les souris et les rats exposés en période prénatale et néonatale au BPA, il a été constaté des malformations du pénis et de l'urètre, une augmentation de la taille de la prostate, une diminution de la production du sperme, une puberté précoce chez la femelle, une hyperactivité avec agressivité, des anomalies des noyaux gris centraux et une diminution de la dopamine (Richter et al., 2007; Vom Saal et al., 1998).

I.4.2. Effet des PEs sur l'homme

Les effets de l'exposition à de faibles doses des PEs sur la santé humaine sont sujets à controverse. Un certain nombre d'affection sont aujourd'hui suspectées d'être la conséquence

de l'exposition à ces substances : altération des fonctions de reproduction et cancers hormono-dépendants notamment. De nombreuses études épidémiologiques ont montré une augmentation des malformations génitales chez les garçons (cryptorchidie, hypospadias), des cancers testiculaires et une diminution de la fertilité masculine (Carlsen et al., 1992; Paris et al., 2002). Au Danemark, l'incidence du cancer du testicule qui touche les hommes jeunes a triplé et une tendance similaire est observée dans les autres pays industrialisés. De nombreuses observations ont permis de suspecter un lien entre produits polluants et pathologies induites tels qu'un taux plus élevé de certains PE dans le sang des mères dont les garçons sont atteints d'un cancer du testicule par rapport à la population témoin.

En 2010, d'après Duval et Simonot (2010), le Dr Béatrice Vuaille rapportait les résultats d'une étude épidémiologique américaine parue dans *Environmental Health Perspectives* (Wolff et al., 2006). Les résultats sur l'étude réalisée chez 1559 fillettes aboutie à des taux significativement élevés de phénols, phtalates et phyto-œstrogènes de nature à perturber le développement pubertaire et d'autre part à entraîner un risque de complication plus tard dans la vie notamment de cancer du sein. L'étude signale un engagement dans la puberté plus précoce, un engagement pubertaire pour un stade mammaire B2 qui correspond à la surévaluation de l'auréole mammaire. Pour ces fillettes, 25 % étaient engagées dans une puberté à 8 ans, 50 % à 9 ans. Les valeurs de référence de la puberté étaient de 10 ans 5 mois en 1970. En 1998, elles se situaient à 9 ans 7 mois.

Progressivement la recherche a commencé à ouvrir de nouvelles perspectives concernant le développement neuro-cognitif ; de nombreux travaux récents indiquent que l'exposition à certains PE pendant la période périnatale a des conséquences sur le développement neurologique et cognitif. Cela peut bien entendu être lié aux récepteurs stéroïdiens, mais d'autres cibles sont à envisager comme la fonction thyroïdienne ou l'homéostasie des neurotransmetteurs, voire d'autres mécanismes développementaux (Barouki, 2016). Un autre système s'est aussi révélé être une cible privilégiée des PE c'est le système immunitaire, avec divers impacts sur l'immunosuppression, les maladies auto-immunes, les allergies et l'inflammation (Vandenberg et al., 2012; Zoeller et al., 2012).

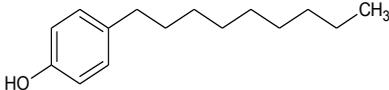
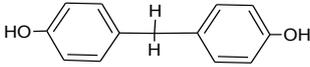
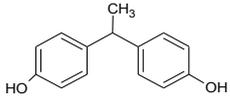
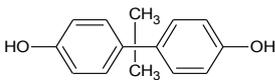
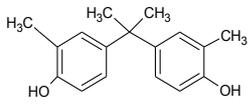
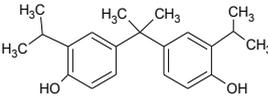
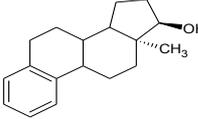
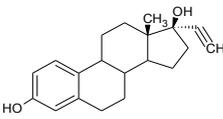
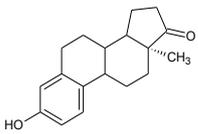
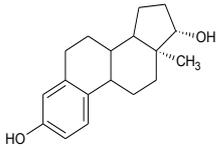
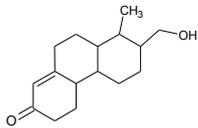
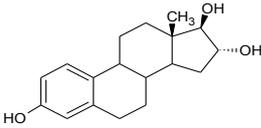
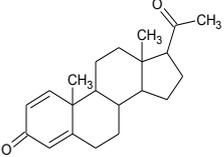
I.5. Propriétés physicochimiques des PE

Les hormones stéroïdes sexuelles possèdent une origine commune, le cholestérol, leur structure chimique ainsi que certaines de leurs propriétés physicochimiques présentent des similitudes (tab. I-1).

Les bisphénols sont issus de la catalyse acide de deux phénols avec une cétone, la présence de groupements phénols rend leur structure proche de celle des œstrogènes naturels et leur confère ainsi une activité œstrogène-mimétique par leur capacité à se lier aux récepteurs de ces hormones.

Pour le nonylphénol ou NP, l'élément de base de la molécule est un noyau phénolique sur lequel est substitué, un radical nonyl avec un groupement fonctionnel –OH de phénol (tab. I-1).

tab. I-1 : Propriétés physico-chimiques des hormones, des bisphénols et de nonylphénol.

Composés	Formule	Structure	PM (g/mol)	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pka	Log k_{ow}
4-nonylphenol NP	$C_{15}H_{24}O$		220	7	10,7	5,76
Bisphenol F BPF	$C_{13}H_{12}O_2$		200	-	9,84-10,45	3,46
Bisphenol E BPE	$C_{14}H_{14}O_2$		214	-	9,81-10,42	3,74
Bisphenol A BPA	$C_{15}H_{16}O_2$		228	5,26	9,7	3,2
Bisphenol C BPC	$C_{17}H_{20}O_2$		256	3,21	-	-
Bisphenol G BPG	$C_{21}H_{28}O_2$		312	-	-	-
17α-estradiol αE2	$C_{18}H_{24}O_2$		272	3,90	10,71	4,01
17α-éthinyloestradiol EE2	$C_{20}H_{24}O_2$		296	4,8	10,2	4,15
Estrone E1	$C_{18}H_{22}O_2$		270	0,8-12,4	10,3-10,8	3,10-3,40
17β-estradiol E2	$C_{18}H_{24}O_2$		272	3,9-13,3	10,5-10,7	3,10-4
Testosterone TST	$C_{19}H_{28}O_2$		288	23,4	17,4	3,32
Estriol E3	$C_{18}H_{24}O_3$		288	3,2-13,3	10,4	2,60-2,80
Progesterone PG	$C_{21}H_{30}O_2$		314	8,81	18,92	3,87

I.6. Règlementation

Depuis les années 30, la production mondiale de substances chimiques a été multipliée par 400 selon l'AFSSET (2013). Parmi les 100 000 substances chimiques recensées par l'UE moins de 3000 ont fait l'objet d'analyses approfondies prenant en compte les risques de toxicité et écotoxiques ainsi que leur devenir (persistance, dégradation, transfert) dans l'environnement. Depuis 1996, l'UE a mis au point une stratégie législative et d'évaluation des risques. Cette législation a permis l'évaluation de certains PEs.

Depuis 2007, 20 substances reconnues PEs sont soumises à des restrictions dont le NP. 27 substances ont fait l'objet d'études sur leurs effets perturbateurs et 48 autres sont en cours d'évaluation (UE, 2007). Parmi les substances PEs ayant été évaluées en 2005-2006, se trouvent les dérivés d'alkylphénols.

En octobre 2011, les députés français ont voté une proposition de loi interdisant le BPA dans les contenants alimentaires à compter de 2014. Dès 2013, les contenants alimentaires de produits pour les enfants de moins de trois ans devaient ne plus être autorisés. L'industrie agro-alimentaire a finalement perdu la partie après avoir favorisé pendant des années l'inertie des autorités réglementaires sur la question.

La réglementation REACH (enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances CHimiques) couvre le contrôle de la fabrication, de l'importation, de la mise sur le marché et de l'utilisation des substances chimiques (MEEDAT, 2008). REACH charge l'industrie de la responsabilité d'évaluer et de gérer les risques posés par les produits chimiques et de fournir des informations de sécurité adéquates à leurs utilisateurs. Le développement de cette réglementation devrait permettre d'identifier d'autres familles de PEs, d'en déterminer la toxicité et le risque environnemental motivant une interdiction, ou au moins une limitation de leur mise sur le marché.

Le risque environnemental des PEs dépend de deux paramètres: la dangerosité de la substance (sa toxicité) et l'exposition des milieux naturels à cette substance. Les directives européennes 93/67/EC, 793/93/EC et 1488/94/EC définissent la méthode d'évaluation de ce risque environnemental. Cette méthode consiste, pour chaque substance potentiellement dangereuse pour l'environnement, à définir:

- ✚ la concentration maximale sans effet prévisible PNEC (Prédicte No-Effect Concentration): c'est la plus forte concentration de la substance sans risque pour l'environnement. Elle définit donc la toxicité de la substance vis à vis de l'environnement. Selon le rapport d'évaluation des risques de l'Union européenne (EU, 2002) la PNEC de NP est égale à 330 ng/L.

- ✚ le rapport de risque RQ (Risk Quotient) : il définit le risque environnemental causé par un PE. C'est le rapport de la concentration environnementale mesurée MES (Measured Environmental Concentration) et la PNEC (Diao et al., 2017) ;

$$RQ = MEC / PNEC.$$

Pour :

RQ > 1 le risque est inacceptable,

0,1 < RQ < 1 le risque est moyen,

RQ < 0,1 le risque est acceptable.

- ✚ Le quotient de danger HQ (Hazard Quotient) : il représente l'estimation de risque potentiel de mélange de PEs sur un individu. C'est le Rapport de la dose estimée d'exposition d'un individu EDI (Estimated Dietary Intake) par à la dose journalière tolérable TDI (tolerable daily intake). Selon l'agence Environnementale danoise, la TDI de NP est 5µg/Kg poids corporel /jour (Diao et al., 2017) ;

$$HQ = EDI / TDI$$

Si HQ > 1, il y aurait un impact potentiel sur la santé humaine.

En France, depuis l'arrêté du 2 février 1998 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation (JO n° 52 du 3 mars 1998), les rejets industriels sont majoritairement contrôlés. Cet arrêté impose aux industriels des mesures précautionnelles afin de limiter la pollution de l'eau même accidentelle. La DREAL (Direction Régionale Environnement, Aménagement et Logement) effectue régulièrement des prélèvements afin de contrôler le respect des valeurs guides des concentrations des rejets dans le milieu.

I.7. Distribution environnementales des PEs

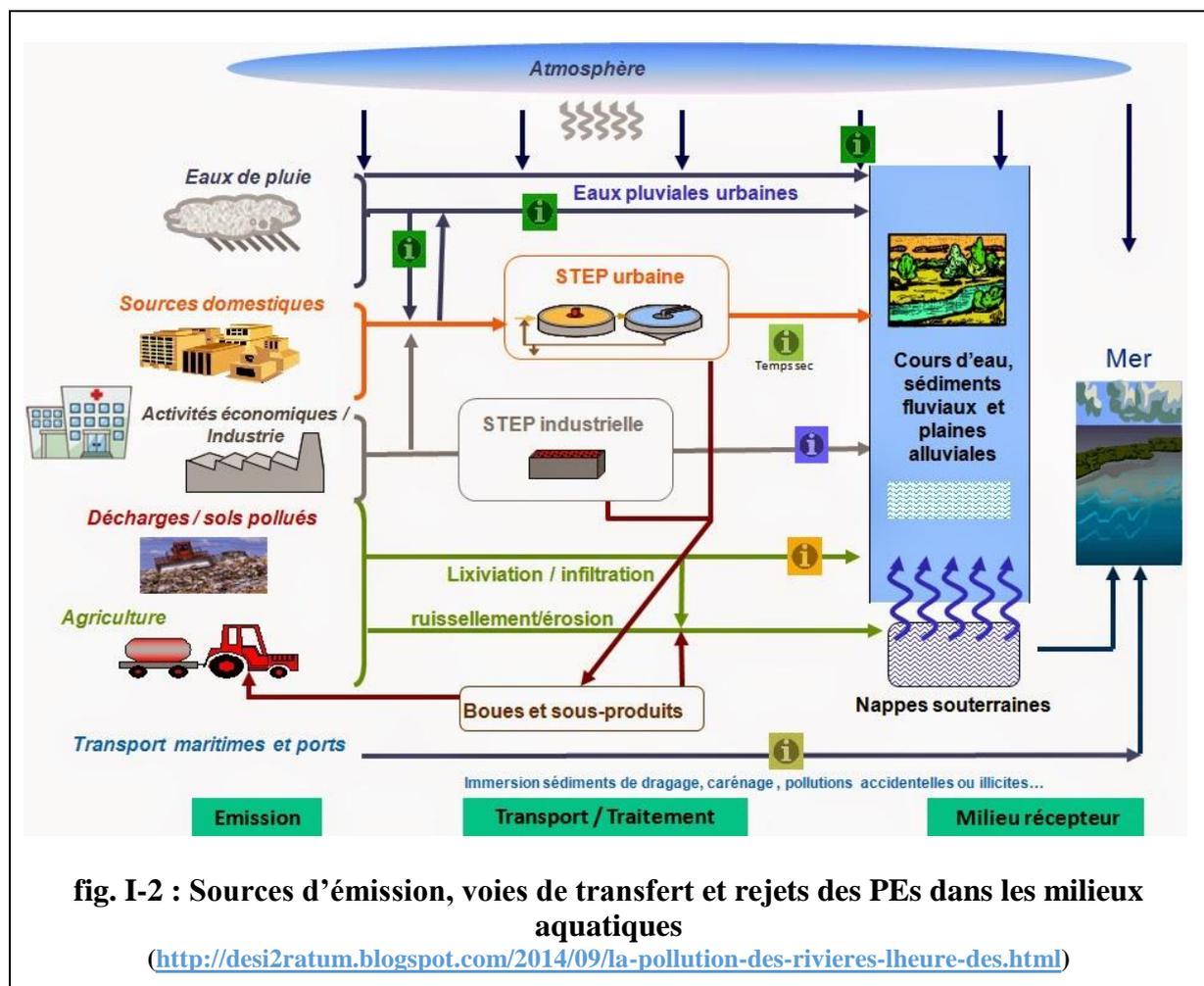
Il est important d'identifier les principales sources de contamination et les voies prédominantes d'introduction des PEs dans l'environnement. Les sources d'introduction sont nombreuses et les apports vers les systèmes aquatiques dépendent de leur origine.

I.7.1. Voie d'introduction dans le milieu naturel

Les PEs peuvent être introduits dans les systèmes aquatiques via plusieurs sources : lessivage des sols, lixiviation des rejets domestiques et industriels (fig. I-2). Certains composés telles les hormones (activités d'élevage) peuvent atteindre les systèmes aquatiques par lessivage des sols par la pluie ou encore par lixiviation (Vulliet et al., 2011). Cependant, ces sources restent minoritaires comparées aux bisphénols ou alkylphénols provenant des rejets industriels et domestiques (Schwarzenbach et al., 2010).

Certains composés ou famille de composés sont préférentiellement retrouvés dans les masses d'eau contaminées par des effluents d'origine domestiques, industrielles ou / et agricoles (Focazio et al., 2008).

Les alkylphénols, les bisphénols sont plus fréquemment détectés dans les eaux de surface. Ces résultats traduisent une empreinte industrielle en raison de la présence de plastifiants, de retardateurs de flamme, de détergents et de teintures, de fuels et de résines et une empreinte domestique avec la présence de désinfectants et de détergents.



I.7.2. Etat de la contamination du milieu aquatique par les PE.

Les PE, d'origine naturelle et synthétique, ont été détectés dans plusieurs matrices aqueuses de l'environnement. L'élimination incomplète de ces composés dans les procédés de traitement des eaux usées représente une source majeure de rejets dans le milieu aquatique. De ce fait, ces PE ont également été détectés dans les eaux de surface ainsi que dans les eaux souterraines (tab. I-2). Pour l'ensemble des PE faisant l'objet de ce travail, les concentrations recensées au cours des quinze dernières années ne sont pas négligeables.

I.7.2.1. Eaux Usées

La recherche des PEs dans les stations de d'épuration (STEPs) a été l'une des préoccupations des chercheurs dans le monde. Les valeurs des concentrations des hormones qui ont été détectées à l'entrée et à la sortie de STEP ont été extraites de nombreuses études réalisées en Amérique du Nord, dans divers pays européens, au Japon, en Corée, en Chine, au Canada et Tunisie. Les variations de concentrations sont importantes et elles sont dues à plusieurs facteurs : le taux de production et de ventes, les pratiques spécifiques, la consommation d'eau / personne / jour, la taille des STEPs, la persistance environnementale et l'efficacité d'élimination des eaux usées (Jelić et al., 2012; Petrovic et al., 2009).

Dans l'ensemble, les concentrations des PEs détectées dans les eaux usées à l'entrée des STEPs sont similaires ou, dans certains cas, légèrement supérieures à celles retrouvées dans les effluents (tab. I-2). Les concentrations à la sortie des STEPs dans ces derniers sont généralement inférieures à 150 ng L^{-1} pour l'ensemble des hormones.

Les alkyphénols ou AP, se trouvent essentiellement dans les effluents industriels. Les AP ne sont pas stables dans l'environnement et sont rapidement dégradés en nonylphénol.

Les concentrations sont élevées et atteignent des concentrations de l'ordre de $100\,000 \text{ ng L}^{-1}$ à l'entrée des STEPs.

I.7.2.2. Eaux de surface

En raison de la dilution de l'eau de rivière, les PEs peuvent être détectés à des niveaux inférieurs aux niveaux d'effluents (Gros et al., 2006). Gómez-Pérez et al. (2012) ont constaté que l'atténuation naturelle des PEs est plus susceptible de résulter de la dilution de l'eau de rivière ou de la sorption par les solides que de la dégradation. Une augmentation constante des concentrations des PEs en fonction des conditions météorologiques sèches et une réduction marquée pendant les conditions météorologiques humides ont été signalées. Wang et al. (2011) ont rapporté que le niveau des PEs détecté en été est inférieur à celui en hiver. Cela pourrait être dû aux conditions favorable de biodégradation des PEs à des températures élevées en été, et à une dilution pendant les périodes plus humides (Luo et al., 2014a). Cependant, les précipitations n'ont pas toujours réduit les niveaux de concentration des micropolluants dans le milieu aquatique. Dans certains cas, les précipitations ont été identifiées comme contribuant à l'émission des PE dans les eaux de surface. Ceci pourrait être dû aux lessivages des PEs.

Des études ont révélé que les produits, tel que le BPA, utilisés dans les matériaux de construction (matériaux de chaussée, façades et toitures) peuvent être lessivés pendant les

précipitations et s'accumuler à des niveaux remarquables dans les eaux de ruissellement du toit et ensuite se retrouver dans les eaux de surface (Jungnickel et al., 2008; Singer et al., 2010). En général, la pollution par des contaminants émergents dans les masses d'eaux naturelles des régions densément peuplées est plus sévère en raison de l'utilisation massive de ces produits. Nous pouvons citer l'exemple des concentrations élevées de NP et de BPA détectées dans l'eau de surface à Guangzhou, l'une des plus grandes villes de Chine, qui ont atteint la valeur de 6526 ng L⁻¹ (Peng et al., 2008). Le nonylphénol a également été trouvé à des concentrations relativement élevées dans une rivière grecque, avec un taux maximum de 2704 ng L⁻¹. Les concentrations maximales de nonylphénol en Chine et en Grèce sont bien supérieures à la celle détectée en France qui dépasse pas 100 ng L⁻¹ (Luo et al., 2014b).

I.7.2.3. Eaux souterraines

Par rapport aux eaux de surface, les eaux souterraines sont moins contaminées par les PEs (Loos et al., 2010; Vulliet and Cren-Olivé, 2011). Une meilleure caractérisation des PEs dans les eaux souterraines n'a été faite qu'à échelle régionale, principalement dans certaines régions d'Europe et d'Amérique du Nord. La contamination des eaux souterraines par les micropolluants résulte principalement des lixiviats de décharge non traité, de l'interaction des eaux souterraines et de l'eau de surface de l'infiltration d'eau contaminée dans les sols agricoles ou de l'infiltration des fosses septiques et des fuites dans les réseaux d'assainissement.

Les concentrations des PEs dans les lixiviats et des fosses septiques sont généralement comprises respectivement entre 10 - 104 ng L⁻¹ et 10 - 103 ng L⁻¹ (Lapworth et al., 2012). Le sol est la voie principale de contamination des eaux souterraines par les micropolluants organiques (González-Rodríguez et al., 2011).

Les PEs peuvent également être introduits dans les eaux souterraines via une filtration ou une recharge artificielle de nappe par de l'eau de STEP traitée (Stepien et al., 2013). En général, les processus qui régissent l'écoulement et le transport des PEs dans le sous-sol (comme la dilution, l'adsorption au matériau aquifère, la dégradation et le temps de déplacement) peuvent diminuer les concentrations des PE provenant des sources vers les eaux souterraines (Teijon et al., 2010).

Pour certains pays, la plupart des micropolluants ont été détectés à moins de 100 ng L⁻¹ dans les eaux souterraines (tab. I-2). NP, BPs et E3, les plus couramment détectés dans les eaux de surface et les eaux usées, ont suscité un intérêt particulier pour les chercheurs.

I.7.2.4. Eau potable

La présence de PEs dans l'eau potable, est un sujet épineux lié à leur risque qui peut être grave pour la santé public (Carmona et al., 2014). Un grand nombre de données publiées concernent l'apparition de ces micropolluants dans les effluents d'eaux usées et les eaux de surface, mais il existe très peu de données concernant leur présence dans les eaux potables. Les raisons pourraient être liées à l'absence de réglementation concernant ces composés émergents, la conviction que les procédés de traitement des STEP s sont capables de les éliminer et/ou que les limites de détection des méthodes analytiques utilisées dépassent la plage de concentration des PEs dans l'eau potable inférieures à ng L^{-1} (Vulliet et al., 2011).

À l'échelle mondiale il été constaté que la quasi-totalité des hormones n'a pas été détectée dans l'eau potable. Cependant BPA et NP ont été fréquemment détectés à des concentrations de l'ordre du ng L^{-1} (tab. I-2). En outre, le BPA et le NP se retrouvent souvent à des concentrations beaucoup plus élevées que de nombreux autres produits pharmaceutiques, produits de soins personnels et perturbateurs endocriniens dans de nombreuses eaux potables (Esteban et al., 2014; Maggioni et al., 2013; Padhye et al., 2014).

tab. I-2 Concentrations, PNEC (ng L⁻¹) et risque environnementale RQ des résidus de PEs dans les eaux dans des différents pays.

	PEs	Concentrations (ng L ⁻¹)						PNEC (ng L ⁻¹)	RQ
		STEP			Eau potable	Eaux de surface	Eaux souterraines		
		Affluent	Effluent	R%					
Tunisie	BPA	~10000 ^a	>1000 ^a	76 ^a	-	954 ^a	24-189 ^a	-	-
	E1	50 ^b -74 ^c	10 ^b -60 ^c	20 ^c -80 ^b	-	-	-	100 ^c	0,7 ^c
	E2	10,8 ^b -62 ^c	Nd ^b -25 ^c	60 ^c -86 ^b	-	-	-	10 ^c	4,6 ^c
	EE2	36,7 ^b -491 ^c	Nd ^b -230 ^c	54 ^c	-	-	-	30 ^c	181 ^c
	E3	398 ^b -993 ^c	Nd ^b -268 ^c	72 ^c	-	-	-	1520 ^c	0,2 ^c
France	NP	10106 ^g	1475 ^q -2100 ^g	80 ^g	-	-	-	330 ^q	26,3 ^q
	BPA	-	4090 ^q	-	1360 ^e	-	-	160 ^q	15,1 ^q
	E1	173,4 ^g	20 ^g -95 ^q	80 ^g	0,3 ^d	71,4 ^h	-	0,16 ^q	35 ^q
	E2	52 ^g	7 ^g -30 ^q	-	-	4,4 ^h	<50 ^p	0,008 ^q	221 ^q
	EE2	3,3 ^g	3,3 ^g -5 ^q	-	-	<4,0 ^h	-	0,04 ^q	7,4 ^q
	E3	-	275 ^q	-	-	4,83 ^f -2,9 ^h	-	7,5 ^q	2,16 ^q
	PG	-	-	-	5,2 ^d	2,4 ^d	<10 ^p	-	-
TST	-	-	-	23,9 ^d	5,9 ^d	-	-	-	

Chapitre I Synthèse bibliographique

Espagne	NP	-	209,1 ^o	100 ^o	11,7 ⁿ -58 ^m	337 ⁱ -2660 ^k	5280 ^l	60 ^k -330 ⁱ	0,6 ⁱ -130 ^k
	BPA	-	25,1 ^o	42,9 ^o	50,3 ⁿ -203 ^m	84 ⁱ -1660 ^k	1580 ^l	150 ⁱ -460 ^k	0,8 ⁱ -10 ^k
	E1	30 ^j	nd ^j -9,7 ^o	57,1 ^o	<50 ⁿ	<640 ^k	-	-	-
	E2	25 ^j	nd ^j -65,4 ^o	27,9 ^o	<37 ⁿ	<1890 ^k	-	-	-
	EE2	-	2,9 ^o	14,3 ^o	-	-	-	-	-
	E3	100 ^j	31,9 ^o	21,3 ^o	<170 ⁿ	<790 ^k	-	-	-
	PG	-	-	-	-	-	-	-	-
	TST	9,95 ^j -40 ^j	2 ^j -5 ^j	-	-	-	-	-	-
Chine	NP	94-184 ^s	11,5-42,2 ^s	62-85 ^s	1950-1174 ^u	769,96 ^r	-	100 ^r -820 ^s	7 ^r -<1 ^s
	BPA	637,6-1,684 ^s	18,7-754,2 ^s	62-85 ^s	6,7-17,5 ^v	49,38 ^r	95,7	60 ^s	<1 ^s
	E1	85,7- 182,1 ^s	10,1-29,4 ^s	75-92 ^s	0,2-4,5 ^v	-	5,9	6 ^s	5,41 ^s
	E2	24,1-45,7 ^s	1,5-10,8 ^s	75-92 ^s	0,9-27,8 ^v	21,82 ^r	1,1	2 ^{r, s}	<1 ^r - 4,9 ^s
	EE2	6,1-19,9 ^s	Nd-9,7 ^s	75-92 ^s	3,38-18,9 ^v	7,97 ^r	1,5	1 ^{r, s}	<1 ^r ->20 ^s
	E3	34,3-65,7 ^s	Nd-7,6 ^s	75-92 ^s	0,2-2,7 ^v	-	18,1	60 ^s	<1 ^s
	PG	7,2-53,4 ^s	Nd-6,4 ^s	86-100 ^s	-	-	-	-	-
	TST	18,4-69,7 ^s	Nd-2,5 ^s	86-100 ^s	-	-	-	-	-

Nd : non détecté

Ref: a : Fries et al., (2016);b : Belhaj et al., (2015); c : Belhaj et al., (2016); d: Vulliet et al., (2011); e : Lapworth et al., (2015); f: Net et al., (2015) ; g :Janex-Habibi et al., (2009); h : Labadie and Budzinski, (2005); i : Salgueiro-González et al., (2015);j : Guedes-Alonso et al., (2013);k : Garrido et al., (2016);l : Jurado et al., (2012);m : Bono-Blay et al., (2012);n : Esteban et al., (2014);o : Vega-Morales et al., (2013);p: Bouissou-Schurtz et al., (2014);q : Brus and Perrodin, (2017);r : Dan Liu et al., (2017);s :Huang et al., (2014);t : Li et al., (2015);u :Jie et al., (2017);v :Nie et al., (2014).

II. Méthodes analytiques de détection des PEs dans l'environnement

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses méthodes ont été mises au point pour déterminer les PEs dans des différentes matrices d'eau. Ces méthodes ont été répertoriées par plusieurs chercheurs (Guedes-Alonso et al., 2014; Luo et al., 2014a). Ils comprennent les étapes suivantes : l'extraction soit en phase solide (SPE) ou extraction liquide-liquide (LLE) suivie d'une chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (MS). Il existe essentiellement deux approches pour cette dernière, soit chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) ou GC/MS, soit chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) ou LC/MS. Il y a des aspects positifs pour chaque approche. La GC/MS permet une excellente séparation grâce à des longues colonnes de silice fondue. Ces colonnes possèdent littéralement des centaines de milliers de plateaux théoriques qui permettent une excellente séparation des PEs de leurs isomères ou substances interférentes.

Des détecteurs optiques ont été aussi utilisés dans l'analyse de divers composés hormonaux et phénoliques malgré leur faible sensibilité par rapport aux détecteurs spectrométriques (tab. I-3). Cependant, des méthodes optiques telles que la détection ultraviolette-visible (UV) ou de diodes (DAD) ont été également utilisées pour optimiser de nouvelles techniques d'extraction (Guedes-Alonso et al., 2014), et pour le suivi de la cinétique et du mécanisme de dégradation des PEs (Ouertani et al., 2013).

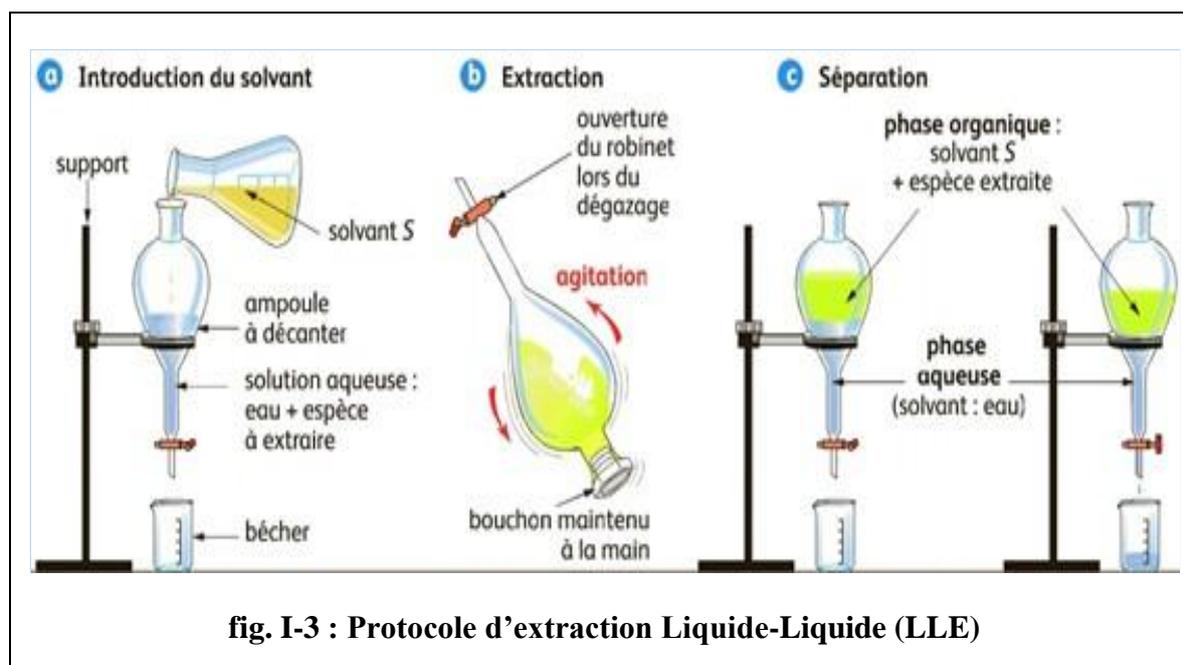
La sensibilité de ces types de détecteurs ne permet pas d'atteindre les limites de détection et de quantification adaptées au domaine de l'environnement : de l'ordre de ng L^{-1} à quelques $\mu\text{g L}^{-1}$ (tab. I-3). Depuis une vingtaine d'années, d'autres détecteurs ayant une sensibilité suffisante pour la recherche environnementale ont été développés. Les systèmes de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse constituent désormais la technique principale pour la recherche et la surveillance des micropolluants dans l'environnement.

tab. I-3 : Méthodes d'extraction et de détection des PEs dans des matrices liquides

PEs Étudiés	Procédure d'extraction SPE			Méthode de détection	LOD (ng L ⁻¹)	Rendement R%	Références
	V _{échantillon} (mL)	pH	Cartouche Solvant d'élution				
E3, E2, E1, EE2	2000	2	ENV-18 10 mL ACN	LC-UV	240-510	78-101	(Stafiej et al., 2007)
E1, E2, E3, EE2	1000	4,5	Oasis HLB 10 mL Ac	GC-MS	0,1–1,3	83–94	(Huang et al., 2011)
E1,E2, EE2,	500	3,5	C18 3 mL ACN	LC-UV	8-112	106-116	(Karnjanapiboonwong et al., 2011)
E1, E2, E3, EE2, NP, BPA	400	3	Oasis HLB 10 mL DCM/Ac (7:3, v/v)	GC-MS	0,2-30	71-119	(Nie et al., 2012)
E1, BPA, NP	200	2	Oasis HLB 3 mL MeOH	GC-MS	0,5-5	65-90	(Yu and Wu, 2015)
E1, E3, EE2, TST	250	8	C18 2 mL MeOH	LC-MS	0,53-9,53	50-90	(Guedes-Alonso et al., 2013)
E1, E2, EE2, E3, BPA, NP	500	7-8	HLB oasis 2*5 mL MeOH	LC-MS	0,05-125	65-104	(Gorga et al., 2013)
E1,E2, EE	1000	3	ENVI-18 2*5 EtOAc 2*5 MeOH	GC-MS	0,8–2.2	43–82	(Xu et al., 2014)
TST , PG	1L	4	HLB oasis 3*5 ethyl acetate	GC-MS	0,6–0.8	89–101	(Jin et al., 2013)

II.1. Extraction liquide-liquide ou LLE

L'extraction liquide-liquide (LLE) a été utilisée pour extraire des antibiotiques et des stéroïdes hormonaux de matrices aqueuses (Balakrishnan et al., 2006; Chen et al., 2006; Sun et al., 2009). Son principe est basé sur le transfert des analytes entre deux phases liquides. Le protocole d'extraction LLE comporte trois étapes (fig. I-3). C'est une technique d'extraction efficace mais dont l'inconvénient est l'utilisation d'une grande quantité de solvant organique.



II.2. Extraction sur phase solide (SPE)

L'extraction sur phase solide ou SPE est introduite en chimie analytique pour la première fois dans les années 1970. C'est la technique d'extraction la plus répandue actuellement dans la quantification des micropolluants présents à l'état de traces dans des échantillons liquides (Grzeškowiak et al., 2016). Elle constitue un outil performant et essentiel pour le développement de méthodes d'analyse de micropolluants organiques présents, dans des matrices aqueuses, à de très faibles concentrations. Depuis son introduction dans les protocoles de prétraitement de l'échantillon, la SPE a subi beaucoup de modification et d'adaptation en fonction de la nature des analytes à extraire et en fonction des objectifs à atteindre. Le principe et les paramètres de fonctionnement de SPE seront alors exposés et discutés.

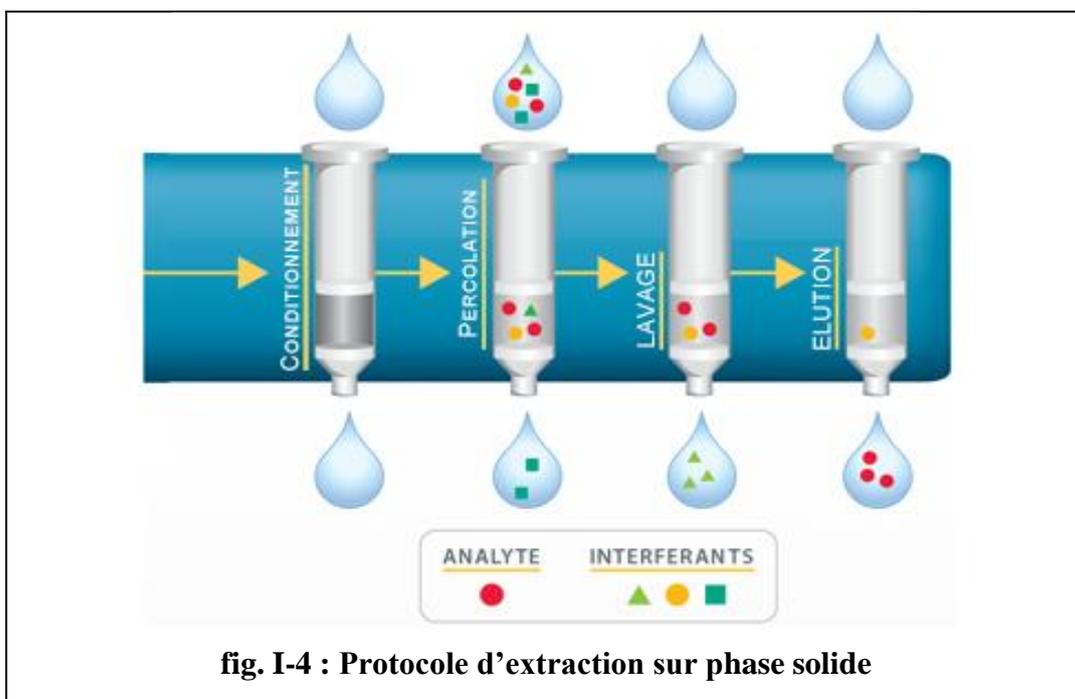
II.2.1. Procédure

Le principe de la SPE repose sur la distribution des composés à extraire entre une phase liquide « l'échantillon » et une phase solide « l'adsorbant ». Cette distribution est gérée par des mécanismes de rétention basés sur les différences d'interactions moléculaires entre

l'analyte, le site actif de l'adsorbant et la phase liquide. Ces deux phases sont placées dans une cartouche appelée cartouche SPE.

En général, le protocole d'extraction sur une cartouche SPE comporte au moins quatre étapes (fig. I-4). La première étape est le conditionnement préalable de support avant le passage de l'échantillon. Elle a pour objectif de mouiller et d'activer les groupements fonctionnels présents à la surface de l'adsorbant. La seconde étape consiste à percoler l'échantillon contenant les solutés à extraire à travers la cartouche SPE en appliquant un vide à la sortie de la cartouche. Durant cette étape, si l'adsorbant greffé est bien sélectionné, les molécules cibles présentant une forte affinité pour le support solide y sont fixées, tandis que les interférents n'ayant aucune affinité pour la phase solide traverseront la colonne avec l'éluant et ne sont pas retenus.

Suivant la nature de l'échantillon, après sa percolation à travers la cartouche, une étape supplémentaire de lavage peut être effectuée en utilisant un solvant de faible force éluante de manière à éliminer les interférents faiblement retenus par le support tout en gardant fixés les composés d'intérêt. L'étape suivante est celle du séchage de l'adsorbant, soit sous vide soit par passage d'un flux de gaz convenable. Enfin, la dernière étape de la SPE est l'éluion des composés cibles par percolation d'un ou de mélange de solvants spécifiquement choisis capable de rompre les interactions mises en jeu entre les composés cibles analytes et le support solide. Les analytes extraits de la cartouche SPE sont souvent concentrés soit en réduisant ou en évaporant à sec le solvant de la phase d'éluion avant d'être analysée.



II.2.1.1. Choix de l'adsorbant

La mise en place d'un protocole SPE débute par le choix de l'adsorbant. Les propriétés physico-chimiques des composés à analyser ainsi que la quantité et la nature de l'échantillon permettent de choisir la nature et la quantité de l'adsorbant.

Plusieurs types d'adsorbants ont été utilisés pour l'extraction des polluants organiques de l'eau, mais la silice greffée octadecyle C18 reste l'adsorbant le plus couramment employé utilisé pour les échantillons aqueux, car l'eau présente une très faible force éluante sur ce type de support. La chaîne C18 présente de bonnes propriétés de rétention, par interactions hydrophobes, des composés apolaires et moyennement polaires.

En revanche, des adsorbants plus polaires sont nécessaires pour extraire les composés polaires qui contiennent de groupes fonctionnels renfermant des hétéroatomes tels que les hydroxyles, les carbonyles et les amines, comme certains pesticides et leurs produits de dégradation.

Pour cette raison, des polymères fonctionnalisés par des groupements polaires ont été synthétisés de manière à améliorer le contact des analytes polaires avec l'échantillon aqueux pendant la percolation, comme la phase Oasis HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance, ou équilibre hydrophile/lipophile) basée sur une copolymérisation de divinylbenzène avec le monomère polaire de N-vinylpyrrolidone. L'adsorbant HLB, appartenant à la nouvelle génération de polymères, est conçu pour simplifier et améliorer la préparation d'échantillons par extraction d'une large gamme de composés hydrophiles et hydrophobes en utilisant la même cartouche SPE.

La cartouche ENVI+ qui est composée de polystyrène et de divinylbenzène modifiées à la surface, est aussi utilisée pour l'extraction de ce type de micropolluants dans l'eau.

II.2.1.2. Volume de l'échantillon

Pour la recherche de micropolluants organiques tels que des PE ou des pesticides dans les eaux, le volume d'échantillon percolé peut varier de quelques millilitres jusqu'à quelques litres selon la nature de l'échantillon, les composés à analyser et selon le facteur d'enrichissement nécessaire pour atteindre une concentration suffisamment détectable par le système analytique. Si l'adsorbant a une bonne capacité de rétention, la quantité d'analytes fixés augmentera proportionnellement avec le volume d'échantillon percolé, améliorant ainsi le facteur d'enrichissement. Cependant, à partir d'un certain volume appelé volume de fin de fixation, les solutés commencent à être élués par le solvant qui constitue l'échantillon ou l'eau (Latrous El Atrache et al., 2013). Lors de la mise en place d'un protocole d'extraction, la

détermination de ce volume est donc indispensable, afin d'établir le volume de l'échantillon à percoler pour obtenir un facteur d'enrichissement satisfaisant avec de bons rendements d'extraction. Le volume de fin de fixation peut être déterminé expérimentalement en percolant un volume d'échantillon croissant, tout en maintenant la quantité de composé constante. Le volume de fin de fixation pour un analyte est déterminé quand la réponse des analytes commence à décroître et par conséquent le rendement de récupération.

II.2.1.3. pH de l'échantillon

Les PEs ont un état de charge variable en fonction des conditions de pH du milieu dans lequel elles se trouvent, or pour leur rétention sur cartouche, l'idéal pour avoir de la rétention serait de faire du recul d'ionisation. L'ionisation étant un phénomène dépendant du pH, il est important de tester l'influence de ce facteur sur la rétention des PEs. Vu la composition du mélange d'analytes à séparer, qui contient des amines primaires et secondaires, des acides aminés et des acides, il n'est pas évident de trouver des conditions de pH pour lesquelles tous les solutés sont retenus avec le même rendement. Il est donc nécessaire d'optimiser ce facteur afin d'avoir le maximum de rendement d'extraction pour l'ensemble des PEs existants dans l'échantillon.

II.2.1.4. Nature et volume de la phase d'élution

Le choix de la phase d'élution dépend, en premier lieu, de la nature du ou des analytes à extraire, du type d'adsorbant et enfin de la méthode d'analyse (chromatographie en phase liquide ou gazeuse). Une réflexion préalable doit être menée afin de définir la nature des interactions impliquées dans le mécanisme de rétention des analytes d'intérêt sur l'adsorbant. Le solvant ou le mélange des solvants adéquats doivent rompre ces interactions et aboutir à une récupération totale des analytes. Pour les composés peu volatils comme les PEs, les rendements de récupération sont plus élevée en utilisant des solvants non volatils, sachant qu'un solvant non polaire est nécessaire afin d'éluer les PEs. Afin d'assurer l'élution complète d'un ensemble de PEs ayant des propriétés physico-chimiques différentes retenus sur une même cartouche SPE, diverses recherches ont montré que des mélanges de solvants sont parfois recommandés.

Les méthodes de détermination des PEs dans des matrices aqueuses ont été développées récemment (tab. I-3).

La technique SPE est une méthode bien adaptée à l'analyse des polluants organiques dans l'eau. Mais lors de son application dans l'analyse multi résidus, elle nécessite une optimisation des différentes étapes et des divers paramètres influençant son efficacité.

II.3. Optimisation par plan d'expériences

Pour une optimisation rigoureuse et précise, et à cause du nombre élevé de facteurs potentiels à étudier, l'utilisation de la méthode des plans d'expériences est recommandée.

L'efficacité de la SPE dépend de plusieurs conditions opératoires telles que la nature et le volume du solvant d'élution, le volume et le pH de l'échantillon, la nature et la masse de l'adsorbant, le débit de percolation de l'échantillon et bien d'autres. Devant le nombre élevé des facteurs potentiels à étudier, l'analyste est amené le plus souvent à déterminer grâce à son expérience les paramètres qu'il faut étudier, puis il fait varier pas à pas et de manière indépendante les différents facteurs et fixe ainsi les conditions optimales opératoires. Cette technique ne permet pas de prendre en compte les interactions entre les facteurs, ce qui constitue une source importante d'imprécision. L'utilisation d'un plan d'expériences permet d'adopter une stratégie plus économique et plus directe. Le nombre des essais à effectuer est déterminé de manière rationnelle ce qui évite les redondances d'informations et facilite la gestion du temps et la maîtrise des coûts. En outre la mise en œuvre d'une procédure d'optimisation permet l'étude des interactions entre les différents facteurs, il peut arriver qu'un facteur qui n'a apparemment aucun effet sur le phénomène étudié, influence en fait ce phénomène indirectement à travers une interaction. Dans ce cas, la méthode des plans d'expériences est la seule qui permette véritablement une optimisation globale des conditions analytiques.

II.4. Méthode d'analyse

Pour identifier et quantifier un composé PE dans une matrice aqueuse, la chromatographie gazeuse (GC) ou encore liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) sont très souvent employées (Ballesteros-Gómez et al., 2009; Céspedes et al., 2008; Facco et al., 2015; Guedes-Alonso et al., 2013)

II.4.1. Chromatographie gazeuse

Le principe de la chromatographie en phase gazeuse est la séparation des constituants d'un mélange mis sous forme vapeur, et entraîné dans une colonne qui sépare les différents composés en fonction de leur affinité avec sa surface.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) est une technique d'analyse fréquemment utilisée pour la détection et la quantification des micropolluants organiques comme les PEs. Il s'agit d'un couplage entre une méthode de séparation (GC) et une méthode de d'identification et de quantification (dosage) des molécules ainsi séparées selon la masse de la molécule (MS) (fig. I-5).

Dans un premier temps, l'échantillon d'intérêt passe par une phase d'extraction éventuelle, ensuite l'échantillon est dérivé, et injecté dans le chromatographe en phase gazeuse. A ce niveau-là, les molécules gazeuses, transportées par un gaz vecteur (hélium, argon, hydrogène ou azote), sont séparées du fait de leurs différentes propriétés chimiques. La colonne capillaire du chromatographe est tapissée d'un film (phase stationnaire) qui peut retenir plus ou moins les composés qui y passent selon leurs affinités. A la sortie de la colonne, les composés sont analysés l'un après l'autre grâce au temps de rétention (temps de sortie de la colonne) qui leur est propre. Le chromatogramme obtenu traduit l'intensité de signal des composés séparés en fonction de leur temps de rétention.

Dans un deuxième temps, les composés séparés arrivent dans le spectromètre de masse pour détection. Le principe d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée. L'analyse par MS nécessite la formation d'ions à partir de l'échantillon à l'état gazeux. Le principe de l'appareillage reste globalement le même bien que les techniques mises en œuvre en spectrométrie de masse soient nombreuses.

Un spectromètre de masse est composé de trois parties principales :

✚ **La source d'ions** : son rôle est de produire des ions à l'état gazeux, soit par l'ionisation directe de l'échantillon, soit par la désolvatation des ions formés. Il existe plusieurs techniques d'ionisation : la thermo-ionisation (l'impact électronique et l'ionisation chimique) et la nébulisation à pression atmosphérique (ESI = Electrospray Ionisation).

✚ **L'analyseur** : réalise le tri des ions en fonction de leurs rapports masse/charge (m/z). Selon leur principe de fonctionnement, les analyseurs peuvent être divisés en plusieurs catégories : les analyseurs à déflexion magnétique, les analyseurs à résonance cyclotronique ionique, les filtres quadripolaires, les pièges à ions et les analyseurs à temps de vol.

✚ **Le détecteur** : recueille tous les ions séparés par l'analyseur et produit un courant électrique proportionnel au nombre d'ions. Il est constitué d'un collecteur et d'un ensemble électronique d'amplification et de mesure du signal.

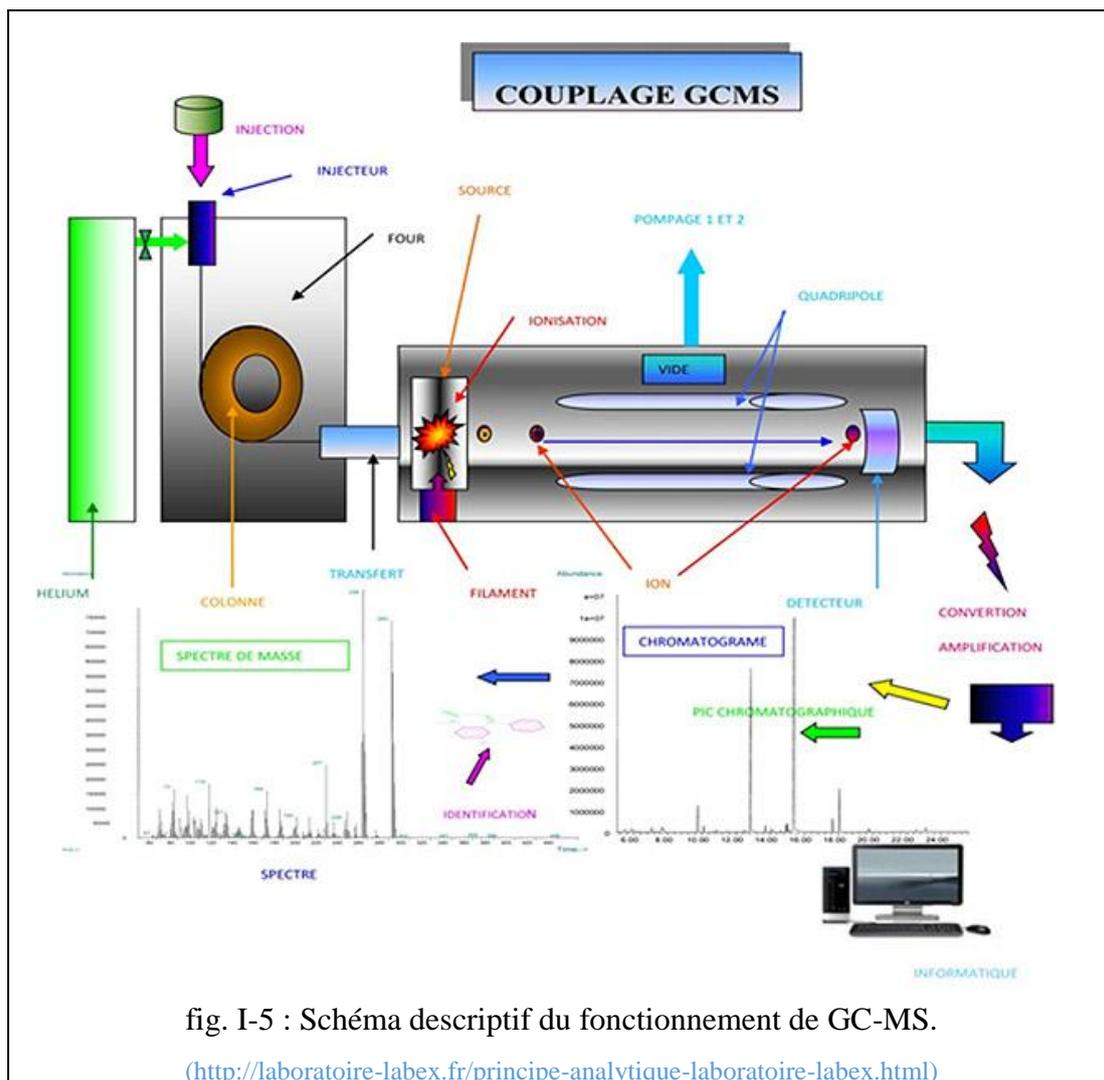


fig. I-5 : Schéma descriptif du fonctionnement de GC-MS.

(<http://laboratoire-labex.fr/principe-analytique-laboratoire-labex.html>)

II.4.2. Chromatographie liquide

A la fin des années 80, la chromatographie liquide (LC) est devenue un outil puissant et indispensable en biochimie. Elle est utilisée pour la purification, la séparation et l'analyse quantitative des composés chimiques. Le besoin en analyse rapide a conduit à l'apparition de nouveaux supports de type monolithe, qui grâce à leur structure macroporeuse permettent de travailler à de hauts débits tout en gardant des pressions dans des limites acceptables pour les systèmes classiques de LC. En parallèle des travaux ont été menés sur la fabrication de supports de silice de très faible granulométrie (diamètre de particules, 1,7 μm) et des pompes capables de travailler à de très haute pression (UPLC – Ultra High Pressure Liquid Chromatography).

Pour couvrir un nombre important d'applications, plusieurs modes d'interactions LC ont été développés en fonctions des caractéristiques des molécules à analyser. La chromatographie à polarité de phases inversée est destinée à la séparation des molécules

apolaires, tandis que les ions et les molécules ionisables sont séparés par chromatographie d'échange d'ions ou d'appariement d'ions.

Pour choisir le mode chromatographique le mieux adapté à une séparation donnée, en premier lieu la considération se base sur les caractéristiques des analytes comme la masse molaire, la polarité et le caractère ionique. La chromatographie à polarité de phases inversée a été envisagée pour l'analyse des PEs, les molécules de faibles masses molaires, polaires et solubles dans l'eau,

Pour pouvoir analyser les solutés il faut au départ pouvoir les détecter à la sortie de la colonne chromatographique. Le choix du mode de détection est basé principalement sur les propriétés caractéristiques des analytes. La présence d'un noyau aromatique (groupement chromophore) justifie l'utilisation d'une détection par UV.

La spectrophotométrie UV-Visible (UV-Vis) permet la détection des molécules qui absorbent dans le domaine de l'UV ou du visible. La chromatographie liquide couplée au détecteur UV à barrette de diodes (DAD : Diode Array Detector) présente l'avantage d'être à la fois un détecteur UV traditionnel (pouvant enregistrer 4 longueurs d'ondes en continu) et un détecteur à barrette de diodes qui balaye toutes les longueurs d'ondes en permanence, et permettent d'obtenir les spectres d'absorption des pics et de retraiter un chromatogramme à la longueur d'onde UV souhaitée. Le principe de la HPLC/DAD est présenté sur la fig. I-6.

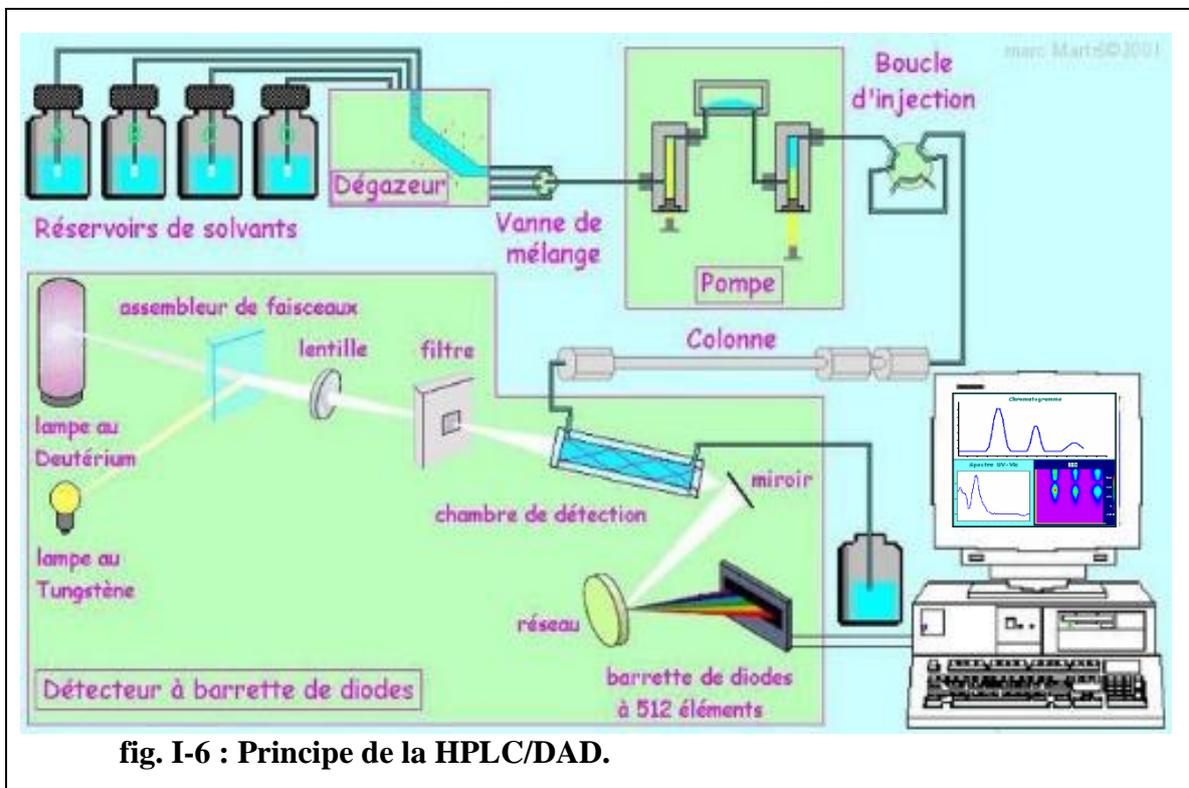
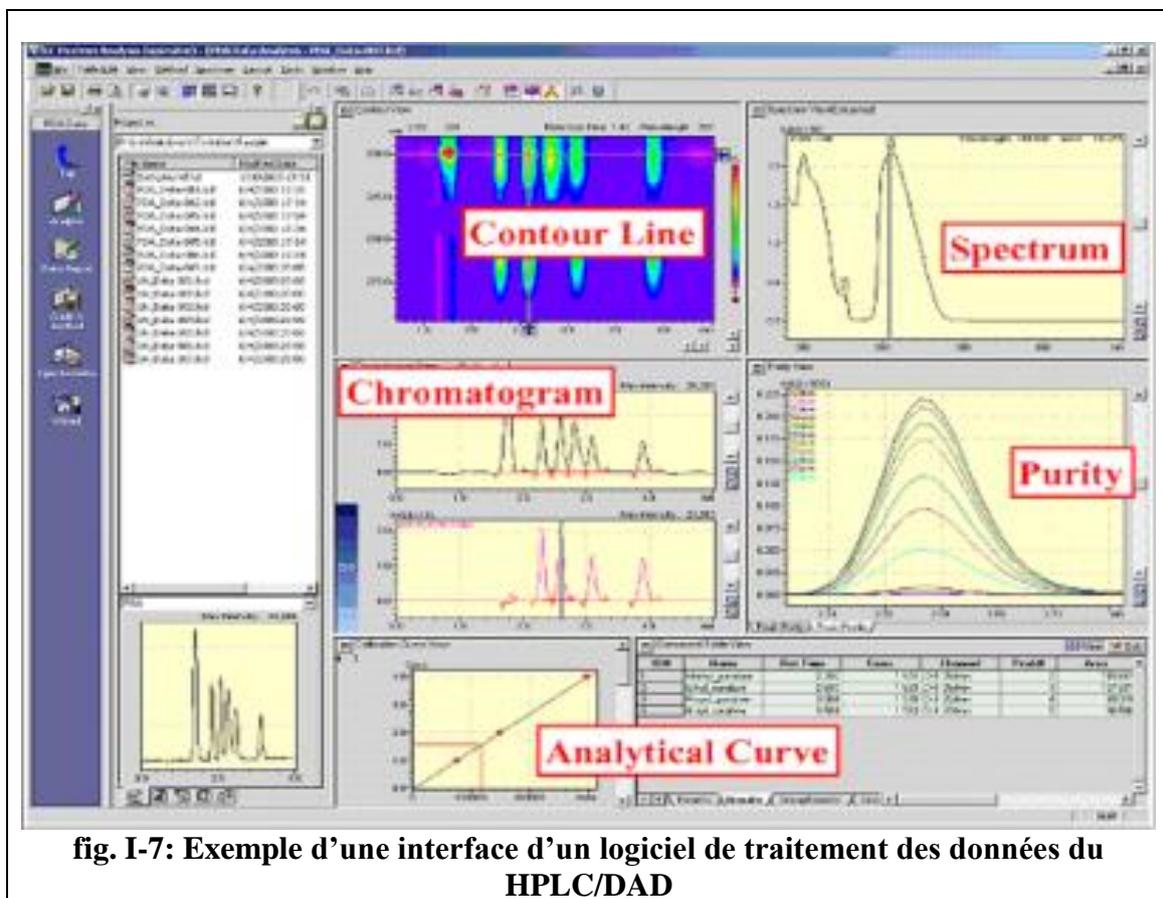


fig. I-6 : Principe de la HPLC/DAD.

L'utilisation du principe de la diode photoélectrique en tant que récepteur dans un spectrophotomètre est réservée au montage de type multicanal, sous forme de barrette de diodes. Une barrette de diodes de quelques mm contient plusieurs centaines de diodes, chacune reçoit le rayonnement contenu dans un petit domaine spectral. Chacun des circuits élémentaires est exploré par un système pilote : par un micro-ordinateur. Ce système permet l'acquisition du spectre de l'échantillon en temps réel, une représentation en 3 dimensions (temps, absorbance, longueur d'onde) et une caractérisation des composés par leur spectre.

Un exemple d'une interface d'un logiciel de traitement des données du HPLC/DAD est présenté sur la fig. I-7.



III. Procédés d'élimination des PE dans l'eau

Les rejets des STEPs sont les principales sources de contamination des eaux de surface par les micropolluants émergents. En effet, les procédés conventionnels les plus utilisés dans les STEPs ne permettent pas d'éliminer efficacement les micropolluants dans les effluents. Ils contaminent ainsi le milieu récepteur (Grassi et al., 2013; Zuccato and Castiglioni, 2009). Pour ces raisons, les STEPs devraient être modernisés par des technologies de traitement avancées

pour améliorer l'efficacité d'élimination des contaminants émergents avant le rejet ou la réutilisation des effluents (Fatta-Kassinos et al., 2011).

Des technologies telles que l'ozonation (Lei and Snyder, 2007; Nakada et al., 2007), l'oxydation avancée (Klamerth et al., 2010; Radjenović et al., 2009), la filtration membranaire (Kimura et al., 2003; Snyder et al., 2007), l'adsorption (Ji et al., 2009; Snyder et al., 2007) et la bioremédiation (Randhawa and Kullar, 2011) peuvent améliorer l'élimination des micropolluants organiques tels que les produits pharmaceutiques et les perturbateurs endocriniens dans les STEPs. Les procédés d'oxydation avancée pourraient être efficaces pour éliminer les micropolluants. Cependant, ces processus peuvent conduire à la formation des molécules intermédiaires d'oxydation et pour la plupart inconnus et parfois plus toxique que les polluants initialement présents (Rizzo, 2011). Une autre technique est la technologie membranaire, elle peut être très efficace pour éliminer les PEs (Snyder et al., 2007), mais le coût d'exploitation, élevé, limite ainsi leur utilisation à l'échelle des STEPs.

III.1. Adsorption

Contrairement à des techniques précédemment cités, les processus d'adsorption présentent un avantage important car ils ne conduisent pas à la formation de sous-produits toxiques, de plus, il ont été jugé efficace pour éliminer certains contaminants émergents (Randhawa and Kullar, 2011; Yu et al., 2008).

L'adsorption est un phénomène d'interface pouvant se manifester entre un solide et un gaz, ou entre un solide et un liquide. Aux interfaces, les attractions intermoléculaires ne sont pas compensées dans toutes les directions, et il subsiste des forces résiduelles dirigées vers l'extérieur. Ces forces représentent une énergie superficielle par unité de surface, comparable à la tension superficielle des liquides. Ces forces sont neutralisées lorsque des particules mobiles (un gaz ou un soluté) se fixent en surface par adsorption.

L'étude des équilibres d'adsorption permet de connaître le degré maximal de séparation susceptible d'être obtenu dans des conditions thermodynamiques données. La vitesse avec laquelle est atteint l'état d'équilibre relève de l'étude cinétique d'adsorption, celle-ci dépend de la vitesse avec laquelle les constituants du mélange à séparer diffusent dans l'adsorbant et dans le fluide.

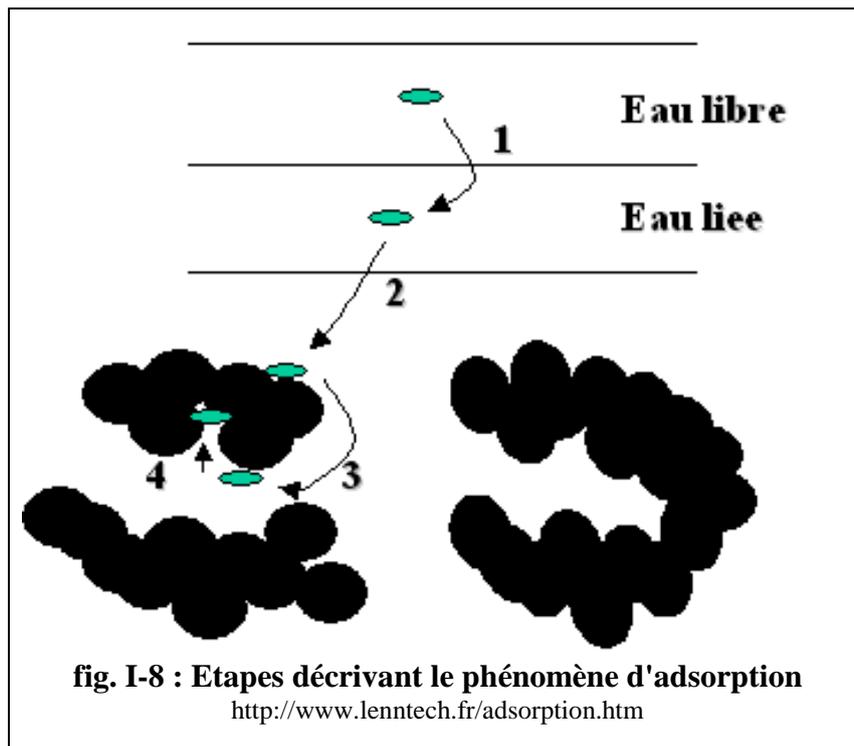
L'adsorption peut être décomposée en quatre étapes (fig. I-8):

Etape 1 : Transfert de la particule.

Etape 2 : Déplacement de l'eau liée jusqu'à être en contact du solide.

Etape 3 : Diffusion à l'intérieur du solide sous l'influence du gradient de concentration.

Etape 4 : Adsorption dans un micropore



Une distinction entre deux catégories de forces attractives doit cependant être faite, ce qui permet de définir deux types d'adsorption :

✚ L'adsorption physique : physisorption

La physisorption est un phénomène réversible qui résulte de l'attraction entre les molécules d'adsorbant composant la surface du solide et les molécules du soluté de la phase fluide. Ces forces attractives sont de nature physique, comprenant les forces dites de Van der Waals ne détruisant pas l'individualité des molécules et lorsqu'elles opèrent, correspondent à des énergies faibles qui sont de l'ordre de quelques kilocalories par mole. Ce phénomène consiste essentiellement à la fixation des molécules sur la surface du solide.

✚ L'adsorption chimique : chimisorption

La chimisorption est une véritable réaction chimique, au cours de laquelle le substrat est lié à la surface adsorbante par une liaison covalente ou ionique. Cette réaction ne pourra cependant se faire que si toutes les conditions sont favorables. Certains auteurs disent qu'une physisorption peut avoir lieu en même temps avec une chimisorption si les conditions sont réunies. Lorsque la température augmente, la chimisorption peut avoir lieu sur certains sites privilégiés de la surface appelé les sites de la chimisorption. Les solides poreux ou finement divisés, tels que les catalyseurs hétérogènes, ont une grande capacité d'adsorption en raison de l'importance de leur surface disponible.

III.1.1. Adsorbants

Dans la littérature, il existe de nombreux adsorbants tels que : l'Aluminate de calcium ; la craie pulvérulente ; les cendres volantes ; les oxydes métalliques (ilménite, rutil, bauxite, oxyde de zirconium, oxyhydroxydes de fer, dioxyde de manganèse) ; les Silicates argileux (kaolinite, bentonite, zéolite, attapulgite) ; les résines macroporeuses ; le charbon actif et bien d'autres.

Le choix d'utilisation des oxyhydroxydes de fer, fixés sur une argile cuite (brique) et pillée, comme adsorbants est justifié par le fait que ces derniers ont souvent une forte capacité d'immobiliser des contaminants en solution aqueuse. Les mécanismes d'adsorption sur les oxyhydroxydes de fer dépendent du pH du milieu, de la concentration initiale de l'élément à éliminer, et de la présence d'interférents (Allahdin, 2014).

III.1.2. Équilibre d'adsorption sur un solide

La cinétique, les isothermes et les grandeurs thermodynamiques de l'adsorption, sont nécessaires pour mieux comprendre le processus d'adsorption des composés sur un support solide.

III.1.2.1. Cinétique d'adsorption

Les mécanismes d'adsorption peuvent être décomposés en plusieurs étapes faisant appel à des processus diffusionnels, en particulier 4 phases peuvent être distinguées :

- ✚ Transfert de matière de la solution vers la couche limite entourant la particule;
- ✚ Transfert de la couche limite vers la surface adsorbante (diffusion externe);
- ✚ Transfert de la surface vers les sites adsorbants (diffusion intraparticulaire dans le solide et dans les micropores et les macropores);
- ✚ Fixation, complexation ou précipitation des solutés.

Les études cinétiques des mécanismes ont permis d'apporter des informations importantes sur : (i) l'étendue de la réaction selon les caractéristiques physico-chimiques de l'analyte étudié ; (ii) le temps de séjour minimal de soluté en contact avec l'adsorbant et (iii) les phénomènes de complexation.

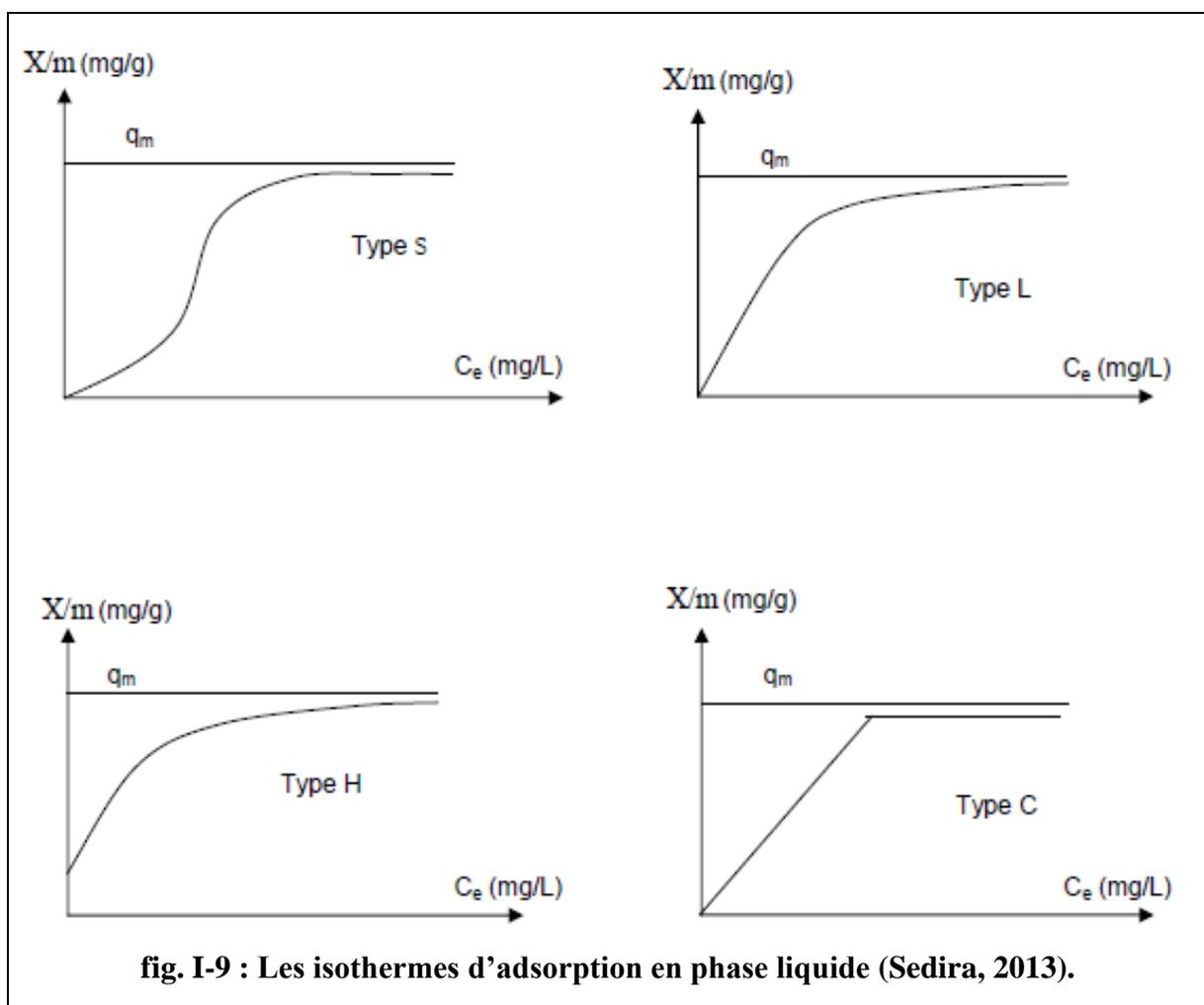
III.1.2.2. Isothermes d'adsorption

Un processus d'adsorption peut être décrit à l'aide d'une isotherme d'adsorption. Une telle isotherme est une courbe qui représente la relation entre la quantité de soluté adsorbé par unité de masse d'adsorbant Q_e et la concentration de soluté en solution C_e .

Une telle courbe est obtenue à partir d'essais effectués à une température constante. Pour ce faire, des quantités connues d'adsorbant sont introduites dans des volumes d'eau à traiter et, après un temps de contact donné, la concentration résiduelle de soluté en solution est mesurée.

Expérimentalement, on distingue quatre classes principales des isothermes d'adsorption nommées :

S (Sigmoïde), L (Langmuir), H (Haute affinité) et C (partition Constante) (fig. I-9) (Sedira, 2013).



Les modèles des isothermes d'adsorption permettent de déterminer la capacité maximale d'adsorption du support.

III.2. Bioremédiation par algues

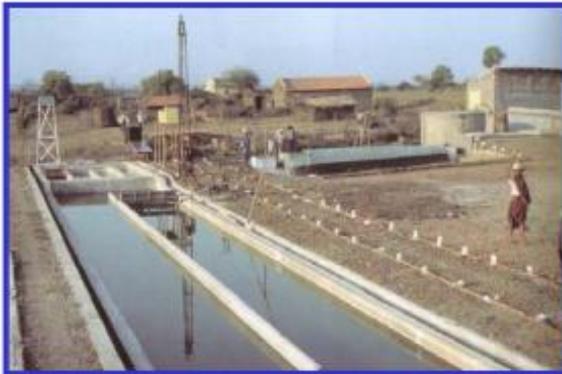
La bioremédiation, à savoir l'emploi de procédés biologiques pour éliminer les polluants qui contaminent le cycle des substances naturelles, est une option avantageuse pour diminuer la pression exercée sur l'environnement. La bioremédiation consiste à utiliser des systèmes biologiques pour réduire le niveau de pollution de l'air, l'eau ou le sol. Ce sont des microorganismes ou des plantes qui sont normalement utilisés comme système biologique. Le plus souvent les opérations de bioremédiation sont menées en laissant faire la biodégradation par des microorganismes. Pour assurer leur croissance et/ou leurs besoins en énergie, les microorganismes peuvent utiliser, en les dégradant la plupart des substances chimiques.

Le phénomène de biodégradation peut apparaître spontanément ; alors c'est une bioremédiation intrinsèque ou d'atténuation naturelle. Cependant, très souvent, les conditions naturelles ne sont pas suffisamment favorables, par manque d'éléments nutritifs, d'oxygène ou des bactéries appropriées. Ce genre de situations est amélioré en complétant l'un ou l'autre des facteurs nécessaires ou même plusieurs. Les agents biologiques utilisés pour la bioremédiation sont les bactéries, champignons, algues, microalgues et plantes supérieures.

En raison de leur surface cellulaire spécifique étendue, les microalgues ont des capacités d'absorption intéressantes pour la décontamination de milieux pollués. Ces applications de bioremédiation sont largement documentées dans la littérature scientifique (Razzak et al., 2013). Les taux de croissance élevés des microalgues, associés à leurs capacités d'absorption, peuvent ainsi être utilisés pour l'épuration des eaux urbaines ou industrielles (Bougaran and Saint-Jean, 2014) ou des effluents d'élevage (Kim et al., 2014). Elles sont utilisées depuis longtemps dans les procédés de traitement des eaux par lagunage en utilisant des végétaux aquatiques comme agents épurateurs (fig. I-10)

Dans des environnements pollués, elles entretiennent des relations coopératives, avec les bactéries, ce qui augmente l'efficacité épuratoire du système. L'oxygène produit par les microalgues favorise une réduction de la dépense énergétique dans les systèmes dits à boues activées (Posadas et al., 2014).

Hollister (Californie)
□ traitement des eaux usées de 14 000 personnes par un bassin de 6 hectares (Spiruline)



Afrique :
-Traitement des eaux usées avec *Spiruline* : → déchets utilisés comme engrais
→*Spiruline* : nourriture de village

(R.Fox, 1984)

fig. I-10 : Exemple des systèmes de traitement des eaux utilisant les algues.

http://rp2e.univ-lorraine.fr/fileadmin/rp2e/seminaires/2012/Mariana_Titica.pdf

Plus de 36 000 espèces différentes d'algues sont disponibles dans les écosystèmes naturels. Ces algues peuvent être classées comme algues rouges, algues vertes, algues brunes, diatomées, algues bleues vertes (procaryotes) ou dinoflagellés. Ces algues ont trouvé diverses utilisations bénéfiques, y compris les aliments pour animaux, les engrais, la production de médicaments, la lutte contre la pollution (traitement de l'eau), les colorants, la fabrication d'agar et comme source de bioénergie (Spolaore et al., 2006).

L'une des familles parmi les très ancienne de microalgues est la famille des cyanophycées qui compte environ 2 000 espèces dans divers habitats. De structure semblable à celle des bactéries, ces organismes ne sont liés à aucun autre groupe d'algues et peuvent, en outre, absorber et fixer l'azote directement à partir de l'atmosphère. Leur couleur caractéristique signale trop souvent des eaux polluées. Elles ne nécessitent essentiellement que de quatre sources vitales : eau, lumière, azote et CO₂. Les spirulines (*Spirulina* sp.) sont parmi les plus produites dans le monde essentiellement pour la consommation humaine (Deschênes, 2009). Elles sont utilisées dans le domaine de traitements des eaux usées (à cause de leur capacité de fixer certains composés toxiques comme les métaux lourds et de fournir l'O₂ aux bactéries qui se chargeront de la dégradation de la matière organique).

Chapitre II Matériels et méthodes

- I- Démarche analytique pour la quantification des PEs
- II- Concentration des PEs dans les milieux récepteurs
- III- Elimination des PEs

Nous avons vu dans la partie bibliographique de ce manuscrit que les perturbateurs endocriniens peuvent perturber l'équilibre hormonal des organismes et/ou interférer avec les fonctions métaboliques des organes. Et qu'ils sont détectés à l'état de trace dans les différents types de matrices liquides (eau de surface, entrée et sortie des stations d'épuration, eau souterraine, eau potable).

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail ont été d'aborder cette problématique sous deux approches différentes.

- ✚ Le premier a consisté à développer une méthode analytique à la fois spécifique et sensible pour analyser et quantifier les traces des PEs présents dans l'eau.
- ✚ Le second a consisté à tester deux différentes techniques d'élimination des PEs à savoir l'adsorption sur brique et la bioremédiation par algue.

Pour atteindre ces objectifs deux méthodes analytiques sont développées. L'extraction en phase solide suivi d'une chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (SPE-GC/MS) est développée et appliquée pour la quantification des PEs dans l'eau. La remédiation des eaux contaminées par les PEs est suivie par l'extraction liquide-liquide et la chromatographie liquide à détecteur à barrette de diode (LLE-HPLC/DAD).

I. Démarche analytique pour la quantification des PEs

Pour effectuer les analyses quantitatives, des standards (composés de grande pureté) ainsi que des étalons internes sont indispensables.

I.1. Standards analytiques et références

Tous les produits objets de cette étude ont été fournis par Sigma-Aldrich : le méthanol, l'acétonitrile (grade HPLC), l'acétate d'éthyle, l'eau grade HPLC, l'acide formique (98%, grade HPLC), l'acide acétique et les standards.

Pour les PEs étudiés, les standards analytiques de qualité HPLC avec la pureté > 90 % ont été utilisés (tab. II-1).

Les étalons internes utilisés sont des composés deutérés : la progestérone -d9, le 17 β -oestradiol-d5 et le bisphénol A- d16 (pureté isotopique > 98%). Les solutions mères individuelles de concentration 100 mg mL⁻¹ de chacun des composés ont été préparées dans l'acétonitrile par pesée et elles sont conservées à -10°C.

tab. II-1 : Référence et pureté des différents standards PEs utilisés.

PEs	Référence	Pureté
Nonylphénol	104-40-5	≥98%
Bisphénol A	80-05-7	≥99%
Bisphénol F	620-92-8	≥98%
Bisphénol E	2081-08-5	≥98%
Bisphénol C	79-97-0	≥99%
Bisphénol G	127-54-8	≥98%
Estrone	53-16-7	≥99%
17 α -éthynylestradiol	57-63-6	≥98%
17 β -estradiol	50-28-2	≥98%
17 α -estradiol	57-91-0	≥98%
Estriol	50-27-1	≥97%
Testostérone	58-22-0	≥98%
Progestérone	57-83-0	≥99%

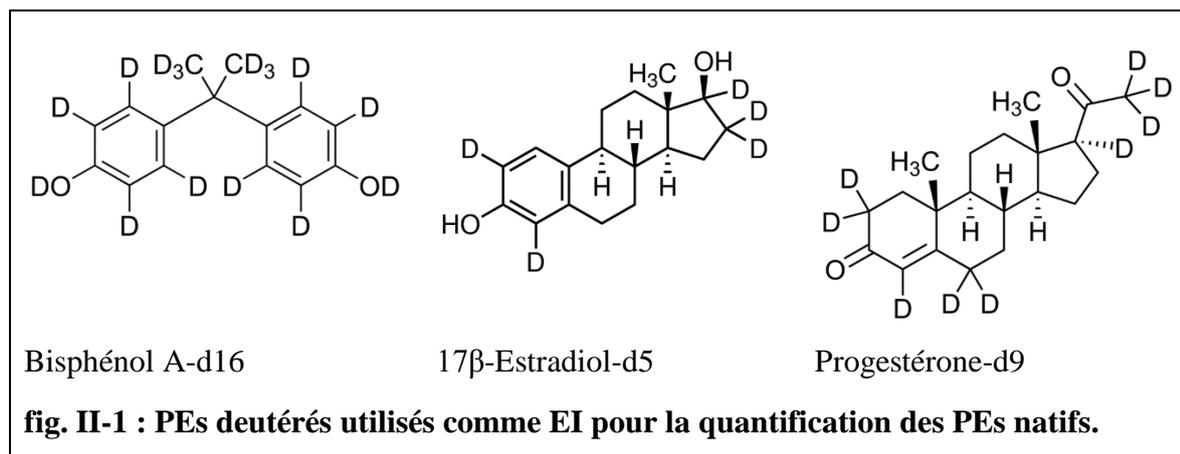
Les solutions qui ont servi aux analyses, ont été préparées à partir des solutions mères par dilutions.

I.2. Quantification des perturbateurs endocriniens par GC/MS

Après l'étape de préparation de l'échantillon, l'analyse des micropolluants ciblés a été réalisée par SPE-GC/MS.

I.2.1. Etalonnage interne

Toutes les analyses ont été réalisées par étalonnage interne. Cette méthode consiste à rajouter, en début de protocole analytique, des composés non présents dans l'échantillon et de propriétés physico-chimiques proches de celles des analytes. Ceci a pour but de s'affranchir des pertes d'analytes intervenant au cours de l'analyse comme par exemple le rinçage de récupération incomplet de la verrerie, pertes par volatilisation aux cours de l'évaporation de pré-concentration... Les trois étalons internes (EI) deutérés utilisés sont : bisphénol A-d16, 17 β -Estradiol-d5 et progestérone-d9 (fig. II-1).



La méthode de calcul faisant intervenir les étalons internes est relativement simple. Elle repose sur l'utilisation de mélanges d'étalons, dans lesquels les concentrations respectives en analytes (i) et en étalons internes (e) sont connues. A chaque pic chromatographique i , est associée une aire A_i , proportionnelle à une quantité injectée m_i . Le coefficient de réponse d'un analyte i par rapport à un étalon e est alors obtenu par la relation suivante :

$$K_i/e = (A_i/(C_i.m_i))/(A_e/(C_e.m_e)) \quad (\text{II.1})$$

La quantité d'analyte m_i présente dans un échantillon inconnu est alors donnée par l'équation suivante :

$$m_i = (A_i.m_e)/(K_i.A_e) \quad (\text{II.2})$$

où m_e est la quantité d'EI e ajoutée à cet échantillon et où K_i est le coefficient de réponse calculé précédemment, qui dépend de multiples facteurs, notamment de l'état du système analytique.

I.2.2. Extraction des perturbateurs endocriniens

La SPE est une technique d'extraction, de purification et de préconcentration la plus employée pour tous types des matrices liquides. Son large succès est dû à son efficacité et sa rapidité. Du plus, cette technique nécessite une faible quantité de solvant ce qui est, pour la chimie verte, un avantage non négligeable.

I.2.2.1. Protocole d'extraction

Le principe de SPE est basé sur les interactions entre une phase solide contenue dans une cartouche, la phase mobile (matrice aqueuse, solution éluante) et les composés à extraire. La SPE consiste en une percolation de l'échantillon aqueux à travers une cartouche (fig. II-2) pour piéger les analytes recherchés ou les interférents.

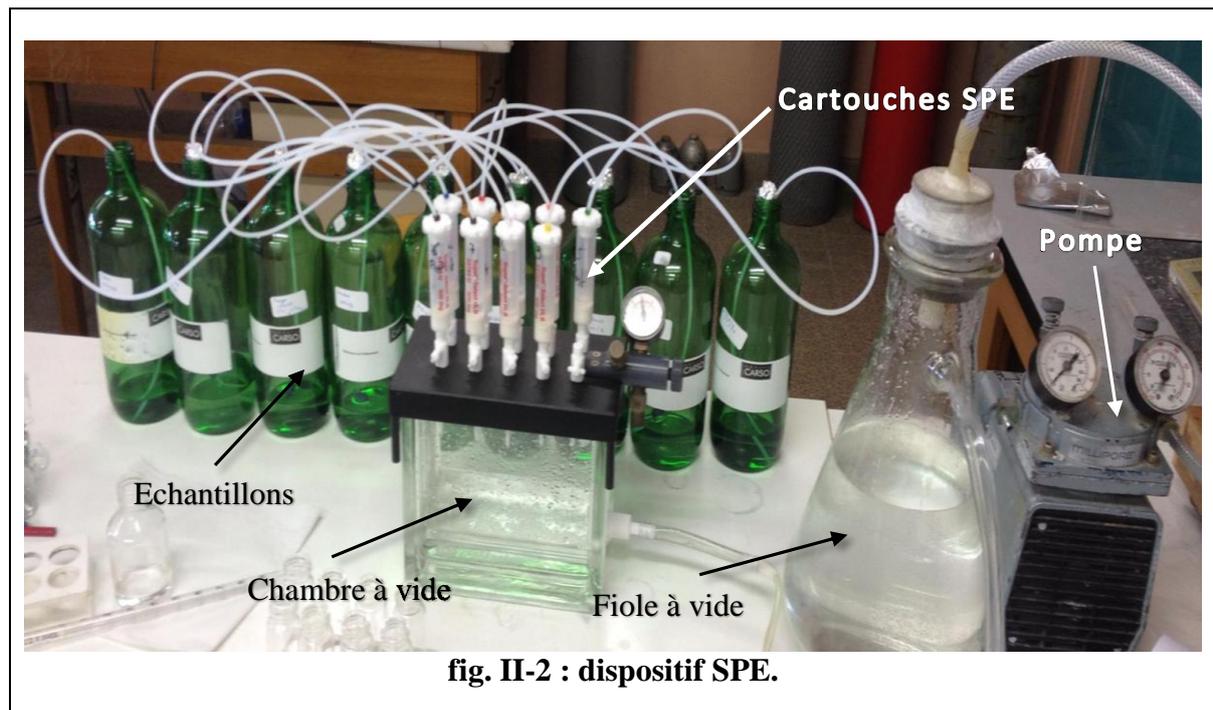


fig. II-2 : dispositif SPE.

I.2.2.2. Optimisation de l'extraction en phase solide

L'effet des facteurs susceptibles de modifier les réponses étudiées peut être quantifié, leurs interactions sont alors calculées et celles qui sont influentes sont repérées. Il est ensuite possible de modéliser ces résultats sous la forme de fonctions analytiques ou graphiques reliant les réponses aux facteurs influents. La modélisation mathématique est ensuite utilisée pour déterminer les meilleures conditions expérimentales de l'analyse. Certains facteurs sont quantitatifs, mesurables et représentés par une grandeur, les valeurs prises par ces facteurs peuvent être continues ou discrètes ; d'autres facteurs, comme la nature de la phase stationnaire, sont qualitatifs. Concernant les facteurs contrôlables, certains sont fixés a priori ou par les contraintes du laboratoire, d'autres sont des variables à optimiser par le plan d'expériences.

A chaque facteur variable sont attribués deux niveaux extrêmes, a (-1) et b (+1), quantitatifs ou qualitatifs, correspondant aux limites d'un intervalle raisonnable de variation. L'ensemble des niveaux a et b, définis pour chaque facteur, délimitent le domaine expérimental de l'étude ; 2^k expériences sont donc programmées, elles conduisent à autant de valeurs y de la réponse Y. La matrice des essais correspondant au plan optimal comporte k colonnes et 2^k lignes. Elle se construit de la façon suivante : dans la colonne correspondante au premier facteur sont alternés les a (-1) et les b (+1), dans celle du second facteur sont alternés les a et les b de 2 lignes en 2 lignes, dans la colonne du facteur de rang k sont alternés les a et les b de 2^{k-1} lignes en 2^{k-1} lignes. Les effets moyens des facteurs et leurs interactions sont calculés.

I.2.2.3. Réponse expérimentale et facteurs choisis

Quatre facteurs potentiellement influents ont été retenus :

- ✚ Volume du solvant d'éluion
- ✚ Volume de l'échantillon traité.
- ✚ pH de l'échantillon traité.
- ✚ Nature de l'adsorbant.

La nature de l'adsorbant, parce que c'est un facteur qualitatif et non pas quantitatif, il a été étudié séparément.

Trois types de cartouche ont été testés : la HLB oasis, la C18 et l'Envi+.

La réponse expérimentale considérée est le rendement d'extraction R, il est exprimé en % et déterminée par GC/MS pour le nonylphénol, le bisphénol A, le 17 α estradiol, le 17 α éthinylestradiol, la progestérone et la testostérone.

Ce rendement est défini, pour chaque soluté, par l'équation suivante :

$$R\% = \frac{\text{Concentration expérimentale}}{\text{Concentration théorique}} \times 100 \quad (\text{II.3})$$

I.2.2.4. Domaine expérimental choisi

Nous avons fixé le domaine expérimental pour les trois facteurs étudiés (tab. II-2).

tab. II-2 Domaine expérimental

Variables (X _i)	Facteurs (U _i)	Niveaux	
		Min. (-1)	Max. (+1)
X ₁	U ₁ : volume d'échantillon (mL)	250	750
X ₂	U ₂ : rapport d'éluion ethylacetate/acétone	0,12	9
X ₃	U ₃ : pH de l'échantillon	3	9

I.2.2.5. Modèle choisi pour le plan d'expériences.

Le polynôme retenu dans cette étude est un polynôme d'ordre 2 (coefficient b_{ii}) avec interaction entre les variables (coefficient b_{ij}, i ≠ j). Le modèle utilisé pour relier la réponse expérimentale aux facteurs étudiés est le suivant :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (\text{II.4})$$

Avec:

Y: réponse expérimentale (taux de récupération)

b_0 : valeur de la réponse au centre du domaine

b_i : estimation de l'effet principal du facteur i pour la réponse Y .

b_{ii} : estimation de l'effet du second ordre du facteur i pour la réponse Y .

b_{ij} : estimation de l'effet d'interaction entre le facteur i et le facteur j pour la réponse Y .

1.2.2.6. Matrice d'expérimentation

Afin d'avoir une qualité d'analyse élevée, la matrice d'expériences de Doehlert a été choisie. Pour un nombre donné de facteurs k , le nombre d'expériences nécessaires pour exécuter le plan de Doehlert est donné par la relation :

$$N = k^2 + k + 1 \quad (\text{II.5})$$

Dans le présent cas, le nombre de facteurs $k = 3$ par conséquent 13 expériences plus 2 expériences au centre, pour évaluer la variance, ont été réalisées.

L'analyse des résultats et la construction du plan d'expérience ont été effectuées avec le logiciel NEMRODW.

Nous utiliserons la méthode des moindres carrés pour déterminer les coefficients de l'équation modèle.

$$B = (X'X)^{-1}X'Y \quad (\text{II.6})$$

Avec :

B : vecteur d'estimation des coefficients

$(X'X)$: matrice d'information

$(X'X)^{-1}$: matrice de dispersion

X' : matrice transposée de la matrice modèle

Y : vecteur des résultats expérimentaux.

La transformation d'une variable réelle U_{ij} en une variable codée X_{ij} est obtenue par la relation :

$$X_i = \left[\frac{U_i - \bar{U}_i}{\Delta U_i} \right] \quad (\text{II.7})$$

Avec:

X_i : valeur de la variable codée i.

U_{ij} : valeur réelle du facteur i.

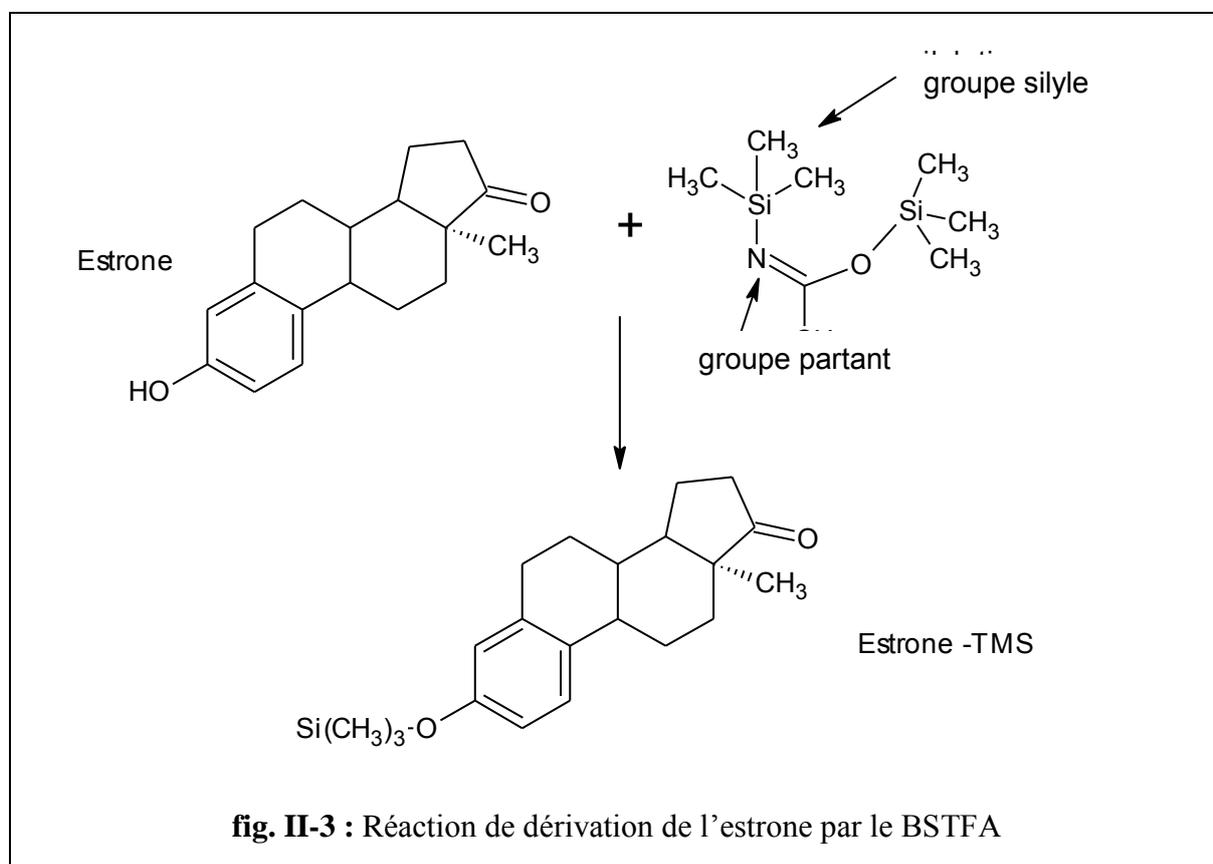
\bar{U}_i : est le facteur i au centre du domaine expérimental.

I.2.3. Analyse par GC/MS

Après la préparation des échantillons, l'analyse est effectuée par GC/MS. Cette analyse nécessite une étape de dérivation des PEs.

I.2.3.1. Dérivation

Les stéroïdes sont des molécules très polaires et peu volatiles pour être analysées directement en GC. Pour améliorer leur comportement chromatographique, il est nécessaire de procéder à la dérivation des fonctions polaires telles que la fonction hydroxyle en dérivés silylés. Le réactif de dérivation retenu dans le cadre de cette étude est le BSTFA (N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide) avec 1% de triméthylchlorosilane (BSTFA 1% TMCS). Cet agent de dérivation a pour but de silyler les fonctions cétones conjuguées et les alcools tertiaires, en présence d'un catalyseur (pyridine). Dans le cas de ce présent travail nous avons choisi la dérivation de l'estrone avec le BSTFA (fig. II-3).



La cinétique de dérivation des fonctions polaires par le BSTFA dépend de la nature de la molécule d'intérêt et de la température (Net, 2010). Pour certaines molécules, la dérivation complète peut être atteinte directement lors du mélange de BSTFA avec la molécule d'intérêt. Cependant, pour certaines molécules, la dérivation complète est atteinte au bout de 24h à la température ambiante (Net, 2010).

Pour les molécules dont la cinétique de dérivation est lente, une élévation de température permet d'accélérer le processus. Le choix du temps et de la température d'incubation ont fait l'objet d'une optimisation dans l'objectif de maximiser l'abondance du signal détecté en CG-SM tout en minimisant la variabilité du coefficient de réponse de chaque analyte. De plus, le temps de stabilisation après le chauffage est également un facteur influent optimisé dans cette étude pour les molécules d'intérêt.

I.2.3.2. Analyse

Chaque extrait a été analysé par chromatographie en phase gazeuse (GC, Varian 3900) couplée à un spectromètre de masse (MS, Saturn 2000) ou GC-MS. Nous donnons Les conditions opératoires utilisées lors des analyses des molécules d'intérêt (tab. III-1).

Les PEs sont identifiés, en mode full scan (FS), sur le chromatogramme par leur temps de rétention (TR) et sur le spectre de masse par leurs fragments caractéristiques (m/z).

Pour des meilleures sélectivités, ces caractéristiques permettent alors de créer une méthode quantitative en mode SIS (Selected Ion Storage) (fig. II-4).

Pour interpréter les chromatogrammes et les spectres de masse il faut tenir compte de la dérivation, en effet, dans le cas de dérivation de groupement fonctionnel OH de fonction d'alcool ou d'acide, le BSTFA réagit avec le groupement OH pour former un dérivé triméthylsilyle (TMS). Sachant que le groupement TMS a une masse molaire de 73 g/mol, chaque fonction TMS augmente donc le rapport masse/charge des ions moléculaires de 72 uma compte-tenu de la perte de l'atome d'hydrogène.

tab. II-3 : Conditions opératoires pour l'analyse des PEs par GC-MS.

GC-MS	Paramètres opératoires
Chromatographe Varian 3900	Passeur d'échantillons CP-8400
Injecteur	Mode d'injection : Splitless
Volume injecté	1 μ L
Température d'injection	280 °C
Colonne capillaire silice fondue	ZB-XLB Phenomenex
Phase	Si-arylene
Longueur	60 m
Diamètre interne	0,25 mm
Epaisseur du film	0,25 μ m
Colonne de protection	Oui (en silice fondue 5 m, 0,25 mm diamètre interne)
Gaz vecteur	Hélium
Débit	1 mL/min
Programmation du four	
Température initiale de four	100°C pendant 2 min
1 ère vitesse de programmation	5°C/min
1 er palier de température	250°C
2 ème vitesse de programmation	3°C/min
2 ème palier de température : température finale, isotherme	300°C pendant 2.33 min
Spectromètre de masse Saturn 2000	Quadripôle
Température de la trappe d'ion	220 °C
Température de la ligne de transfert	280 °C

Dans ce qui suit, la masse moléculaire des produits de dérivation sera notée M_w -TMS, d'où M_w -TMS = $M_w + 72n$ OH et n correspond au nombre de fonction OH dans la molécule d'intérêt. Le nombre des ions fragments m/z caractéristiques des dérivés TMS est 1,2 et 3 selon le cas.

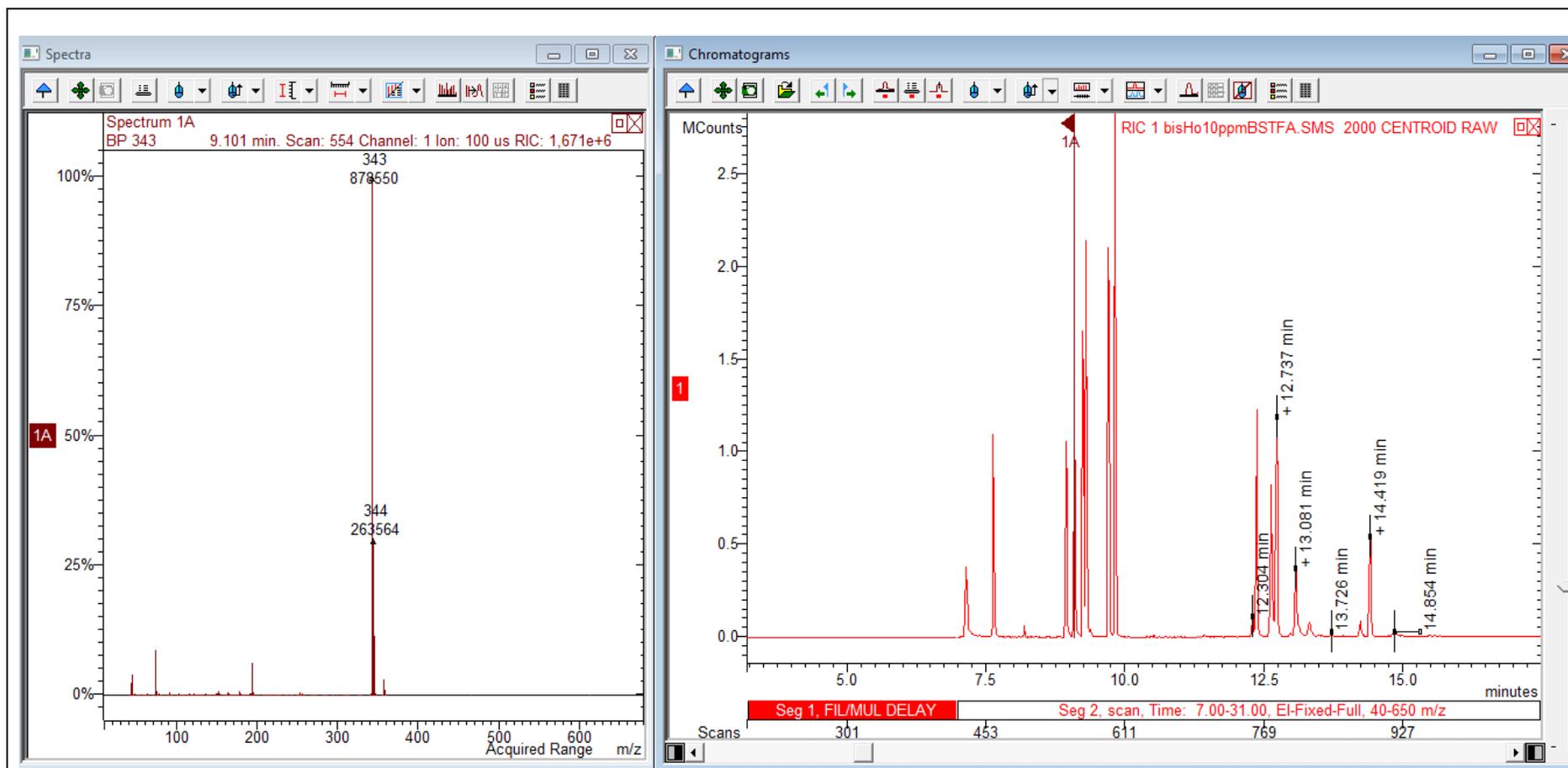


fig. II-4 : (1) Un exemple de chromatogramme d'un mélange des standards de 13 PEs étudiés [de concentration 10 µg/mL (1A) spectre de masse (m/z) de BPF.

I.2.4. Validation de la méthode optimisée

L'extraction SPE a été validée suivant les recommandations de Feinberg (1996) pour une validation analytique.

I.2.4.1. Linéarité

La linéarité d'une méthode de mesure ou d'une procédure d'analyse est, sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, d'obtenir des résultats de mesure directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance de l'échantillon analysé. Elle a été évaluée en analysant des eaux dopées dans une gamme de concentration de 0,5 ng/L à 500 ng/L. La linéarité a été évaluée trois fois en trois jours différents.

I.2.4.2. Spécificité

Une méthode d'analyse est spécifique si elle ne mesure que la caractéristique que l'on souhaite mesurer. La spécificité de l'analyse sera assurée par l'absence d'un pic au temps de rétention des PEs (+/- 1minute par rapport au contrôle) lors de l'injection d'un blanc.

I.2.4.3. Limite de détection

La limite de détection correspond à la quantité la plus faible d'analyte qui peut être détectée dans un échantillon, sans forcément pouvoir être quantifiée de façon exacte. L'évaluation du seuil de détection dépend essentiellement du rapport Signal/Bruit de fond. La limite de détection (LOD) a été déterminée telle que la concentration de l'analyte produit un pic d'une hauteur égale à trois fois l'écart-type du bruit. Et la LOD est vérifiée expérimentalement.

$$\text{LOD} : \text{Signal/Bruit}=3 \quad (\text{II.8})$$

I.2.4.4. Limite de quantification

La limite de quantification (LOQ) correspond à la concentration pour laquelle la hauteur du pic de l'analyte est égale à dix fois l'écart-type du bruit, ceci sur la transition la plus intense. De même que le LOD, la LOQ est vérifiée expérimentalement.

$$\text{LOQ} : \text{Signal/Bruit}=10 \quad (\text{II.9})$$

I.2.4.5. Fidélité

La fidélité de la procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'essais d'un même échantillon homogène. La précision (fidélité) s'exprime par la mesure de la répétabilité et la reproductibilité. La moyenne, l'écart

type (**SD** : déviation standard) et le coefficient de variation (**CV, %**) pour les différentes concentrations sont exprimées ainsi :

$$\text{Moyenne } \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (\text{II.10})$$

$$\text{Ecart type (SD)} = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{II.11})$$

$$\text{CV(\%)} = \frac{\text{Ecart type (SD)}}{\text{Moyenne } \bar{X}} \times 100 \quad (\text{II.12})$$

I.2.4.6. Répétabilité

La répétabilité se rapporte à des essais de la même grandeur effectués dans des conditions aussi stables que possible, à de court intervalle de temps, dans un même laboratoire et par un même opérateur employant le même équipement. L'objectif est d'obtenir des mesures dans les conditions les plus similaires possibles. La répétabilité traduit la variation intra-journalière.

La répétabilité a été évaluée en calculant les coefficients de variation (CV, %) pour les différentes concentrations. Elle a été évaluée sur trois concentrations (basse : 1,5 ng L⁻¹; moyenne : 50 ng L⁻¹ et élevée : 500 ng L⁻¹) en effectuant 3 essais pour chaque concentration.

I.2.4.7. Reproductibilité

C'est la mesure de la fidélité lorsqu'une ou plusieurs conditions opératoires changent à savoir des opérateurs différents et/ou des instruments différents et/ou des méthodes d'analyses différentes, et/ou des délais variables. Pour obtenir des mesures reproductibles, dans des conditions à une ou plusieurs sources de variabilité il faut qu'il n'y ait pas d'interférence. La reproductibilité a été évaluée trois fois à des jours différents, par deux opérateurs sur une concentration égale à 50 ng L⁻¹.

II. Concentration des PEs dans les milieux récepteurs

La mise point d'une méthode analytique robuste et rigoureuse a pour but d'évaluer les niveaux de contaminations des eaux. Pour cette objectif différentes types d'eaux ont été collectés dans deux régions de France et de Tunisie.

I.1. Traitement des échantillons

La détection des micropolluants organiques dans l'eau nécessite une méthodologie d'analyse rigoureuse et une attention particulière aux prélèvements et aux traitements des échantillons afin d'éviter les risques de contamination.

Les échantillons d'eau ont été collectés dans des flacons ambrés. Dès l'arrivée au laboratoire, ils ont été filtrés en utilisant des filtres en fibres de verre (0,7 μm Whatman) préalablement calcinés 450 °C pendant une nuit. La filtration doit être réalisée rapidement après le prélèvement afin de séparer la phase dissoute et les matières en suspension (MES). En effet, il est très important de filtrer d'eau rapidement pour éviter les phénomènes d'adsorption/désorption ou de biodégradation due à la présence des micro-organismes.

Après la filtration, les échantillons sont conservés à -5 °C puis extraits dans les plus brefs délais. Les extraits sont ensuite analysés par la GC/MS.

II.1. Description des différents sites d'échantillonnage

Les sites d'échantillonnage choisis sont situés dans des zones des activités industrielles et agricoles lourdes avec une densité de population élevée, mais aucune donnée n'était auparavant disponible pour les niveaux de contaminations de ces sites par PEs.

II.1.1. En France

Les échantillons ont été prélevés dans quinze sites localisés dans six rivières du bassin versant de l'Escaut de la région transfrontalière Franco-Belge. Le fleuve principal du bassin est l'Escaut, long de 355 km il prend sa source à Gouy le Câtelet, en France et traverse la Belgique pour se jeter dans la mer du Nord aux Pays-Bas.

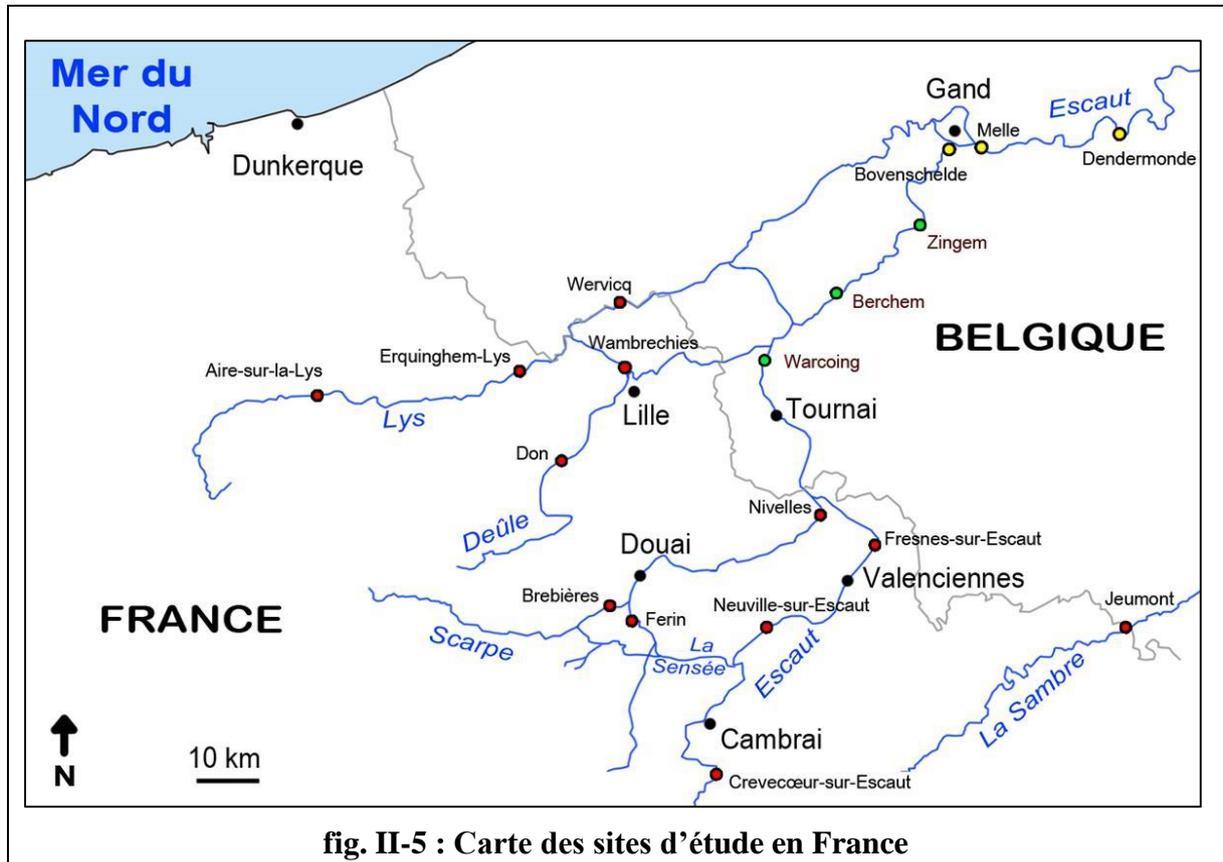
La Deûle et La Lys sont les principaux tributaires, la Lys est entièrement canalisé à partir d'Aire-sur-la-Lys, ce canal couvre 85 km jusqu'à l'Escaut et il finit son acheminement en Belgique au niveau de Gand. Le canal Deûle-Lys présente une activité industrielle historique parmi les plus élevées en Europe et une forte densité de population (plus de 10 millions), plus concentrées aux abords des grandes villes comme Lille, Gand, Douai et Anvers.

L'Escaut reçoit près de 40 affluents directs qui drainent et irriguent un territoire d'environ 21 863 km² (Meire et al., 2005) de bassins versants et alimente et/ou reçoit de nombreux rejets industriels, agricoles, d'assainissement et d'adduction en eau potable ce qui conduit à sa contamination par les différents polluants organiques. De plus, le bassin versant de l'Escaut est aussi caractérisé par une surface agricole très importante, avec une prédominance de l'élevage intensif dans la partie nord du bassin et de cultures (en particulier céréalières) dans le sud du bassin (Lecoz, 2017).

La fig. II-5 illustre les 15 sites d'étude localisés dans six rivières dans le Nord de la France :

- ✚ Six sites situés dans l'Escaut (Fresnes, Neuville, Crevecœur, Warcoing, Berchem, Zingem),

- ✚ Trois sites dans la Lys (Aire-sur-la-Lys, Erquinghem-Lys, Wervicq),
- ✚ Deux sites dans la Deûle (Don, Wambrechies),
- ✚ Deux sites dans la Scarpe (Brebrières et Nivelles),
- ✚ Un site dans la Sensée (Férin)
- ✚ Un site dans la Sambre (Jeumont).



Afin de déterminer les caractéristiques physico-chimiques des eaux des différents sites, les analyses des paramètres classiques ont été effectuées lors de prélèvement sur site (tab. II-4)

tab. II-4 : Propriétés physico-chimiques des différents sites étudiés.

Sites	pH	T (°C)	O ₂ (mg/L)	Turbidité (F.N.U)	Conductivité (μSi/cm)
Fresnes-sur-Escaut	7,87	14	13,11	12,5	603
Neuville-sur-Escaut	7,79	14,2	13,77	3,98	543
Crevecœur-sur-Escaut	7,86	11,2	12,75	5,06	472
Warcoing	8,28	14,8	19,5	10,6	657
Berchem	8,56	14,6	16,15	18	708
Aire-sur-la-Lys	7,76	14,1	11,66	17,2	638
Erquinghem-Lys	7,81	14	6,5	10,2	704
Wervicq	7,68	16,1	9,6	19,7	786
Don	7,77	14,9	10,05	13,1	654
Wambrechies	7,82	15,2	8,49	20,5	775
Brebières	8,03	14,3	12,71	1,35	787
Nivelle	8,28	14,8	14,93	20,6	802
Ferin	7,85	14,7	11,53	8,4	753,9
Jeumont	8,43	14,5	14,07	9,56	396

II.1.2. En Tunisie

La campagne d'échantillonnage a été effectuée au début du printemps 2014. Tous les échantillons ont été prélevés pendant 10 jours successifs.

Ces échantillons ont été prélevés dans le grand Tunis (fig. II-6) présente la localisation des sites d'étude. Ces zones présentent des activités à la fois industrielles et agricoles.

✚ Le premier site d'étude (ST1) situé à Soukra, Ariana. Les échantillons ont été prélevés à l'entrée et à la sortie des deux stations d'épuration Chotrana1 et Chotrana 2. La STEP

Chotrana 1 est la plus grande station du grand Tunis, elle reçoit des effluents principalement domestiques. La STEP Chotrana 2 reçoit principalement des effluents industriels.

- Le deuxième site est la STEP de Ben Arous située dans la Médina Jadida- (ST2). Elle est opérationnelle depuis 1982. Cependant, elle n'était pas opérationnelle au cours de la campagne d'échantillonnage, les échantillons sont ceux de l'entrée de STEP. Ben Arous est la plus grande ville industrielle de Tunis et en particulier l'industrie pharmaceutique. De ce fait, la station d'épuration de Ben Arous reçoit principalement les effluents industriels y compris les effluents de l'industrie pharmaceutique.

Ces trois STEPs ont des différents types de traitement des eaux usées (tab. II-5)

- ST3 se trouve au centre hospitalier de Bab Saadoun qui regroupe 6 différents hôpitaux. Il est le plus grand centre de soins de santé en Tunisie.
- Les échantillons d'eaux d'Oued Zarga ont été prélevés au niveau de nord du pays, dans le gouvernorat de l'Ariana, Sidi Thabet (ST4) ou se situent les fermes d'élevage bovin et des vaches laitières Sur le même site, il y a la fondation nationale d'amélioration de la race chevaline.

tab. II-5 : Caractéristiques des STEPs

	STEP	Chotrana 1	Chotrana 2	Ben Arous
	Volume d'eau traitée /jour	80 000 m ³	30 000 m ³	37 500 m ³
Traitement	Boue activée moyenne charge	x		x
	Boue activée faible charge		x	
	Lagunage aéré	x		
	traitement chimique			x

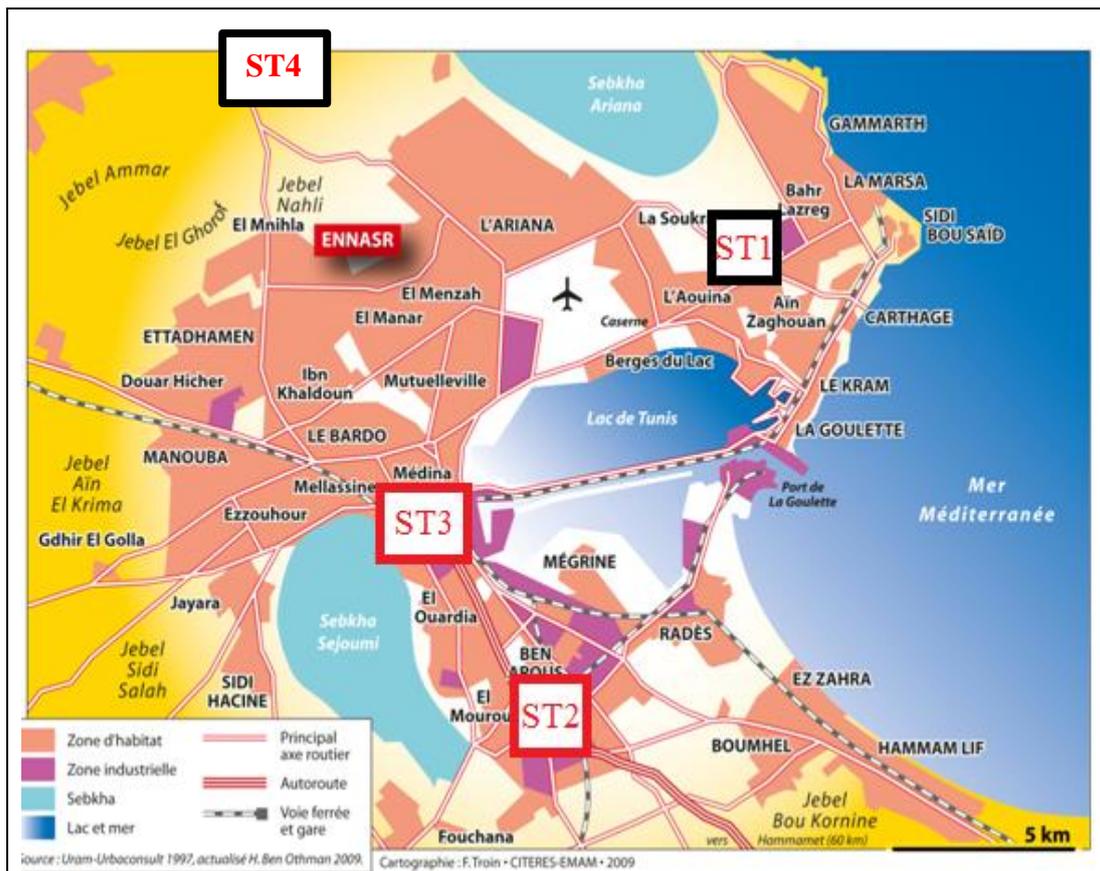


fig. II-6 : Carte des sites d'études en Tunisie

(ST1) : STEP Chotrana 1 et STEP Chotrana 2

(ST2): STEP Ben Arous

(ST3) : Centre hospitalier de Bab Saadoun

(ST4) : Oued Zarga région sidi Thabet

III. Elimination des PEs

En générale, la méthode d'analyse en HPLC-DAD n'est pas bien adaptée pour le dosage des PEs dans des échantillons naturels car les PEs sont présents en concentration relativement faible et l'échantillon est constitué d'une matrice complexe. Cependant, lors d'une étude expérimentale en laboratoire utilisant l'eau pure comme milieu d'étude, la matrice est simple et les concentrations sont maîtrisables ; dans ce cas l'emploi de HPLC-DAD est approprié. L'emploi de HPLC-DAD permet de gagner du temps puisque l'analyse peut se faire directement sans les étapes d'extraction/purification/pré-concentration et de dérivation préalable. C'est la raison pour laquelle HPLC couplée à un détecteur DAD est utilisée comme outil de dosage des PEs pour l'efficacité et la faisabilité du traitement des eaux contaminées par les PEs.

III.1. Méthode d'analyse des PEs

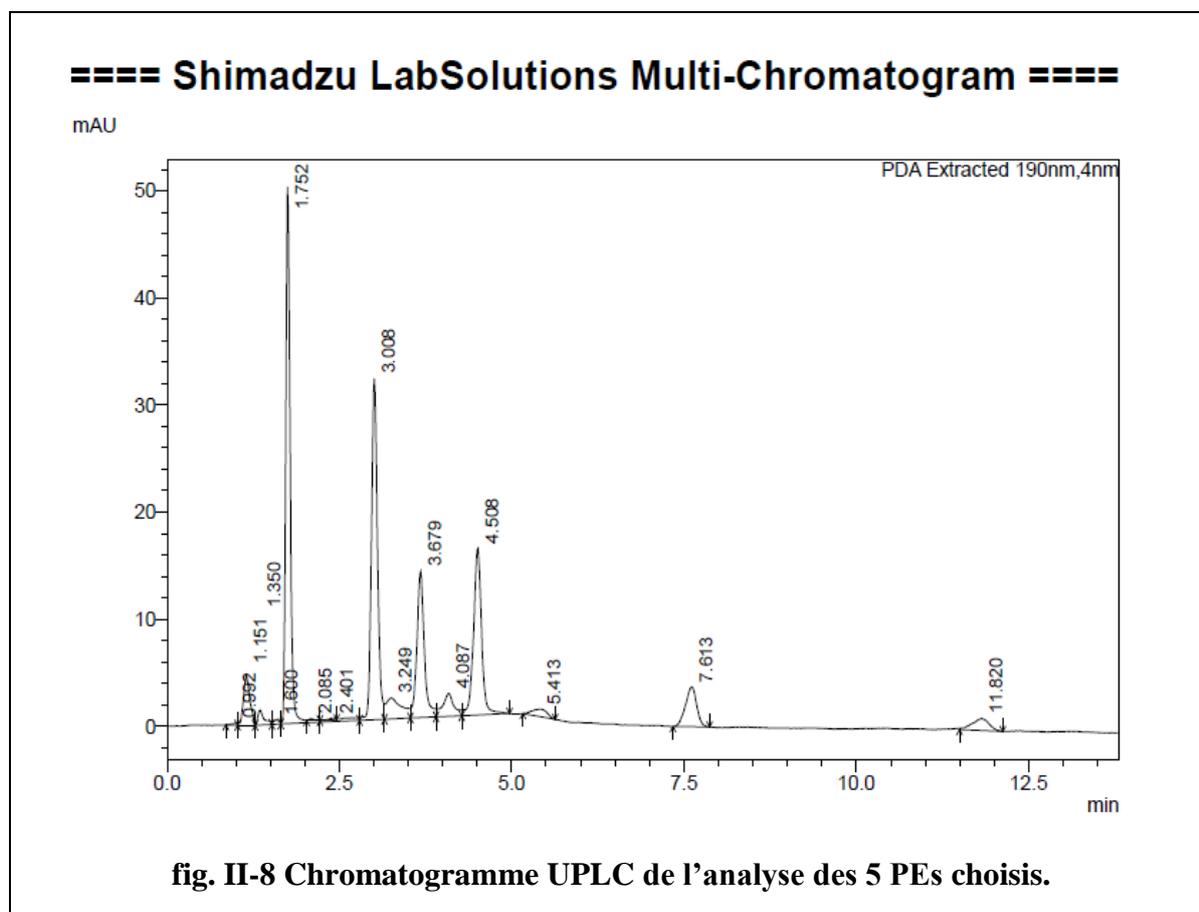
La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. La chromatographie est une technique dans laquelle les constituants d'un mélange se séparent en fonction des vitesses auxquelles ils sont entraînés à travers une phase stationnaire par une phase mobile. Selon la phase stationnaire et la phase mobile choisies, les solutés sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne. De ce phénomène appelé rétention, il résulte que les solutés injectés se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés.

Pour étudier l'efficacité d'élimination, cinq perturbateurs endocriniens ont été choisis comme modèle pour l'étude : NP, BPA, E1, EE2 et TST. La quantification de suivi de l'efficacité est effectuée par la HPLC/DAD (fig. II-7). La méthode a été préalablement optimisée et plusieurs critères ont été évalués tels que le changement du pH et le changement des solvants.



fig. II-7 : UPLC Shimadzu model LC20A

Les dosages ont été réalisés à l'aide d'une HPLC Shimadzu model LC20A équipée de deux pompes LC-20AD, ESA 584, un four CTO-10AS VP et une colonne Altima (C18 5 μ m, 250 x 4,6mm) avec une boucle d'injection de 5 μ L. Le logiciel utilisé pour le traitement des données est « Labsolution ». Le débit de la phase mobile était de 1,2 mL min⁻¹. La séparation a été réalisée à 40 °C. La phase mobile est un mélange d'acétonitrile et d'eau. Après l'injection de l'échantillon, la colonne a été conditionnée avec de l'acétonitrile 58 % pendant 10 min, ensuite avec un gradient linéaire de 58 % à 100% d'acétonitrile pendant 5 min. Dans ces conditions, toutes les molécules d'intérêt sont éluées avec une séparation et bonne forme de pic avec des LOD entre 0,01 et 0,05 mgL⁻¹ pour les molécules cibles (fig. II-8).



La méthode d'étalonnage externe a été utilisée pour l'analyse des PE's. Les courbes d'étalonnage sont des droites pour chacun des PE's sélectionnés dans le domaine de concentration de [0,1-10 mg L⁻¹] (

fig. II-9).

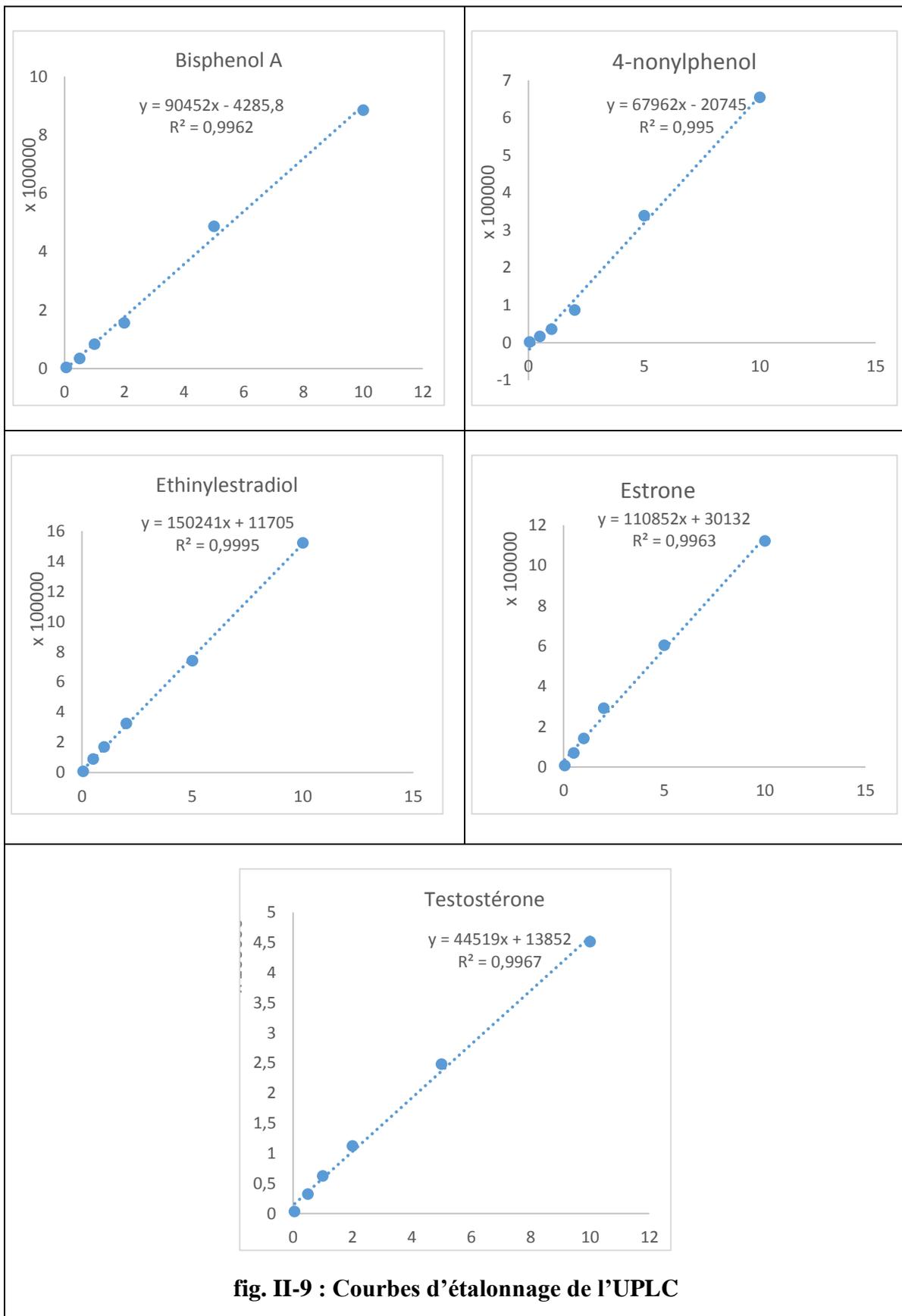


fig. II-9 : Courbes d'étalonnage de l'UPLC

Deux méthodes d'élimination des PEs ont été testées, la méthode d'adsorption sur les résidus de briques et la méthode de sorption sur les algues (le bio-traitement).

III.2. Adsorption sur brique

Les briques ayant servies à ce travail ont été préparé au sein du laboratoire LASIR par Dr Oscar ALLAH DIN.

III.2.1. Adsorbant utilisé

En raison de sa structure lamellaire, l'argile fait partie des composés naturels possédants des propriétés adsorbantes. La métakaolinite est un bon adsorbant qui pourrait remplacer avantageusement les zéolites, dont le coût est élevé. Les briques peuvent donc être des sources de métakaolinite si la température de cuisson est supérieure à 450°C (début de la deshydroxylation de la kaolinite en métakaolinite) et inférieure à 950° (début de la transformation de la métakaolinite en mullite vitreuse).

Dans une logique de la valorisation des sous-produits de la construction des habitations, les briques hors d'usage pour la construction ont été récupéré, pour cette étude. Les briques ont été pilées et la fraction comprise entre 0,7 à 1 mm a été retenue, taille des adsorbants habituellement utilisés. Les grains ont été alors lavés avec de l'eau Milli-Q et séchés à 105° C.

III.2.2. Expérimentation

Notre étude a porté sur la fixation de micropolluants sur les grains de brique modifiée et recouverts de ferrihydrite. Le but principal a été de comprendre les phénomènes mis en jeu en vue d'améliorer son applicabilité au traitement des eaux. La méthode utilisée est la méthode de « batch ». Pour cette étude, 0,5 g de chaque adsorbant ont été mis en contact avec 50 mL d'une solution aqueuse contenant le mélange de cinq PEs ciblés à une concentration de 100 mg L⁻¹. Les mélanges ont été mis sous agitation mécanique. Pour l'étude de l'effet de pH sur l'adsorption, une série d'expériences à pH 2.5 ; 4 ; 7 ; 9 et 10 a été effectuée. Le pH des solutions a été modifié par une solution de soude 1M.

III.2.3. Cinétique d'adsorption

Les équations cinétiques de pseudo-premier ordre et pseudo-second ordre ont permis d'exprimer la vitesse d'adsorption des analytes sur l'adsorbant.

III.2.3.1. Equation cinétique de pseudo-premier ordre

L'équation cinétique de pseudo-premier ordre peut être présentée selon l'expression mathématique :

$$\frac{dQ_t}{dt} = k_2 (Q_e - Q_t) \quad (\text{II.12})$$

où Q_e (mg g⁻¹) représente la quantité de PE adsorbée à l'équilibre, Q_t (mg g⁻¹) (mg/g) est la quantité de PE adsorbée à l'instant t (min) et k_1 en min⁻¹ est la constante de vitesse d'adsorption de pseudo-premier ordre.

$$Q_t = \frac{(C_i - C_t) * V}{m} \quad (\text{II.13})$$

où C_i (mg L⁻¹) représente la concentration initiale de PE, C_t (mg L⁻¹) représente la concentration trouvée de PE à l'instant t (min), V est le volume de la solution de PE et m (g) est la masse d'adsorbant utilisé.

En intégrant l'équation (II.12), on obtient :

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 t \quad (\text{II.14})$$

III.2.3.2. Equation cinétique de pseudo-second ordre

Cette équation peut s'écrire :

$$\frac{dQ_t}{dt} = k_2 (Q_e - Q_t)^2 \quad (\text{II.15})$$

Où k_2 en (g/(mg.min)) est la constante de vitesse d'adsorption de pseudo-second ordre. En intégrant cette équation, on trouve :

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e} + \frac{1}{Q_e} t \quad (\text{II.16})$$

L'étude de la cinétique d'adsorption permet la détermination de l'ordre de la vitesse de réaction d'adsorption du soluté sur le matériau.

III.2.4. Isotherme d'adsorption

Les expériences d'isothermes d'adsorption ont été réalisées dans dix flacons de 100 mL et sous agitation lente. Chaque flacon contient 0,5 g de grains de brique dans lesquels ont été ajoutés 50 mL de solution des PEs de 100 mg/L. Ces flacons ont été placés sur un agitateur mécanique orbital (Modèle : IKA Labortechnik KS250 de base) et agités lentement à une vitesse de 120 tr/minute. Les expériences d'isothermes d'adsorption ont duré une nuit bien qu'un temps de réaction de 4 heures à une température de 23 °C±1°C soit suffisant pour que le système atteigne l'équilibre. Les suspensions ont été filtrées et les solutions récupérées ont été analysées en HPLC/DAD afin de déterminer les concentrations des PEs restant en solution à l'équilibre. Chaque expérience a été effectuée en triplicata ($n \geq 3$) et les données présentées correspondent à des valeurs moyennes.

Parmi les modèles les plus utilisés des isothermes d'adsorption, nous pouvons citer les isothermes de Langmuir et de Freundlich.

III.2.4.1. Isotherme de Langmuir

L'isotherme de Langmuir suppose que tous les sites d'adsorption en surface aient une affinité égale avec le soluté et un site de sorption n'affecte pas l'adsorption d'un autre site adjacent (Langmuir, 1916). Langmuir suppose que l'adsorption se fait sur une surface homogène (elle a lieu sur des sites équivalents) et que la saturation est atteinte lorsque les solutés remplissent tous les sites. L'équation de Langmuir peut être écrite comme :

$$Q_e = \frac{Q_{max} b C_e}{1 + b C_e} \quad (\text{II.17})$$

Où Q_e : est la quantité de soluté adsorbée à l'équilibre en (mg g^{-1}) ;

Q_{max} : capacité maximale d'adsorption sur une monocouche de l'adsorbant (en mg g^{-1}) ;

C_e : concentration du soluté dans la solution à l'équilibre en (mg L^{-1}) ;

b : constante d'adsorption de LANGMUIR liée à la température et à l'énergie d'adsorption en (L mg^{-1}).

Pour déterminer les constantes b et Q_{max} , l'équation (II.17) peut être transformée comme suit :

$$\frac{1}{Q_e} = \frac{1}{Q_{max}} + \frac{1}{b Q_{max} C_e} \quad (\text{II.18})$$

Les valeurs des constantes b et Q_{max} peuvent être déterminées en traçant $1/Q_e$ en fonction de $1/C_e$ à partir des données expérimentales. Les caractéristiques de l'isotherme de Langmuir peuvent être exprimées au moyen de la constante R_L , appelé paramètre d'équilibre ou facteur de séparation de LANGMUIR. R_L permet de conclure si l'adsorption est favorable ou non, et il est calculée suivant l'équation :

$$R_L = \frac{1}{1 + b C_0} \quad (\text{II.19})$$

b : constante d'adsorption de LANGMUIR liée à l'énergie d'adsorption en (L mg^{-1}) ;

C_0 : concentration initiale de l'adsorbant en (mg L^{-1}).

Selon R_L le processus d'adsorption est :

- Irréversible $R_L = 0$
- Favorable $R_L < 1$
- Linéaire $R_L = 1$
- Défavorable $R_L > 1$

III.2.4.2. Isotherme de FREUNDLICH

Le modèle d'isotherme de Freundlich (Freundlich, 1906) décrit l'équilibre d'adsorption des solutés sur des surfaces hétérogènes de solide contrairement à LANGMUIR. Ce modèle permet de supposer l'existence de plusieurs types de sites d'adsorption à la surface hétérogène du support solide et que l'adsorption des solutés peut se faire en multicouches. Le modèle est décrit par l'équation suivante :

$$Q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (\text{II.20})$$

Où K_F et n sont des constantes de Freundlich liés respectivement à la capacité d'adsorption et à l'intensité d'adsorption de l'adsorbant. L'équation (II.20) peut être linéarisée en prenant l'expression logarithmique :

$$\text{Log}Q_e = \text{Log}K_F + \left(\frac{1}{n}\right) \text{Log}C_e \quad (\text{II.21})$$

A partir des données expérimentales K_F et n ont été déterminées à partir des pentes et de l'ordonnée à l'origine des droites obtenues en traçant $\text{Log}Q_e$ en fonction de $\text{Log}C_e$. K_F est une constante liée à la capacité d'adsorption. C_e est souvent exprimée en mg/L et Q_e en mg/g. La relation entre K_F et la capacité maximale d'adsorption (Q_{\max}) est donnée par :

$$K_F = \frac{Q_{\max}}{C_0^n} \quad (\text{II.22})$$

La constante n (adimensionnelle) permet d'avoir une indication sur l'intensité de l'adsorption. Il est généralement admis (Allahdin, 2014) que des faibles valeurs de n ($0,1 < n < 0,5$) sont caractéristiques d'une bonne adsorption, alors que des valeurs plus élevées révèlent des adsorptions modérées ($0,5 < n < 1$) et faible si $n > 1$. La constante « n » est très souvent remplacée par « $1/n$ » comme le facteur d'hétérogénéité.

III.2.5. Etude thermodynamique

La réaction hétérogène à l'interface « solide-liquide » conduit à un équilibre entre une réaction d'adsorption et une réaction inverse de désorption. Ce phénomène est contrôlé par la thermodynamie. Ces réactions font intervenir dans une première étape une activation qui conduit à la formation de réactifs intermédiaires. Elles nécessitent généralement, avant de former des complexes stables, un apport d'énergie supplémentaire appelée énergie d'activation.

III.2.5.1. Energie d'activation de processus d'adsorption

L'énergie d'activation peut être déterminée à partir de l'équation d'Arrhenius :

$$\mathbf{Ln}(k) = \mathbf{Ln}(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (\text{II.23})$$

où k la constante de vitesse, obtenue à partir de modèle d'adsorption choisi, A et E_a sont respectivement le facteur d'Arrhenius et l'énergie d'activation ; R et T sont respectivement la constante des gaz parfaits $8,314\text{J}/(\text{mol.K})$ et la température absolue ($^{\circ}\text{K}$). L'énergie d'activation est obtenue à partir de la pente de la droite obtenue en traçant $\mathbf{Ln}(k)$ versus $1/T$. L'enthalpie (ΔH_a) et l'entropie (ΔS_a) des réactions d'activation sont déterminées en utilisant l'équation d'Eyring :

$$\mathbf{Ln}\left(\frac{k}{T}\right) = \mathbf{Ln}\left(\frac{k_B}{h}\right) - \frac{\Delta H_a}{RT} + \frac{\Delta S_a}{R} \quad (\text{II.24})$$

où k_B est la constante de Boltzmann ($1,38063 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), h est la constante de Planck ($6,62606957 \cdot 10^{-34} \text{ J S}$). La pente et l'ordonnée à l'origine de la droite obtenue en traçant $\mathbf{Ln}(k/T)$ en fonction de $1/T$, ont été utilisées pour calculer les paramètres thermodynamiques ΔH_a et ΔS_a .

L'énergie libre d'activation de Gibbs (ΔG_a) peut être exprimée en fonction de l'enthalpie et de l'entropie d'activation par l'équation suivante :

$$\Delta G_a = \Delta H_a - T\Delta S_a \quad (\text{II.25})$$

III.2.5.2. Détermination des grandeurs thermodynamiques de la réaction d'adsorption

L'état d'équilibre de la réaction d'adsorption est caractérisé par le coefficient K_D de distribution du soluté en équilibre entre la solution (phase liquide) et l'adsorbant (phase solide). A l'équilibre K_D est donné par le rapport :

$$K_D = \frac{C_{ads}}{C_{eq}} \quad (\text{II.26})$$

C_{ads} représente la quantité de soluté adsorbée sur la brique à l'équilibre et C_{eq} la concentration de soluté en solution à l'équilibre (Allahdin, 2014).

Les grandeurs thermodynamiques ΔH° variation de l'enthalpie standard, ΔS° variation de l'entropie standard et ΔG° variation d'énergie libre de Gibbs de la réaction d'adsorption de chaque PE sur la brique sont liés au coefficient de distribution de l'équation de Van't Hoff:

$$\mathbf{Ln}K_D = -\frac{\Delta H^{\circ}}{RT} + \frac{\Delta S^{\circ}}{R} \quad (\text{II.27})$$

Les interceptions de la droite obtenue en traçant $\mathbf{Ln}K_D$ en fonction de $1/T$, permettent de déterminer les enthalpies (ΔH°) et les entropies (ΔS°) des différentes réactions entre solutés

étudiés et brique modifiée dans l'eau. Ces deux grandeurs permettent ensuite de calculer l'énergie libre de Gibbs Helmholtz ΔG° à partir de l'équation suivante:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Les données énergétiques obtenues renseignent sur la faisabilité de la réaction d'adsorption d'un point de vue thermodynamique

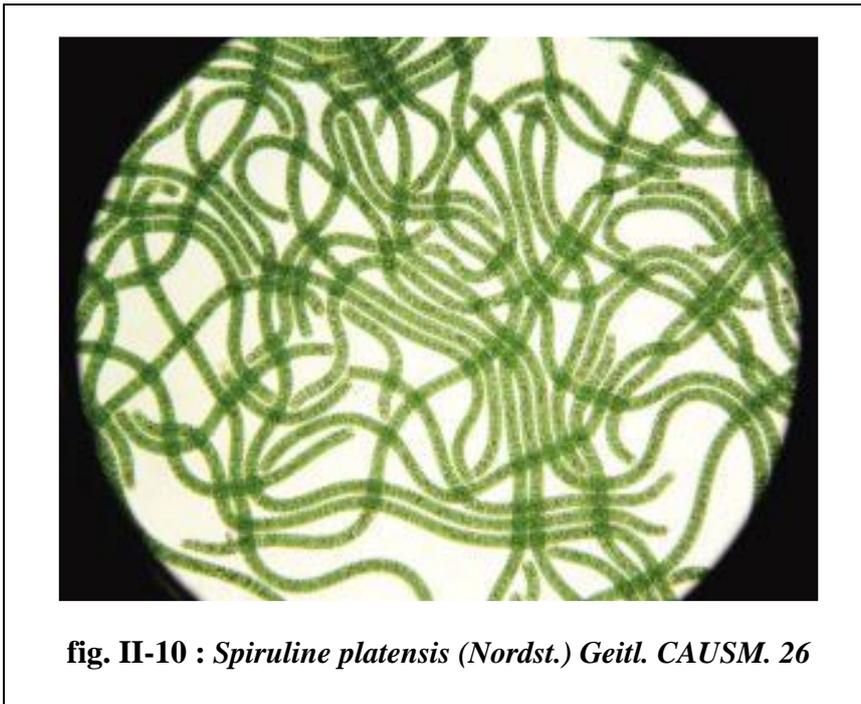
III.3. Bioremédiation par algue

Une autre technique a été étudiée : le traitement par les algues, appelée aussi la bioremédiation. Une étude préalable a été menée avec un collègue biologiste (Tudor Popescu) afin de choisir les espèces qui ont un fort potentiel d'élimination des PE. L'algue retenue pour l'étude de bioremédiation est *Spiruline platensis*.

III.3.1. Algue utilisée : *Spirulina platensis*

La *Spiruline platensis* (Nordst.) Geitl. souche CALU-835 a été sélectionnée dans un étang dans la région d'Ungheni, près du village de Nicolaevca, en République de Moldova. Il est à noter que les échantillons prélevés dans l'étang montrent que le développement algal est presque en monoculture. Par conséquent, il était facile de choisir une souche presque pure. Pendant l'échantillonnage, absolument tous les filaments *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. CALU-835 a été enroulé.

Son aspect est un filament bleu-vert, spiralé, d'une longueur d'environ 0,1 mm (fig. II-10). Les spirulines vivent dans une eau à la fois salée et alcaline.



III.3.2. Culture de la *Spiruline*

La *Spiruline* vit dans des eaux chaudes, salées et alcalines. Elle se développe bien lorsque la température de l'eau se situe entre 20 et 40 °C, et peut survivre dans des eaux plus chaudes jusqu'à 60 °C. Généralement, elle croît dans des petites étendues d'eau comme les lacs. La salinité de l'eau doit être d'au moins 10 g/L, mais peut s'élever jusqu'à 200g par litre. Malgré cette forte adaptation à la salinité, la spiruline n'est pas une algue marine. Elle ne contient d'ailleurs qu'extrêmement peu de sel et pratiquement pas d'iode. Le degré d'alcalinité de l'eau dans laquelle se développe la *Spiruline* a un pH qui se situe entre 8,5 et 11 (l'eau douce a un pH ~7). Cette grande alcalinité entrave la prolifération des micro-organismes. Les eaux dans lesquelles la spiruline croît sont donc des eaux très propres.

Pour cette étude, la *Spiruline* a été purifiée et reproduite en laboratoire. Les milieux de culture de *Spiruline* dans notre laboratoire sont réalisés dans les conditions de température est de 23-27 °C et d'éclairage assurées 24/24 heures. L'environnement optimal pour le développement de la souche est le milieu Gusev qui a la composition suivante: NaHCO₃ -16,8 g/L; NaNO₃ -2,5 g/L; K₂HPO₄*3H₂O -0,5 g/L; K₂SO₄ -1g/L; NaCl -1g/L; MgSO₄ * 7H₂O - 0,2 g/L; CaCl₂ * 6H₂O - 0,04 g/L; FeSO₄ -0,01 g/L; EDTA -0,08 g/L; Solution de micronutriments - 4 ml à pH 9,5.

L'utilisation de la biomasse d'algues en culture libre comporte quelques inconvénients incluant la petite taille des particules d'algues, la faible résistance et la difficulté de séparer la

biomasse et les effluents. Pour pallier à ces problèmes, l'immobilisation des algues dans les perles d'alginate est utilisée (Popescu, 2016). Dans nos expériences, nous avons choisi d'immobiliser les algues dans des gels naturels obtenus à partir d'algues brunes pour le respect de l'environnement. Cet extrait est un produit organique très populaire et économiquement avantageux. Nous avons choisi de travailler avec Na-alginate, considérée parmi les gels les plus couramment utilisés tels que l'alginate et le carraghénane.

La culture et l'immobilisation des algues a été effectuée avec l'aide du collègue biologiste Tudor Popescu.

III.3.3. Test de bioremédiation

Dans le but de mener à bien cette étude sur la faisabilité d'élimination des PEs et du comportement de la spiruline dans les eaux contaminées, trois séries d'expériences ont été réalisées dans différents milieux :

- ✚ Témoign ;
- ✚ *Spiruline platensis* libre (2g/l)
- ✚ *Spiruline platensis* immobilisé (2g/l).

Les différents milieux ont été dopés avec une concentration de 200 μ L de chacun des étalons standards des PEs, ensuite, les solutions ont été réparties dans une quarantaine d'erlenmeyers. Deux types de milieu d'étude ont été développés avec la dispersion en culture libre et la dispersion immobilisés de la *Spiruline platensis* (fig. II-11).



fig. II-11 Milieux d'étude de la bioremédiation par la *Spiruline*

Pour le suivi cinétique, trois échantillons ont été prélevés chaque jour afin de quantifier les PE résiduels. D'abord, chacune des solutions a été filtrée puis les PE ont été extraits par LLE.

La LLE a été réalisée par ajout de 10 ml de dichlorométhane suivi d'une agitation de 5 min. Ensuite, la fraction organique est séparée par décantation. Ce processus est répété deux fois et suivi d'une double extraction avec 20 ml d'hexane. Toutes les fractions organiques sont rassemblées dans un tube en pointe. Les éventuelles traces d'eau dans l'extrait sont éliminées par l'ajout de Sulfate de Sodium (Na_2SO_4). Enfin, les extraits sont préconcentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif et sous flux d'azote afin d'obtenir un volume final de 100 μL pour l'analyse par HPLC-DAD.

En conclusion notre travail porte sur deux axes de recherche :

Le premier axe est l'optimisation et la validation de la SPE-GC/MS pour la détection et la quantification de 13 PEs dans des différents sites d'étude en Tunisie et en France.

Le deuxième est l'étude de faisabilité d'éliminations de quelques PEs par adsorption sur des résidus de brique modifiée et par bioremédiation par algue.

Chapitre III Quantification des PEs dans les milieux aquatiques

I- Développement de la méthode analytique

II- Performances de la méthode analytique

III- Concentration des PEs dans les milieux naturels

L'analyse des PEs sélectionnés (tab. II-1) présents à l'état de traces dans les matrices aqueuses environnementales a nécessité le développement d'une méthode d'extraction effective pour l'ensemble des molécules étudiées puis l'optimisation de l'analyse par GC-MS. L'ensemble de ces développements a abouti à la mise en œuvre d'une méthode analytique multi-résidus.

I. Développement de la méthode analytique

Le développement de la méthode analytique pour la quantification simultanée de plusieurs PEs présent dans les milieux aquatiques, nécessite l'optimisation des conditions opératoires de l'analyse par GC/MS et l'extraction SPE.

I.1. Analyse par GC/MS

La GC/MS est la technique la plus utilisée pour une analyse multi-résiduelle des PEs. Pour avoir une meilleure séparation et sensibilité, plusieurs paramètres doivent être optimisés à savoir la température d'injection et la réaction de dérivation des PEs.

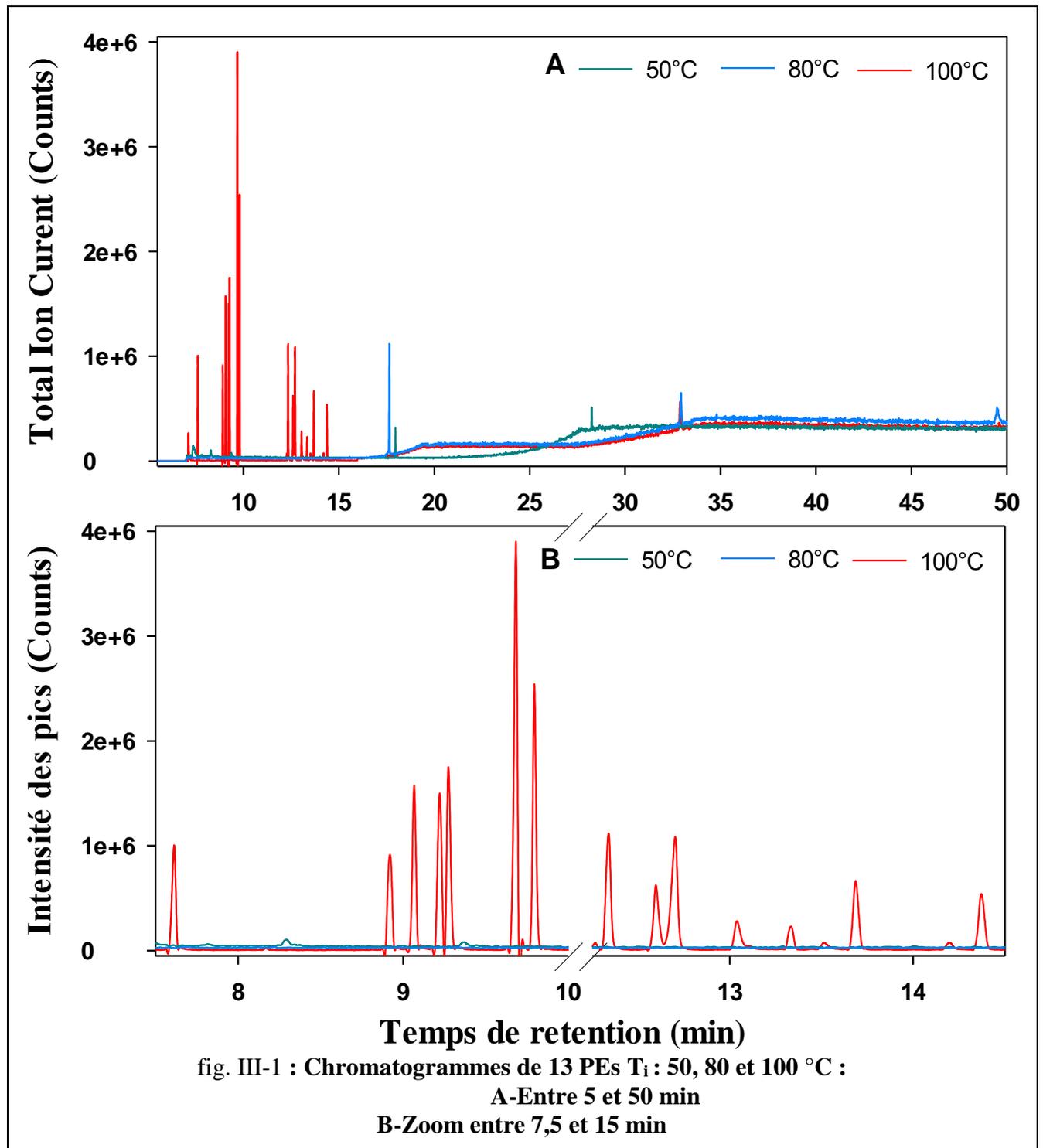
I.1.1. Optimisation de la température initiale

La température initiale joue un rôle important dans le développement de l'analyse des PEs par GC-MS. Elle a été établie pour permettre d'évaporer rapidement du solvant sans perte des analytes.

Pour étudier l'effet de cette température, trois expériences à 50 °C, 80 °C et 100 °C ont été réalisées en mode FS en utilisant 5 µg/mL de solution des standards de PEs.

Les chromatogrammes obtenus aux températures initiales de 50, 80 et 100 °C (fig. III-1) permettent de conclure que la meilleure détection a été obtenue à 100 °C. Pour cette raison, la programmation de la température a été fixée comme suivant :

- ✚ Maintien de la température durant 2 min à 100°C
- ✚ Montée en température à une vitesse de 5°C/min jusqu'à atteindre 250 °C
- ✚ Montée en température à une vitesse de 3°C/min jusqu'à atteindre 300 °C
- ✚ Maintien de la température à 300°C durant 2,33 min.



I.1.2. Dérivation

Pour augmenter la volatilité et la stabilité thermique, chaque groupement hydroxyle des PEs a subi une dérivation en utilisant BSTFA catalysée avec 1% de TMCS (50 μ L de BSTFA, 1% de TMCS).

La dérivation totale dépend de la température, la durée de la réaction et aussi le temps de stabilisation. Au cours de cette étude la dérivation totale a été optimisée.

Pour un meilleur compromis pour la dérivation de l'ensemble des PEs sélectionnés le mélange doit être chauffé à 65 °C (Thurman et al., 2013).

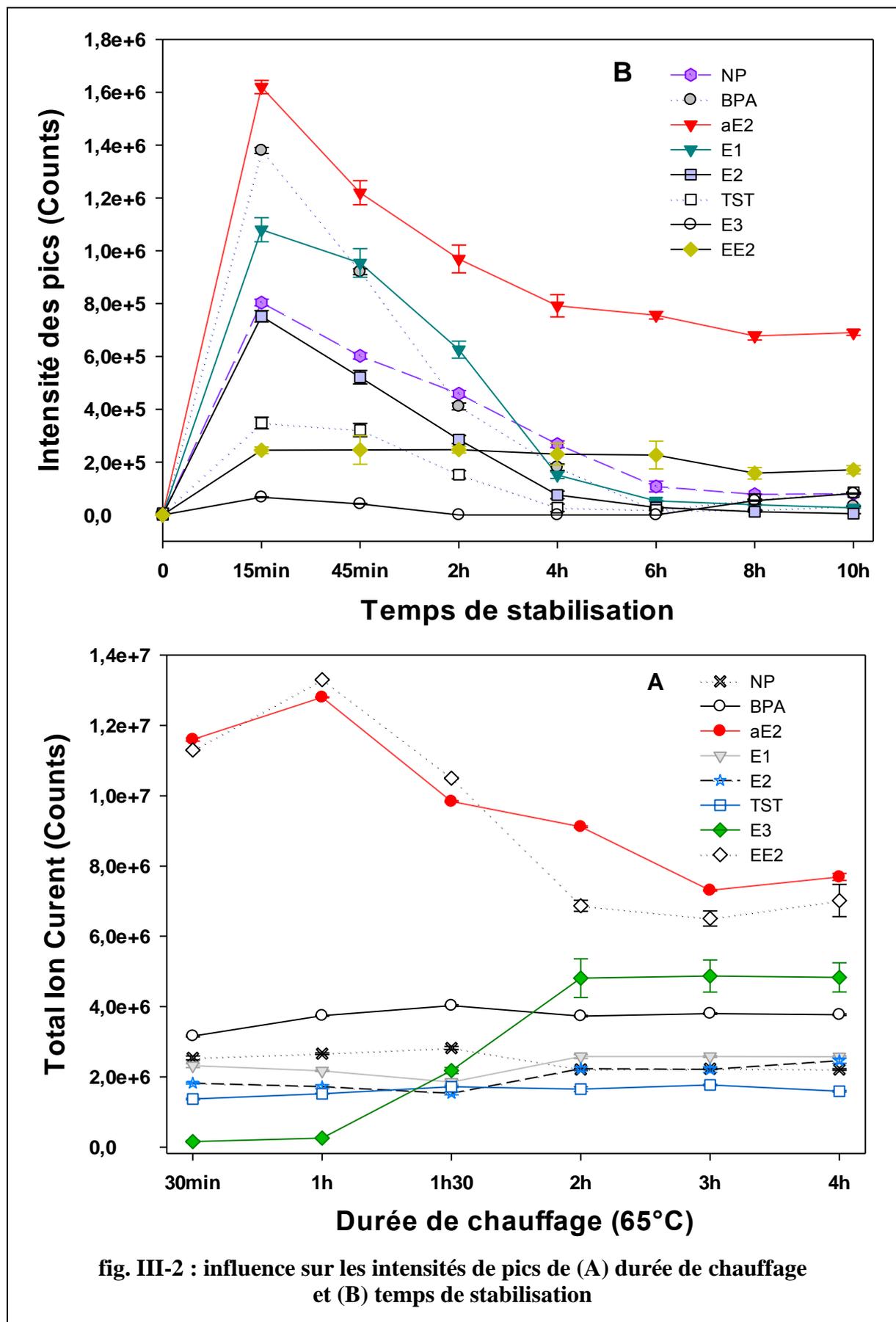
L'influence du temps de chauffage a été étudiée pour obtenir la durée optimale du chauffage. Des durées de chauffage de 30 min, 1 h, 1 h 30 min, 2 h, 3 h et 4 h ont été effectuées pour la plupart des PEs (fig. II.2.B). Les résultats ont permis de préciser les conditions optimales de chauffage de la solution. La meilleure dérivation a été obtenue pour une durée de chauffage de 2h à 65 °C, à l'exception d'EE2 et α E2 dont une meilleure détection a été obtenue en chauffant pendant 1h. Cependant, ces deux composés (EE2 et α E2) présentent également une forte intensité de détection lors du chauffage pendant 2h. La durée de chauffage de 2h a été validée.

Le temps de stabilisation après chauffage peut également influencer significativement la détection en GC-MS. Une série de test a été effectuée pour optimiser le temps de stabilité.

Après le chauffage à 65 °C pendant 2h, avant l'analyse GC-MS, les mélanges ont été refroidis à la température ambiante à différentes durée : 0 min, 15 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h et 10h (fig. II.2.A). Pour l'ensemble des composés choisis, les résultats permettent de conclure que le temps de stabilité optimale après chauffage est de 15 min de refroidissement à la température ambiante.

En conclusion les conditions optimales pour une dérivation simultanée de ces PEs sont :

- ✚ chauffage à 65 °C pendant 2 h
- ✚ maintenir à température ambiante pendant 15 min.



I.1.3. Méthodologie expérimentale

Pour chaque composé, le spectre de masse a été obtenu en injectant des solutions individuelles des stéroïdes en mode FS. L'ion majoritaire du spectre de masse ainsi obtenu a ensuite été retenu pour la quantification. Un second ion (choisi parmi les plus abondants du spectre de masse) a été utilisé pour confirmer l'attribution du pic. Après avoir déterminé ces deux ions, la détection des PEs par la GC/MS a été réalisée en mode SIS pour améliorer la sensibilité et pour une identification plus spécifique.

tab. III-1 : Masse moléculaire (Mw), masse moléculaire de dérivé triméthylsilyle (Mw-TMS) correspondant, temps de rétention (TR) et les ions caractéristiques de chaque PE étudié.

Composés	Mw (g/mol)	Mw-TMS (g/mol)	TR (min)	Ions de quantification (m/z)
4-nonylphenol	220	292	7,61	179; 292
Bisphenol F	200	344	8,92	344; 343
Bisphenol E	214	394	9,06	369
Bisphenol A	228	372	9,27	357; 358
Bisphenol C	256	400	9,68	386; 400
Bisphenol G	312	456	9,7	441; 456
17α-estradiol	272	416	12,33	282; 342; 416
17α-ethynylestradiol	296	440	12,41	425; 285
Estrone	270	342	12,59	257; 342;343
17β-estradiol	272	416	12,7	342;416
Testosterone	288	360	13,24	129;226;345
Estriol	288	504	14,3	311;386;504
Progesterone	314	-	14,64	124;299;314

I.2. Extraction sur phase solide (SPE)

La SPE est une méthode d'extraction qui permet à la fois d'extraire, de purifier et de concentrer des composés organiques présents dans des matrices aqueuses. Elle a été choisie pour l'analyse des composés PEs recherchés dans cette étude.

La mise au point de cette technique a consisté à l'optimisation :

- ✚ du choix de la cartouche (nature de l'adsorbant)
- ✚ du volume et le pH de l'échantillon
- ✚ de la composition du solvant d'élution

Les tests ont été réalisés sur 7 molécules représentatives des classes chimiques auxquelles appartiennent les 13 produits sélectionnés.

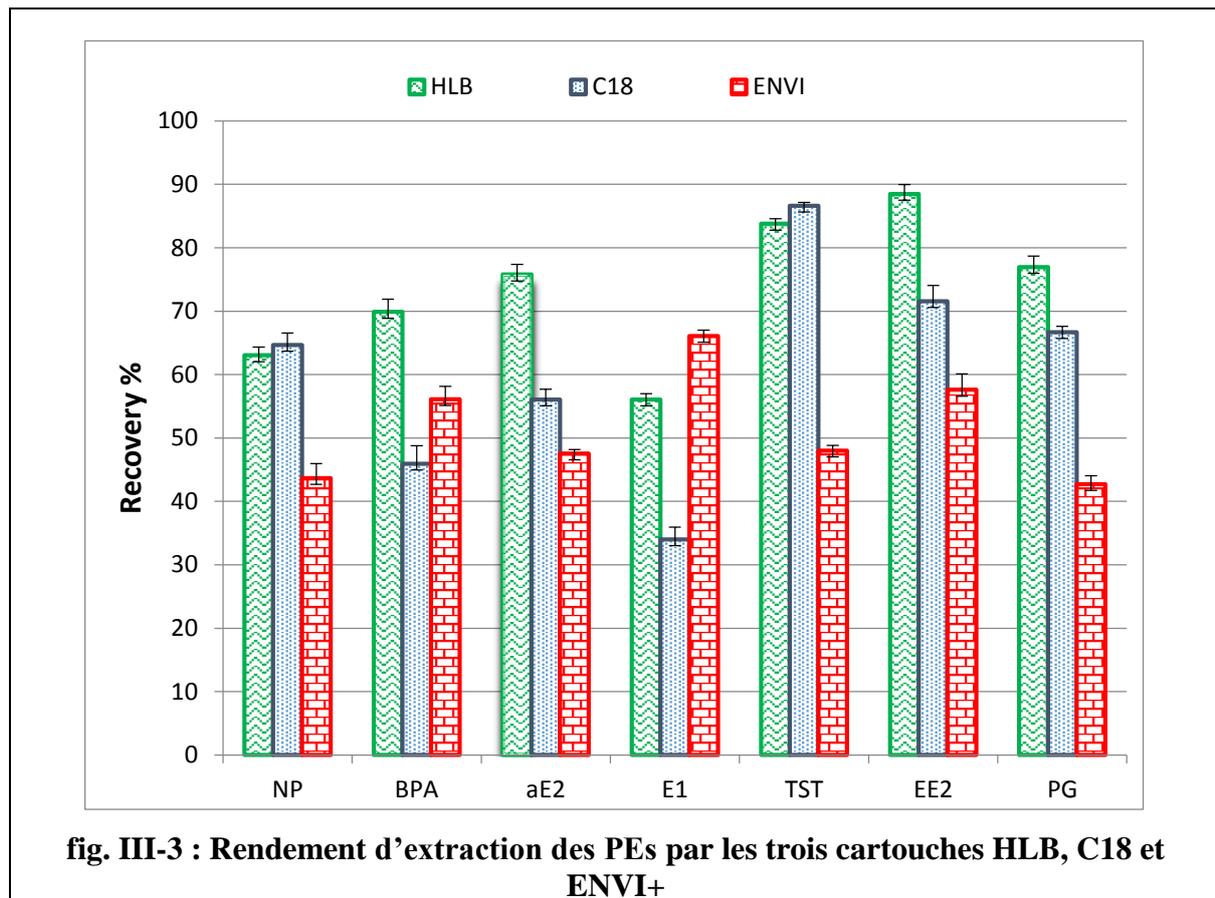
I.2.1. Choix de l'adsorbant

Les PEs sélectionnés présentent des solubilités dans l'eau (tab. I-1) variant de quelques mg/L à plusieurs g/L. La majorité d'entre eux sont faiblement lipophiles. Certains possèdent un caractère acide, d'autres sont basiques. Etant donné la diversité des propriétés physico-chimiques des composés étudiés, l'efficacité de trois cartouches d'extraction présentant des propriétés de rétention différentes ont été choisies :

- ✚ Supel-Select HLB
- ✚ Supelclean ENVI+
- ✚ Supelclean LC-18

Pour la suite de ce travail le pH de la solution a été fixé à 7, le volume de chargement de l'échantillon est 500 mL. Le solvant d'élution utilisé a été composé de 10 mL de l'éthylacetate et l'acétone. Les résultats (fig. III-3) correspondant au meilleur rendement sont obtenus avec les cartouches OASIS HLB pour l'ensemble des molécules étudiées. Cependant nous pouvons remarquer que pour E1 la cartouche ENVI+ donne de meilleurs résultats que ceux obtenus avec OASIS HLB.

Dans ce travail nous nous sommes orientés vers l'utilisation de la cartouche OASIS HLB pour l'extraction des PEs étudiés.



I.2.2. Optimisation des conditions opératoires par plan d'expériences

Pour optimiser les conditions d'extraction des PEs dans l'eau par la SPE avec le cartouche OASIS HLB préalablement sélectionné, nous avons eu recours à la méthodologie de la recherche expérimentale. Compte tenu de nombreux paramètres à étudier, les plans d'expériences représentent une alternative intéressante. En effet cet outil permet de modéliser les réponses d'un système à l'aide des polynômes empiriques d'ordre n postulé a priori. Cette technique possède également l'avantage de structurer la campagne expérimentale, afin de minimiser le nombre d'essais à réaliser et ainsi réduire le temps et le coût. La matrice de Doelhart a été employée.

Les principales propriétés sont :

- ✚ la distribution uniforme des points expérimentaux. Ces matrices d'expériences seront aussi utiles pour interpoler une réponse ; cette interpolation étant toujours de qualité constante puisque le réseau est uniforme,
- ✚ leur extension dans le domaine expérimental. En effet, si après une série d'expériences nous nous apercevons que la zone expérimentale la plus intéressante est plutôt située au voisinage du domaine choisi, nous pouvons définir un nouveau

domaine autour de l'un des points de la matrice de Doelhart et définir une nouvelle matrice qui comprend une partie des points déjà effectués,

- ✚ l'augmentation du nombre de facteurs en cours d'étude, il est toujours possible d'ajouter de nouvelles variables à étudier sans que la matrice ne perde de sa qualité,
- ✚ le nombre d'expériences peu élevé, le nombre minimal de points distincts N d'une matrice de Doelhart pour un nombre de facteurs k est $N = k^2 + k + 1$. (dans le cas présent $N = 13$ expériences).

Les niveaux de la variable indépendante (variables effectives U_i) ont été calculés selon les relations suivantes :

$$U_1 = 250 X_1 + 500$$

$$U_2 = \frac{4.44}{0.866} X_2 + 4.56$$

$$U_3 = \frac{3}{0.816} X_3 + 6$$

Pour les trois facteurs étudiés, la matrice d'expérience est obtenue avec au total de 15 expériences à des conditions différentes (tab. III-2).

tab. III-2 : Matrice d'expériences à 3 facteurs

N°Exp	X1	X2	X3
1	1,0000	0,0000	0,0000
2	-1,0000	0,0000	0,0000
3	0,5000	0,8660	0,0000
4	-0,5000	-0,8660	0,0000
5	0,5000	-0,8660	0,0000
6	-0,5000	0,8660	0,0000
7	0,5000	0,2887	0,8165
8	-0,5000	-0,2887	-0,8165
9	0,5000	-0,2887	-0,8165
10	0,0000	0,5774	-0,8165
11	-0,5000	0,2887	0,8165
12	0,0000	-0,5774	0,8165
13	0,0000	0,0000	0,0000
14	0,0000	0,0000	0,0000
15	0,0000	0,0000	0,0000

A la suite de ce traitement des données les taux de récupération sont obtenus (tab. III-3).

tab. III-3 : plan d'expériences et taux de récupération.

N°EXP	Plan d'expériences			Résultats Y (%)						
	U1	U2	U3	NP	BPA	α E2	E1	TST	EE2	PG
1	750,0	4,56	6	77,65	72,55	60,20	40,92	58,54	55,56	64,47
2	250,0	4,56	6	97,78	83,57	78,01	68,86	72,57	89,67	45,46
3	625,0	9,00	6	41,48	80,45	89,95	89,03	44,04	47,99	35,93
4	375,0	0,12	6	30,43	84,30	97,07	97,71	33,06	90,42	19,21
5	625,0	0,12	6	35,45	96,22	97,77	92,16	40,76	92,83	31,60
6	375,0	9,00	6	27,26	69,71	77,35	82,75	26,50	72,03	32,76
7	625,0	6,04	9	57,04	79,91	97,41	94,30	28,81	90,92	34,40
8	375,0	3,08	3	89,11	70,79	63,11	42,09	58,15	26,07	54,76
9	625,0	3,08	3	85,23	88,36	93,32	71,17	26,45	56,83	14,16
10	500,0	7,52	3	31,38	71,82	89,41	44,11	27,04	81,83	15,99
11	375,0	6,04	9	37,92	82,68	75,36	88,51	40,79	90,42	31,72
12	500,0	1,60	9	40,18	93,17	71,78	50,21	78,31	46,90	7,28
13	500,0	4,56	6	85,45	82,14	79,11	64,29	61,74	82,43	93,38

Des répliques au niveau central des variables sont effectuées afin de valider le modèle au moyen d'une estimation de la variance expérimentale. Pour estimer l'erreur expérimentale, l'expérience au centre (expérience N° 13) a été réalisée en triple (tab. III-4).

tab. III-4 : Expériences répétées au centre du domaine choisi (Exp N°13)

V échantillon (mL)	R _{élution} (V/V)	pH	Résultats Y (R %)								
			NP	BPA	α E2	E1	TST	EE2	PG	NP	BPA
500	4,56	6	85,45	82,14	79,11	64,29	61,74	82,43	93,38	85,45	82,14
500	4,56	6	86,74	83,63	77,23	66,35	61,52	82,17	92,46	86,74	83,63
500	4,56	6	85,45	82,14	79,11	64,29	61,74	82,43	93,38	85,45	82,14

Selon ces résultats, les coefficients du modèle polynomial ont été calculés à l'aide du logiciel NEMROD (tab. III-5).

tab. III-5 : Coefficients polynomiaux

	Coefficients polynomiaux						
	NP	BPA	α E2	E1	TST	EE2	PG
b ₀	85,124	83,662	78,600	64,916	61,275	82,711	93,546
b ₁	-0,724	1,927	3,743	-2,532	-5,815	-7,322	1,958
b ₂	-6,382	-9,409	-2,239	0,222	-9,192	-1,541	4,924
b ₃	-14,406	5,058	-0,260	15,441	7,402	12,962	-2,349
b ₁₁	2,590	-5,600	-9,494	-10,026	4,282	-10,097	-38,585
b ₂₂	-69,493	0,542	19,081	37,337	-35,01	-5,827	-72,038
b ₃₃	-25,743	-2,543	2,297	-6,606	-19,342	-21,842	-73,080
b ₁₂	5,307	-0,683	6,874	6,834	5,679	-15,270	-5,331
b ₁₃	12,206	-12,211	-7,425	-16,678	10,069	-13,129	28,390
b ₂₃	19,121	-0,743	12,517	54,722	-33,861	3,911	19,456

Pour déterminer les conditions optimales de l'extraction des PEs en phase solide, nous avons tracé l'évolution du rendement d'extraction en fonction du rapport d'élution, du volume de l'échantillon et du pH de l'échantillon (fig. III-4). Nous avons rassemblé les courbes des isoréponses du rendement d'extraction.

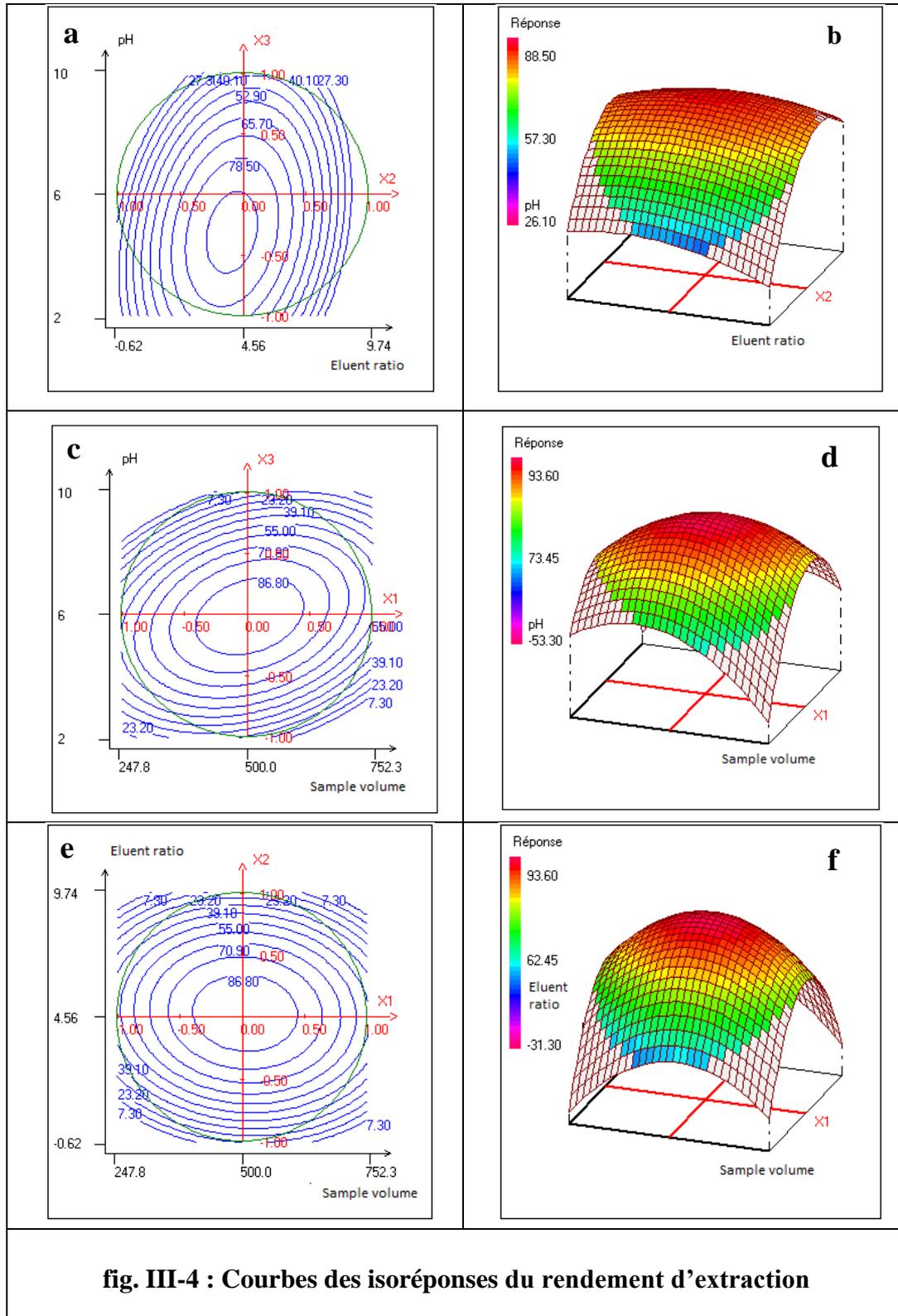


fig. III-4 : Courbes des isoréponses du rendement d'extraction

- (a) Courbe isoréponse du rendement d'extraction du Nonylphénol dans le plan (R_{el} , V_{ech}).
- (b) Variation du taux de récupération du Nonylphénol en fonction du rapport d'élution et du volume de l'échantillon.
- (c) Courbe isoréponse du rendement d'extraction du Nonylphénol dans le plan (R_{el} , pH).
- (d) Variation du taux de récupération du Nonylphénol en fonction du volume d'élution et du pH d'échantillon.
- (e) Courbe isoréponse du rendement d'extraction du Nonylphénol dans le plan (V_{ech} , pH).
- (f) Variation du taux de récupération du Nonylphénol en fonction du volume d'échantillon et du pH d'échantillon.

L'analyse des courbes d'isoréponse au domaine expérimental choisi délimité par un cercle montre que la récupération maximale d'extraction a été obtenue lorsque 540,4 mL d'échantillon d'eau à pH 8 sont chargés sur la cartouche HLB puis élués avec 10 mL de mélange d'acétate d'éthyle / acétone (rapport 5,67 / 4,33 ; v : v).

II. Performances de la méthode analytique

Le protocole d'extraction basé sur la SPE suivi de l'analyse par GC/MS a été validé pour l'ensemble des 13 PEs sélectionnés. La sélectivité, la linéarité (R^2), la répétabilité, la reproductibilité, le rendement d'extraction (R%) ainsi que les limites de détection et quantification méthodologiques (LOD et LOQ) sont des paramètres à évaluer (Seifrtová et al., 2009 ; Jacobsen et al., 2004 ; Pamreddy et al., 2013):

- ✚ Sélectivité : elle a été confirmée car aucune interférence n'a été observée dans le blanc analytique par rapport aux échantillons d'eau dopée. De plus, les chromatogrammes des extraits présentaient une résolution chromatographique satisfaisante.

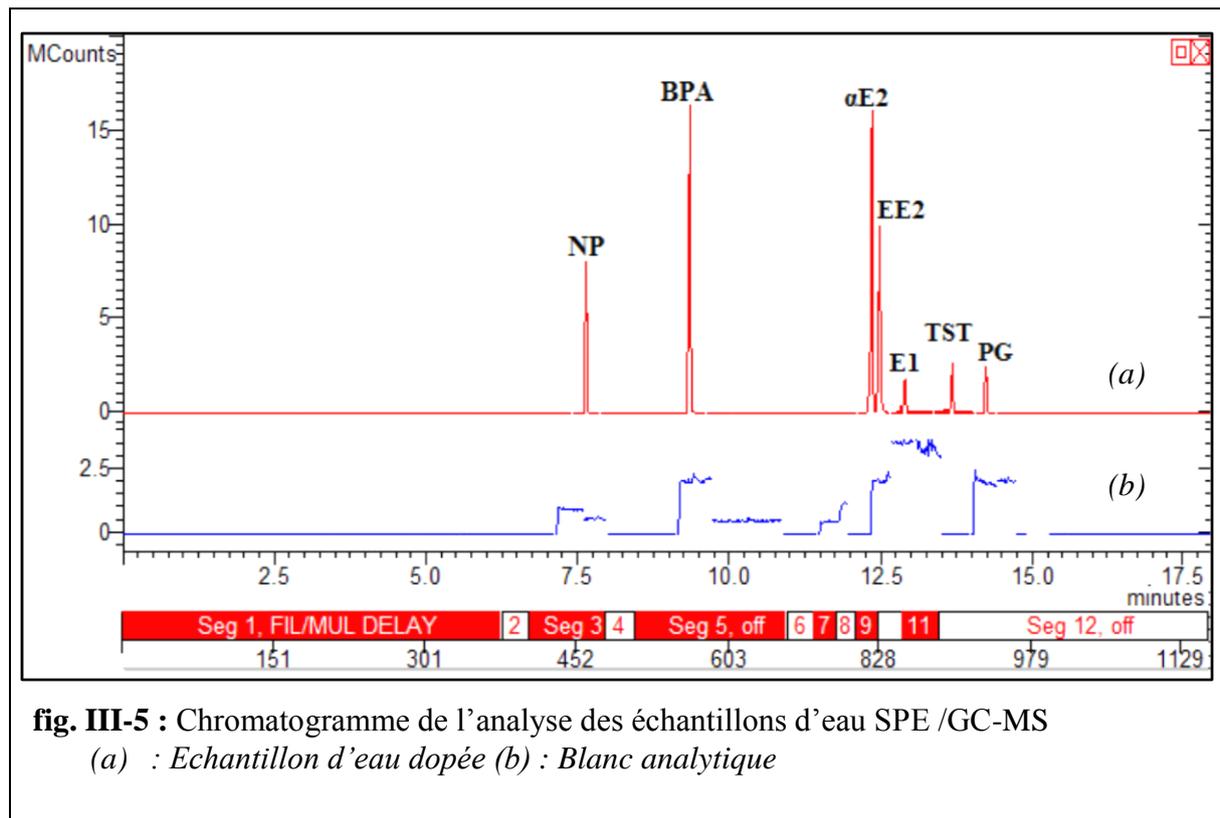


fig. III-5 : Chromatogramme de l'analyse des échantillons d'eau SPE /GC-MS
 (a) : Echantillon d'eau dopée (b) : Blanc analytique

- ✚ Linéarité : la gamme de linéarité a été effectuée pour les concentrations variant de 0,5 ng L⁻¹ (C1) à 500 ng L⁻¹ (C9) (avec 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 50 ; 75 ; 100 et 150 ng L⁻¹).
- ✚ Limites de détection et de quantification de la méthode (tab. III-6).
- ✚ Fidélité : elle est exprimée par la répétabilité, la reproductibilité et la fidélité intermédiaire :
 - Répétabilité : nous avons procédé à une analyse quotidienne en triplicata de 3 échantillons à différentes concentrations C2= 1 ng L⁻¹, C5= 50 ng L⁻¹ et C8= 150 ng L⁻¹. Elle est exprimée par le coefficient de variation (CV, %). Une méthode est dite répétable si les valeurs de coefficient de variation sont inférieures à 2%.
 - Reproductibilité : nous avons procédé à l'analyse par deux différents opérateurs en triplicata de 3 échantillons de concentration égale à C5= 50 ng L⁻¹. Elle exprimée par le coefficient de variation (CV, %). Une méthode est reproductible si les valeurs de coefficient de variation sont inférieures à 2%.
 - Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) : nous avons procédé à l'analyse par le même opérateur avec la même concentration égale à C5= 50 ng/L sur une durée de 1j, 7j et 14j. Elle est exprimée par le coefficient de variation (CV, %). Une méthode est reproductible si les valeurs de coefficient de variation sont inférieures à 2%.
- ✚ Rendement d'extraction : nous avons procédé à l'analyse en triplicata de 3 échantillons à différentes concentrations C2= 1 ng L⁻¹ , C5= 50 ng L⁻¹ et C8= 150 ng L⁻¹.

Les résultats de la validation de la méthode SPE sont satisfaisants (tab. III-6), pour toutes les substances, la linéarité de la méthode, exprimé par le coefficient de corrélation (R^2) $> 0,99$.

tab. III-6 : Performances de la méthode analytique développée.

PEs	R ²	Fidélité									LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ngL ⁻¹)
		reproductibilité		Fidélité intermédiaire				Répétabilité				
		R (%)	CV (%)	1j	7j	14j	CV (%)	10 ng L ⁻¹	30 ng L ⁻¹	50 ng L ⁻¹		
				R (%)				R (%) and CV (%)				
NP	0,997	93,5	0,99	93,5	92,6	92,5	0,60	93,5; 0,99	93,9; 0,78	94,6; 0,57	0,33	1,0
BPA	0,997	92,4	0,87	92,4	91,2	92,8	0,93	92,4; 0,87	93,5; 0,98	93,9; 0,42	0,33	1,0
αE2	0,998	98,7	0,80	98,7	99,2	98,4	0,41	98,7; 0,80	99,2; 1,02	997; 0,99	3,33	10,0
E1	0,996	91,9	0,58	91,9	92,5	90,0	1,39	91,9; 0,58	92,4; 0,58	92,2; 1,17	3,33	10,0
EE2	0,998	92,9	0,55	92,9	93,4	91,8	0,88	92,9; 0,55	93,5; 1,23	93,9; 0,84	3,33	10,0
TST	0,995	97,5	1,16	97,5	98,8	97,9	0,67	97,5; 1,16	97,8; 0,87	97,9; 0,98	1,66	5,0
PG	0,997	95,3	0,86	95,3	94,3	96,7	1,29	95,3; 1,29	96,9; 0,96	97,3; 0,58	1,66	5,0

III. Concentration des PEs dans les milieux naturels

Les échantillons d'eau de surface ont été prélevés à la fois en France et en Tunisie. En Tunisie les échantillons proviennent de trois STEP, des eaux de puits et d'oued provenant de grand Tunis (fig. II-6). En France les sites d'études sont des eaux de six rivières localisées sur quinze sites au Nord de France (fig. II-5).

La détection des micropolluants organiques dans les différents échantillons nécessite une méthodologie d'analyse rigoureuse et une attention particulière afin d'éviter les risques de contamination.

III.1. Etat de contamination des sites sélectionnés en France

La concentration de chaque composé individuel détectée dans chaque site d'échantillonnage est présentée dans le tab. III-7. La concentration de chaque composé variait fortement d'un site à l'autre, une forte hétérogénéité a été observée entre les rivières du bassin versant de l'Escaut. Parmi les molécules phénoliques, le NP était le plus fréquemment détecté et suivi par le BPA. Et pour les hormones sélectionnées, la PG était la plus fréquemment détectée. Sa concentration variait de <LOQ à $10,9 \pm 0,5$ ng/L (Brebrières). Ces concentrations étaient dans le même ordre de grandeur que celles rapportées par Labadie et Budzinski (2005) dans la rivière Jalle d'Eysines près de Bordeaux (France) et dans le Mississippi (Zhang et al., 2016), mais légèrement supérieures à celles Mesurée dans la rivière Guangzhou, en Chine (Peng et al., 2008) (tab. III-8).

tab. III-7 : Concentration individuelle des PEs dans les quinze sites

Site d'étude	Concentration individuelle de chaque PE (ng L ⁻¹)												
	NP	BPF	BPE	BPA	BPC	BPG	αE2	EE2	E1	E2	TST	E3	PG
Aire sur LaLys	14,9±0,4	77,7±0,4	<1	38,8±0,2	<1	<1	<10	<10	<10	<10	<5	<10	6,1±0,1
Berchem	16,9±0,4	<1	<1	76,4±0,2	<1	10,3±0,1	<10	<10	70,2±0,1	<10	<5	<10	6,0±0,01
Brebieres	20,1±0,4	91,9±0,4	<1	286±2,0	24,26±0,4	<1	<10	<10	<10	<10	<5	<10	10,9±0,5
Crevecoeur	1,9±0,4	<1	<1	39,5±0,2	68,22±0,2	<1	<10	<10	116,2±0,4	<10	<5	<10	6,3±0,4
Don	20,3±0,4	<1	<1	51,7±0,3	<1	20,9±0,4	<10	<10	<10	<10	5,8±0,5	21,0±0,4	6,7±0,1
Erquinghem	8,1±0,5	<1	<1	27,7±0,2	<1	<1	<10	<10	<10	<10	6,5±0,4	70,7±0,1	<5
Ferin	3,6±0,1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	<10	<10	<10	5,4±0,5	<10	7,3±0,4
Frenes	15,5±0,5	<1	<1	11,8±0,3	<1	<1	<10	<10	<10	<10	<5	47,6±0,4	5,7±0,1
Jeumont	25,9±0,7	15,7±0,6	<1	42,5±0,1	<1	<1	<10	<10	<10	<10	5,8±0,4	<10	7,9±0,1
Neuville	7,4±0,7	<1	<1	11,9±0,1	<1	<1	<10	<10	<10	<10	<5	<10	<5
Nivelle	25,7±0,1	<1	<1	21,6±0,1	<1	<1	<10	<10	34,2±0,6	<10	<5	77,7±0,2	<5
Wambrechies	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	<10	<10	<10	<5	<10	<5
Warcoing	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<10	<10	<10	<10	<5	<10	<5
Wervicq	24,2±0,5	44,0±0,6	<1	<1	<1	<1	<10	<10	92,0±0,2	<10	<5	<10	<5
Zingem	9,2±0,1	<1	<1	6,8±0,1	<1	<1	<10	<10	<10	3,6±0,1	<5	<10	6,4±0,1

tab. III-8: La comparaison des concentrations des PEs détectées dans le Nord de la France-Belgique avec d'autres sites dans le monde.

PE	Rivières dans le nord de la France						Europe ^{a,b}	USA ^c	Chine ^d	Japan ^{e,a}
	Lys	Deûle	Scarp	Sensée	Scheldt	Sambre				
NP	15,7±0,7	10,2±0,8	22,9±0,7	3,6±0,5	8,5±0,4	25,9±1,3	<1-644	<1-40	36-33	51,40-144,1
BPF	40,6±0,7	<1	46,0±0,7	<1	<1	15,7±0,6	<1-180	-	-	-
BPA	22,2±0,4,0	25,9±0,3	153,8±1,0	<1	24,4±0,6	42,5±0,1	<1-66	<1-12	6-331	16,50-150,2
BPE	<1	<1	<1	<1	<1	<1	-	-	-	-
BPC	<1	<1	12,0±0,2	<1	11,4±0,1	<1	-	-	-	-
BPG	<1	20,9±0,4	<1	<1	10,3±0,1	<1	-	-	-	-
αE2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<2	<10-74	<10-2	-
EE2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<1	<10-1	<10-1	-
E1	30,7±0,3	<10	17,1±0,2	<10	31,1±0,2	<10	<0,40-33	<10-112	<10-65	17,1-44,5
E2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<0,10-3,60	<10-93	<10-2	2,6-7,7
TST	2,2±0,1	2,9±0,3	<5	5,4±0,5	<5	5,8±0,4	1,60-3,40	-	-	-
PG	2,0±0,0	3,3±0,1	5,4±0,1	7,3±0,1	4,1±0,1	7,3±0,1	-	-	-	-
E3	23,6±0,3	10,5±0,5	38,9±0,1	<10	7,9±0,4	<10	-	<10-51	<10-1	<0,2

Ref: (a) Guedes-Alonso et al., 2014 (b) Labadie and Budzinski, 2005 (c) Ibrahim et al., 2007 (d) Peng et al., 2008 (e) Furuichi et al., 2004

La moyenne de concentration d'E1 varie très fortement entre les six rivières étudiées. Cette variabilité pourrait s'expliquer par les différentes sources de contaminations locales situées à proximité du site d'échantillonnage. Elle peut aussi être liée à la densité de la population et aux pratiques agricoles ou industrielles environnantes.

Cela peut être dû à l'impact des apports de rejets urbain et les activités industrielles concentrées des grandes villes comme Lille, Douai et Cambrai. Pour la testostérone, la concentration est proche de la valeur LOQ pour l'ensemble des sites. Des résultats similaires ont été rapportés à Gran Canaria en Espagne (Guedes-Alonso et al., 2013).

III.1.1. Résidus des hormones

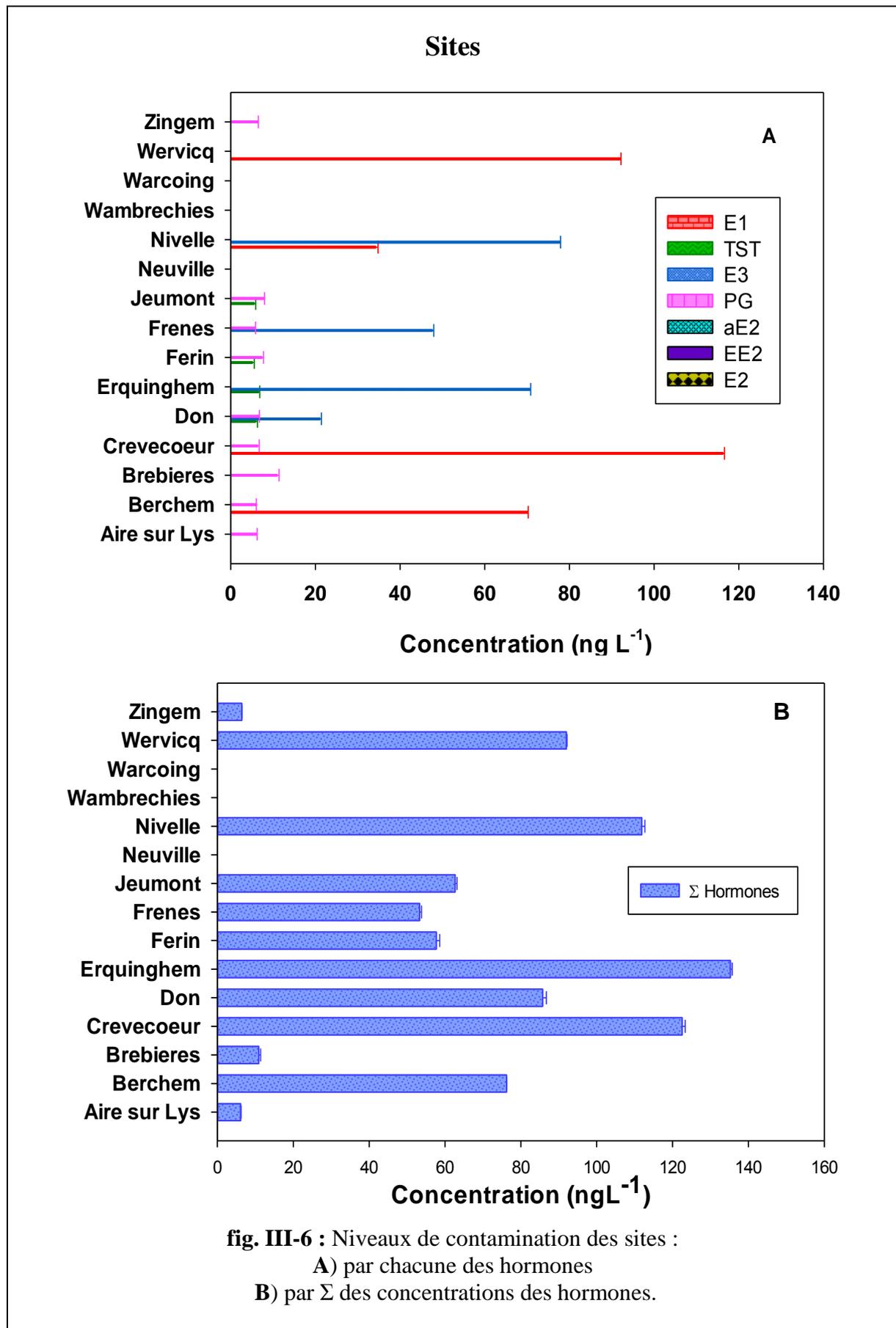
Nos résultats ont montré que le taux de E1 est plus élevé que celui des autres hormones stéroïdiennes avec un maximum détecté dans le site de Crèvecœur à $116,2 \pm 0,4 \text{ ng L}^{-1}$ (fig. III-6). E2 et α E2 ont été détectés à l'état de traces ($\leq 2 \text{ ng L}^{-1}$). Des observations similaires ont été rapportées dans la littérature (Net et al., 2015). Cela pourrait être dû aux instabilités d'E3, E2 et α E2 dans les eaux de surfaces. En effet, E3, E2 et α E2 ont été signalées comme substances instables en milieu naturel (Czajka and Londry, 2006).

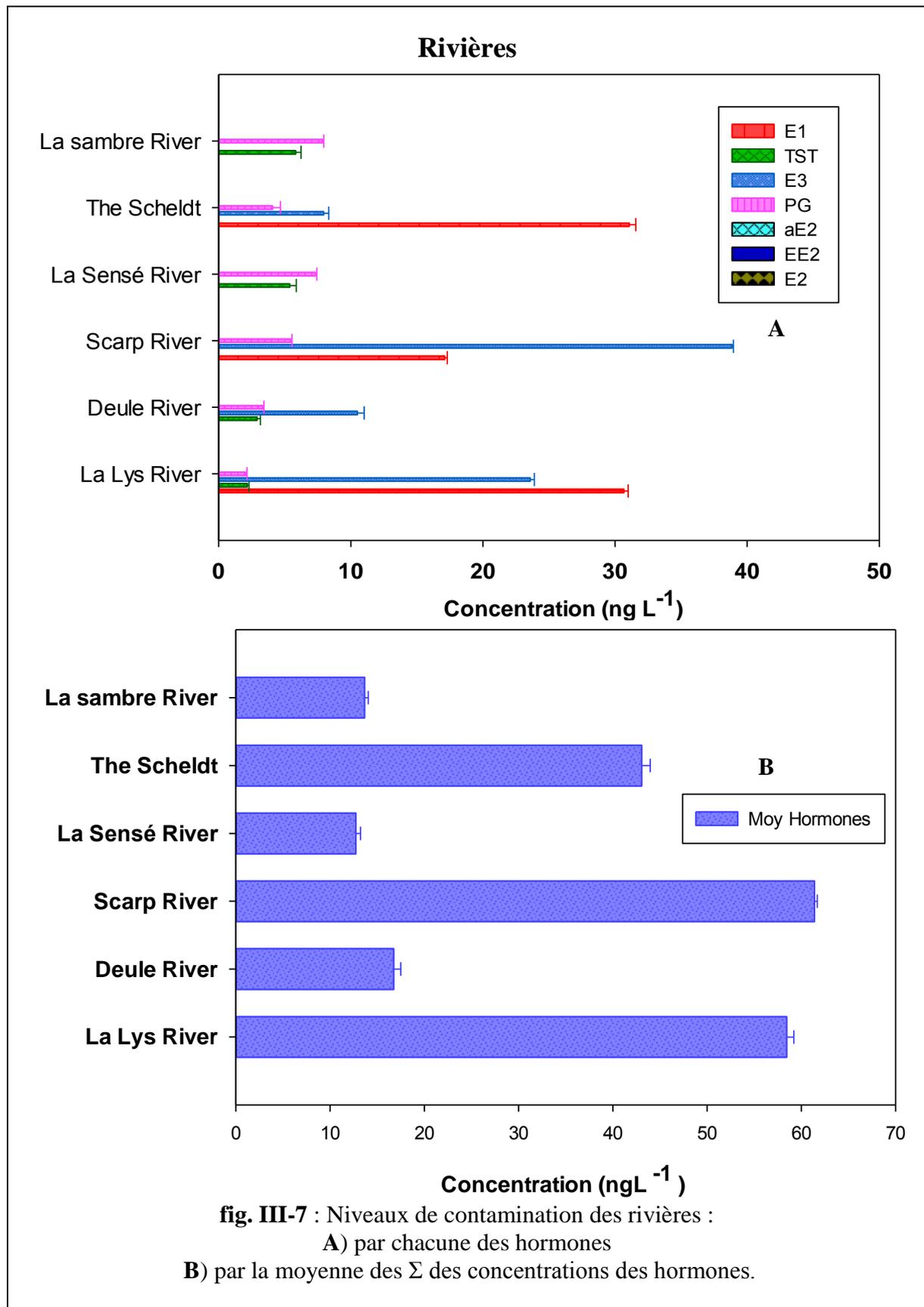
EE2 n'a été détecté dans aucun des sites. Cela peut être dû à la faible quantité consommée pour la contraception. Elle n'est utilisée qu'à des doses approximatives de $30 \mu\text{g}$ d' α EE2/femme/jour. À titre de comparaison, la production quotidienne d'œstrogènes naturels est proche de $150 \mu\text{g}$ /femme/jour et la production de progestérone varie de 3 à 30 mg / femme / jour (Labadie and Budzinski, 2005). Les raisons sont que l'E1 est plus stable que l' α EE2 et l'E2 (E2 > EE2 > E1) (Peng et al., 2008).

Les faibles concentrations de TST détectées dans nos sites peuvent être dues à son instabilité dans les eaux naturelles. En effet, une étude récente a rapporté que la TST se dégrade rapidement dans les eaux naturelles (Vulliet and Cren-Olivé, 2011). Certaines hormones ont été détectées à des concentrations relativement élevées et facilement quantifiables dans les six rivières étudiées (particulièrement sur les sites de Crèvecœur et Nivelles). Même si certaines molécules sont présentes à l'état de trace ou en dessous de la limite de détection elles pourraient constituer une menace pour les faunes aquatiques, ces molécules sont conçues pour être biologiquement actif à des faibles concentrations. De plus, ces molécules ont la capacité à se bioaccumuler dans les organismes vivants.

Pour mieux apprécier les taux de contaminations, nous avons présenté les résultats :

- ✚ Contaminations des sites par chacune des hormones (fig. III-6 A)
- ✚ Contaminations des sites par la somme additive des concentrations des hormones (fig. III-6 B)
- ✚ Contaminations des rivières par chacune des hormones (fig. III-7 A)
- ✚ Contaminations des rivières par la moyenne des sommes des concentrations des hormones (fig. III-7 B)





III.1.2. Résidus des contaminants phénoliques

NP est détecté d'une façon prédominante parmi les cinq composés phénoliques sélectionnés dans tous les échantillons. Le niveau de contamination est entre des valeurs inférieures à LOQ et $25,9 \text{ ngL}^{-1}$ (tab. III-7). Ces valeurs sont dans le même ordre de grandeur comparée à celles rapportées par Peng et al. (2008) (tab. III-8). Arnold et al. (2013) signalent, en Amérique du Nord, en Europe et en Asie, des concentrations élevées de BPA en milieu naturel pouvant atteindre respectivement 1900, 2970 et 4230 ngL^{-1} . Pour le site de Brebières, situé dans la rivière Scarpe, les résultats ont montré que la concentration maximale de BPA est de 286 ngL^{-1} (fig. III-9).

Pour les six rivières étudiées, les concentrations de BPA enregistrées sont proches à celles trouvées en Amérique du Nord (Arnold et al., 2013), mais supérieures à celles trouvées dans la rivière de Guangzhou, en Chine (Peng et al., 2008).

La dose journalière admissible (DJA) fixée par la Commission Européenne et la dose de référence (DRf) établie par l'Agence américaine pour la protection de l'environnement (US-EPA) est de $0,05 \text{ mg}$ de BPA /kg de poids corporel /jour. En raison de cette restriction, d'autres bisphénols (BPs) tels que BPF, BPE, BPC et BPG, considérés comme des substituts du BPA dans des applications industrielles commencent à être utilisés pour la production de résine époxy. Cependant, ces BPs ont montré une toxicité aiguë, modérée à légère et des effets oestrogéniques semblables à ceux du BPA (Gallart-Ayala et al., 2011).

BPF est détectable dans 26,66% des échantillons et sa concentration varie de $< \text{LOQ}$ à $91,9 \text{ ngL}^{-1}$. Ces concentrations sont inférieures à celles signalées en Rhénanie-du-Nord-Westphalie en Allemagne (Fromme et al., 2002).

Pour les autres BP, très peu d'informations ont été publiées. BPC et BPG ont été détectés dans seulement deux des sites étudiés avec une concentration maximale respectivement de $68,2$ et $20,9 \text{ ngL}^{-1}$ (tab. III-7). Les concentrations de BFE sont en dessous de LOQ pour tous les sites étudiés.

Pour mieux apprécier les taux de contaminations, nous avons présenté les résultats :

-  Contaminations des sites par chacune des composés phénoliques (fig. III-8A)
-  Contaminations des sites par la somme additive des concentrations des composés phénoliques (fig. III-8 B)
-  Contaminations des rivières par chacun des composés phénoliques (fig. III-9 A)

- ✚ Contaminations des rivières par la moyenne des sommes des concentrations des composés phénoliques (fig. III-9 B)

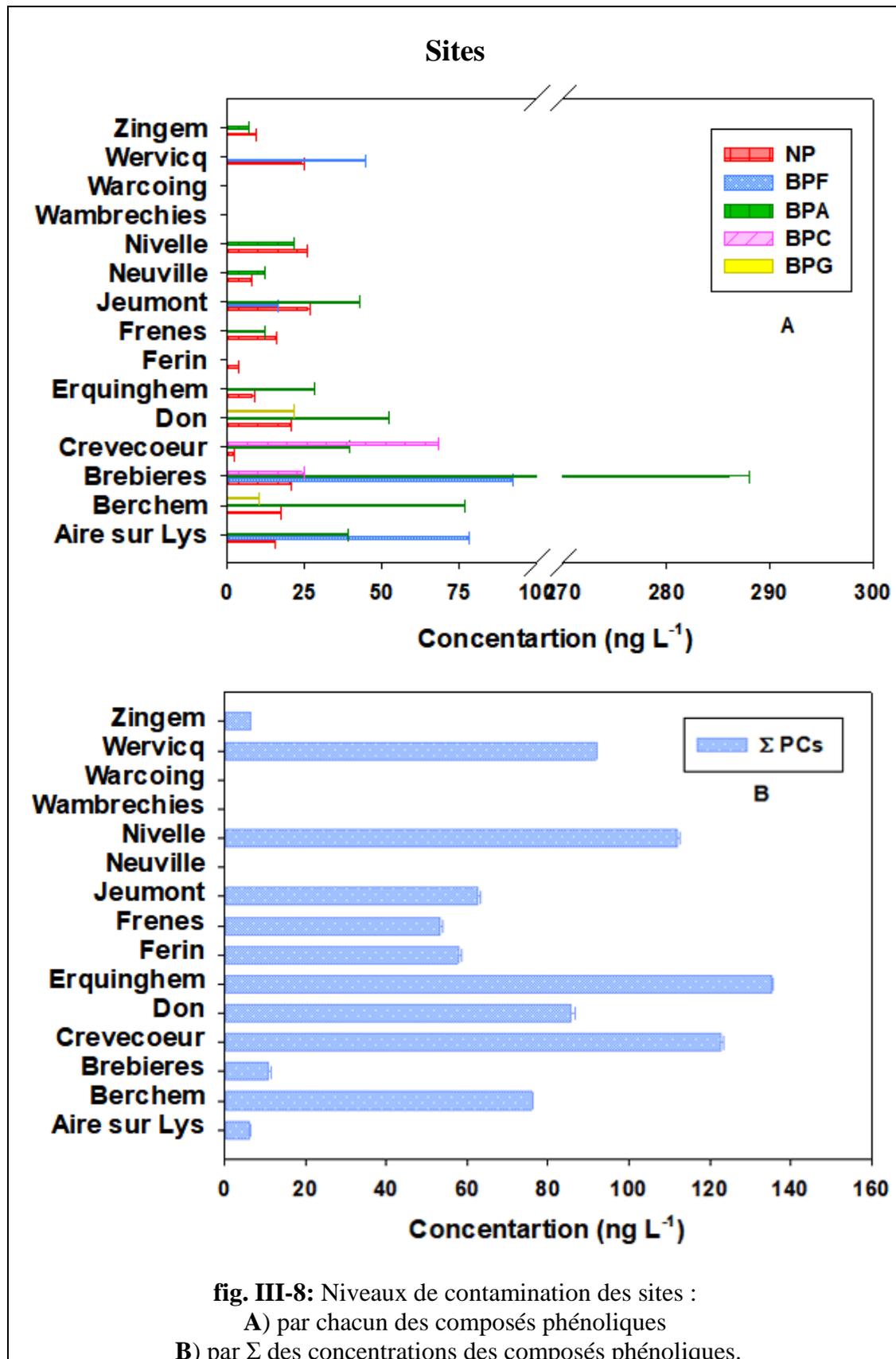


fig. III-8: Niveaux de contamination des sites :

A) par chacun des composés phénoliques

B) par Σ des concentrations des composés phénoliques.

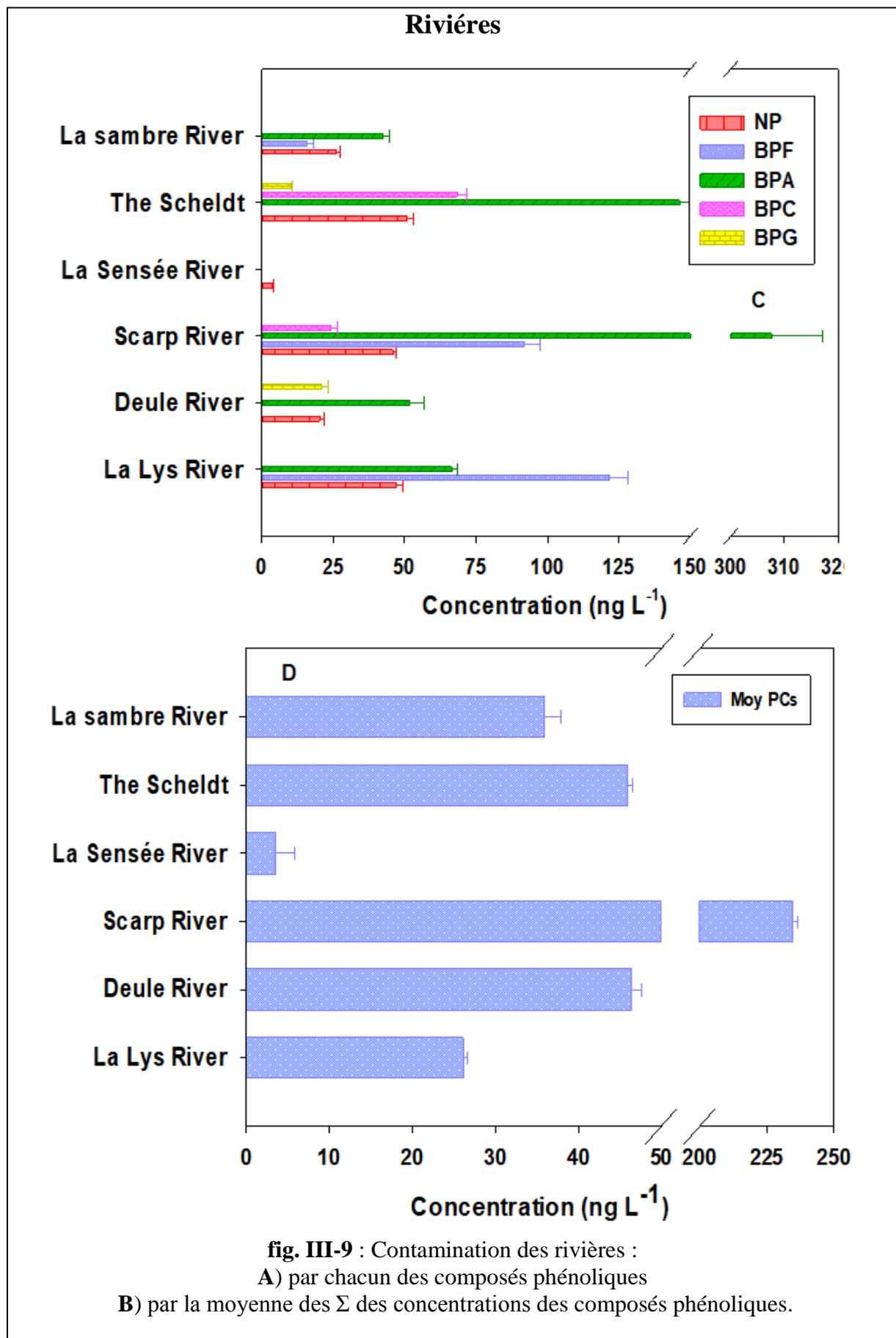


fig. III-9 : Contamination des rivières :
A) par chacun des composés phénoliques
B) par la moyenne des Σ des concentrations des composés phénoliques.

III.2. Etat de contamination des sites sélectionnés en Tunisie

La concentration de chaque composé individuel détectée dans chaque site d'étude est présentée dans le (tab. III-9)

Dans les différents échantillons, la concentration des résidus des PEs est variable. Les valeurs des concentrations les plus élevées ont été identifiées à l'entrée et à la sortie de la station d'épuration de Chotrana I (STEP I) avec respectivement $92,5 \pm 0,2$ et $87,2 \pm 0,2 \text{ ngL}^{-1}$.

Parmi les 13 perturbateurs endocriniens sélectionnés :

- 5 perturbateurs ont été détectés dans l'eau d'Oued Zarga
- 3 perturbateurs dans le puits au voisinage du centre hospitalier de Bab Saadoun
- 3 perturbateurs à l'entrée de la STEP de Ben Arous
- 5 perturbateurs à l'entrée de STEP de Chotrana I
- 4 perturbateurs à la sortie de la STEP de Chotrana I
- 3 perturbateurs à l'entrée de STEP de Chotrana II
- 3 perturbateurs à la sortie de la STEP de Chotrana II.

tab. III-9 : Concentration individuelle des PEs dans les sept sites

PEs	Concentration individuelle de chaque PE (ng L ⁻¹)												
	NP	BPF	BPE	BPA	BPC	BPG	α E2	EE2	E1	E2	TST	E3	PG
Entrée STEP1	54,9±0,7	<1	<1	92,5±0,2	<1	<1	<10	<10	51,7±0,4	<10	<5	16,5±0,3	5,6±0,9
Sortie STEP 1	41,1±0,5	<1	<1	87,2±0,2	<1	<1	<10	<10	76,5±0,3	<10	<5	10,2±0,9	<5
Entrée STEP2	14,26±0,2	14,3±0,8	<1	42,1±1,0	<1	<1	<10	<10	<10	<10	6,5±0,9	<10	<5
Sortie STEP2	11,9±0,4	<1	<1	39,5±0,2	<1	<1	<10	<10	26,7±0,5	<10	<5	<10	<5
Entrée et sortie STEP3	9,8±0,4	<1	<1	<1	<1	<1	<10	<10	<10	<10	7,8±0,9	<10	6,2±0,9
Eau de puits	5,1±0,9	<1	<1	16,7±0,7	<1	<1	<10	<10	18,2±0,9	<10	<5	<10	<5
Oued zarga	28,5±0,7	<1	<1	20,2±0,4	<1	<1	<10	<10	82,7±0,7	<10	10,6±0,6	20,5±0,3	<5

NP, BPA et E1 ont été les plus fréquemment détectés dans les sept sites avec des concentrations élevées. Bisphénol E, bisphénol C, bisphénol G, 17 α estradiol, 17 β -estradiol et 17 α -éthinyloestradiol n'ont pas été détecté dans tous les sites.

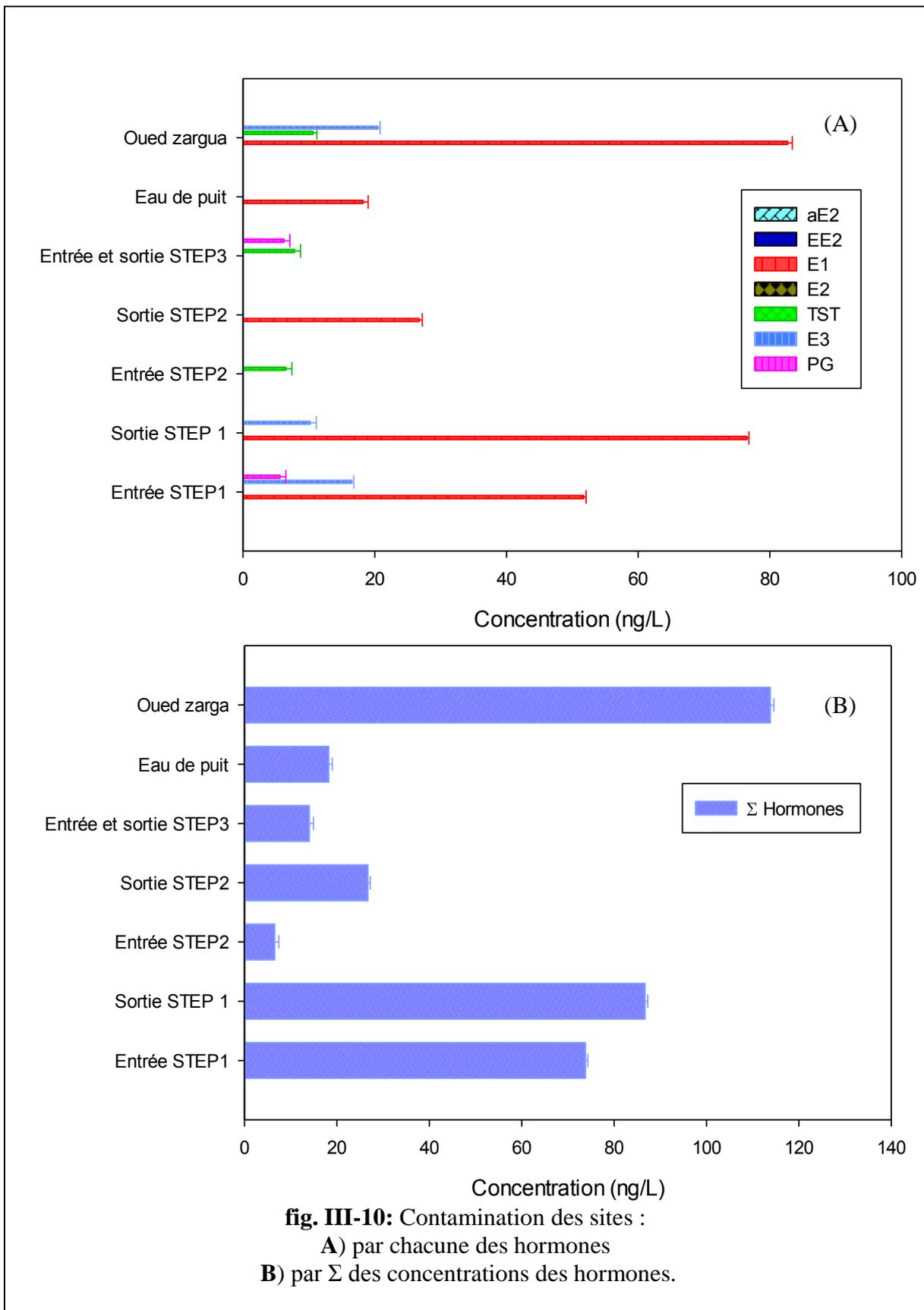
Les niveaux de concentration détectés sont en bon accord avec ceux trouvés dans la littérature (tab. III-8).

Des niveaux élevés de résidus des perturbateurs endocriniens ont été détectés dans les effluents en amont des STEPs, atteignant respectivement 87,2 \pm 0,2 et 39,5 \pm 0,2 ngL⁻¹ pour Chotrana I et Chotrana II. Ces deux stations d'épuration se sont avérées inefficaces pour traiter ce type de micropolluants.

La station de Ben Arous (STEP 3) était non opérationnelle, au moment de l'échantillonnage, ceci explique les niveaux de concentration trouvés à l'entrée de la station et sont retrouvées à la sortie de la station.

III.2.1. Résidus des hormones

Les résultats montrent que tous les sites ont été contaminés par une ou plusieurs hormones. Parmi les sept hormones sélectionnées E1 été le plus fréquemment détecté (six sites sur sept), avec la concentration la plus élevée par rapport à toutes les hormones soient 82,7 \pm 0,7 ng L⁻¹.



Les estradiols (EE2, E2 et α E2) n'ont été détecté dans aucun site. Cela pourrait être dû à leur instabilité en milieu naturel (Czajka and Londry, 2006). La testostérone a été détectée dans les deux entrées des STEP Chotrana II et Ben Arous avec une concentration très inférieure à celle d'E1. La concentration de TST est inférieure à la LOD à la sortie de STEP de Chotrana II ce qui indique un rabattement élevé de ce produit.

E3 a été détecté à l'entrée de la STEP de Chotrana I avec une concentration de $16,5 \pm 0,3 \text{ ng L}^{-1}$ et à la sortie à une concentration de $10,2 \pm 0,9 \text{ ng L}^{-1}$. Pour cette STEP, nous observons un rabattement moyen de 39% pour l'estriol.

L'estrone E1 a été détecté à la sortie des deux stations d'épuration Chotrana I et II avec des concentrations plus élevées qu'à l'entrée. Un phénomène bio-chimique se produit probablement entre l'entrée et la sortie des STEPs et vient s'ajouter au transfert des hormones. A titre d'exemple, l'estriol E3 et l'estradiol E2 peut se transformer en estrone E1 et d'autres produits (De Champlain, 2011).

Parmi les sept sites étudiés Oued Zarga est le plus contaminé par les hormones avec des concentrations de $82,7 \pm 0,7 \text{ ng L}^{-1}$, $20,5 \pm 0,3 \text{ ng L}^{-1}$ et $10,6 \pm 0,6 \text{ ng L}^{-1}$ pour respectivement l'estrone E1, la testostérone TST et l'estriol E3 (fig. III-10). Cela pourrait être dû au rejet des fermes d'élevage de vaches laitières, des bovins et des chevaux qui rejoignent l'oued sans traitement. Ces fermes d'élevage utilisent des traitements hormonaux à base des estrogènes pour augmenter la production laitière totale pour les vaches (Le Cozler et al., 2009; Pont and Delouis, 1987). Ces traitements hormonaux sont également utilisés comme stimulateurs de croissance sous forme d'un implant, glissé sous la peau près de l'oreille, qui diffuse de manière uniforme, la substance dans le système sanguin durant environ 120 jours. Cet implant contient les trois hormones sexuelles (estradiol, progestérone et testostérone) (Ngapo and Gariépy, 2004).

Dans l'eau de puits, l'estrone E1 a été la seule hormone détectée parmi les sept hormones étudiées, avec une concentration de $18,2 \pm 0,9 \text{ ng L}^{-1}$. L'existence de cette hormone dans l'eau souterraine résulte du fait que l'estrone a été détectée avec des concentrations élevées dans les sorties des STEPs. (fig. III-10)

III.2.2. Résidus des contaminants phénoliques

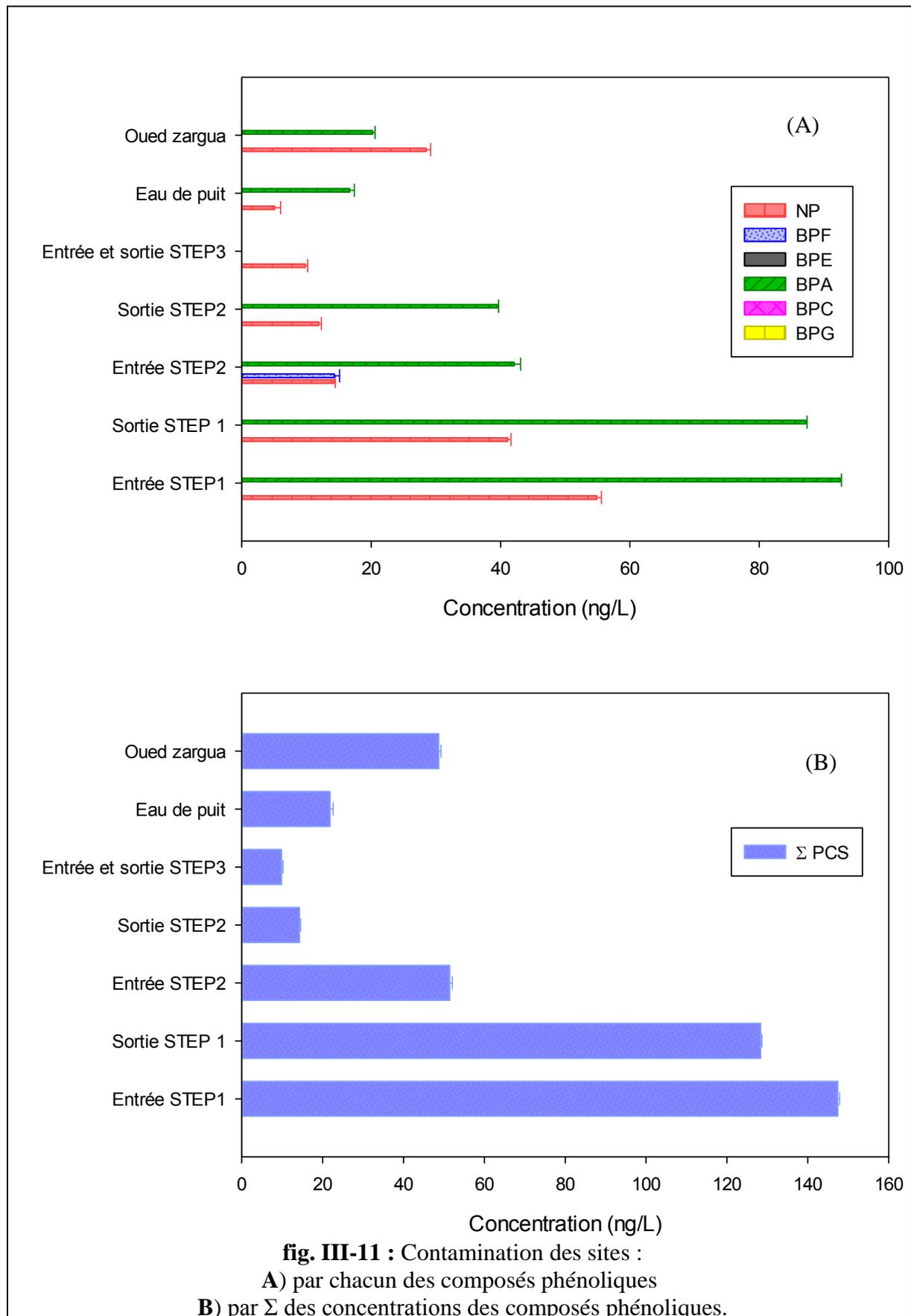
De fortes concentrations de bisphénol A ont été détecté dans la majorité des sites étudiés et varient entre $92,5 \pm 0,2$ et $16,7 \pm 0,7$ ng L⁻¹ (tab. III-7). Ces valeurs élevées peuvent être expliquées par le fait que le bisphénol A est très persistant et non-dégradable dans l'environnement aquatique. Ces concentrations sont similaires à celles détectées au nord de la France (tab. III-8).

Le 4-nonylphénol a été détecté dans tous les sites avec des concentrations moyennement fortes (fig. III-11). Le taux de rabattement de NP dans la STEP de Chotrana I et II été respectivement égale à 26% et 17%. Ce faible taux de rabattement montre bien que les procédés de traitement utilisés dans ces STEP sont inefficaces pour traiter ce type des micropolluants.

Le bisphénol F a été détecté qu'à l'entrée de la STEP de Chotrana II avec une concentration de $14,3 \pm 0,8$ ng L⁻¹. Ce bisphénol a été le seul composé phénolique non détecté à la sortie de STEP I et II. Ce résultat nous ramène à deux hypothèses :

- ✚ le taux de rabattement de BPF est de 100 %
- ✚ ou bien le BPF se transforme en une autre forme de bisphénol.

Parmi les sept sites étudiés la STEP Chotrana I est la plus contaminée par les composés phénoliques (fig. III-11) cela pourrait être dû au fait qu'elle reçoit Les rejets d'eaux usées d'origine industrielle.



III.3. Risque environnemental

La présence de PEs dans l'environnement naturel peut constituer une menace sérieuse pour le fonctionnement de l'écosystème.

Parmi les PEs étudiés BPA, NP et E1 sont les plus fréquemment détectés dans les sites d'étude en France et en Tunisie. Le risque environnemental RQ de ces trois PEs est estimé par le rapport de la concentration environnementale mesurée MES et la concentration maximale sans effet prévisible PNEC :

$$RQ = MEC / PNEC.$$

Les PNEC de NP, BPA et E1 utilisées dans ce travail sont 330, 60 et 2 ngL⁻¹ (Diao et al., 2017).

tab. III-10 Risque Environnemental (RQ) de NP, BPA et E1.

		RQ		
		NP	BPA	E1
En France	Aire sur LaLys	0,05	0,65	-
	Berchem	0,05	1,27	35,1
	Brebieres	0,05	4,77	-
	Crevecoeur	-	0,66	58,1
	Don	0,05	0,86	-
	Erquinghem	0,02	0,46	-
	Ferin	-	-	-
	Frenes	0,05	0,20	-
	Jeumont	0,07	0,71	-
	Neuville	0,02	0,20	-
	Nivelle	0,07	0,36	17,1
	Wambrechies	-	-	-
	Warcoing	-	-	-
	Wervicq	0,07	-	46
Zingem	0,02	0,11	-	
En Tunisie	Entrée STEP1	0,17	1,54	25,85
	Sortie STEP 1	0,12	1,45	38,25
	Entrée STEP2	0,05	0,70	-
	Sortie STEP2	0,02	0,66	13,35
	Entrée et sortie STEP3	0,02	-	-
	Eau de puits	0,02	0,28	9,1
	Oued zarga	0,07	0,34	41,35

Le rapport de risque (RQ) de NP est $< 0,1$ dans tous les sites d'étude qui permet de considérer que le risque est acceptable pour l'environnement, même si la vigilance est nécessaire (tab. III-10).

Pour le BPA, RQ est supérieur à 1 dans les sites de Berchem, Brebieres, l'effluent et l'affluent de STEP Chostrana 1. Ces valeurs permettent d'établir que le risque de danger est élevé. Dans le reste des sites d'étude les valeurs de RQ sont comprises entre 0,1 et 1 ce qui estime un risque moyen.

E1 possède des RQ très élevés (9,1- 58,1). Ces valeurs révèlent un risque très élevé pour l'environnement et la santé humaine et qu'il est nécessaire d'éliminer d'avantages ces PEs.

Les PEs sont une classe importante de contaminants émergents. Leur quantification fiable peut être difficile en raison de leur présence à l'état de trace dans les milieux naturels.

Dans ce travail, les principaux paramètres qui influent sur l'efficacité de l'extraction et la détection de 13 PEs par SPE-GC/MS ont été optimisés en utilisant les plans d'expériences. La méthode a une bonne récupération $R\% > 90 \%$ et LOQs de la méthode ont été compris entre 1 et 10 ng L⁻¹. Cette méthode a été appliquée pour évaluer les niveaux de contamination des sites situés en France et en Tunisie par ces PEs.

La présence de PEs dans l'environnement naturel peut constituer une menace sérieuse pour le fonctionnement de l'écosystème. Pour minimiser leurs impacts sur les écosystèmes et la santé humaine, il semble essentiel de développer une technologie rentable pour améliorer leur rendement d'élimination des eaux usées et limiter ainsi problème de la source et / ou remédier à l'environnement naturel contaminé.

Chapitre IV Procédés d'élimination des PEs

- I- Adsorption sur des résidus de brique modifiée
- II- Bioremédiation par les algues

Les résultats de l'identification et de la quantification de la contamination des sites d'études en Tunisie et en France par les PEs incitent à la recherche de méthode de remédiation. Si la pollution bactérienne peut être aisément traitée à l'aide de désinfectant, l'élimination de ces micropolluants organiques par des procédés à bas coût est plus délicate.

Parmi les nombreuses techniques d'élimination des micropolluants, l'adsorption par des matériaux poreux a été reconnue comme le procédé le plus efficace dans les traitements des eaux, en raison de sa simplicité, son coût modéré et ses performances. Différents types d'argiles, charbons actifs et déchets des industries agroalimentaires ont été étudiés dans cet objectif. Il en résulte que les argiles sont les plus disponibles et les moins coûteux (Khazri et al., 2017).

Depuis environ un siècle, les algues et les plantes macrophytes ont été utilisées pour le traitement des eaux usées pour l'élimination des métaux lourds et des micropolluants organiques. L'innovation et l'utilisation de ces deux procédés pour l'élimination des perturbateurs endocriniens peuvent être envisagées.

Dans la première partie de ce chapitre, la remédiation par les argiles a suscité une modélisation des isothermes d'adsorption des PEs sur l'argile modifiée. Plusieurs paramètres sont étudiés : l'effet du pH et de la température sur l'adsorption. Quelques grandeurs thermodynamiques sont calculées : l'enthalpie, l'entropie et l'énergie d'activation.

Dans la deuxième partie, nous décrivons les résultats des traitements avec les algues. Les algues *Spiruline* sous forme libre et immobilisée ont été utilisées comme procédé biologique pour l'élimination des PEs. Nous avons étudié leur taux d'élimination et leur stabilité.

I. Adsorption sur des résidus de brique modifiée

Dans ce qui suit l'expérimentation a été réalisée sur des résidus de brique modifiée fournis par le laboratoire LASIR de l'université de Lille. Il est intéressant de bien connaître le mécanisme d'adsorption afin de mieux la contrôler.

I.1. Etude cinétique du processus d'adsorption des PEs sur les résidus de brique

Les études cinétiques ont permis d'apporter des informations importantes sur :

- (i) l'étendue de la réaction selon les caractéristiques physico-chimiques du PE étudié ;
- (ii) le temps de séjour minimal de soluté en contact avec l'adsorbant,
- (iii) les phénomènes de complexation. Les équations cinétiques de pseudo-premier ordre et pseudo-second ordre ont permis d'exprimer la vitesse d'adsorption des PEs sur la brique modifiée. L'adsorption sur les briques peut être influencée par le pH et la température et,

par conséquence, l'effet de ces deux paramètres a été étudié. Dans ces études préliminaires, les concentrations initiales choisies sont volontairement très supérieures (e.g. 10^9 ng L⁻¹) à celles retrouvées dans l'environnement (e.g. 10^{1-4} ng L⁻¹). En effet, l'objectif principal était à la fois (i) d'étudier la capacité d'adsorption maximale de la brique modifiée, (ii) de modéliser les mécanismes d'adsorption, et (iii) de considérer l'influence de la température sur l'adsorption.

I.1.1. Effet de pH sur les isothermes d'adsorption

Les isothermes d'adsorption ont été établies à pH 2,5 ; 4 ; 7 ; 9 et 10. Les résultats montrent que la capacité d'adsorption des composés étudiés par les briques modifiées dépend fortement de la valeur du pH de la solution (fig. IV-1). L'influence du pH varie d'une molécule à une autre. Cependant, les résultats ont montré que pH = 7 est la valeur optimale d'adsorption pour l'ensemble de molécules étudiées, à savoir NP, BPA, EE2, TST et E1.

I.1.2. Effet température

L'établissement des isothermes a permis de confirmer que la température est l'un des facteurs influents sur les mécanismes d'adsorption. Pour étudier l'influence de la température, les expériences d'adsorption ont été réalisées à trois températures, à savoir 293, 303 et 313 K (fig. IV-2). Etant donné que l'adsorption est en général un processus exothermique, il était attendu qu'une augmentation de la température se traduise par une diminution de la capacité d'adsorption. Les résultats montrent au contraire qu'une élévation de la température augmente la capacité d'adsorption pour toutes les molécules PEs sélectionnés. Ce qui permet de conclure de la réaction d'adsorption des PEs sur les résidus de brique modifiée et une réaction endothermique.

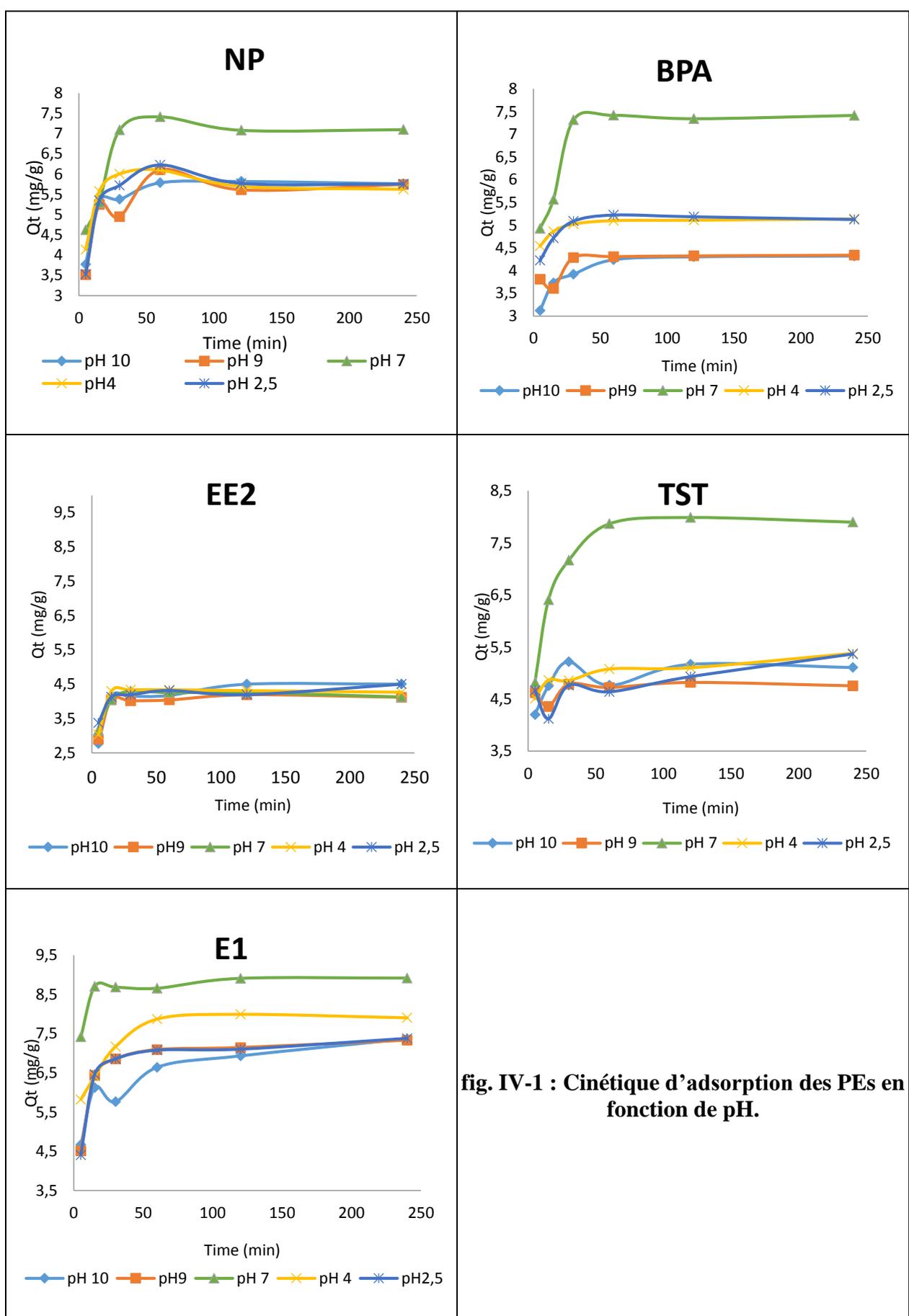


fig. IV-1 : Cinétique d'adsorption des PE en fonction de pH.

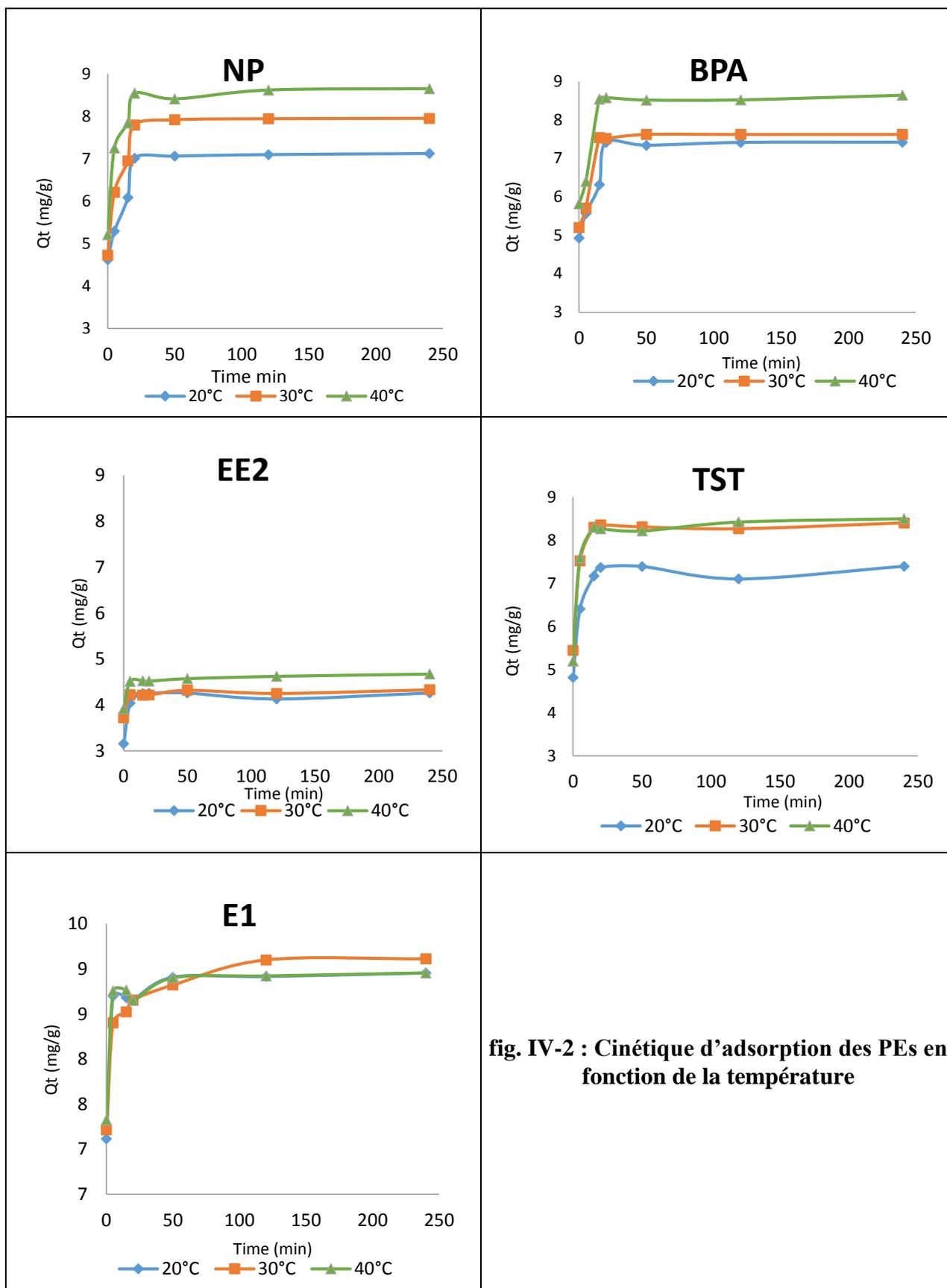


fig. IV-2 : Cinétique d'adsorption des PEs en fonction de la température

I.1.3. Cinétique d'adsorption

Afin d'analyser les résultats expérimentaux trouvés et d'examiner le mécanisme de processus d'adsorption des PEs sur les résidus des briques modifiées, les deux modèles cinétiques ont été testés, à savoir le pseudo-premier ordre et le pseudo second ordre.

I.1.4. Modèle de cinétique de pseudo premier ordre

Le modèle de cinétique de pseudo premier ordre est exprimé par l'équation suivante :

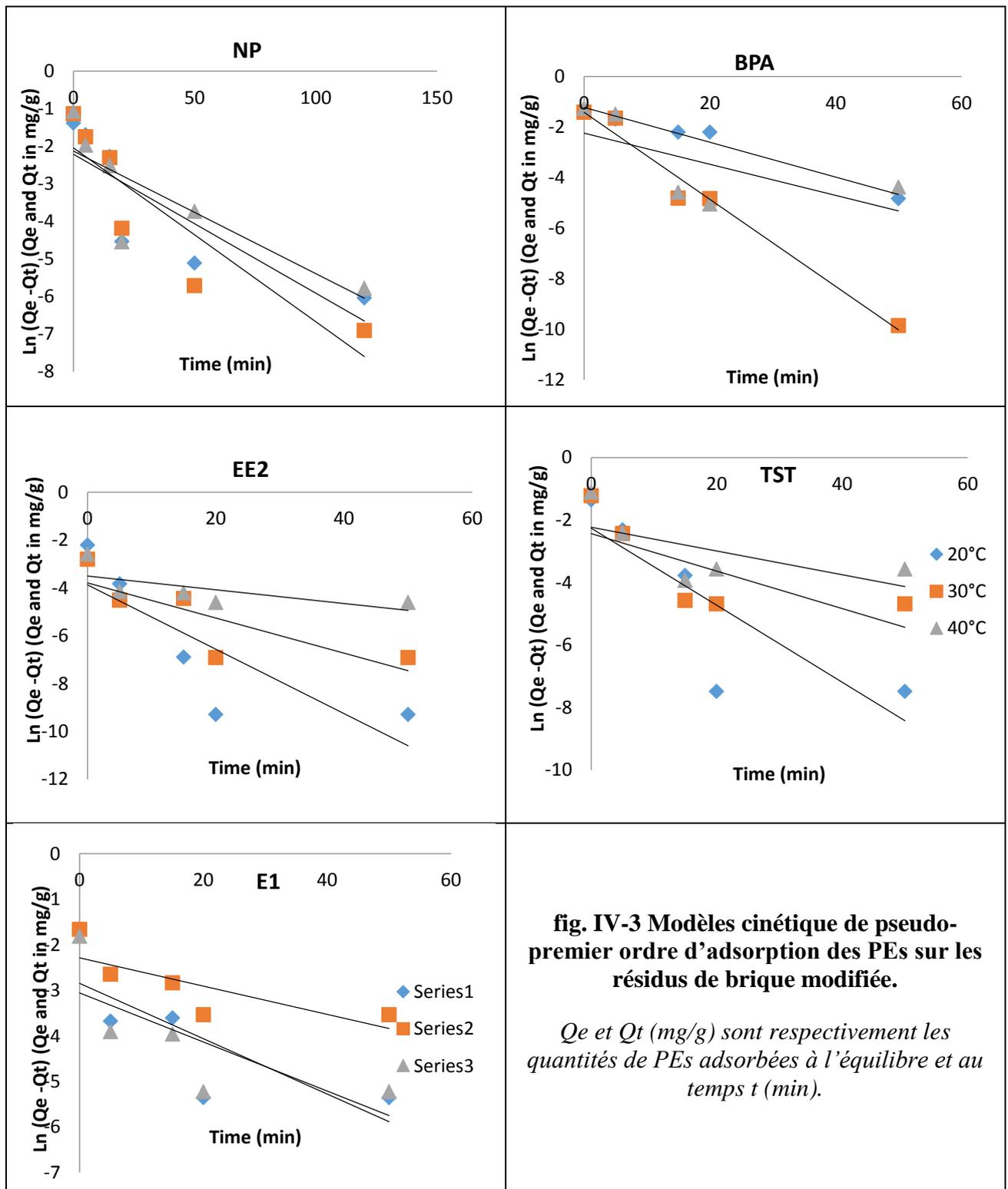
$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 t \quad (\text{II.13})$$

où Q_e (mg/g) représente la quantité de PE adsorbée à l'équilibre, Q_t (mg/g) est la quantité de PE adsorbée à l'instant t (min) et k_1 (min^{-1}) est la constante de vitesse d'adsorption de pseudo-premier ordre.

L'application de l'équation (II.13) sur les résultats expérimentaux de l'adsorption des PEs sur les résidus de la brique modifiée est représentée dans la fig. IV-3.

Il apparaît clairement que les données expérimentales diffèrent des données théoriques d'une cinétique du pseudo-premier ordre (tab. IV-1). La constante de vitesse a aussi une valeur très faible. La quantité de PE adsorbé à l'équilibre (Q_{exp}) est très supérieure à celle calculée théoriquement Q_{cal} . Le coefficient de corrélation ne donne pas des valeurs raisonnables pour la majorité des PEs ($R^2 < 0,75$).

Ces interprétations nous conduisent à conclure que la cinétique ne répond pas au modèle de pseudo premier ordre.



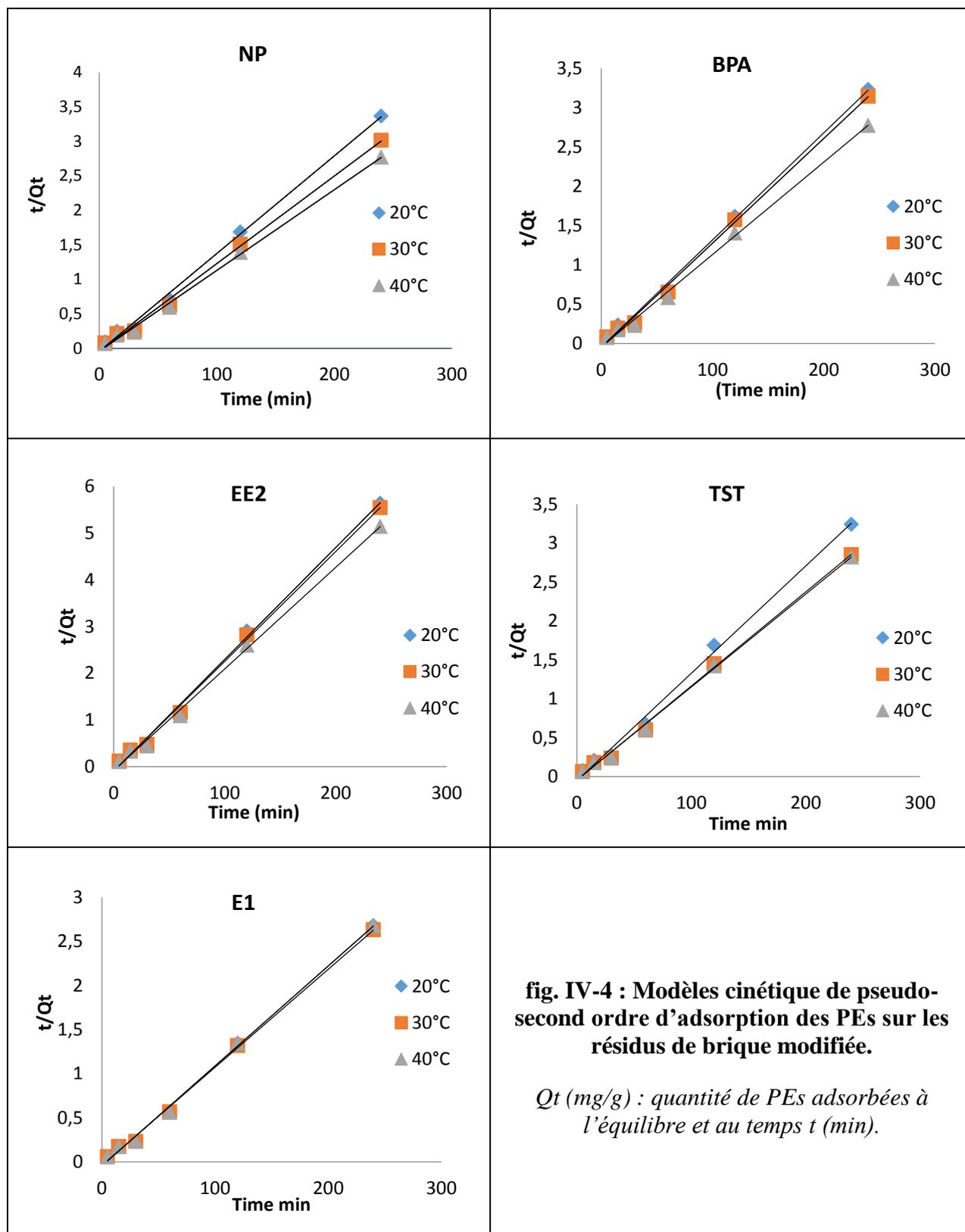
I.1.1. Modèle de cinétique de pseudo second ordre

Le modèle de cinétique de pseudo second ordre est exprimé par l'équation suivante :

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e} + \frac{1}{Q_e} t \quad (\text{II.15})$$

Où k_2 en (g/(mg.min)) est la constante de vitesse d'adsorption de pseudo-second ordre.

L'application de l'équation (II.15) sur les résultats expérimentaux de l'adsorption des PEs sur les résidus de la brique modifiée est représentée dans la fig. IV-4.



Les données expérimentales suivent très bien le modèle cinétique de pseudo-second ordre ($R^2 > 0.99$) (fig.IV.3). Pour le modèle mathématique de second ordre, les valeurs expérimentales de la quantité de PEs adsorbée à l'équilibre (Q_{exp}) sont plus proches des valeurs théoriques en comparaison avec celle obtenues par le modèle cinétique de premier ordre (tab. IV-1). Par conséquent, le processus d'adsorption est contrôlé par une cinétique de pseudo-second ordre. Ce modèle suppose que les molécules des PEs sont adsorbées sur deux sites de sorption à la surface de la brique.

tab. IV-1 : Paramètres cinétiques des modèles pseudo-premier ordre et pseudo- second ordre.

PE	T°K	Q_{exp} (mg/g)	Pseudo-Premier ordre			Pseudo-second ordre		
			Q_{ecal} (mg/g)	K_1 (1/min)	R^2	Q_{ecal} (mg/g)	K_2 (g/(mgmin))	R^2
NP	293	7,124	1,095	0,04	0,721	7,179	0,90	0,996
BPA	293,5	7,422	2,948	0,07	0,970	7,353	0,35	0,996
EE2	293,2	4,259	2,807	0,13	0,673	4,175	0,58	0,996
TST	293	7,397	1,042	0,12	0,705	7,254	0,37	0,996
E1	293	8,954	5,041	0,06	0,623	8,819	0,28	0,997
NP	303,1	7,954	1,295	0,05	0,811	8,009	0,98	0,996
BPA	303	7,622	2,430	0,17	0,977	7,523	0,40	0,997
EE2	303,4	4,332	2,727	0,07	0,656	4,257	0,58	0,997
TST	303	8,402	0,875	0,06	0,536	8,261	0,38	0,997
E1	303	9,112	6,063	0,02	0,211	8,996	0,31	0,998
NP	313	8,652	1,192	0,03	0,710	8,646	1,02	0,997
BPA	313,3	8,643	3,057	0,06	0,437	8,520	0,59	0,997
EE2	313,3	4,672	2,999	0,03	0,444	4,600	0,64	0,997
TST	313,1	8,498	1,073	0,04	0,409	8,375	0,42	0,997
E1	313	8,955	4,970	0,05	0,568	8,818	0,37	0,997

I.2. Modèles d'isothermes d'adsorption

Les modèles mathématiques d'isothermes d'adsorption selon LANGMUIR et FREUNDLICH permettent de déterminer la capacité maximum d'adsorption du support.

A partir des résultats expérimentaux, les isothermes de Freundlich et Langmuir ont été calculés. L'analyse de ces données nous ont aussi permis d'identifier le modèle mathématique auquel obéit cette sorption.

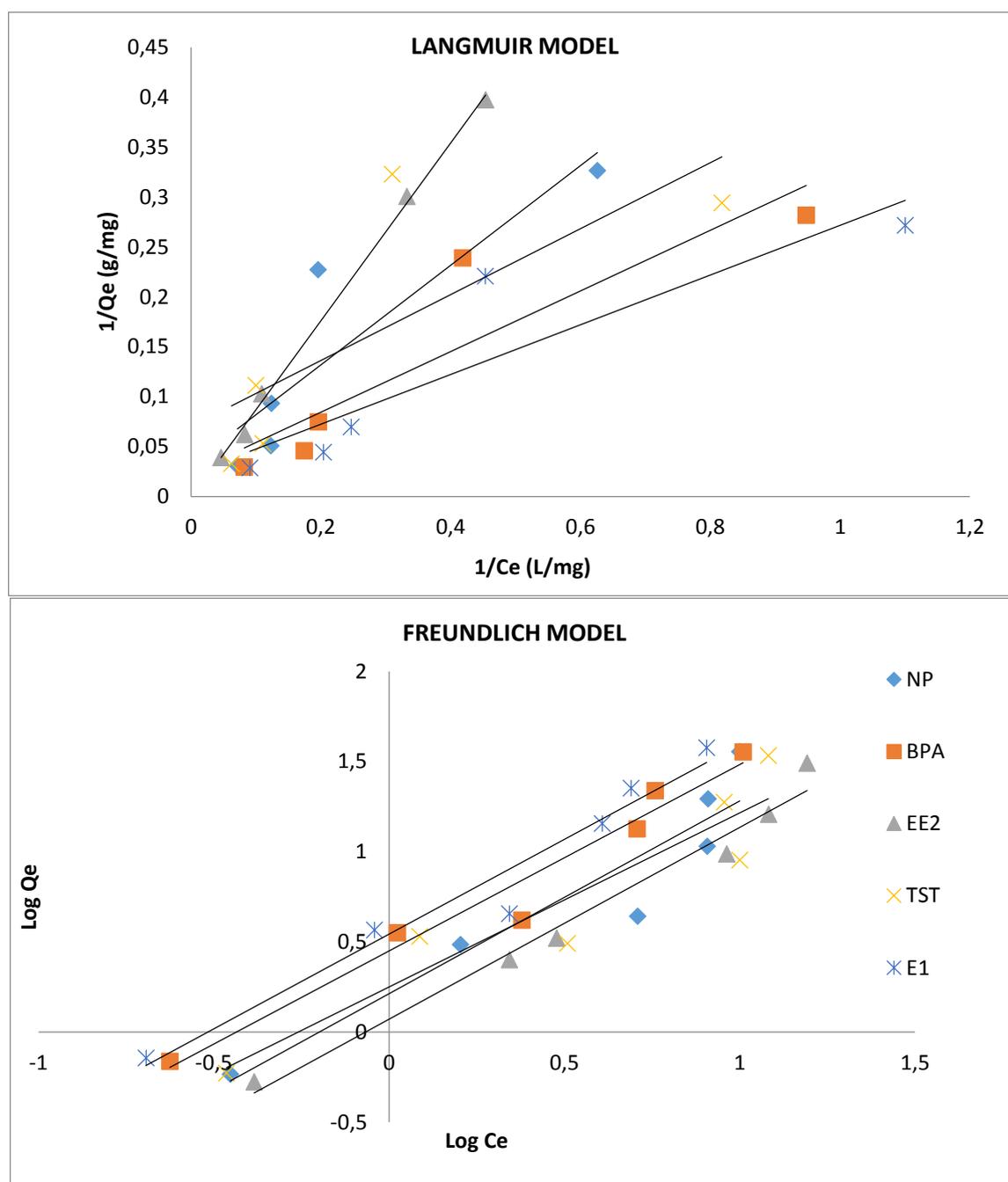


fig. IV-5 : Isothermes d'adsorption de PEs sur la brique modifiée : modèles de Langmuir et de Freundlich (T= 293 K)

La comparaison des paramètres équationnels (fig. IV-5) représentant les modèles de Langmuir et de Freundlich, montre la non-conformité des données réelles et les données empiriques du modèle Langmuir. Les valeurs du facteur R_L sont supérieures à 1 pour BPA, EE2, TST et E1 et inférieure à 1 pour NP, d'où l'adsorption est défavorable (sauf pour le NP) selon Langmuir.

Les coefficients de corrélation R^2 de modèle de Freundlich sont les plus élevées ($R^2 > 0,90$) (tab. IV-2). Les valeurs de la constante n obtenues pour le BPA, EE2, TST et E1, appartient au domaine de validité du modèle de Freundlich [0,1-0,5] qui caractérise une bonne adsorption alors que la valeur obtenue pour NP ($0,5 > n > 1$) révèle une adsorption modérée.

Ces interprétations nous permettent à conclure que l'isotherme de rétention des cinq PEs est mieux représentée par une isotherme de Freundlich.

tab. IV-2 Constantes de Langmuir et de Freundlich pour l'absorption des PEs sur les résidus de brique modifiée

Isotherme de Langmuir				Isotherme de Freundlich			
PEs	R^2	b L/mg	R_L	R^2	Q_{max} (mg/g)	N	K_f (mg/g)
NP	0,814	0,0179	0,9746	0,929	9,3457	0,528	1,2251
BPA	0,817	0,0319	1,0020	0,966	9,1743	0,385	1,5636
EE2	0,583	0,2664	1,0095	0,996	4,8543	0,070	1,0817
TST	0,797	0,0205	1,0798	0,907	8,6206	0,493	1,2752
E1	0,998	0,0387	1,0099	0,963	9,259	0,341	1,7054

I.3. Etude thermodynamique

L'équilibre entre une réaction d'adsorption et une réaction inverse de désorption, à l'interface solide-liquide, est contrôlé par la thermodynamique. Nous avons abordé quelques aspects thermodynamiques relatifs aux échanges entre solutés et la brique modifiée. Ces

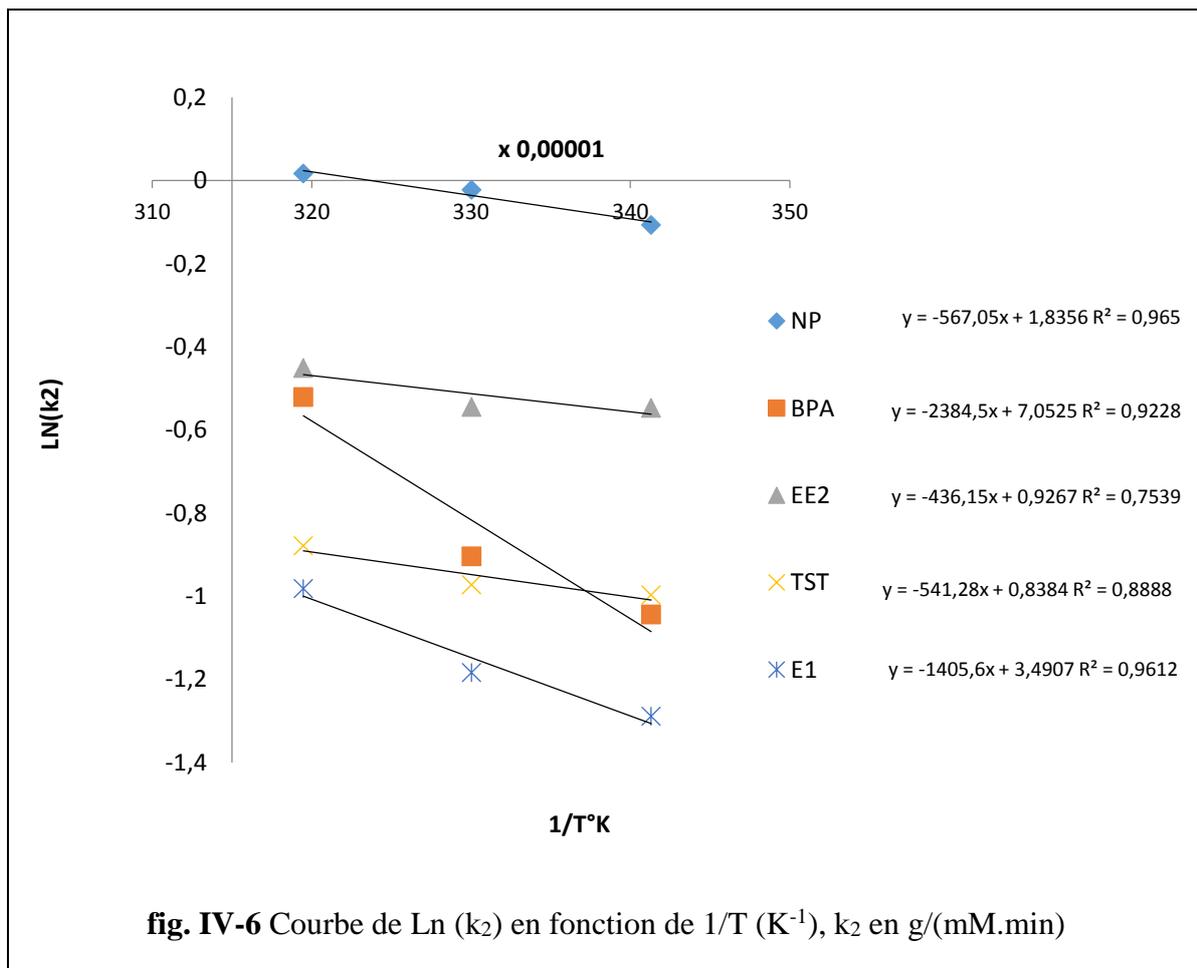
réactions font intervenir une étape d'activation de la surface de la brique qui conduit à la formation de réactifs intermédiaires. Elles nécessitent généralement un apport d'énergie supplémentaire appelée énergie d'activation.

I.3.1. Energie d'activation

Les résultats obtenus (tab. IV.1) permettent de déduire que le modèle cinétique de pseudo-second ordre s'applique le mieux aux données expérimentales. La constante de vitesse k_2 , obtenue à partir de ce modèle a été utilisée dans l'équation d'Arrhenius pour déterminer l'énergie d'activation (tab. IV-3).

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (\text{II.22})$$

L'énergie d'activation est obtenue à partir de la pente de la droite de $\ln(k)$ en $f(1/T)$ (fig. IV-6).

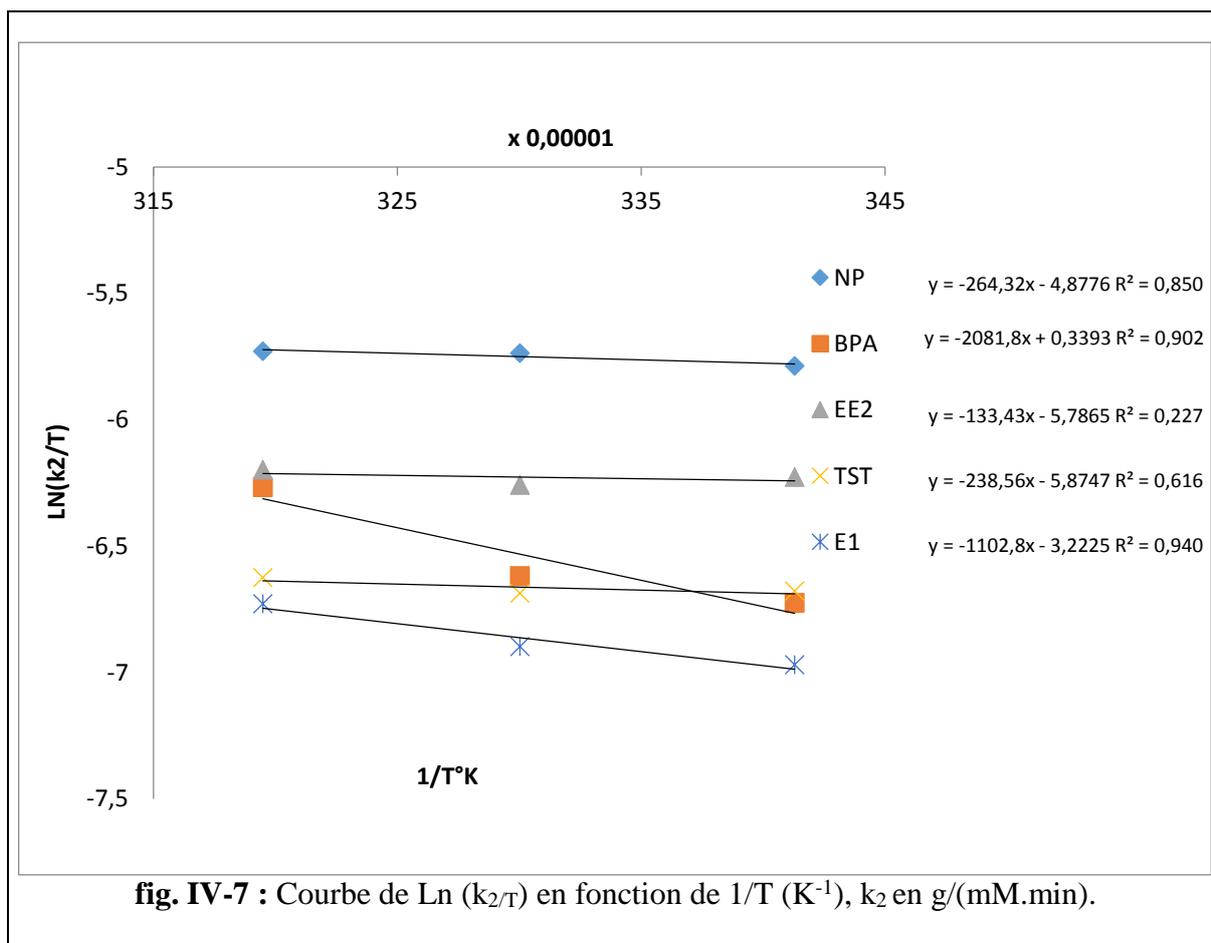


L'enthalpie (ΔH_a) et l'entropie (ΔS_a) des réactions d'activation ont été évaluées en utilisant l'équation d'Eyring qui découle de la théorie des complexes activés:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) - \frac{\Delta H_a}{RT} + \frac{\Delta S_a}{R} \quad (\text{II.23})$$

k_B est la constante de Boltzmann ($1.38063 \cdot 10^{-23}$ J.K-1), h est la constante de Planck ($6.62606957 \cdot 10^{-34}$ J.S).

La pente et l'ordonnée à l'origine de la droite obtenue en traçant $\ln(k_2/T)$ en fonction de $1/T$, ont été utilisées pour calculer les paramètres thermodynamiques de la réaction d'activation ΔH_a et ΔS_a .



Les paramètres thermodynamiques d'activation de la réaction d'adsorption de PEs à ont été calculées (tab. IV-3).

tab. IV-3 : Paramètres thermodynamiques obtenus lors des études des cinétiques d'adsorption des PEs sur les résidus de brique modifiée.

PE	Ea (kJ/mol)	ΔH_a (kJ/mol)	ΔS_a (j/mol.k)
NP	4,714	2,198	-238,093
BPA	19,821	17,301	-194,719
EE2	3,626	1,109	-246,383
TST	4,500	1,983	-245,649
E1	11,686	9,169	-224,332

L'étude de l'effet de la température sur l'adsorption des PEs sur les résidus de la brique modifiée a permis de conclure que cette réaction est endothermique. Ceci est aussi confirmé par les valeurs positives d'Ea et de ΔH_a qui suggèrent que l'augmentation de la température favorise le processus. L'entropie d'activation ΔS_a négative montre qu'au début de la réaction, la cinétique d'adsorption des PEs est contrôlée par des phénomènes d'attraction électrostatique.

Des études ont montré que des énergies d'activation inférieures à 40 kJ/mol sont indicateurs de réactions d'adsorption de type physisorption, alors que celles variant de 40 à 800 kJ/mol sont attribuées aux réactions d'adsorption de type chimisorption. La physisorption nécessite peu d'énergie pour se réaliser, alors que la chimisorption a besoin d'énergie plus élevée (Allahdin, 2014).

Les valeurs de l'énergie d'activation de la réaction d'adsorption des PEs calculées sont comprises entre 3 et 20 kJ/mol. Ces valeurs montrent donc qu'il s'agit bien d'une adsorption de type physisorption.

1.3.2. Détermination des paramètres thermodynamiques de la réaction d'adsorption

La faisabilité d'une réaction est définie par ΔG (kJ mol⁻¹), la variation d'enthalpie libre, qui correspond à la variation d'énergie à pression constante. Un système thermodynamique évolue toujours spontanément vers un niveau énergétique plus bas. Pour qu'une réaction soit spontanée, ΔG doit être négatif.

Lorsque la teneur du soluté adsorbé sur la brique est en équilibre avec la teneur résiduelle dans la phase liquide, l'état d'équilibre de la réaction d'adsorption est atteint. Cet état est caractérisé par un paramètre K_D qui est le coefficient de distribution du soluté en équilibre entre la solution (phase liquide) et l'adsorbant (phase solide).

$$\text{A l'équilibre } K_D \text{ est donné par le rapport : } K_D = C_{ads}/C_{eq} \quad (\text{IV.1})$$

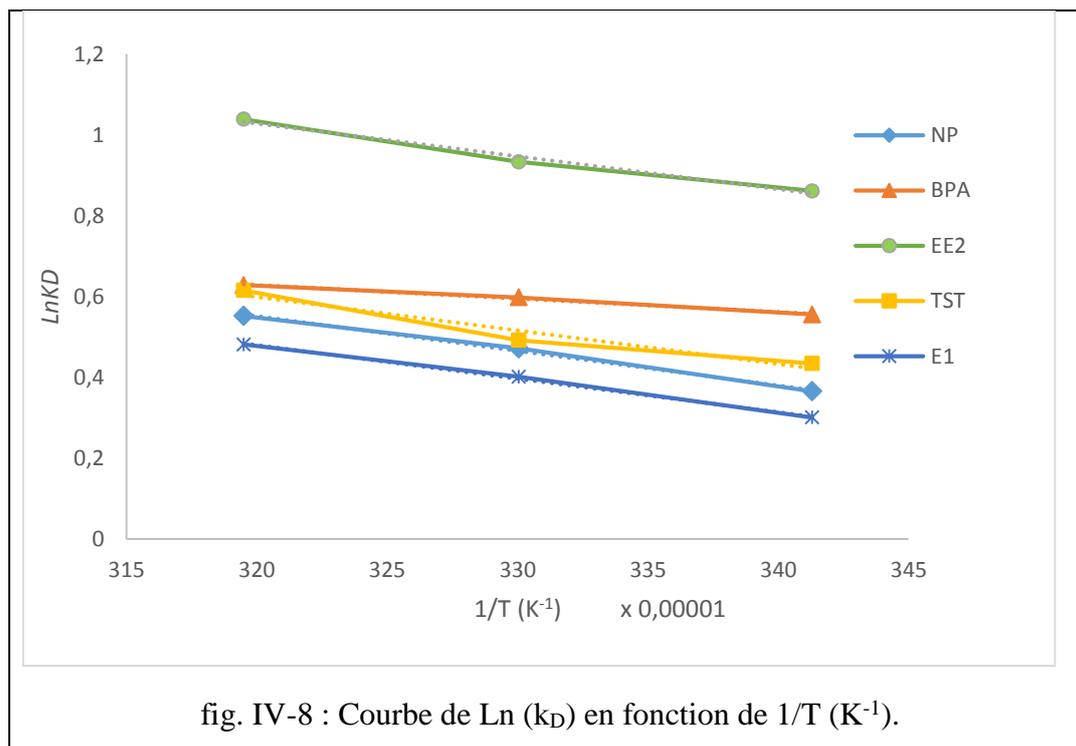
C_{ads} représente la quantité de soluté adsorbée sur la brique à l'équilibre et C_{eq} la concentration de soluté en solution à l'équilibre (Allahdin, 2014).

Les paramètres thermodynamiques, tels que la variation de l'enthalpie standard ΔH° , la variation de l'entropie standard ΔS° et la variation d'énergie libre de Gibbs ΔG° de la réaction d'adsorption de chaque PE sur la brique sont liés au coefficient de distribution de l'équation de Van't Hoff:

$$\text{Ln } K_D = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (\text{IV.2})$$

Avec R : constante des gaz parfaits 8,31447 J mol⁻¹ K

Les intersections de la droite obtenue en traçant $\text{Ln}K_D$ en fonction de $1/T$, permettent de déterminer les enthalpies (ΔH°) et les entropies (ΔS°) des différentes réactions entre solutés étudiés et brique modifiée dans l'eau (fig. IV-8).



Les paramètres thermodynamiques de la réaction d'adsorption de PEs à ont été calculées (tab. IV-4).

tab. IV-4 Paramètres thermodynamiques de la réaction d'adsorption.

PEs étudiés	R^2	ΔH_a (kJ/mol)	ΔS_a (j/mol.k)	ΔG_a $_{293^{\circ}K}$ (J/mol)
NP	0,953	7,126	27,35	-888,75
BPA	0,994	2,776	14,04	-1338,4
EE2	0,984	6,736	30,098	-2082,2
TST	0,950	6,869	26,92	-1019,4
E1	0,998	6,872	26,59	-919,42

Les valeurs négatives de ΔG_a correspondent à une réaction spontanée. Les données énergétiques obtenues (tab. IV-4) confirment la faisabilité de la réaction d'adsorption d'un point de vue thermodynamique. Notons que la variation d'énergie libre d'un système liquide-solide est estimée entre -20 et 0 kJ/mol dans le cas de la physisorption, tandis qu'elle varie de -80 à -

400 kJ/mol dans le cas de la chimisorption (Özean et al., 2006 ; Jaycock et al., 1981). Dans cette étude l'énergie libre de Gibbs ΔG° des processus d'adsorption des PEs sur la brique varie de -4,11 à -8,81 kJ/mol. Par conséquent, le mécanisme d'adsorption se fait plutôt par physisorption, en accord avec nos résultats décrits ci-avant. Ce mécanisme physique d'adsorption fait intervenir les forces électrostatiques entre les molécules de PEs et les sites actifs de la brique.

En outre, les valeurs positives de la variation d'enthalpie confirment que le procédé d'adsorption des PEs est endothermique. La grandeur des ΔH° obtenus peut également renseigner sur le type de sorption mis en jeu dans ce système. En effet, les forces de liaison de chimisorption sont généralement de l'ordre de 84 à 420 kJ/mol, alors que celles de physisorption sont < 84 kJ/mol (Kuo et al., 2008 ; Chen et al., 2010). Les valeurs de ΔH° obtenus varient de 2,776 à 7,126 kJ/mole, et confirment donc que les PEs sont adsorbés sur la brique recouverte de ferrihydrite par un processus impliquant la physisorption.

Quant aux valeurs positives de ΔS° , elles indiquent une augmentation de degré de liberté de l'adsorbat lors de son adsorption à l'interface solide-liquide suite à des modifications structurales. L'élévation d'entropie est supposée se produire lorsque les molécules d'eau des PEs hydratés à la surface d'adsorbant ont été libérées au cours de la migration des solutés vers les sites de la brique.

En **conclusion** La réaction d'adsorption de NP, BPA, EE2, E1 et TST est une réaction endothermique, de type physisorption et qui suit le modèle cinétique de type pseudo-second ordre. La quantité maximale d'adsorption peut atteindre jusqu'à 9300 $\mu\text{g/g}$. Cette quantité est assez importantes comparée à celle retrouvée par adsorption sur un polymère composé de silice et β -cyclodextrine (38,8 $\mu\text{g/g}$) (Bhattarai et al., 2014) et aussi sur le charbon actif commercial F400 (23,6 $\mu\text{g/g}$ pour le EE2) (Joseph et al., 2013).

Ce qui nous permet de conclure que l'adsorption pourrait être une solution pour l'élimination des PEs des milieux aquatiques.

II. Bioremédiation par les algues

Une autre solution qui s'avère prometteuse pour la remédiation des eaux contaminées, et qui a été testée pour l'élimination des métaux lourds c'est la bioremédiation par les algues.

Les tests de bioremédiation de l'eau contaminée avec PEs par les algues, durent plusieurs jours. Pour cette raison, la biodégradation des PEs doivent être prise en considération.

II.1. Test de biodégradation

L'étude de faisabilité de bioremédiation par les algues a été effectuée à l'échelle de laboratoire durant 14 jours et nous avons suivi l'évolution de la concentration des PEs dans la solution témoin en fonction du temps (fig. IV-9).

Les résultats nous ont permis de constater que les cinq perturbateurs endocriniens sélectionnés comme modèle d'étude sont relativement stables en solution dans les conditions expérimentales. Durant 12 jours d'exposition, ces molécules modèles se sont très peu dégradées avec des taux de dégradation variant de 0,5 à 1,7%.

Pour la majorité des molécules, les taux de dégradation ont été déterminés à <0,9% ; seule la testostérone (TST) a été détecté avec une dégradation s'élevant à 1,70%. Ces résultats montrent la stabilité de ces molécules dans les conditions expérimentales. Malgré leurs faibles taux de dégradation dans le témoin, ces taux ont été pris en considération dans le calcul de celle absorbée par les algues.

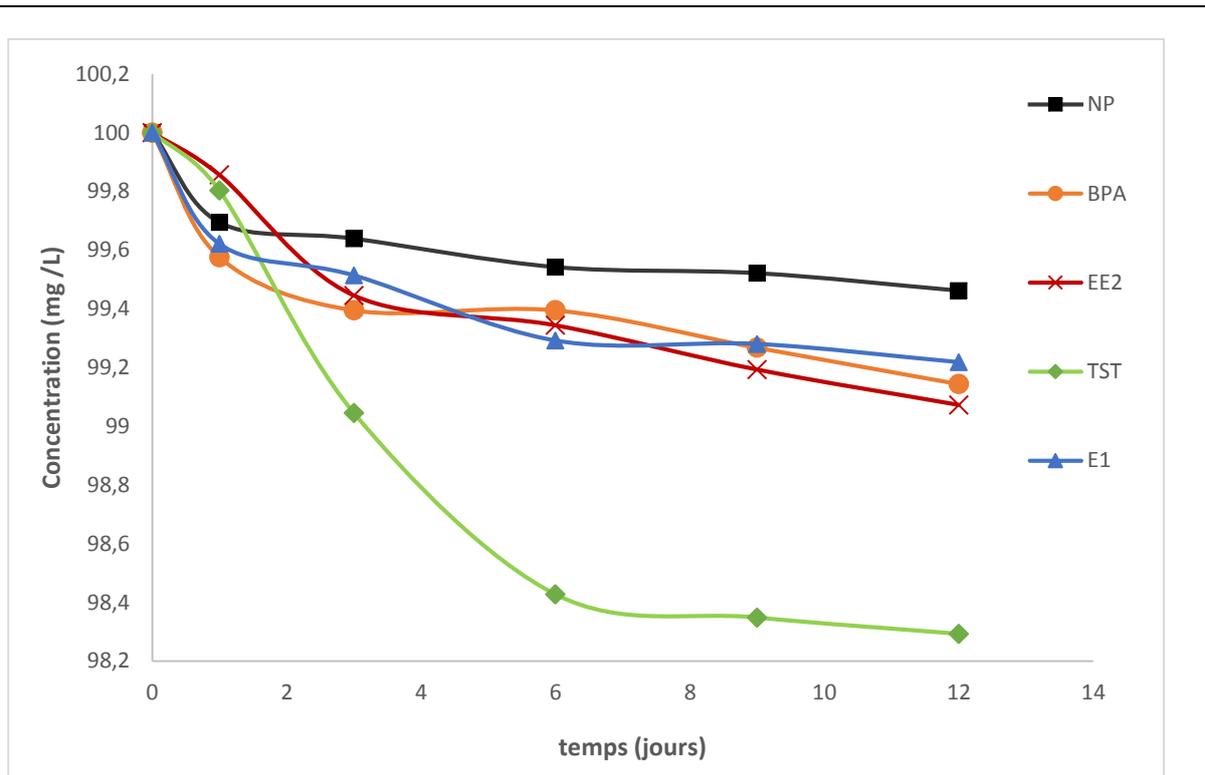


fig. IV-9 : Evolution en fonction du temps de la concentration des PEs sélectionnés en solution témoin.

II.2. Etude de faisabilité de bioremédiation

La durée expérimentale a été fixée pour une période de 24 jours. Cependant, les expériences ont été suspendues au bout de 12^{ème} jour de contact avec les algues en raison de la dégradation des billes supports des algues en dispersion immobilisée. L'évolution de la concentration des PEs sélectionnés dans les solutions contenant la *Spiruline* libre (algue SP) et la *Spiruline* immobilisée (Algue B) est représentée dans la fig. IV-10.

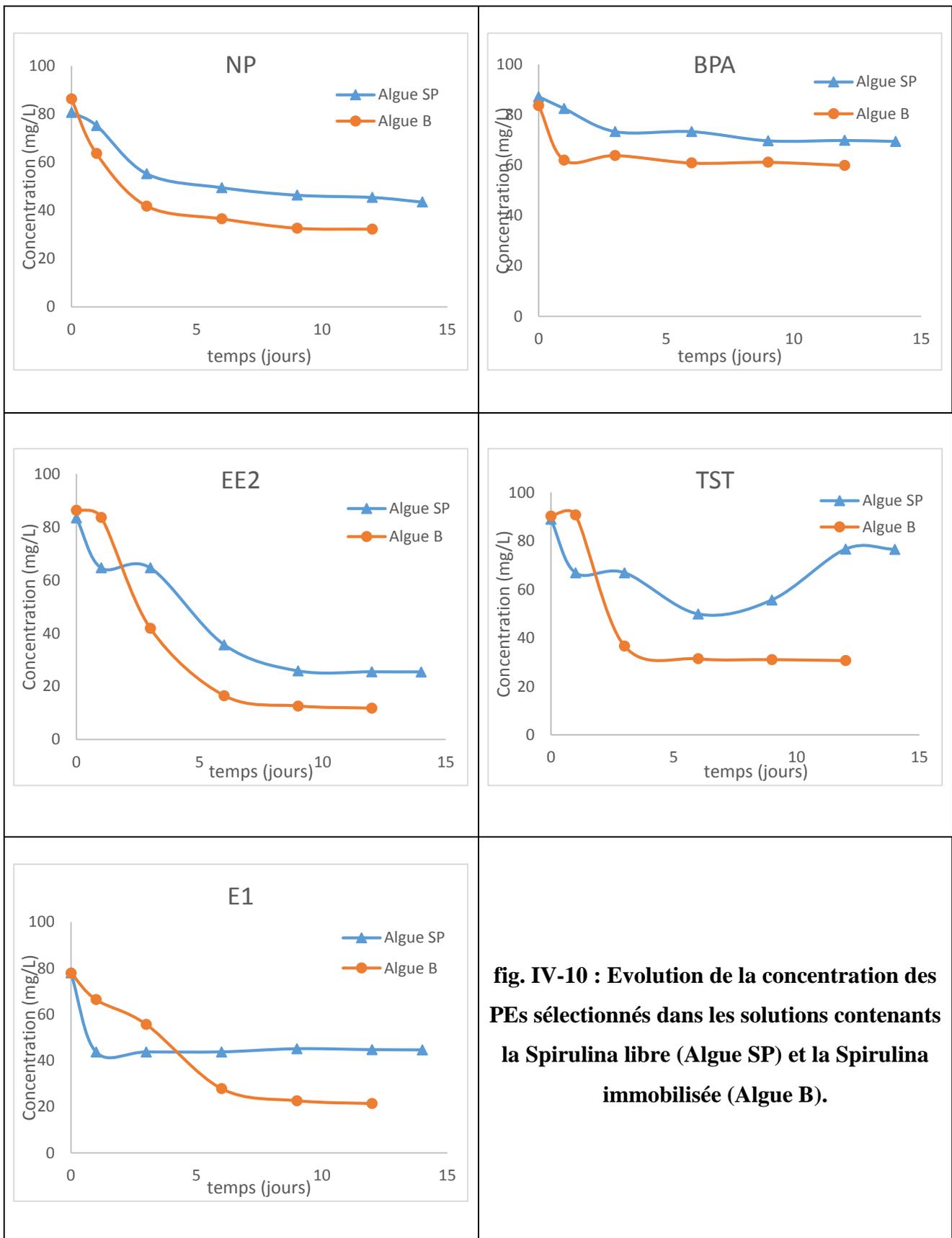


fig. IV-10 : Evolution de la concentration des PE_s sélectionnés dans les solutions contenant la Spirulina libre (Algue SP) et la Spirulina immobilisée (Algue B).

Les résultats obtenus montrent que le meilleur taux d'abattement est observé avec la spiruline immobilisée pour les cinq PEs étudiés. Cependant, les expériences n'ont pas pu être prolongées à plus de 12 jours car les billes d'algues en dispersion immobilisée sur l'alginate ont été dégradées dès le douzième jour d'expérience. Il semblerait que l'équilibre de la dégradation est atteint pour les deux milieux à partir de huitième jour, sauf la testostérone pour laquelle on remarque une désorption.

Les résultats ont montré que parmi les cinq perturbateurs endocriniens étudiés, le 17 α -éthynylestradiol se dégrade le plus rapidement par la Spiruline immobilisée avec un taux d'abattement de 88%. A l'opposée, le BPA est le plus résistant à la biodégradation par la Spiruline immobilisée avec un taux d'abattement de 40%.

Les quantités maximales de PEs dégradées en fonction de la masse de la Spiruline immobilisée sont présentées dans la fig. IV-11.

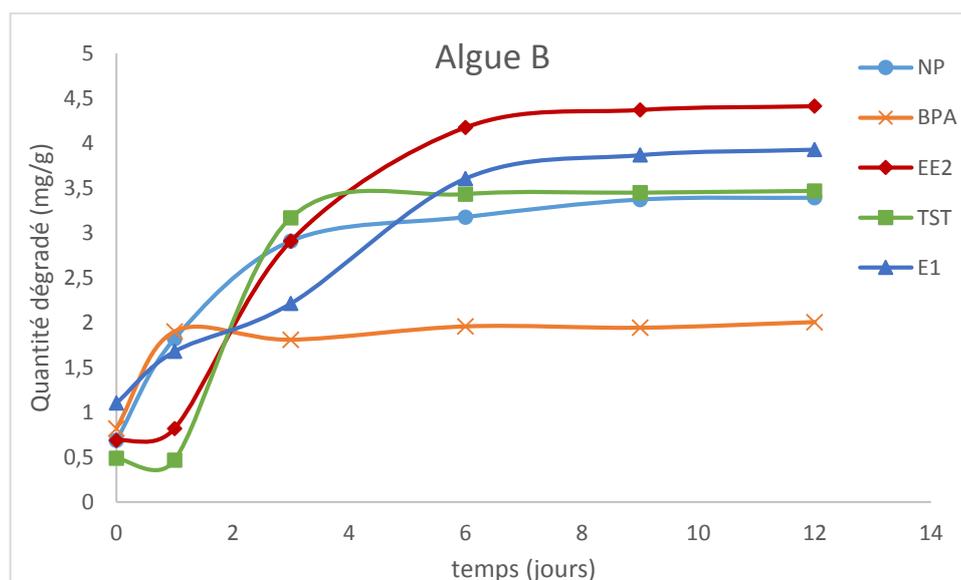


fig. IV-11 : la quantité dégradée des PEs par masse de la spiruline immobilisée en fonction de temps

Les résultats obtenus permettent de conclure que les algues Spiruline pourraient être efficaces pour le traitement des eaux contaminées par des PEs avec des quantités adsorbées supérieures à celles trouvées par l'adsorption sur les résidus des briques modifiées. Mais le processus d'élimination dure des jours pour la plupart des PEs étudiés.

Conclusion générale

Les objectifs de cette thèse sont multiples, le principal est de développer une méthode d'analyse pour la quantification simultanée des résidus de perturbateurs endocriniens susceptibles d'être présents dans l'environnement. Les contrôles de pollution nécessitent de disposer de méthodes analytiques précises et fiables pour les analyses des traces des PEs dans les matrices environnementales. L'effort a donc été focalisé essentiellement sur le développement analytique afin d'optimiser une méthode d'analyse multi-résiduelle pour la détection et la quantification de plusieurs PEs (13).

Le travail a débuté par la mise au point d'une méthode de quantification des PEs par GC-MS.

La majorité des PEs choisis sont polaires, peu volatiles et thermo instables : ce qui rend la détection et la quantification difficile avec la méthode d'analyse directe en GC-MS. La dérivation en dérivé triméthylsilylé a permis de les rendre plus volatiles, moins polaires et stables thermiquement, ce qui facilite par conséquent leurs analyses en GC-MS. La conduite optimale de la dérivation des PEs sélectionnées a été déterminée.

Pour l'optimisation des conditions de SPE, plusieurs paramètres ont été testés, à savoir la nature de la cartouche SPE, le pH de l'échantillon, le volume de l'échantillon et la nature de l'éluant. En raison du nombre important des paramètres qui peuvent influencer le rendement de l'extraction, l'optimisation a été effectuée à l'aide d'un plan d'expériences. Les conditions d'extraction et de purification par SPE ont été optimisées. Les conditions optimales ont été obtenues :

- ✚ avec la cartouche OASIS HLB,
- ✚ un pH d'échantillon fixé à 8,
- ✚ un volume de chargement de 540 ml,
- ✚ un mélange éthylacetate/acétone (5,67/4,3 : v/v) comme éluant.

Dans ce travail, les limites de quantification déterminées pour les PEs sont comprises entre 1 et 10 ng L⁻¹ et ce sont inférieures aux limites de concentration fixées par l'UE (cas de NP : LOQ = 2 µg L⁻¹) pour la plupart des PEs étudiées. Ces limites permettront une meilleure quantification des résidus de PEs dans l'environnement comparés à celle reportés par Garrido et al., (2016) (LOQ : 1,3 – 27 ng L⁻¹) utilisant la LC-MS/MS.

Cette procédure a ensuite été validée selon les normes d'une validation analytique à savoir la linéarité, la spécificité et la fidélité.

Le deuxième objectif porte sur l'application de la méthode optimisée pour évaluer les niveaux de concentration des PEs dans les eaux de surface, les eaux de rivières, les eaux de stations d'épuration et l'eau d'un puit d'une zone urbaine. Les résultats ont montré l'omniprésence de PEs dans les matrices environnementales. Ils sont détectés dans presque tous les échantillons d'eau de surface prélevés à la fois dans la Région Haut de France et dans le Grand Tunis (Tunisie).

Le troisième objectif de ces recherches est l'étude de la faisabilité d'élimination de ces résidus dangereux pour l'écosystème. Deux orientations ont été suivies : les techniques de traitement par adsorption sur les résidus de briques modifiés et la technique de bioremédiation avec l'algue verte, la Spiruline. L'étude de faisabilité de traitement par adsorption sur les briques modifiées, avec le suivi des paramètres d'adsorption (effet de la température et l'effet de pH) a été réalisée. Les paramètres thermodynamiques d'adsorption tels que l'enthalpie, l'entropie et l'énergie d'activation ont été calculées pour préciser les conditions de faisabilité.

Ce travail a permis de conclure que ce type de traitement pourrait être une solution efficace pour l'élimination des perturbateurs endocriniens présents dans les eaux. En une heure, une quantité moyenne de 8000 $\mu\text{g/g}$ des PEs a été adsorbée sur les résidus de brique modifiée et cette quantité est assez importante comparé à celle trouvée par adsorption sur le charbon actif commercial F400 (23 $\mu\text{g/g}$) (Joseph et al., 2013).

La deuxième technique de traitement biologique des eaux contaminées par des perturbateurs endocriniens, par la Spiruline s'avère prometteuse. La Spiruline a été utilisée sous la forme immobilisée dans les billes d'alginate. Dans les deux types de dispersion, le taux d'élimination déterminé est satisfaisant, et peut atteindre 90%. Malgré sa vitesse d'élimination qui dure jusqu'à 6 jours pour quelques PEs, cette technique peut être une solution avantageuse, peu coûteuse et efficace pour la remédiation dans les milieux naturels.

Perspectives

Dans une perspective de développement durable, il est souhaitable de maîtriser la gestion du risque, des rejets des perturbateurs endocriniens dans l'environnement. La limitation des risques environnementaux nécessite la mise en place d'une structure institutionnelle chargée, tels que l'observatoire nationale de la surveillance des milieux aquatiques.

Concernant les stations d'épuration des eaux usées (STEP), un contrôle strict de la présence des PE à l'entrée de la station, doit prévoir un traitement d'élimination adéquate en ligne : mise en place d'une technique analytique permettant la détection et la quantification in situ

Afin de réduire les risques de pollution de nos ressources d'eau potable, de la faune et la flore, il est indispensable de développer des méthodes pour l'élimination des perturbateurs endocriniens des milieux aquatiques, en utilisant des produits naturels telles que l'argile (brute ou modifiée). En Tunisie ce matériau est disponible en quantité et en variété. Les entreprises fournisseurs d'eau potable doivent être sensibilisées.

Comme les perturbateurs endocriniens interagissent fortement avec l'argile contenue dans le sol, il serait intéressant, dans une étude future, de se focaliser sur l'influence des paramètres du sol (les pourcentages en argile et en matière organique, la capacité d'échange cationique CEC), sur les rendements d'extraction des perturbateurs endocriniens des matrices solides. Ce travail nécessitera une étude sur l'interaction des PE avec les constituants du sol (humus, oligo-élément, bactéries, champignons...)

L'étude de l'influence des paramètres de l'extraction PLE sur le rendement d'extraction des perturbateurs endocriniens des matrices solides en utilisant l'approche des plans d'expériences.

Références bibliographiques

{A}

Allahdin, O., 2014. Elimination (par adsorption sur la brique activée) de polluants métalliques dans les eaux de la République Centrafricaine : pays en voie de développement. Aspects texturaux, physico-chimiques (électro)cinétiques et thermodynamiques. L'université-Lille1 Sciences Et Technologies.

Arnold, S.M., Clark, K.E., Staples, C.A., Klecka, G.M., Dimond, S.S., Caspers, N., Hentges, S.G., 2013. Relevance of drinking water as a source of human exposure to bisphenol A. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 23, 137.

{B}

Balaguer, P., Bourguet, W., 2017. Caractérisation des interactions entre récepteurs nucléaires et perturbateurs endocriniens contenus dans l'alimentation. *Cah. Nutr. Diététique* 52, 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2017.06.003>

Balakrishnan, V.K., Terry, K.A., Toito, J., 2006. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *J. Chromatogr. A* 1131, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.011>

Ballesteros-Gómez, A., Rubio, S., Pérez-Bendito, D., 2009. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *J. Chromatogr. A* 1216, 449–469. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.06.037>

Barouki, R., 2016. Les perturbateurs endocriniens: 25 ans déjà. *Environ. Risques Santé* 1, 22.

Belhaj, D., Athmouni, K., Jerbi, B., Kallel, M., Ayadi, H., Zhou, J.L., 2016. Estrogenic compounds in Tunisian urban sewage treatment plant: occurrence, removal and ecotoxicological impact of sewage discharge and sludge disposal. *Ecotoxicology* 25, 1849–1857. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1733-8>

Belhaj, D., Baccar, R., Jaabiri, I., Bouzid, J., Kallel, M., Ayadi, H., Zhou, J.L., 2015. Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa). *Sci. Total Environ.* 505, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.018>

- Beltrand, J., Godot, C., Kerbouch, S., Lepage, N., Jourdon, I., Polak, M., Schmidt, M.E., 2017. Utilisation d'un serious game dans l'éducation thérapeutique des patients d'âges pédiatriques atteints de diabète de type 1 : évaluation de l'intérêt et de l'adhérence chez des patients âgés de 10 à 16 ans. *Ann. Endocrinol.* 78, 203–204. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2017.07.749>
- Berryman, D., Houde, F., Deblois, C., O'Shea, M., 2003. Suivi des nonylphénols éthoxylés dans l'eau brute et l'eau traitée de onze stations de traitement d'eau potable au Québec. Dir. Suivi L'état L'environnement Ministère L'Environnement Qué. *Envirodoq No ENV20030001*.
- Bhattacharai, B., Muruganandham, M., Suri, R.P.S., 2014. Development of high efficiency silica coated β -cyclodextrin polymeric adsorbent for the removal of emerging contaminants of concern from water. *J. Hazard. Mater.* 273, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.044>
- Bono-Blay, F., Guart, A., de la Fuente, B., Pedemonte, M., Pastor, M.C., Borrell, A., Lacorte, S., 2012. Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and herbicides in Spanish source waters intended for bottling. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 3339–3349. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0851-y>
- Boron, W., Boulpaep, E., 2003. *Medical Physiology: a cellular and molecular approach*.
- Bougaran, G., Saint-Jean, B., 2014. Microalgues: de petits végétaux aux grandes promesses! *Biofutur* 28–31.
- Bouissou-Schurtz, C., Houeto, P., Guerbet, M., Bachelot, M., Casellas, C., Mauclair, A.-C., Panetier, P., Delval, C., Masset, D., 2014. Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69, 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.04.006>
- Braun, J.M., Kalkbrenner, A.E., Calafat, A.M., Yolton, K., Ye, X., Dietrich, K.N., Lanphear, B.P., 2011. Impact of Early-Life Bisphenol A Exposure on Behavior and Executive Function in Children. *PEDIATRICS* 128, 873–882. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-1335>

Brus, A., Perrodin, Y., 2017. Identification, assessment and prioritization of ecotoxicological risks on the scale of a territory: Application to WWTP discharges in a geographical area located in northeast Lyon, France. *Chemosphere* 189, 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.054>

Burgos, A.E., Ribeiro-Santos, T.A., Lago, R.M., 2016. Adsorption of the harmful hormone ethinyl estradiol inside hydrophobic cavities of CTA+ intercalated montmorillonite. *Water Sci. Technol.* 74, 663–671. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.207>

{C}

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E., 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Bmj* 305, 609–613.

Carmona, E., Andreu, V., Picó, Y., 2014. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Sci. Total Environ.* 484, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.085>

Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., 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). *Environ. Pollut.* 153, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.026>

Chaturvedi, S., Dave, P.N., 2012. Removal of iron for safe drinking water. *Desalination* 303, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2012.07.003>

Chen, J., Lichwa, J., Snehota, M., Mohanty, S., Ray, C., 2006. Determination of Hormones and Non-ionic Surfactant Degradation Products in Small-Volume Aqueous Samples from Soil Columns Using LC-ESI-MS-MS and GC-MS. *Chromatographia* 64, 413–418. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0036-2>

Christin-Maitre, S., Vatié, C., Fève, B., 2016. Impact des estrogènes sur la glycorégulation. *Médecine Mal. Métaboliques* 10, 717–724.

Czajka, C.P., Londry, K.L., 2006. Anaerobic biotransformation of estrogens. *Sci. Total Environ.* 367, 932–941. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.021>

{D}

- Damstra, T., 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors: an assessment prepared by an expert group on behalf of the World Health Organization, the International Labour Organisation, and the United Nations Environment Programme. World Health Organization.
- Dan Liu, Wu, S., Xu, H., Zhang, Q., Zhang, S., Shi, L., Yao, C., Liu, Y., Cheng, J., 2017. Distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in water, sediment and fishes in a shallow Chinese freshwater lake: Implications for ecological and human health risks. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 140, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.045>
- Danzl, E., Sei, K., Soda, S., Ike, M., Fujita, M., 2009. Biodegradation of Bisphenol A, Bisphenol F and Bisphenol S in Seawater. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6, 1472–1484. <https://doi.org/10.3390/ijerph6041472>
- De Champlain, M., 2011. Effet des hormones stéroïdes sexuelles non traitées dans les effluents municipaux. Université de Sherbrooke.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1549–1558.
- Deschênes, F., 2009. Utilisation des microalgues comme source d'énergie durable. Université de Sherbrooke.
- Diao, P., Chen, Q., Wang, R., Sun, D., Cai, Z., Wu, H., Duan, S., 2017. Phenolic endocrine-disrupting compounds in the Pearl River Estuary: Occurrence, bioaccumulation and risk assessment. *Sci. Total Environ.* 584–585, 1100–1107. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.169>
- Duval, G., Simonot, B., 2010. Les perturbateurs endocriniens : un enjeu sanitaire pour le xxième siècle. *Air Pur.*

{E}

- EC (2013) Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Off. J. Eur. Union L*, 226
- El Azher, N., Gourich, B., Vial, C., Souлами, M.B., Ziyad, M., 2008. Study of ferrous iron oxidation in Morocco drinking water in an airlift reactor. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 47, 1877–1886. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.10.013>
- Esteban, S., Gorga, M., González-Alonso, S., Petrovic, M., Barceló, D., Valcárcel, Y., 2014. Monitoring endocrine disrupting compounds and estrogenic activity in tap water from Central Spain. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 9297–9310. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2847-2>

{F}

- Facco, J.F., Martins, M.L., Bernardi, G., Prestes, O.D., Adaime, M.B., Zanella, R., 2015. Optimization and validation of a multiresidue method for pesticide determination in maize using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Methods* 7, 359–365. <https://doi.org/10.1039/C4AY01970A>
- Fatta-Kassinos, D., Meric, S., Nikolaou, A., 2011. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 251–275. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4300-9>
- Feinberg, max, 1996. la validation des méthodes d'analyse, Masson. ed. Paris.
- Focazio, M.J., Kolpin, D.W., Barnes, K.K., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Thurman, M.E., 2008. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — II) Untreated drinking water sources. *Sci. Total Environ.* 402, 201–216. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.021>
- Fries, E., Mahjoub, O., Mahjoub, B., Berrehouc, A., Lions, J., Bahadir, M., 2016. Occurrence of contaminants of emerging concern (cec) in conventional and non-conventional water resources in tunisia. *FEB-FRESENIUS Environ. Bull.* 3317.

Fromme, H., Küchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., Wenzel, A., 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36, 1429–1438.

{G}

Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galceran, M.T., 2011. Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 683, 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.034>

Garrido, E., Camacho-Muñoz, D., Martín, J., Santos, A., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2016. Monitoring of emerging pollutants in Guadiamar River basin (South of Spain): analytical method, spatial distribution and environmental risk assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 25127–25144. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7759-x>

Gómez-Pérez, M.L., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Martínez-Vidal, J.L., Garrido-Frenich, A., 2012. Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1248, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.088>

González-Rodríguez, R.M., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., Gonzalez-Barreiro, C., Simal-Gándara, J., 2011. A Review on the Fate of Pesticides during the Processes within the Food-Production Chain. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 99–114. <https://doi.org/10.1080/10408390903432625>

Gorga, M., Petrovic, M., Barceló, D., 2013. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1295, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.028>

Goupy, J., 2013. Introduction aux plans d'expériences: avec applications. "l'Usine nouvelle : Dunod, Paris.

Grassi, M., Rizzo, L., Farina, A., 2013. Endocrine disruptors compounds, pharmaceuticals and personal care products in urban wastewater: implications for agricultural reuse and their

- removal by adsorption process. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 3616–3628. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1636-7>
- Gros, M., Petrović, M., Barceló, D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70, 678–690. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.024>
- Grzeškowiak, T., Czarzyńska-Goślińska, B., Zgoła-Grzeškowiak, A., 2016. Current approaches in sample preparation for trace analysis of selected endocrine-disrupting compounds: Focus on polychlorinated biphenyls, alkylphenols, and parabens. *TrAC Trends Anal. Chem.* 75, 209–226. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.07.005>
- Guedes-Alonso, R., Montesdeoca-Esponda, S., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2014. Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. *Trends Environ. Anal. Chem.* 3–4, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2014.10.001>
- Guedes-Alonso, R., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2013. Simultaneous Determination of Hormonal Residues in Treated Waters Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Methods Chem.* 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/210653>

{H}

- Huang, B., Li, X., Sun, W., Ren, D., Li, X., Li, X., Liu, Y., Li, Q., Pan, X., 2014. Occurrence, removal, and fate of progestogens, androgens, estrogens, and phenols in six sewage treatment plants around Dianchi Lake in China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 12898–12908. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3236-6>
- Huang, B., Pan, X.-J., Wan, X., Liu, J.-L., Zhao, S.-M., Hu, P., Li, F.-R., 2011. Simultaneous Determination of Steroid Endocrine Disrupting Chemicals in Water by Solid Phase Extraction-Derivatization- Gas Chromatographic-Mass Spectrometry. *Chin. J. Anal. Chem.* 39, 449–454. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(10\)60431-8](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(10)60431-8)

{I}

Ibrahim, H., Boyer, A., Bouajila, J., Couderc, F., Nepveu, F., 2007. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceuticals and human serum by dual-mode gradient HPLC and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 857, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.07.008>

{J}

Janex-Habibi, M.-L., Huyard, A., Esperanza, M., Bruchet, A., 2009. Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: The benefit of wastewater treatment. *Water Res.* 43, 1565–1576. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.051>

Jelić, A., Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A., Barceló, D., 2012. Occurrence and Elimination of Pharmaceuticals During Conventional Wastewater Treatment, in: Guasch, H., Ginebreda, A., Geiszinger, A. (Eds.), *Emerging and Priority Pollutants in Rivers*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–23.

Ji, L., Chen, W., Duan, L., Zhu, D., 2009. Mechanisms for strong adsorption of tetracycline to carbon nanotubes: A comparative study using activated carbon and graphite as adsorbents. *Environ. Sci. Technol.* 43, 2322–2327. <https://doi.org/10.1021/es803268b>

Jie, Y., Jie, Z., Ya, L., Xuesong, Y., Jing, Y., Yu, Y., Jiaqi, Y., Jie, X., 2017. Pollution by Nonylphenol in river, tap water, and aquatic in an acid rain-plagued city in southwest China. *Int. J. Environ. Health Res.* 27, 179–190. <https://doi.org/10.1080/09603123.2017.1332345>

Jin, W., Huang, B., Wang, B., Wang, D.-W., Zhao, S.-M., Pan, X.-J., 2013. Simultaneous Determination of Androgens and Progestogen in Surface Water and Sediment by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chin. J. Anal. Chem.* 41, 205–209. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(13\)60628-3](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(13)60628-3)

Joseph, L., Boateng, L.K., Flora, J.R.V., Park, Y.-G., Son, A., Badawy, M., Yoon, Y., 2013. Removal of bisphenol A and 17 α -ethinyl estradiol by combined coagulation and adsorption using carbon nanomaterials and powdered activated carbon. *Sep. Purif. Technol.* 107, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.01.012>

Jungnickel, C., Stock, F., Brandsch, T., Ranke, J., 2008. Risk assessment of biocides in roof paint: Part 1: Experimental determination and modelling of biocide leaching from roof paint. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15, 258–265. <https://doi.org/10.1065/espr2007.12.465>

Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., López de Alda, M., Pujades, E., Barceló, D., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Sci. Total Environ.* 440, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.029>

{K}

Karnjanapiboonwong, A., Suski, J.G., Shah, A.A., Cai, Q., Morse, A.N., Anderson, T.A., 2011. Occurrence of PPCPs at a Wastewater Treatment Plant and in Soil and Groundwater at a Land Application Site. *Water. Air. Soil Pollut.* 216, 257–273. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0532-8>

Khazri, H., Ghorbel-Abid, I., Kalfat, R., Trabelsi-Ayadi, M., 2017. Removal of ibuprofen, naproxen and carbamazepine in aqueous solution onto natural clay: equilibrium, kinetics, and thermodynamic study. *Appl. Water Sci.* 7, 3031–3040. <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0414-3>

Kim, H.-C., Choi, W.J., Ryu, J.H., Maeng, S.K., Kim, H.S., Lee, B.-C., Song, K.G., 2014. Optimizing Cultivation Strategies for Robust Algal Growth and Consequent Removal of Inorganic Nutrients in Pretreated Livestock Effluent. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174, 1668–1682. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1145-2>

Kimura, K., Amy, G., Drewes, J.E., Heberer, T., Kim, T.-U., Watanabe, Y., 2003. Rejection of organic micropollutants (disinfection by-products, endocrine disrupting compounds, and pharmaceutically active compounds) by NF/RO membranes. *J. Membr. Sci.* 227, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2003.09.005>

Klamerth, N., Malato, S., Maldonado, M.I., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2010. Application of Photo-Fenton as a Tertiary Treatment of Emerging Contaminants in Municipal Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1792–1798. <https://doi.org/10.1021/es903455p>

{L}

- Labadie, P., Budzinski, H., 2005. Determination of Steroidal Hormone Profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environ. Sci. Technol.* 39, 5113–5120. <https://doi.org/10.1021/es048443g>
- Langmuir, I., 1916. The construction and fundamental properties of solids and liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 38(11), 2221-2295.
- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Manamsa, K., Talbot, J., 2015. Persistent and emerging micro-organic contaminants in Chalk groundwater of England and France. *Environ. Pollut.* 203, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.02.030>
- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. *Environ. Pollut.* 163, 287–303.
- Latrous El Atrache, L., Ben Sghaier, R., Bejaoui Kefi, B., Haldys, V., Dachraoui, M., Tortajada, J., 2013. Factorial design optimization of experimental variables in preconcentration of carbamates pesticides in water samples using solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray-mass spectrometry determination. *Talanta* 117, 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.032>
- Le Cozler, Y., Peccatte, J.-R., Porhiel, J.-Y., Brunschwig, P., Disenhaus, C., 2009. Pratiques d'élevages et performances des génisses laitières: état des connaissances et perspectives. *Prod. Anim.* 22, 303–316.
- Lei, H., Snyder, S.A., 2007. 3D QSPR models for the removal of trace organic contaminants by ozone and free chlorine. *Water Res.* 41, 4051–4060. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.010>
- Li, Z., Xiang, X., Li, M., Ma, Y., Wang, J., Liu, X., 2015. Occurrence and risk assessment of pharmaceuticals and personal care products and endocrine disrupting chemicals in reclaimed water and receiving groundwater in China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 119, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.031>
- Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., Balsaa, P., Gans, O., Weiss, S., Blaha, L., Bolchi, M., Gawlik, B.M., 2010. Pan-European survey on the

occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res.* 44, 4115–4126. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.032>

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014a. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473–474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014b. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473–474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>

{M}

Maggioni, S., Balaguer, P., Chiozzotto, C., Benfenati, E., 2013. Screening of endocrine-disrupting phenols, herbicides, steroid estrogens, and estrogenicity in drinking water from the waterworks of 35 Italian cities and from PET-bottled mineral water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 1649–1660. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1075-x>

Matthiessen, P., Sumpter, J.P., 1998. Effects of estrogenic substances in the aquatic environment, in: *Fish Ecotoxicology*. Birkhäuser Basel, pp. 319–335.

{N}

Nakada, N., Shinohara, H., Murata, A., Kiri, K., Managaki, S., Sato, N., Takada, H., 2007. Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Res.* 41, 4373–4382. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.038>

Net, S., 2010. Etude de la réactivité hétérogène des composés organiques issus de la combustion de la biomasse. Université de Provence Aix-Marseille 1.

Net, S., Rabodonirina, S., Sghaier, R.B., Dumoulin, D., Chbib, C., Tlili, I., Ouddane, B., 2015. Distribution of phthalates, pesticides and drug residues in the dissolved, particulate and

sedimentary phases from transboundary rivers (France–Belgium). *Sci. Total Environ.* 521–522, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.087>

Ngapo, T., Garipey, C., 2004. Hormones de croissance - Revue de littérature.pdf.

Nie, M., Yang, Y., Liu, M., Yan, C., Shi, H., Dong, W., Zhou, J.L., 2014. Environmental estrogens in a drinking water reservoir area in Shanghai: Occurrence, colloidal contribution and risk assessment. *Sci. Total Environ.* 487, 785–791. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.010>

Nie, Y., Qiang, Z., Zhang, H., Ben, W., 2012. Fate and seasonal variation of endocrine-disrupting chemicals in a sewage treatment plant with A/A/O process. *Sep. Purif. Technol.* 84, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.01.030>

{O}

Ouertani, R., El Atrache, L.L., Hamida, N.B., 2013. Alkaline hydrolysis of ethiofencarb: Kinetic study and mechanism degradation. *Int. J. Chem. Kinet.* 45, 118–124. <https://doi.org/10.1002/kin.20748>

{P}

Padhye, L.P., Yao, H., Kung'u, F.T., Huang, C.-H., 2014. Year-long evaluation on the occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disrupting chemicals in an urban drinking water treatment plant. *Water Res.* 51, 266–276. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.070>

Paris, F., Servant, N., Térouanne, B., Sultan, C., 2002. Evaluation of androgenic bioactivity in human serum by recombinant cell line: preliminary results. *Mol. Cell. Endocrinol.* 198, 123–129.

Peng, X., Yu, Y., Tang, C., Tan, J., Huang, Q., 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. *Sci. Total Environ.* 397, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.059>

Petrovic, M., de Alda, M.J.L., Diaz-Cruz, S., Postigo, C., Radjenovic, J., Gros, M., Barcelo, D., 2009. Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and

- membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* 367, 3979–4003. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0105>
- Pinson, A., Franssen, D., Gérard, A., Parent, A.-S., Bourguignon, J.-P., 2017. Neuroendocrine disruption without direct endocrine mode of action: Polychloro-biphenyls (PCBs) and bisphenol A (BPA) as case studies. *C. R. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2017.07.006>
- Pont, J., Delouis, C., 1987. Induction hormonale de la lactation chez la vache: résultats de trois années d'expérimentation en ferme, in: *Annales de Zootechnie*. pp. 237–248.
- Posadas, E., Bochon, S., Coca, M., García-González, M.C., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2014. Microalgae-based agro-industrial wastewater treatment: a preliminary screening of biodegradability. *J. Appl. Phycol.* 26, 2335–2345. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0263-0>
- {R}**
- Radjenović, J., Petrović, M., Barceló, D., 2009. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Res.* 43, 831–841. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.043>
- Randhawa, G.K., Kullar, J.S., 2011. Bioremediation of Pharmaceuticals, Pesticides, and Petrochemicals with Gomeya/Cow Dung. *ISRN Pharmacol.* 2011, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2011/362459>
- Razzak, S.A., Hossain, M.M., Lucky, R.A., Bassi, A.S., de Lasa, H., 2013. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 27, 622–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.063>
- Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R., vom Saal, F.S., 2007. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod. Toxicol.* 24, 199–224. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.06.004>

Rizzo, L., 2011. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Res.* 45, 4311–4340. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.035>

{S}

Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Viñas-Diéguéz, L., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2015. Occurrence of endocrine disrupting compounds in five estuaries of the northwest coast of Spain: Ecological and human health impact. *Chemosphere* 131, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.062>

Schwarzenbach, R.P., Egli, T., Hofstetter, T.B., von Gunten, U., Wehrli, B., 2010. Global Water Pollution and Human Health. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 35, 109–136. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-100809-125342>

Sedira, N., 2013. Etude de l'adsorption des métaux lourds sur un charbon actif issu de noyaux de dattes. University of Souk Ahras.

Singer, H., Jaus, S., Hanke, I., Lück, A., Hollender, J., Alder, A.C., 2010. Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water. *Environ. Pollut.* 158, 3054–3064. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.013>

Snyder, S.A., Adham, S., Redding, A.M., Cannon, F.S., DeCarolis, J., Oppenheimer, J., Wert, E.C., Yoon, Y., 2007. Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination* 202, 156–181. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.12.052>

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>

Stafiej, A., Pyrzynska, K., Regan, F., 2007. Determination of anti-inflammatory drugs and estrogens in water by HPLC with UV detection. *J. Sep. Sci.* 30, 985–991. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600433>

Stepien, D.K., Regnery, J., Merz, C., Püttmann, W., 2013. Behavior of organophosphates and hydrophilic ethers during bank filtration and their potential application as organic

tracers. A field study from the Oderbruch, Germany. *Sci. Total Environ.* 458–460, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.020>

Sun, L., Yong, W., Chu, X., Lin, J.-M., 2009. Simultaneous determination of 15 steroidal oral contraceptives in water using solid-phase disk extraction followed by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 5416–5423. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.041>

{T}

Teijon, G., Candela, L., Tamoh, K., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Sci. Total Environ.* 408, 3584–3595. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.041>

Thurman, E.M., Writer, J.H., Ferrer, I., 2013. Injection Port Derivatization for GC/MS–MS, in: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, pp. 115–141.

Tostain, J., Rossi, D., Martin, P.M., 2004. Physiologie des androgènes chez l’homme adulte. *Prog Urol* 14, 639–660.

{V}

Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T., Myers, J.P., 2012. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr. Rev.* 33, 378–455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>

Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2013. Evaluation of the Presence of Endocrine-Disrupting Compounds in Dissolved and Solid Wastewater Treatment Plant Samples of Gran Canaria Island (Spain). *BioMed Res. Int.* 2013, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/790570>

Vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Parmigiani, S., Welshons, W.V., 1998. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol. Ind. Health* 14, 239–260.

Vulliet, E., Cren-Olivé, C., 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environ. Pollut.* 159, 2929–2934. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.033>

Vulliet, E., Cren-Olivé, C., Grenier-Loustalot, M.-F., 2011. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Environ. Chem. Lett.* 9, 103–114. <https://doi.org/10.1007/s10311-009-0253-7>

{W}

Wang, C., Shi, H., Adams, C.D., Gamagedara, S., Stayton, I., Timmons, T., Ma, Y., 2011. Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Water Res.* 45, 1818–1828. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.043>

Wilson, J., Foster, D., 1985. *textbook of endocrinology*, 7th ed.

Wolff, M.S., Teitelbaum, S.L., Windham, G., Pinney, S.M., Britton, J.A., Chelimo, C., Godbold, J., Biro, F., Kushi, L.H., Pfeiffer, C.M., Calafat, A.M., 2006. Pilot Study of Urinary Biomarkers of Phytoestrogens, Phthalates, and Phenols in Girls. *Environ. Health Perspect.* 115, 116–121. <https://doi.org/10.1289/ehp.9488>

{X}

Xu, Y., Xu, N., Llewellyn, N.R., Tao, H., 2014. Occurrence and removal of free and conjugated estrogens in wastewater and sludge in five sewage treatment plants. *Env. Sci Process. Impacts* 16, 262–270. <https://doi.org/10.1039/C3EM00199G>

{Y}

Yu, Y., Wu, L., 2015. Determination and occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in fish (*Morone saxatilis*). *Front. Environ. Sci. Eng.* 9, 475–481. <https://doi.org/10.1007/s11783-014-0640-6>

Yu, Z., Peldszus, S., Huck, P.M., 2008. Adsorption characteristics of selected pharmaceuticals and an endocrine disrupting compound—Naproxen, carbamazepine and nonylphenol—

on activated carbon. *Water Res.* 42, 2873–2882.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.020>

{Z}

Zhang, C., Li, Y., Wang, C., Niu, L., Cai, W., 2016. Occurrence of endocrine disrupting compounds in aqueous environment and their bacterial degradation: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 46, 1–59. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1061881>

Zoeller, R.T., Brown, T.R., Doan, L.L., Gore, A.C., Skakkebaek, N.E., Soto, A.M., Woodruff, T.J., Vom Saal, F.S., 2012. Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153, 4097–4110. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1422>

Zuccato, E., Castiglioni, S., 2009. Illicit drugs in the environment. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* 367, 3965–3978. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0107>

Annexe

Annexe 1 Généralités sur les plans d'expériences

Annexe 2 Modes de détection MS

Annexe 3 Structure des principaux minéraux argileux

Annexe 4 Adsorbant utilisé

Annexe 1 Généralités sur les plans d'expériences

Les plans d'expériences ont un vocabulaire et une terminologie qu'il est nécessaire de définir (Goupy, 2013). Ces vocabulaires sont définis ci-dessous :

✚ **Facteur** : Un facteur est une grandeur physique ou chimique, modifiable ou contrôlable par l'expérimentateur, censée avoir une influence sur les réponses considérées. Lorsqu'un facteur varie on dit qu'il change de niveau. La connaissance de l'ensemble de tous les niveaux utilisés par chaque facteur est nécessaire pour la réalisation des expériences. On fait souvent varier un facteur étudié entre un niveau bas (-1) et niveau haut (+1).

✚ **Réponse** : On appelle réponse la grandeur physique étudiée dans l'examen d'un phénomène. Cette étude peut se traduire par plusieurs réponses (rendement, abattement..). La valeur d'une réponse ne peut être modifiée que de manière indirecte en faisant varier les facteurs.

✚ **Domaine expérimental** : Il présente l'espace dans lequel peuvent varier les facteurs. Les informations tirées des résultats expérimentaux ne seront valables que dans ce domaine.

✚ **Variables codées** : Les variables naturelles sont des valeurs algébriques qui sont définies pour quantifier les différents facteurs. Généralement, elles ne sont pas exprimées dans le même système d'unités, ce qui rend difficile la comparaison de leurs effets. Pour cela, dans les plans d'expériences, toutes les variables naturelles sont transformées en valeurs codées sans dimension.

✚ **Matrice d'expérience** : Une matrice d'expérience est un objet mathématique qui représente l'ensemble des expériences à réaliser. Elle est toujours écrite sous forme codée. Elle est constituée de N lignes correspondants au nombre d'expérience et k colonnes correspondant au nombre de variables. Dans une matrice donnée, un élément X_{ij} correspond au niveau de l' $i^{\text{ème}}$ expérience et de la $j^{\text{ème}}$ variable.

✚ **Plan d'expérimentation** : Un plan d'expérimentation correspond à la «traduction» de la matrice d'expériences en une matrice directement utilisable par l'expérimentateur car les variables seront exprimées en variables naturelles. Le plan d'expérimentation doit faire l'objet d'une analyse minutieuse pour voir si toutes les expériences sont réalisables et si elles ne présentent aucun risque.

Types de plans d'expériences

Selon l'objectif recherché, on peut distinguer trois types de plans d'expériences, les plans de criblage, de modélisation et des mélanges (Goupy, 2013) :

- ✚ Les plans de criblage dont l'objectif est de repérer les facteurs les plus influents sur une réponse donnée avec un minimum d'essais.
- ✚ Les plans de modélisation dont l'objectif est de trouver la relation mathématique qui lie les réponses aux facteurs. Les plans factoriels complets et fractionnaires ainsi que les plans pour surfaces de réponses font partie de cette famille.

Ces deux premiers types de plans sont définis comme des plans conventionnels. Ils concernent les plans dont les facteurs sont indépendants. Le plan factoriel complet est celui utilisé dans ces travaux de recherches.

- ✚ les plans de mélange dont l'objectif est le même que la deuxième famille mais les facteurs ne sont pas indépendants. Il faut prendre en compte pour la construction de ces plans le fait que leurs sommes ou leurs rapports doit être égale à une constante.

Etude quantitative des facteurs

Dans ces plans, on attribue à chaque facteur variable deux niveaux extrêmes, a (-1) et b (+1), quantitatifs ou qualitatifs, correspondant aux limites d'un intervalle raisonnable de variation. L'ensemble des niveaux a et b définis pour chaque facteur délimite le domaine expérimental de l'étude ; 2^k expériences sont donc programmées, elles conduiront à autant de valeurs y de la réponse Y. La matrice des essais correspondant au plan optimal comporte k colonnes et 2^k lignes. Elle se construit de la façon suivante : dans la colonne correspondant au premier facteur on alterne les a (-1) et les b (+1), dans celle du second facteur on alterne les a et les b de 2 lignes en 2 lignes, dans la colonne du facteur de rang k on alterne les a et les b de 2^{k-1} lignes en 2^{k-1} lignes. Les effets moyens des facteurs et leurs interactions sont calculés.

Pour déterminer les effets principaux des facteurs et les interactions entre les facteurs, nous utiliserons un modèle polynomiale du premier degré :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{44}X_4^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4$$

Avec :

Y: réponse expérimentale (taux de récupération)

b_0 = une constante égale à la valeur de Y quand les X_i sont égaux à zéro.

b_i : représente l'évaluation des effets principaux du facteur i

b_{ii} : représente l'évaluation de l'effet du second ordre du facteur i

b_{ij} : représente l'évaluation des interactions entre le facteur i et le facteur j.

Annexe 2 Modes de détection MS

Avec le détecteur MS de la trappe d'ion, l'analyse peut se faire en plusieurs modes :

- ✚ **FS** : le détecteur détecte toutes les molécules et à tout moment. Cela permet de déterminer les temps de rétention et les spectres de masses relatifs aux composés que nous voulons étudier.
- ✚ **SIS** : Une méthode SIS peut être créée seulement lorsqu'on connaît préalablement les fragments caractéristiques et le TR de chaque molécule obtenus lors d'acquisition en mode FS. Le mode SIS permet de stocker dans la trappe ou d'éjecter un ou plusieurs ion(s) ou une gamme d'ions spécifiques. Les ions matriciels indésirables sont ainsi éliminés ce qui permet de réduire le bruit de fond et d'augmenter la sensibilité pour des échantillons complexes. Ce mode sélectif est plus adapté à l'analyse quantitative des HAP et des Me-HAP dans les extraits de sédiments.
- ✚ **MS/MS** : Il consiste à sélectionner un ion par une première spectrométrie de masse, puis à le fragmenter, et effectuer une deuxième spectrométrie de masse sur les fragments ainsi générés. Elle peut être réalisée à l'aide de nombreux appareils combinant des secteurs magnétiques, électriques, quadripolaires ou des temps de vol, mais également au sein d'un même analyseur dans le cas d'une trappe d'ions.
- ✚ **MRM** : Le principe de MRM est identique à celui du MS/MS. La seule différence est que le MRM permet de visualiser sur plusieurs canaux des pics qui ont les TR proches ou identiques. Il facilite ainsi le traitement de données chromatographiques.

Annexe 3 Structure des principaux minéraux argileux

Il existe différentes classifications des argiles. La plus classique est basée sur l'épaisseur et la structure du feuillet. On distingue ainsi 4 groupes :

- Minéraux à 7 Å : Le feuillet est constitué d'une couche tétraédrique et d'une couche octaédrique. Il est qualifié de T/O ou de type 1/1;
- Minéraux à 10 Å : Le feuillet est constitué de deux couches tétraédriques et d'une couche octaédrique. Il est qualifié de T/O/T ou de type 2/1;
- Minéraux à 14 Å : Le feuillet est constitué de l'alternance de feuillets T/O/T et de couches octaédriques interfoliaires.

tab. A-3-1 Classification des minéraux argileux (Khazri ,2017).

Groupe Minéraux argileux	Espace Minérale	Structure T=couche de tétraèdre O=couche d'octaèdre
Kaolinite	Kaolinite Halloysite Dickites	Minéraux à 2 couches T-O T-O
Smectite	Montmorillonite Saponites Beidellite	Minéraux à 3 couches T-O-T T-O-T ↑
Illite Vermiculites Micas	Illite Vermiculites Muscovites Biotite	H ₂ O, cations ↓
Sepiolites Palygorskites	Sépiolite (écume de mer) Attapulgite	Minéraux en latte <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">T-O-T</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">T-O-T</div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 5px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">T-O-T</div> </div>

✚ La kaolinite

La kaolinite est constituée d'une succession de couches alternées de feuillets en tétraèdre (Silice) et de feuillets en octaèdre (Aluminium), qui explique donc que l'on considère la kaolinite comme un minéral argileux 1/1. Sa formule théorique est $\text{Si}_4\text{Al}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$. Les deux feuillets sont liés de telle manière qu'ils forment une seule couche d'épaisseur d'environ 7 Å (0,7 nm) qui s'étend indéfiniment dans les deux autres directions.

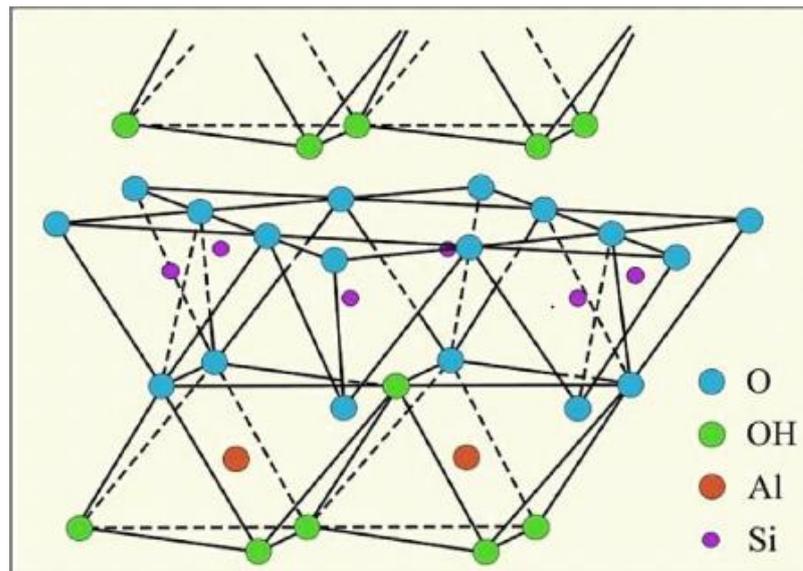


fig. 00-1-3 Représentation schématique de la structure de kaolinite

✚ L'illite

L'illite est constituée d'une couche octaédrique (O) intercalée entre deux couches tétraédriques (T). Les illites sont des minéraux argileux à feuillet de type 2/1 et à équidistance basale stable à 10 Å. Elle présente des substitutions fréquentes de Si^{4+} par Mg^{2+} , Fe^{2+} ou Fe^{3+} , les défauts de charge de la maille sont compensés en général par des ions K^+ dans les cavités hexagonales des couches tétraédriques. Ces gros cations assurent la liaison ionique des feuillets adjacents et bloquent l'écart réticulaire à 10 Å quel que soit l'état d'hydratation.

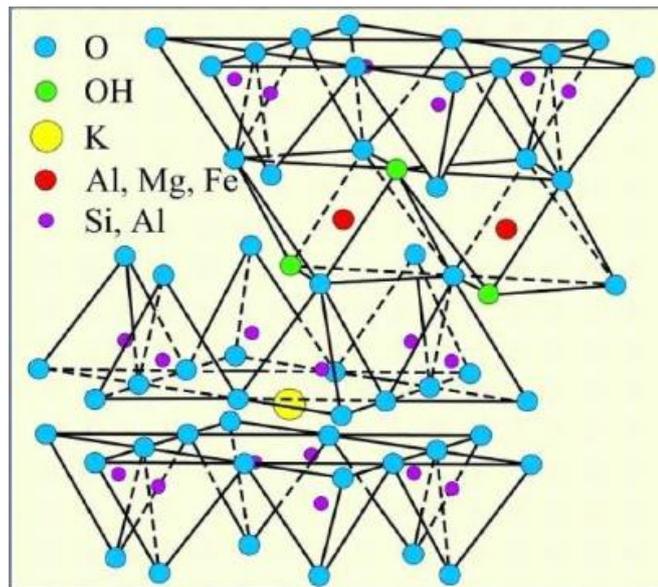


fig. 0-2 Représentation schématique de la structure de l'illite

✚ Les smectites

Les smectites sont des phyllosilicates de type 2/1 (ou TOT), constituées de deux couches tétraédriques encadrant une couche octaédrique. Les smectites diffèrent selon que les substitutions isomorphiques sont prédominantes dans les couches tétraédriques et/ou octaédriques ainsi que selon la composition chimique de leurs couches octaédriques, autrement dit suivant que si le minéral est dioctaédrique ou trioctaédrique

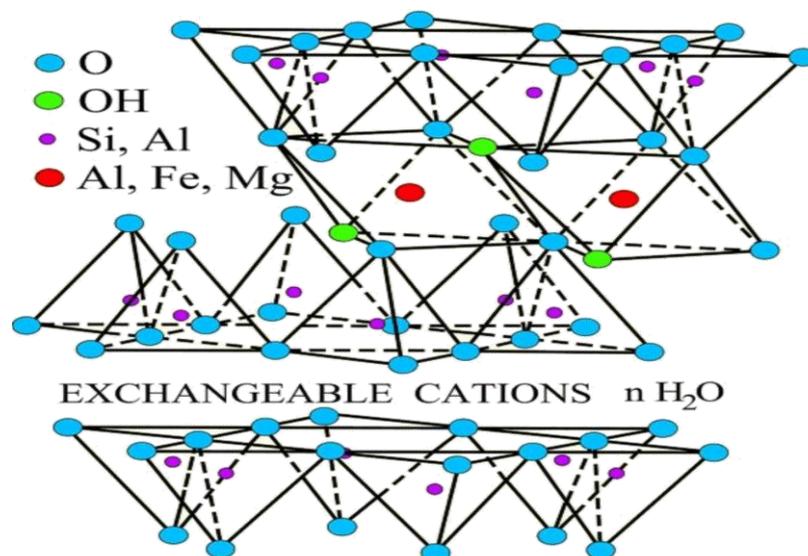
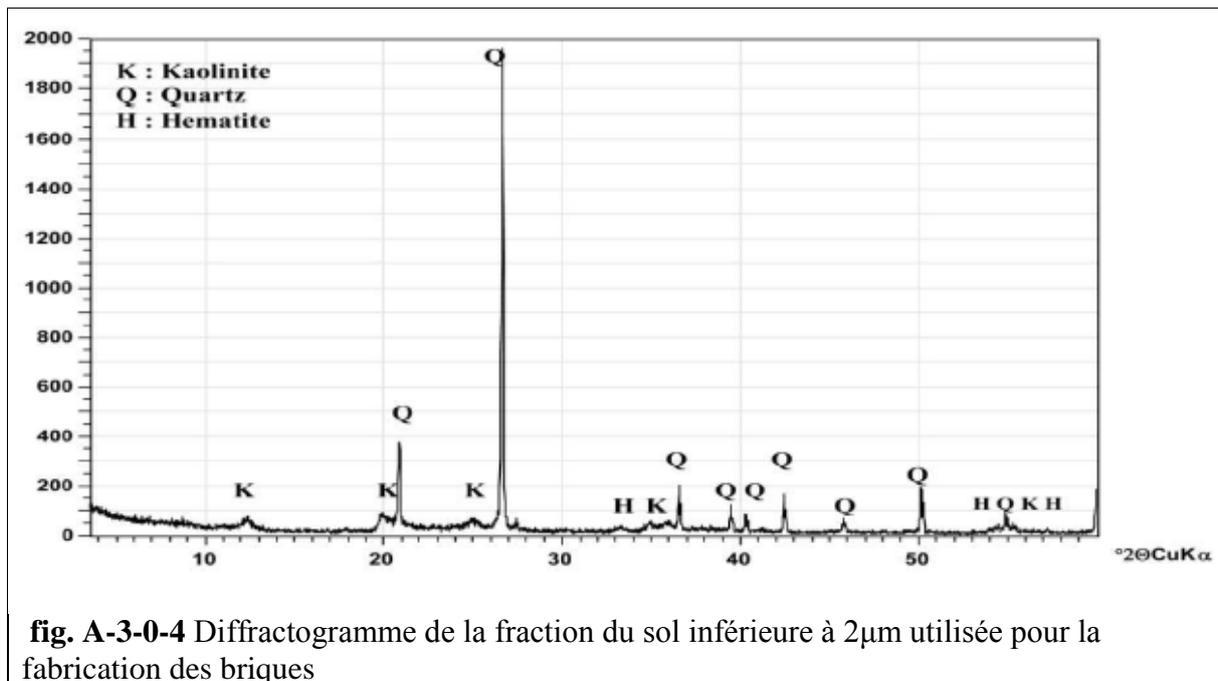


fig. A-3-0-3 Représentation schématique de la structure de smectite

Annexe 4 Adsorbant utilisé

Le diffractogramme DRX (diffraction des Rayons X) de l'échantillon du sol utilisé pour la fabrication des briques montre différentes raies correspondant au quartz (SiO_2), à la kaolinite [$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$] et en faible quantité à l'hématite (Fe_2O_3). La fraction du sol inférieure à $2\mu\text{m}$ est très riche en argile.



Le Kaolinite : le feuillet est toujours neutre, dioctaédrique et alumineux, de composition $(\text{Si}_2)(\text{Al}_2)\text{O}_5(\text{OH})_4$ par demi-maille. Morphologiquement, la kaolinite se présente sous forme de particules hexagonales constituées par des empilements de feuillets (Errais, 2011). Des études récentes ont montré que la kaolinite est un bon adsorbant (Allahdin, 2014).

Pour fabriquer artisanalement les briques, seule la partie du sol extrait à 0,2m en dessous de la surface est utilisée. L'eau est ajoutée pour constituer une pâte pouvant être moulée sous forme de brique. Ces briques sont ensuite séchées à l'air pendant 48 heures puis empilées pour former un four avec des ouvertures dans lesquelles du bois est brûlé durant 2 à 3 jours. Après refroidissement du four (environ une semaine) les briques sont récupérées.

Des travaux récents montrent que l'activation de la kaolinite par traitement acide à différentes températures produit une désagrégation des feuillets, élimine les impuretés, altère les couches de surface, et permet d'augmenter l'aire spécifique et la porosité. Afin d'augmenter le pouvoir adsorbant de la brique élaborée en RCA, ont utilisé cette méthode afin d'augmenter son aire spécifique et son volume poreux (Allahdin, 2014).

Les briques sont pilées et tamisées à une granulométrie comprise entre 0,7 et 1mm (16-25 mesh). Nous avons retenu cette taille (tamis à notre disposition) qui est voisine de celle des résines échangeuses d'ions (Chelex, Amberlite) : 0,5 et 0,6 mm. L'aire spécifique de la brique brute utilisée ($31 \pm 2.8 \text{ m}^2/\text{g}$) est supérieure à celle donnée par Selvaraju et Pushpavanam ($9.8 \text{ m}^2/\text{g}$) pour des particules de briques de tailles comprises entre 0,4 et 0,7 mm fabriquées en Inde. Pour augmenter l'aire spécifique deux méthodes chimiques ont été testé: un prétraitement de la brique par de l'acide dilué et un prétraitement de la brique par de l'acide concentré à chaud. Les résultats obtenus ont montré que les grains de brique activée par l'acide chlorhydrique 6M pendant 3 heures à 90°C ont une aire spécifique de 31 à $76 \text{ m}^2/\text{g}$. Le traitement acide avec une solution HCl 6M modifie la morphologie de la brique. Suite à ce traitement acide, on remarque en outre l'apparition de fissures entre les particules constituant le grain.

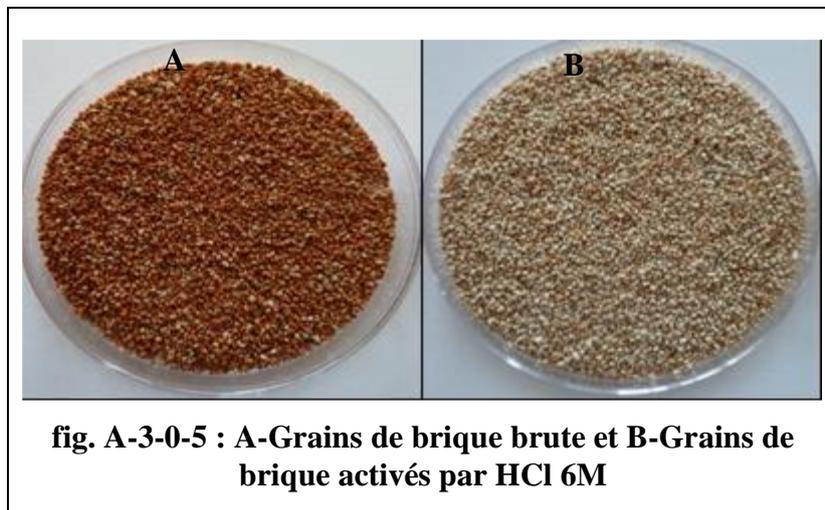


fig. A-3-0-5 : A-Grains de brique brute et B-Grains de brique activés par HCl 6M

Une grande partie du fer de constitution est enlevé par l'acide chlorhydrique à chaud, en accord avec la décoloration des grains. Les travaux précédents ont montré que le traitement acide génère des sites dits de Brönsted (H^+) et/ou de Lewis (Si, Al) localisés à la surface du matériau modifié. Ce traitement acide favorise une augmentation de la surface spécifique (de $S=31 \text{ m}^2/\text{g}$ à $S=76 \text{ m}^2/\text{g}$), du volume poreux (de $V_{\text{pore}} = 0.15 \text{ cm}^3/\text{g}$ à $V_{\text{pore}} = 0.23 \text{ cm}^3/\text{g}$) et une élévation de la microporosité du matériel. L'amélioration des caractéristiques texturales de la brique par activation va nous servir à rendre la brique plus adsorbante.

Articles

Article 1 Simultaneous detection of 13 Endocrine disrupting Chemicals in Water by a combined of SPE-BSTFA Derivatization and GC-MS in transboundary rivers (France-Belgium).

Article 2 A Combine of Factorial Design, off-line SPE and GC-MS Method for Quantifying 7 Endocrine Disrupting Compounds in Water.

**Simultaneous detection of 13 Endocrine Disrupting Chemicals in Water by a combined
of SPE-BSTFA Derivatization and GC-MS in transboundary rivers
(France-Belgium)**

Rafika Ben Sghaier^{1,2}, Sopheak Net^{1,*}, Ibtissem Ghorbel-Abid^{2,3}, Salma Bessadok¹, Maiwen
Le Coz⁴, Dalila Ben Hassan-Chehimi², Malika Trabelsi-Ayadi², Michele Tackx⁴ & Baghdad
Ouddane¹

¹Université de Lille 1, Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman
(LASIR)-UMR CNRS 8516, Equipe Physico-chimie de l'Environnement,
Cité Scientifique 59655 Villeneuve d'Ascq, France

²Faculté des Sciences de Bizerte, Laboratoire d'Application de la Chimie aux Ressources et
Substances Naturelles et à l'Environnement-LACReSNE-Université de Carthage
7021 Zarzouna, Bizerte-Tunisie

³Laboratoire méthodes et techniques d'analyses(LMTA). Institut national de recherche
d'analyse physico-chimique (INRAP) Tunisie

⁴ECOLAB, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, France.

Water, Air, & Soil Pollution

2017

* Corresponding author: Dr. Sopheak NET

Email: sopheak.net@univ-lille1.fr

Tel: + 33 (0)3 28 77 85 24

Fax: +33 (0)3 20 43 48 22

Abstract

The occurrence of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in the aquatic environment has brought increasing concern due to their potential adverse impacts on ecosystems and humans. These compounds are generally present in complex water matrices, such as surface waters at trace levels (ng L^{-1}) making their analysis difficult. In this work, an analytical method for the simultaneous determination of 13 EDCs, including 5 steroid estrogens, 1 progestogen, 1 androgen and 6 endocrine-disrupting phenols in water was developed using solid phase extraction (SPE), derivatization and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The method was validated by spiking the 13 EDCs to the interest matrix. The recovery was in the range of 52-71% with an average of 62%. The limits of quantification were 1 ng L^{-1} and 5-10 ng L^{-1} for phenolic compounds and hormones respectively. The validated method was applied to assess the contamination level of the targeted EDCs in fifteen sites collected from six rivers located at the cross-border area of Northern France and Belgium. The majority of the considered compounds were detected in the sampling sites and among them, bisphenol A (BPA) was found at the highest level which can be up to 286 ng L^{-1} . However, NP was the most frequently detected, followed by BPA and PG.

Keywords: Endocrine-disrupting compounds, surface waters, derivatization, GC-MS

1. Introduction

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) such as steroid estrogens, both natural and synthetic, and phenolic chemicals are widely used as surfactants, plasticizer, preservatives, disinfectants, and antiseptics (Silva et al., 2002; Jobling et al., 2004; Roepke et al., 2005). They have attracted a large worldwide scientific attention due to their widespread distribution into ecosystems and aquatic organisms, and potentially adverse health effects (Jobling and Tyler, 2006; Fernandez et al., 2007; Lee et al., 2010; Sim et al., 2010; Gomez et al., 2012). EDCs have been linked to infertility, feminization, premature puberty, developmental problems, attention-deficit hyperactivity disorder, obesity, diabetes, impaired immune function, endocrine cancers (prostate, ovarian and breast), birth deformities, metabolic syndrome and other diseases (Jobling et al., 2004; Roepke et al., 2005; De Coster and van Larebeke, 2012; Rogers et al., 2013). Due to the adverse physiological effects of EDCs for human and wildlife, it is therefore critical to develop a reliable method for their reliable quantification.

Numerous analytical methods have been proposed to monitor the EDCs in water samples (Kuster et al., 2004; Petrovic et al., 2004; Jiménez-Díaz et al., 2015). Among them, gas

chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high performance liquid chromatography-liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) are the most currently used for the simultaneous analysis of EDCs. However, GC-MS offers good separation, identification capabilities and exhibit high sensitivity for lower experiment cost (Zhang et al., 2005; Streck et al., 2009). But, in order to enhance detection sensibility and best separation resolution in GC-MS analysis, silylation is required to derivatize hydroxyl groups of EDCs, and thus reduce polarity, increase volatility and thermal stability of the analytes. The most common derivatization reagent is the N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) (Liu et al., 2004; Lei et al., 2009). Indeed, the GC-MS analytical technique linked with BSTFA as a derivatization agent allows identification of a large range of organic compounds which contain –OH and/or –COOH moieties (Net et al., 2010). BSTFA is usually used in combination with a small proportion of catalyst trimethylchlorosilane (TMCS) to enhance derivatization efficiency (Duong et al., 2010). However, optimal conditions such as temperature, heating time of derivatization and equilibration time vary strongly from one compound to another.

In this work, firstly, the optimal conditions for the simultaneous quantification of 13 EDCs have been determined. Secondly, the method was applied to assess the concentration of 13 EDCs in dissolved phase in water collected from fifteen sites in six rivers located in the cross-border area Northern France-Belgium and the upstream Scheldt watershed.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

EDCs standards: progesterone, testosterone, 17 α -estradiol, 17 α -ethynylestradiol, 17 β -estradiol, estriol, estrone, 4-nonylphenol, bisphenol A, bisphenol F, bisphenol E, bisphenol C and bisphenol G, were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA) with a purity of 99%. The silylation derivatization reagent N,O-bis[trimethylsilyltrifluoroacetamide] w/1% trimethylchlorosilane (BSTFA 1% TMCS) were obtained from Restek (Bellefonte, USA). 17 β -estradiol-d₂, progesterone-C₁₃ and bisphenolA-d₁₆ with a purity of 99% were used as internal standards for steroid estrogens and phenolic chemicals. Supel-Select HLB SPE cartridges (200 mg/6 mL) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). HPLC grade ethyl acetate, dichloromethane (DCM), methanol, acetonitrile and hexane were purchased from Dislab (Lens, France). Ultrapure water (Milli-Q) was produced by a Millipore apparatus

(18.2 M Ω cm⁻¹ resistivity). Sodium sulfate, silica and diatomaceous earth were calcinated at 450°C overnight to eliminate the potential contaminants.

2.2. Study sites and Sampling

The studied area is part of the watershed of the Scheldt, which presents high anthropogenic activities and high population density. Moreover, its historical industrialization was among the highest in Europe (Boughriet et al., 2007; Net et al., 2014a, b, 2015; Rabodonirina et al., 2015). These sites have been known to be among the most contaminated areas by trace metallic elements and organic pollutants. However, there is lack of data available in the literature concerning EDCs residues for the study area.

The sampling campaign was conducted in early spring 2015, from 07/04 to 10/04/2015 in fifteen sites in six rivers located at the cross-border area Northern France - Belgium (Fig. 1). Six sites were located along the Scheldt river (Fresnes, Neuville, Crevecoeur, Warcoing, Berchem, Zingem), three sites along the Lys River (Aire sur-la-Lys, Erquinghem-Lys, Wervicq), two on the Deûle river (Don and Wambrechies), two on the Scarpe River (Brebrières and Nivelles), one on the Sensée River (Férin) and one on the Sambre River (Jeumont). Water samplings were performed using pre-cleaned amber glass 2.5 L bottles that were immediately capped with Teflon-lined lid. Water samples were directly filtered using 0.45 μ m Whatman glass microfiber filters to separate the dissolved phase from suspended solid matter (SSM). Targeted EDCs residues in filtered water were extracted using Solid Phase Extraction (SPE).

During the sampling, classical parameters such as pH, temperature (T), dissolved oxygen (O₂), turbidity, and potential (E) have been measured directly in the field.

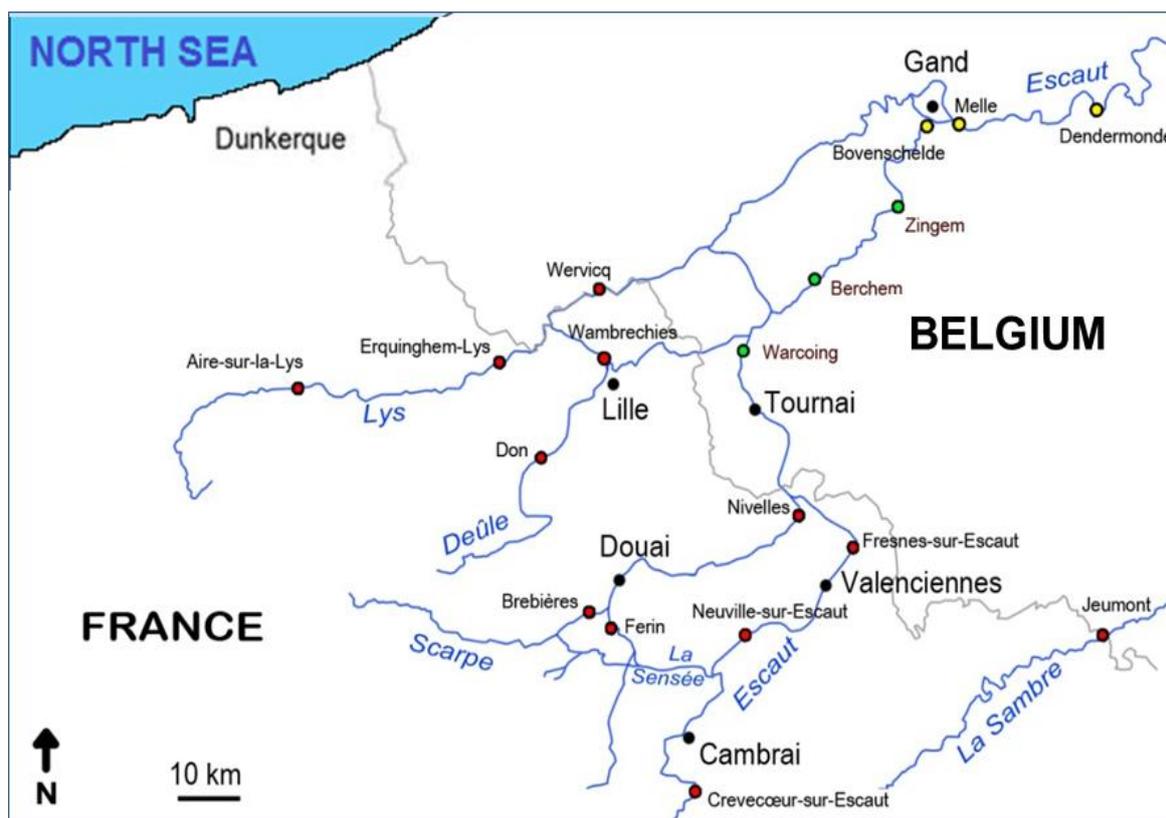


Fig. 1: Studied sites at the cross-border area Northern France - Belgium and the watershed upstream of the Scheldt. Sampling sites are indicated by red and green cycles respectively for the studied areas located in France and in Belgium.

2.3. Targeted analytes

In this work, 13 endocrine disrupting chemicals were analyzed. (i) Hormones: Progesterone (PG), Testosterone (TST) and five estrogens namely 17α -estradiol (α E1), 17α -ethynylestradiol (α EE2), 17β -estradiol (β E2), estriol (E3) and estrone (E1). (ii) Phenolic contaminants (PCs) including 5 bisphenols (BPs): 4-nonylphenol (NP), bisphenol A (BPA), bisphenol F (BPF), bisphenol E (BPE), bisphenol C (BPC) and bisphenol G (BPG). Their structures, acronyms, chemical formula, molecular mass, molecular mass of derivative compound, retention time (RT), quantifier ions, recoveries and limit of quantification (LOQ) are presented in Table 1.

Table 1: Trivial name, acronyms, elemental composition, chemical structure, molecular weight (Mw), Molecular weight after silylation (Mw-TMS), retention time (RT), characteristic ions

(m/z), correlation coefficient (R^2), method quantification limits (LOQ) and method detection limits (LOD) of 13 EDCs.

Trivial name and acronyms	Chemical formula	Chemical structure	Mw	Mw - TMS	RT (min)	Ions (m/z)	Recovery (%; n≥3)	R2	LOQ (ng L ⁻¹)	LOD (ng L ⁻¹)
4-nonylphenol NP	C ₁₅ H ₂₄ O		220	292	7.61	179; 292	63±1.4	0.99 7	1	0.33
Bisphenol F BPF	C ₁₃ H ₁₂ O ₂		200	344	8.92	344; 343	68±2.2	0.99 7	1	0.33
Bisphenol E BPE	C ₁₄ H ₁₄ O ₂		214	394	9.06	369	70±2.3	0.99 7	1	0.33
Bisphenol A BPA	C ₁₅ H ₁₆ O ₂		228	372	9.27	357; 358	67±1.6	0.99 7	1	0.33
Bisphenol C BPC	C ₁₇ H ₂₀ O ₂		256	400	9.68	386; 400	71±2.2	0.99 7	1	0.33
Bisphenol G BPG	C ₂₁ H ₂₈ O ₂		312	456	9.7	441; 456	70±2.1	0.99 7	1	0.33
17α-estradiol αE2	C ₁₈ H ₂₄ O ₂		272	416	12.33	282; 342; 416	53±1.7	0.99 8	10	3.33
17α-ethynylestradiol αEE2	C ₂₀ H ₂₄ O ₂		296	440	12.41	425; 285	52±2.3	0.99 8	10	3.33
Estrone E1	C ₁₈ H ₂₂ O ₂		270	342	12.59	257; 342; 343	58±1.9	0.99 6	10	3.33
17β-estradiol E2	C ₁₈ H ₂₄ O ₂		272	416	12.7	342; 416	54±1.3	0.98 9	10	3.33
Testosterone TST	C ₁₉ H ₂₈ O ₂		288	360	13.24	129; 226; 345	62±2.1	0.98 5	5	1.66
Estriol E3	C ₁₈ H ₂₄ O ₃		288	504	14.3	311; 386; 504	54±1.8	0.99 8	10	3.33
Progesterone PG	C ₂₁ H ₃₀ O ₂		314	-	14.64	124; 299; 314	68±2.2	0.98 9	5	1.66

2.4. Solid phase extraction (SPE)

Filtered water samples (500 mL) were spiked with internal standards (17β-estradiol-d₂, progesterone-C¹³ and bisphenol A-d₁₆). The SPE cartridges, containing hydrophilic-lipophilic-balanced (HLB) copolymer were chosen for the extraction/pre-concentration of EDCs. SPE cartridges were placed on 12-port Visiprep vacuum manifold and conditioned sequentially with

3 mL of ethyl acetate/methanol (1/1, v/v), 3 mL of methanol and 3 mL of ultrapure Millipore-Q water (pH 2). Then, filtered water was extracted at a flow rate ~ 5 mL/min. The cartridges were washed with 3 mL of methanol-water (2/3, v/v) then dried under vacuum for 1h. The analytes were eluted from the sorbents with 9 mL of ethyl acetate/acetone (1/1, v/v) at a flow rate of 1-2 mL/min. The eluate was dried under a gentle stream of nitrogen and transferred into GC injection vial by solubilizing in 50 μ L of acetonitrile. Finally, each extract was subjected to derivatization with BSTFA.

2.5. Derivatization

Each extract was derivatized with 50 μ L of derivatization reagent (BSTFA containing 1% TMCS) and heated at 65°C. Indeed, the temperature and the duration of derivatization were studied and the optimal condition was obtained with 65°C and 2h of heating. For the calibration curve, the linearity range between 0.1 and 10 μ g/mL was appropriate for every compound and has been used in this study. For the calibration curve, 50 μ L of standard mixture solution (10 mg L⁻¹) were spiked with 10 μ L internal standard (0.01 g L⁻¹) then were derivatized by adding 50 μ L derivatization reagent and heat at 65°C for 1h as for the extract. After the derivatization reaction, the derivatives were kept at room temperature during 15 min prior to GC-MS analysis.

2.6. GC-MS analysis

The extracts were analyzed using a Varian 3900 gas chromatograph (GC) equipped with a deactivated fused-silica guard column (5 m, 0.25 mm i.d.) and a fused-silica capillary Phenomenex XLB (60 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness) and coupled with a Varian Ion Trap Saturn 2000 Mass Spectrometer (MS). The carrier gas was helium, held at a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. One μ L of each sample was injected in the splitless mode at 280°C and the injector was purged with helium after 1 min. The temperature of the GC was programmed as follows: initial temperature 100°C, held for 2 min, 5°C/min ramped to 250°C then 3°C/min ramped to 300°C and held for 2.33 min. The transfer line and the ion trap were respectively held at 280°C and 220°C. Each targeted compound was identified based on the retention time (RT) and the mass spectrum (m/z) from chromatogram of standard solutions acquired in full scan (FS) mode. Quantification was then performed in the single ion storage (SIS), MS/MS or multiple reaction monitoring (MRM) modes for better selectivity. Response factors were determined relative to the internal standards response and to standard mixtures.

3. Results and discussions

3.1. Method development

3.1.1. Initial temperature effect study

The initial temperature plays an important role in the analysis of the endocrine disrupting chemicals (EDCs) with GC-MS. It was set to allow fast removal of the solvent without losses of the analytes. To study the injector temperature effect, three experiments were carried out in FS mode by using a 5 µg/mL of standard solution EDCs: 50°C, 80°C and 100°C. Fig. 2 shows the chromatograms obtained with the initial temperature 50, 80 and 100°C. Best detection was obtained with initial injector temperature set at 100°C. Accordingly, the temperature of the GC was programmed as follows: initial temperature 100°C, held for 2 min, 5°C/min ramped to 250°C then 3°C/min ramped to 300°C and held for 2.33 min.

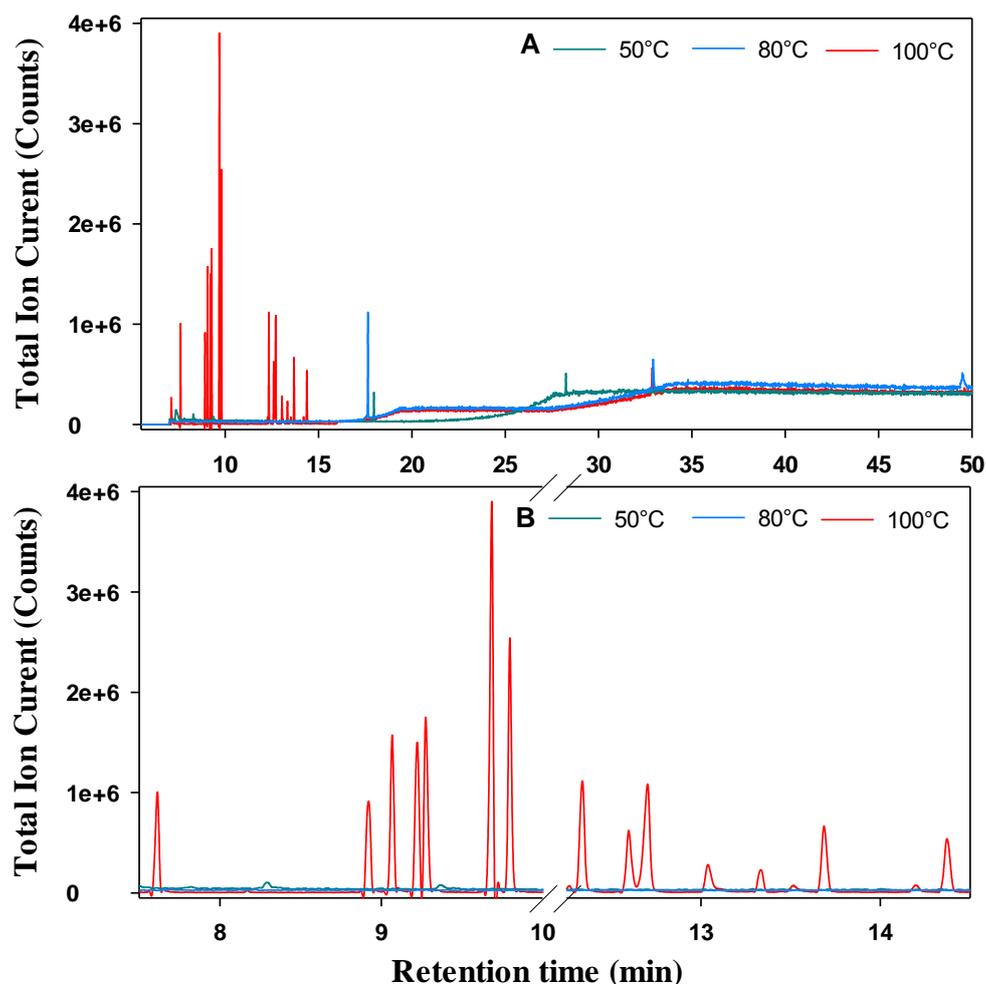


Fig. 2: Chromatograms of the 13 EDCs with injector temperature 50°C, 80°C and 100°C (A) between 5 and 50 min and (B) a zoom between 7.5 and 15 min.

3.1.2. Derivatization optimization

The E1, α E2, TST and NP contain one hydroxyl group in their structure, while EE2, E2, BPA, BPC, BPF, BPG and BPE contain two hydroxyl groups and the E3 contains 3 hydroxyl groups. Direct analysis of these compounds by using GC-MS could not allow good efficiency. To enhance the detection sensitivity and separation resolution for the analysis of target EDCs by GC-MS, derivatization is an essential step to increase their volatility and thermal stability. The common derivatization reagents which proved their efficiency for the EDCs are silylation reagents, such as BSTFA or N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA) (Thurman et al., 2013). These reagents silylate the hydroxyl groups of the EDCs to get trimethylsilyl (TMS) derivative (Fig. 3). However, this stepwise derivatization method has significant problems such as incomplete derivatization and the derivate instability.

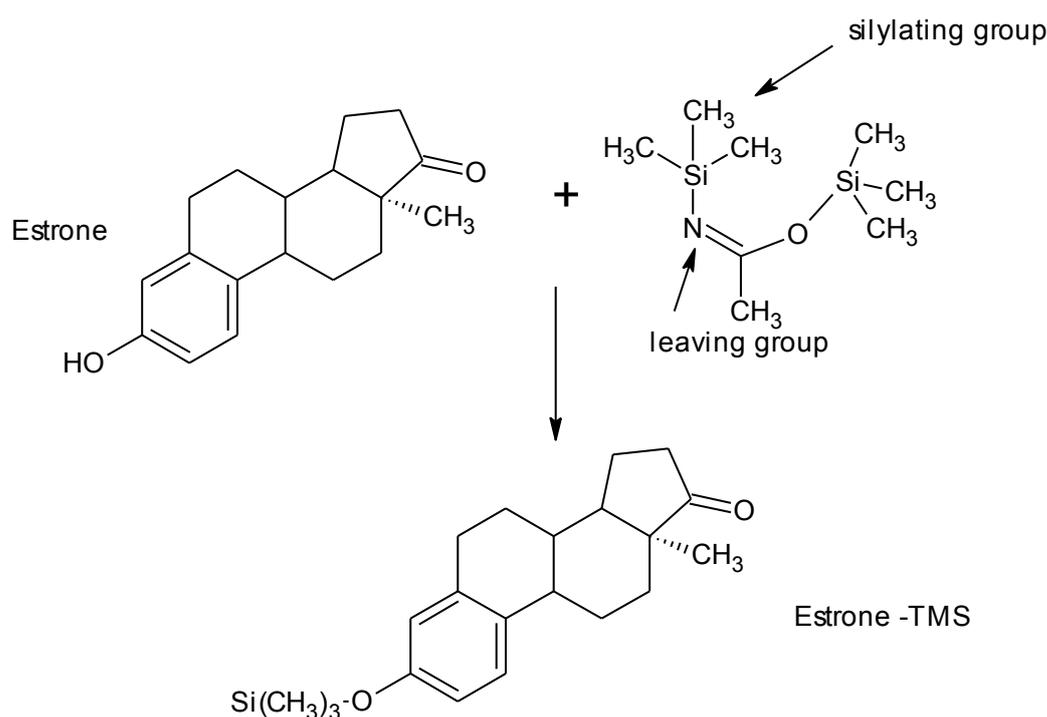
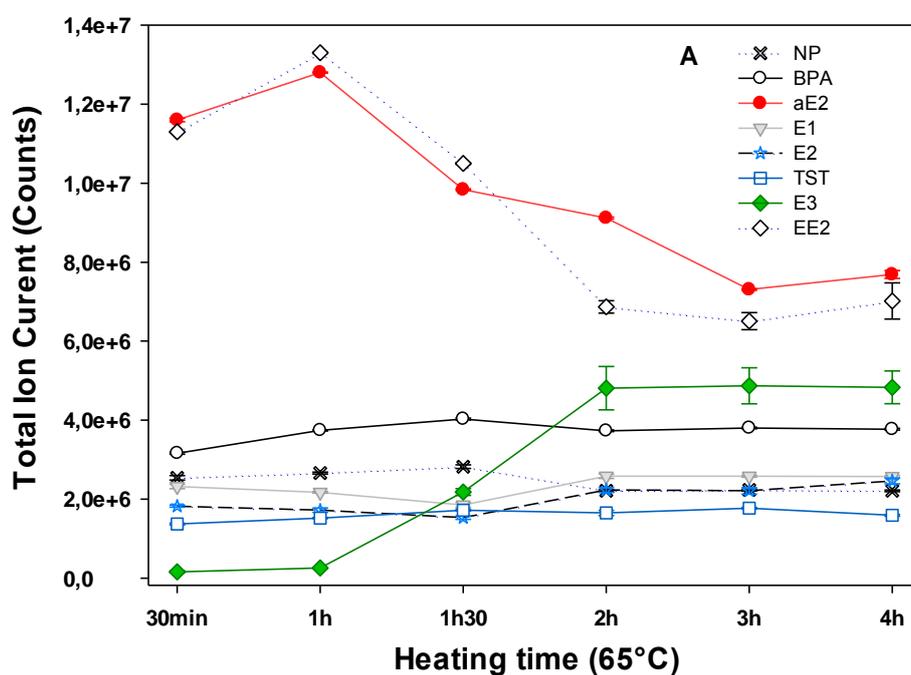


Fig. 3: The silylation reaction of estrone with BSTFA.

In this study the hydroxyl groups were derivatized by using BSTFA catalyzed with 1% of TMCS (50 μ L of BSTFA, 1% TMCS) and heating at 65°C. The influence of the reaction time (heating time) was carried out to investigate the optimum condition of heating. Heating times of 30 min, 1h, 1 h 30 min, 2h, 3h and 4h have been performed and the results are shown in Fig. 4A. The equilibrium time after heating can also influence significantly on the detection (Fig.

4B). Indeed, after heating at 65°C for 2h, the mixtures were cooled at room temperature during 0 min, 15 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h and 10h prior to GC-MS analysis. The results showed that the best efficiencies were obtained when heated at 65°C during 2 h except for EE2 and α E2 of which better detection was obtained when heating during 1 h. However, these two compounds (EE2 and α E2) still presented a high intensity of detection when heating during 2h. For the equilibration time after heating, the optimum was obtained with 15 min of equilibration at room temperature for all the selected compounds. The best compromise for the simultaneous detection of these hormones and alkylphenols was to heat at 65°C during 2h and keep at room temperature for 15 min for equilibration.



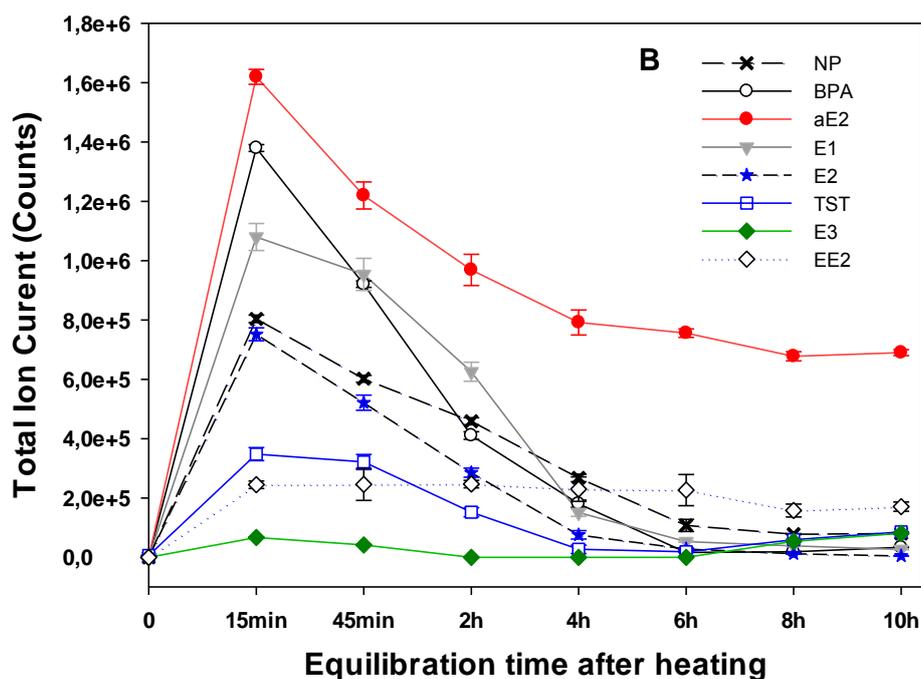


Fig. 4: (A) Effect of heating time on the reaction of the derivatization at 65°C. (B) Effect of equilibration at room temperature after heating at 65°C of hormones and alkylphenols (n=3).

3.1.3. Method validation

The optimum conditions were validated and linearity range, repeatability of these 13 hormones and alkylphenols were studied. For this purpose, a series of injections of the mixture of targeted compounds at the concentration ranging from 0.001 to 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) with 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of internal standards was used to determine the linear concentration range. For each concentration, the analysis was performed in triplicate. Table 1 presents the details on the RT, LOQ, LOD, quantifier ions (m/z) and correlation coefficient (R^2) of each targeted EDC.

In this work, the limits of detection and quantification obtained for the studied compounds were lower than the values reported in previous studies. In a study conducted by Vega-Morales (Vega-Morales et al., 2010) using HPLC-DAD, the method limits of detection (LOD) obtained for the estrogens and progesterone were 600 and 300 ng L^{-1} , respectively. In another study by Queiroz (Queiroz et al., 2014) using HPLC/HRMS, the LOD for estrogens was 9.3-12.4 ng L^{-1} and for BPA was 2.1 ng L^{-1} . In another study, Selvaraj (Selvaraj et al 2014), reported an LOD of 1.5 ng L^{-1} for BPA and 1.1 for estrogens when using GC/MS.

As shown in table 1, the studied EDCs achieved recoveries ranged from 52 to 71 %. Queiroz (Queiroz et al., 2014) and Viglino (Viglino et al., 2008) reported a recovery range for these compound 12 to 87 % and 46 to 87 % respectively. The total recoveries obtained for all

analytes were lower than those observed when each family of EDCs was extracted separately. Despite the low recovery rates of the analytes, the coefficients of variation were less than 10%. This was regarded as satisfactory, considering that the 13 EDCs were extract simultaneously.

3.2. Application for surface water

3.2.1. Physicochemical characteristics of waters

In the laboratory, SSM was also measured. The values of the field measured water parameters and SSM values parameters are listed in Table 1S. Generally, the water bodies were relatively neutral or slightly basic with pH values of 7.68-8.57 and well oxygenated with dissolved oxygen concentration ranging between 6.5 and 18.44 mg L⁻¹. The temperature was ranging from 11.2 to 16.1°C. However, SSM along the Scheldt presented a large variation ranging from 2.47 at Brebières to 66.36 mg L⁻¹ at Berchem.

3.2.2. Occurrence of EDCs in the environment

Table 3 presents the concentration of every individual compound detected in each sampling site. The concentration of each compound varied significantly from site to site. NP was the most frequently detected and followed by BPA and PG. Among the selected hormones, PG was the most frequently detected. Its concentration varied from <LOQ to 10.9±0.5 ng L⁻¹ (Brebières) (Table 2). These concentrations were in the same order as those reported by Labadie and Budzinski (2005) in the Jalle d'Eysines River near Bordeaux, France.

Table 2: Individual concentration of the EDCs in the fifteen sites

Compounds	Concentration of individual EDC (ng L ⁻¹)												
	NP	BPF	B P E	BPA	BPC	BPG	αE 2	EE 2	E1	E2	TST	E3	PG
Aire sur LaLys	14.9±0 .4	77.7±0 .4	N Q	38.8± 0.2	NQ	NQ	N Q	N Q	NQ	NQ	NQ	NQ	6.1±0. 1
Berchem	16.9±0 .4	NQ	N Q	76.4± 0.2	NQ	10.3± 0.1	N Q	N Q	70.2±0. 1	NQ	NQ	NQ	6.0±0. 01
Brebières	20.1±0 .4	91.9±0 .4	N Q	286±2 .0	24.26± 0.4	NQ	N Q	N Q	NQ	NQ	NQ	NQ	10.9±0 .5
Crevecoeur	1.9±0. 4	NQ	N Q	39.5± 0.2	68.22± 0.2	NQ	N Q	N Q	116.2± 0.4	NQ	NQ	NQ	6.3±0. 4
Don	20.3±0 .4	NQ	N Q	51.7± 0.3	NQ	20.9± 0.4	N Q	N Q	NQ	NQ	5.8±0. 5	21.0±0 .4	6.7±0. 1
Erquinghem	8.1±0. 5	NQ	N Q	27.7± 0.2	NQ	NQ	N Q	N Q	NQ	NQ	6.5±0. 4	70.7±0 .1	NQ
Ferin	3.6±0. 1	NQ	N Q	NQ	NQ	NQ	N Q	N Q	NQ	NQ	5.4±0. 5	NQ	7.3±0. 4
Frenes	15.5±0 .5	NQ	N Q	11.8± 0.3	NQ	NQ	N Q	N Q	NQ	NQ	NQ	47.6±0 .4	5.7±0. 1
Jeumont	25.9±0 .7	15.7±0 .6	N Q	42.5± 0.1	NQ	NQ	N Q	N Q	NQ	NQ	5.8±0. 4	NQ	7.9±0. 1

Neuville	7.4±0.7	NQ	N	11.9±0.1	NQ	NQ	N	N	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
Nivelle	25.7±0.1	NQ	N	21.6±0.1	NQ	NQ	N	N	34.2±0.6	NQ	NQ	77.7±0.2	NQ
Wambrechies	NQ	NQ	N	NQ	NQ	NQ	N	N	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
Warcoing	NQ	NQ	N	NQ	NQ	NQ	N	N	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
Wervicq	24.2±0.5	44.0±0.6	N	NQ	NQ	NQ	N	N	92.0±0.2	NQ	NQ	NQ	NQ
Zingem	9.2±0.1	NQ	N	6.8±0.1	NQ	NQ	N	N	NQ	3.6±0.1	NQ	NQ	6.4±0.1

*NQ: not detected (<LOQ)

Table 3 presents the mean values of each compound in each river. High heterogeneity of concentrations was observed between the rivers. The concentrations of E1 detected in the six rivers at Nord-Pas-de-Calais and at the cross-border France-Belgium were similar to the ones measured in the Mississippi River (Zhang et al., 2007), but slightly higher than those measured in Guangzhou River, China (Peng et al., 2008) (Table 3). The variability of E1 level in the sampling sites may be explained by their local sources located near to the sampling site. It can also be related to the population density and the agricultural or industrial practices. The Scarp River was the most contaminated river (Fig. 4C). This may be due to the fact that it is closely surrounded by big cities (Lille, Douai and Cambrai) where urban and industrial activities are concentrated. For testosterone, the concentration was close to LOQ value. Similar results were reported in Gran Canaria, Spain (Rayco et al., 2013). The low concentrations of testosterone detected in our samplings sites may be due to its instability in natural waters. Indeed, a recent study has reported that testosterone is rapidly transformed in natural water (Vulliet et al., 2010). Above all, in global, high levels of hormones were detected at Crevecoeur and Nivelle.

Table 3: The comparison of EDCs concentrations (ng L⁻¹) detected in aquatic environment in Northern France-Belgium with literature

ED Cs	Rivers in northern France -Belgium						Rivers in Europe	Rivers, north America	Rivers, China	Rivers, Japan
	Lys River	Deûle River	Scarp River	Sensée River	The Scheldt	Sambre River				
NP	15.7±0.7	10.2±0.8	22.9±0.7	3.6±0.5	8.5±0.4	25.9±1.3	NQ-644 (83%)	NQ-40 (50%)	36-33 (100%)	51.40-144.10 (100%)
BP F	40.6±0.7	NQ	46.0±0.7	NQ	NQ	15.7±0.6	NQ-180	-	-	-
BP A	22.2±0.4	25.9±0.3	153.8±1.0	NQ	24.4±0.6	42.5±0.1	NQ-66	NQ-12 (41%)	6-331 (100%)	16.50-150.2 (100%)
BP E	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	-	-	-	-
BP C	NQ	NQ	12.0±0.2	NQ	11.4±0.1	NQ	-	-	-	-

BP G	NQ	20.9± 0.4	NQ	NQ	10.3 ±0.1	NQ	-	-	-	-
αE 2	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	<2	NQ-74 (5%)	NQ-2 (22%)	-
EE 2	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ		NQ-1 (5%)	-
E1	30.7 ±0.3	NQ	17.1 ±0.2	NQ	31.1 ±0.2	NQ	<0.40-33	NQ-112 (7%)	NQ- 65 (61%)	17.1- 44.5 (100%)
E2	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	<0.10-3.60	NQ-93 (10%)	NQ-2 (11%)	2.6-7.7 (100%)
TS T	2.2 ±0.1	2.9 ±0.3	NQ	5.4 ±0.5	NQ	5.8 ±0.4	1.60-3.40	-	-	-
PG	2.0 ±0.0	3.3 ±0.1	5.4 ±0.1	7.3 ±0.1	4.1 ±0.1	7.3 ±0.1	-	-	-	-
E3	23.6 ±0.3	10.5 ±0.5	38.9 ±0.1	NQ	7.9 ±0.4	NQ	-	NQ-51 (21%)	NQ-1 (5%)	<0.2
Re f.	This work				Hermann et al., 2002; Labadie and Budzinski, 2005; Raycoguesdes- alonso et al., 2014 ; Raycoguesdes-alonso et al., 2014		Boyd et al., 2004	Peng et al., 2008	Furuich i et al., 2004	

*NQ: not quantified (<LOQ); “-”: no data

^aThe values in the parentheses are the detection frequencies.

3.2.3. Hormone residues

The level of E1 was higher than those of the other steroid hormones with the maximum detected at Crevecoeur ($116.2 \pm 0.4 \text{ ng L}^{-1}$) (Fig. 4).

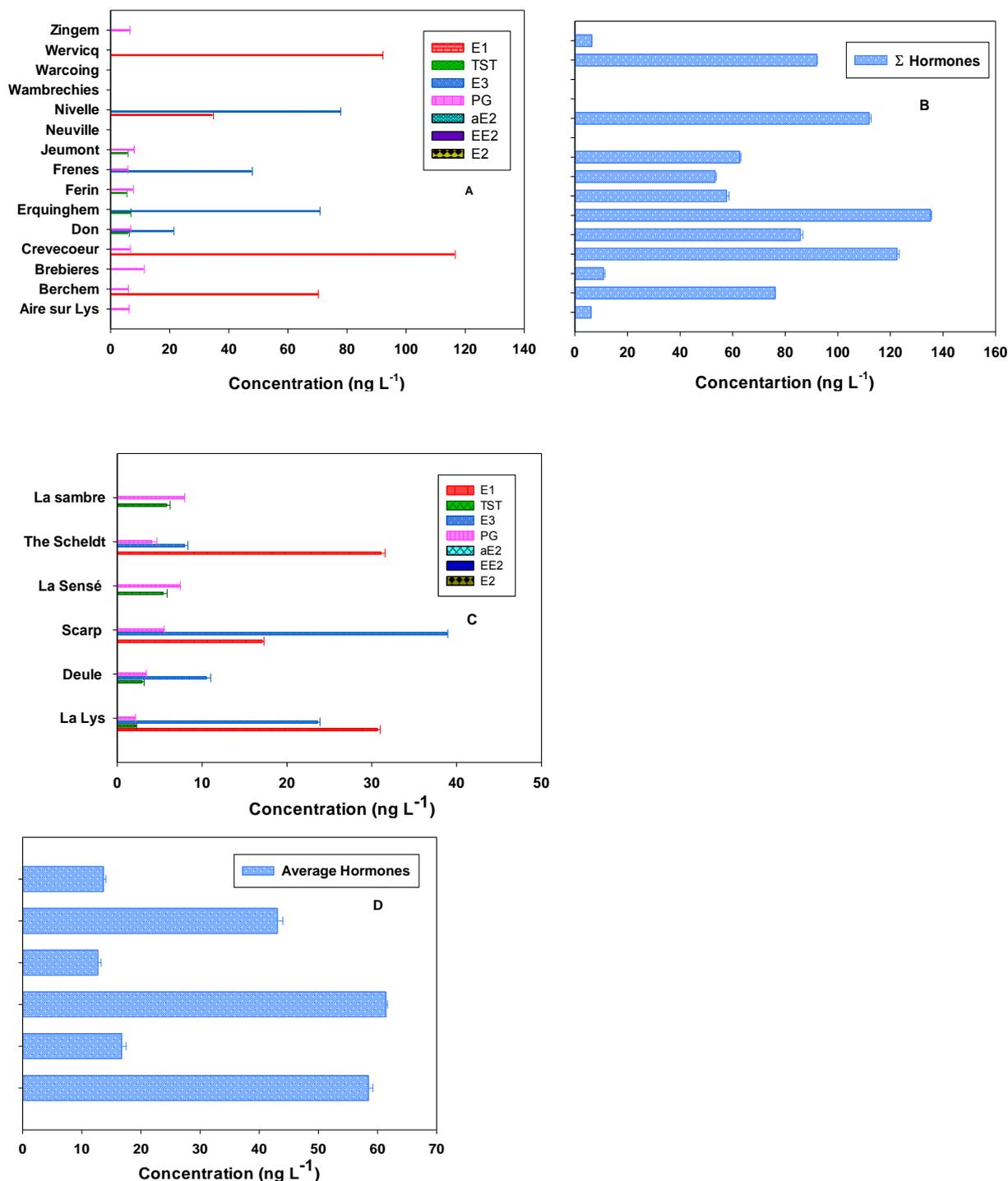


Fig. 4: Concentration of each individual hormone in each site (A), in each river (B), the Σ Hormones in each site (C) and in each river (D).

E2 and α E2 were detected at trace level (≤ 2 ng L⁻¹). Similar observations has been reported in the literature (Kuch and Ballaschmitter, 2001; Net et al., 2014). These may be due to the instabilities of E1, E2 and α E2 in surface water. Indeed, E1, E2 and α E2 have been reported

unstable in natural environment (Czajka and Londry, 2006; Ternes et al., 1999). α EE2 was not detected at any site. This may be because of the low amount consumed for contraception purpose; it is used only in doses of approximately 30 μg of α EE2/woman/day. For comparison, daily production of natural estrogens is close to 150 μg /woman/day and progesterone production ranges from 3 to 30 mg/woman/day (Labadie and Budzinski, 2005). Moreover, E1 is more stable than α EE2 and E2 ($E2 > EE2 > E1$) (Feng, 2005).

3.2.3. Phenolic contaminants residues

NP, the metabolite of nonylphenol ethoxylates surfactants, which are widely used in detergents and emulsifiers, was predominant among the five selected phenolic contaminants and was detected in all samples. The contamination level was detected from <LOQ to 25.9 ng L^{-1} (Table 2). These values are in the same order of the one reported by Peng et al. (2008) (Table 3). BPA is primarily used as an intermediate in the production of polycarbonate plastic, epoxy and other specialty resins. BPA is mainly used in the polycarbonate include glazing and sheeting, household equipment, electrical and electronic goods, electronic storage media, including bottles, utensils and containers. It is also used in the production of phenoplast, phenolic, polyvinylchloride unsaturated, polyester resins and thermal paper. Arnold et al. (2013) report high concentrations of BPA which can be up to 1900 ng L^{-1} , 2970 ng L^{-1} and 4230 ng L^{-1} in natural environment detected respectively in North America, Europe and Asia. Our result showed the maximum concentration of BPA at 286 ng L^{-1} detected in Brebières, a site of the Scarpe River (Fig. 5). For the studied area, BPA concentrations recorded in the fifteen sites were similar to those found in North America (Arnold et al., 2013) but higher than those found in river of Guangzhou, China (Peng et al., 2008).

Both the tolerable daily intake (TDI) set by the EU Commission and the reference dose (RfD) established by the United State Environmental Protection Agency (US-EPA) are 0.05 mg BPA/kg body weight/day. Due to this restriction, other bisphenols (BPs) such as BPF, BPE, BPC and BPG, considered as substitutes for BPA in industrial applications are starting to be used for the production of epoxy resins. These BPs have shown moderate to slight acute toxicity and estrogenic effects similar to those of BPA (Gallart-Ayala et al., 2011). BPF was detectable in 26.66 % of the samples; it was detected from <LOQ to 91.9 ng L^{-1} . These concentrations were lower than those reported in North Rhine-Westphalia, Germany (Hermann et al., 2002).

For the other BPs, less information has been published. BPC and BPG were detected in only two sites with the maximum concentration of 68.2 ng L⁻¹ and 20.9 ng L⁻¹ (Table 2). BFE was detected at below LOQ for all sites. Fig. 5 shows the concentration of individual PCs and the sum of PCs (Σ PCs) in each site and in each river.

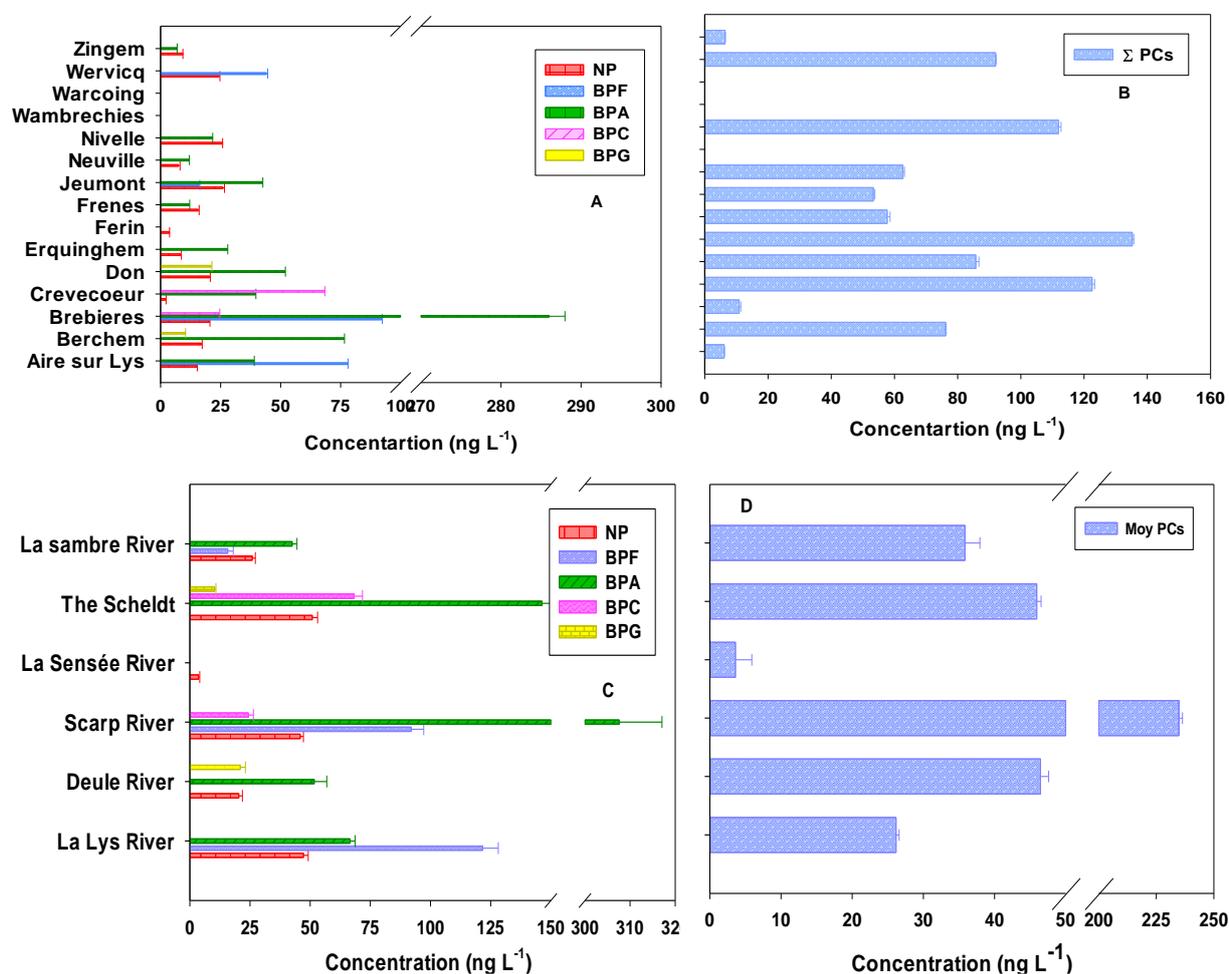


Fig. 5: concentration of individual phenolic contaminants PCs in the fifteen sites (A), in each river (B), the Σ PCs concentration in each site (C) and in each river (D).

4. Conclusion

EDCs are an important class of emerging contaminants. Their reliable quantification can be difficult due to their presence in trace levels in natural environment. In this work, main parameters which influence on the efficiency of detection of 13 EDCs have been optimized using a combination of SPE, BSTFA derivatization and GC/MS analysis. The method has a good recovery and LOQs of the method were ranging from 1 to 10 ng L⁻¹. This method was applied to assess the contamination of the 13 EDCs in 15 sites located at the cross-border area

Northern France and Belgium. The results showed significant contamination by the EDCs in the 15 sites located on six rivers (The Scheldt, the Lys, Deûle, the Scarpe, the Sensée and the Sambre Rivers). High concentration of Bisphenol A and Estrone were detected in Brebières and Crevecoeur. Globally, the Scarpe and the Scheldt Rivers were the most contaminated by PCs and hormones, lowest concentration levels of PCs and hormones were detected for the Deûle and the Sensée River respectively. EDCs in natural environment can be a serious threat to ecosystem functioning. To minimize their impacts on ecosystems and human health, it seems essential to develop cost-effective technology to improve their elimination yield from wastewaters and thus limit the problem from the source and/or to remediate the contaminated natural environment.

Acknowledgement

The authors are gratefully indebted to the Nord-Pas-de-Calais Region and Foundation for Biodiversity Research (FRB) for their financial support for this work via BIOFOZI project. We like to thank to David Dumoulin for the technical support and assistance during the sampling campaigns. We acknowledged the financial support from the Tunisian Minister of Higher Education and Scientific Research, which provided a PhD scholarship for Rafika BEN SGHAIER.

References

- Arnold, S., Clark, K., Stapes, C., Klecka, G., Dimond, S., Caspers, N. Hentges, S. (2013). Relevance of drinking water as a source of human exposure to bisphenol A. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 23 (2) 137-144.
- Boughriet, A., Proix, N., Billon, G., Recourt, P. and Ouddane, B. (2007). Environmental Impacts of Heavy Metal Discharges from a Smelter in Deûle-canal Sediments (Northern France): Concentration Levels and Chemical Fractionation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 180, 83-95.
- Coster, S. D. and Larebeke, N. V. (2012). Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action, *Journal of Environmental and Public Health*, doi:10.1155/2012/713696.

Duong, C. N., Ra, J. S., Cho, J. Kim, S. D., Choi, H. K., Park, J. H., et al. (2010). Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere*, 78, 286-293.

Feng, X. H., Ding, S. M., Tu, J. F., Wu, F. and Deng, N. S., (2005). Degradation of estrone in aqueous solution by photo-Fenton system. *Science of the Total Environment*, 345 (1) 229-237.

Fernandez, M. P., Ikonou, M. G. and Buchanan, I. (2007). An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Science of the Total Environment*, 373 (1) 250-269.

Gallart-Ayala, H., Moyano, E. and Galceran, M.T. (2011). Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 683 (2) 227-233.

Gomez, E., Bachelot, M., Boillot, C., Munaron, D., Chiron, S., Casellas, C., Fenet, H. (2012). Bioconcentration of two pharmaceuticals (benzodiazepines) and two personal care products (UN filters) in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) under controlled laboratory conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 2561-2569.

Guedes-Alonso, R., Montesdeoca-Esponda, S., Sosa-Ferrera, Z. and Santana-Rodríguez, J. J. (2014). Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. *Environmental Analytical Chemistry*, 3, 14-27.

Huang, B. Pan, X. P., Wan, X., Liu, J. L., Zhao, S. M., Hu, P. and Li, F. R. (2011). Simultaneous determination of steroid endocrine disrupting chemicals in water by solid phase extraction-derivatization- gas chromatographic-mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 394, 49-454.

Jiménez-Díaz, I., Vela-Soria, F., Rodríguez-Gómez, R., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, Navalón, O. A. (2015). Analytical methods for the assessment of endocrine disrupting chemical exposure during human fetal and lactation stages. *Analytica Chimica Acta*, 892, 27-48.

Jobling, S. and Tyler, C. R. (2006). Introduction: The ecological relevance of chemically induced endocrine disruption in wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 114 (1) 7-8.

Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U. and Pawlowski, S. (2004). Comparative responses of mollusks and fish to environmental estrogens and estrogenic effluents. *Aquatic Toxicology*, 66 (2) 207-222.

Kuster, M., De Alda, M. J. L., Barceló, D. (2004). Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *Trends in Analytical Chemistry*, 23 (2) 790-798.

Labadie, P. and Budzinski, H., (2005). Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France), *Environmental Science & Technology*, 39, 5113-5120.

Lee, I. S., Lee, S. H., Oh, J. E., (2010). Occurrence and fate of synthetic musk compounds in water environment. *Water Research*, 44 (1) 214-222.

Lei, B. L., Huang, S. B., Zhou, Y. Q., Wang, D. H., Wang, Z. J., (2009). Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere*, 76 (1) 36-42.

Liu, R., Zhou, J.L., Wilding, A. (2004). Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1022 (1-2) 179-189.

Net, S., (2010). Etude de la réactivité hétérogène des composés organiques issus de la combustion de la biomasse. Thèse de Doctorat, 214p, 2010, Université de Provence Aix-Marseille 1, Marseille, France.

Net, S., Dumoulin, D., El-Osmeni, R., Rabodonirina, S. and Ouddane, B. (2014). Case study of PAHs, Me-PAHs, PCBs, Phthalates and Pesticides Contamination in the Somme River water, France. *International Journal of Environmental Research*, 8 (3) 1159-1170.

Net, S., Rabodonirina, S., Ben Sghaier, R., Dumoulin, D., Chbib, C., Tlili, I., Ouddane B. (2015) Distribution of phthalates, pesticides and drug residues in the dissolved, particulate and sedimentary phases from transboundary rivers (France-Belgium), *Science of the Total Environment*, 521, 152-159.

Peng, X., Yu, Y., Tang, C., Tan, J., Huang, Q., 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*, 397, 158-66.

Petrovic, M., Eljarrat, E., De Alda, M. J. L. and Barceló, D. (2004). Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (3) 549-562.

- Queiroz, F. B., Silva, J. C., Aquino, S. F., Coutrim, M. X., and Afonso, R. J. (2014). Determination of endocrine disrupters and pharmaceuticals in sewage samples by tandem solid phase clean up/extraction and high performance liquid chromatography-negative and positive electrospray high-resolution mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(2), 298-312.
- Rabodonirina, S. Net, S., Ouddane, B., Merhaby, D., Dumoulin, D., Popescu, T., Ravelonandro P. (2015). Distribution of persistent organic pollutants (PAHs, Me-PAHs, PCBs) in dissolved, particulate and sedimentary phases in freshwater systems. *Environmental Pollution*, 206, 38-48.
- Roepke, T. A., Snyder, M. J., Cherr, G. N., (2005). Estradiol and endocrine disrupting compounds adversely affect development of sea urchin embryos at environmentally relevant concentrations. *Aquatic Toxicology*, 71 (2) 155-173.
- Rogers, J. A., Metz, L. and Yong, V. W. (2013). Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms, *Molecular Immunology*, 53 (4) 421-430.
- Scognamiglio, V., Antonacci, A., Patrolecco, L., Lambreva, M.D., Litescu, S.C., Ghuge, S., Rea, G. (2016). Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals. *Trends in Analytical Chemistry*, 80, 555–567.
- Selvaraj, K. K., Shanmugam, G., Sampath, S., Larsson, D. J., and Ramaswamy, B. R. (2014). GC–MS determination of bisphenol A and alkylphenol ethoxylates in river water from India and their ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 99, 13-20.
- Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., and Santana-Rodríguez, J. J. (2010). Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17 α -ethynylestradiol and 17 β -estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1), 701-711
- Viglino, L., Aboufadel, K., Prévost, M., and Sauvé, S. (2008). Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. *Talanta*, 76(5), 1088-1096.
- Silva, E., Rajapakse, N., Kortenkamp, A. (2002). Something from “nothing” eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environmental Science & Technology*, 36 (8) 1751-1756.

Sim, W. J., Lee, J. W., Oh, J. E. (2010). Occurrence and fate of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and rivers in Korea. *Environmental Pollution*, 158 (5) 1938-1947.

Ternes, T. A., Kreckel, P., Mueller, J. (1999). Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants, aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of the Total Environment*, 225 (1-2) 91-99.

Thurman, E. M., Writer, J. H. and Ferrer, I., (2013). Chapter 5 - Injection Port Derivatization for GC/MS–MS: Analysis of Hormones in Water, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 61, 115-141.

Vulliet, E., Falletta, M., Marote, P., Lomberget, T., Paise, J.O., Grenier-Loustalot, M. F. (2010). Light induced degradation of testosterone in waters. *Science of the Total Environment*, 408 (17) 3554-3559.

Zhang, K. and Zuo, Y.G., (2005). Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry after derivatization with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. *Analytica Chimica Acta*, 554, 190-196.

Zhang, S., Zhang, Q., Darisaw, S., Ehie, O., Wang, G. (2007). Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. *Chemosphere*, 66 (6) 1057-69.

Zhang, Z. L., Hibberd, A., Zhou, J. L. (2006). Optimization of derivatization for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 577 (1) 52-61.

**A Combine of Factorial Design, off-line SPE and GC-MS Method for Quantifying 7
Endocrine Disrupting Compounds in Water**

R. Ben Sghaier^{1,2}, I. Tlili^{1,2}, L. Latrous El Atrache³, S. Net^{1,*}, I. Ghorbel-Abid^{2,4}, B. Ouddane¹
, D. Ben Hassan-Chehimi², M. Trabelsi-Ayadi²

¹Université de Lille, Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR)-UMR
CNRS 8516, Equipe Physico-chimie de l'Environnement, Cité Scientifique 59655
Villeneuve d'Ascq, France

²Université de Carthage, Faculté des Sciences de Bizerte, Laboratoire d'Application de la
Chimie aux Ressources et Substances Naturelles et à l'Environnement (LACReSNE) 7021
Zarzouna, Bizerte, Tunisie

³Université de Tunis El Manar, Faculté des Sciences de Tunis, Laboratoire de Chimie
Analytique et Electrochimie (LCAE), Campus universitaire, 2092 Tunis, Tunisie

⁴Institut national de recherche d'analyse physico-chimique (INRAP), Laboratoire méthodes et
techniques d'analyses (LMTA). Institut national de recherche d'analyse physico-chimique
(INRAP) Tunisie

International Journal of Environmental Research

2017

* Corresponding author: Dr. Sopheak NET
Mail: sopheak.net@univ-lille1.fr
Tel: + 33 (0)3 28 77 85 24
Fax: +33 (0)3 20 43 48 22

ABSTRACT

A sensitive and reliable analytical method for the simultaneous determination of seven endocrine disrupting compounds (EDCs), in water was developed and validated. This quantification method is based on solid phase extraction (SPE) followed by a derivatization with BSTFA and finally the 7 EDCs were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A 2³ Factorial design was used to optimize the extraction procedure. Three factors namely sample volume, elution solvent, and pH of sample were investigated using Doehlert Matrix. The optimal conditions of SPE method were: HLB cartridge, 540 mL of water sample with a pH 8 and 10 mL of mixture of ethyl acetate/acetone with a ratio of (55/45, v/v) in the elution step. For validation of the technique, accuracy, precision, detection and quantification limits, linearity, sensibility and selectivity were determined. Extraction recovery of these 7 EDCs were above 90% with relative standard deviations (RSD) \leq 2%. The method limit of detection and limit of quantification were in the range of 0.33-3.33 ng/L and 1-10 ng/L respectively.

Keywords: Endocrine disrupting compounds, water, SPE, GC-MS, Factorial design

1. Introduction

Endocrine disrupting compounds (EDCs) cover an important range of natural and synthetic substances which disturb the hormone function (Jiang et al., 2013; Yang et al., 2013; Laurenson et al., 2014), such as alkylphenols, bisphenol A, endogenous and synthetic hormones, among authors (Reinen et al., 2010). Recently, EDCs have become an important issue in water pollution because of their potential risk on human health and their universal distribution (Lee et al., 2010; Sin et al., 2010). These compounds can interfere with the endocrine system by antagonizing the action of naturally produced hormones, or by preventing the action of endogenous hormones, altering the function and synthesis of hormone matrix receptors, or by modifying the metabolism, transport and excretion of hormones (Reinen et al., 2010; Ballesteros-Gomez et al., 2009; Munaretto et al., 2013). The EDCs are presents in wastewater and surface water (Vandenberg et al., 2012; Zoeller et al., 2012; Sun et al., 2014; Net et al., 2015; Rabodonirina et al., 2015). However, measurement of EDCs residues is a very difficult task due to their low concentrations levels in complex matrices. To overcome these difficulties, various methods have been developed. Currently, the most prevailing methodological approach

designed to analyze EDCs incorporates a mass-based analysis process. Overall, the methods employing mass spectrometry (MS) such as gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) show relatively low detection limits compared to other methods like liquid chromatography – UV detection (LC-UV) (Huang et al., 2011; Munaretto et al., 2013, Yang et al., 2015). Among this methods, (GC-MS) offers the power of excellent separation because of the long columns of fused silica that have literally hundreds of thousands of theoretical plates, which allow excellent separation of hormones from their isomers or interfering substances (Thurman et al. 2013).

Enrichment separation approaches including solvent extraction, solid phase extraction (SPE) and solid phase microextraction (SPME) have been commonly used to improve the instrumental limits of detection (LOD) (Latrous El Atrache et al., 2013). The SPE is an extraction and pre-concentration technique the most commonly used for liquid samples (Guedes-Alonso et al., 2013). The SPE has an important role in pre-concentration step due to its simplicity, high enrichment factors and environmental friendliness. However, several factors can affect the extraction efficiency and should be optimized. The conventional strategies for developing analytical methods by univariate experiments can lead to a number of disadvantages. They require more experiments and do not offer the information on the interactions between factors (Friedrich et al., 2016). Multivariate techniques have also been used, in the recent years, to optimize analytical methods, allowing the optimization of many variable simultaneously. Multivariate techniques allow saving time, practicality, economy and reducing number of experiments (Facco et al., 2015; Kemmerich et al., 2015; Hibbert, 2012). This mathematical model allows an estimation of the significance of effects on processes as well as of the effects of interactions between factors. Factorial design is one of the available statistical processes for multivariate techniques. It was used in analytical method development (Hibbert, 2012). However, in order to determine the real functionality established among the analytical response and the significant factors, second order designs are used.

The objective of this study is to develop a rapid and simple procedure of extraction, preconcentration and determination of seven EDCs in water, based on off-line SPE, BSTFA derivatization and GC-MS quantification. A two level full factorial design was used to evaluate the experimental variables including eluent solvent, sample volume and pH sample. The experiments for the optimization were performed according to Doehlert matrix. The developed method was applied to the identification and quantification of these compounds in wastewater

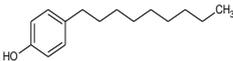
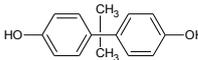
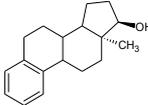
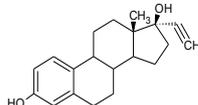
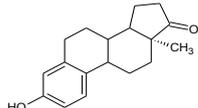
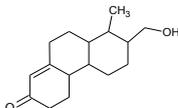
samples obtained from the effluents of two wastewater treatment plants (WWTPs) of Tunis (Tunisia).

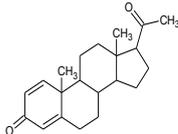
2. Experimental

2.1 Chemicals and materials

EDCs standards were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA) and Restek (Bellefonte, USA) with a purity of 99%. Supel-Select HLB, Supelclean ENVI-18 and Supelclean LC-18 SPE cartridges (200 mg/6 mL) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). HPLC grade ethyl acetate, methanol and acetonitrile were purchased from Dislab (Lens, France). Ultrapure water (Milli-Q) was produced by a Millipore apparatus with 18.2 MΩ/cm resistivity. The derivatization reagent N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% of trimethylchlorosilane (BSTFA, 1% TMCS) were obtained from Sigma-Aldrich. Standard stock solutions of 500 mg/L were prepared by weighing and dissolving 12.5 mg of each compound in 25 mL of acetonitrile. These solutions were stored at 4°C. The analyzed seven EDCs with their chemical structures and other characteristics are shown in Table 1.

Table 1: Trivial name, acronyms, elemental composition, chemical structure, molecular mass (M_w), Molecular mass after silylation (M_w -TMS), retention time (RT) and characteristic ions (m/z) of 7 EDCs.

Trivial name and acronyms	Chemical formula	Chemical structure	M_w	M_w -TMS	RT (min)	Ions (m/z)
4-nonylphenol NP	$C_{15}H_{24}O$		220	292	7.61	179; 292
Bisphenol A BPA	$C_{15}H_{16}O_2$		228	372	9.27	357; 358
17α-estradiol αE2	$C_{18}H_{24}O_2$		272	416	12.33	343; 416; 286
17α-ethynyl-estradiol EE2	$C_{20}H_{24}O_2$		296	440	12.41	425; 285
Estrone E1	$C_{18}H_{22}O_2$		270	342	12.59	257; 342
Testosterone TST	$C_{19}H_{28}O_2$		288	360	13.04	226; 345

Progesterone PG	$C_{21}H_{30}O_2$		314	-	14.64	299; 314
--------------------	-------------------	---	-----	---	-------	----------

2.2 Sample preparation

Samples of water was fortified with the 7 EDCs. 1 mL of the solution of the studied EDCs at concentrations of 10 $\mu\text{g/mL}$ were added. SPE cartridges were first conditioned with 5 mL of acetone, 5 mL of ethylacetate then with 5 mL of deionized water. The pH of samples was adjusted with a solution of HCl 1M. The solutes were eluted with 10 mL of mixture of ethylacetate/acetone with a ratio of (5.67/4.33; v/v). The eluent was collected in a graduated tube and concentrated, under stream of nitrogen to 1 mL.

2.3 Sample collection

Wastewater samples were collected from two WWTP located in Tunis (Fig. 1). The first WWTP is Chotrana (S1) located in Chotrana 1 Ariana. Chotrana WWTP used a biological treatment system, while the second WWTP, located in Médina Jadida-Ben Arous (S2), used an activated sludge treatment system combined with chemical treatment. The samples were collected in 2 L amber glass bottles. Samples were filtered with glass fiber filters with 0.45 μm Whatman glass microfiber filters. The filtered waters were stored in the dark at 4°C.

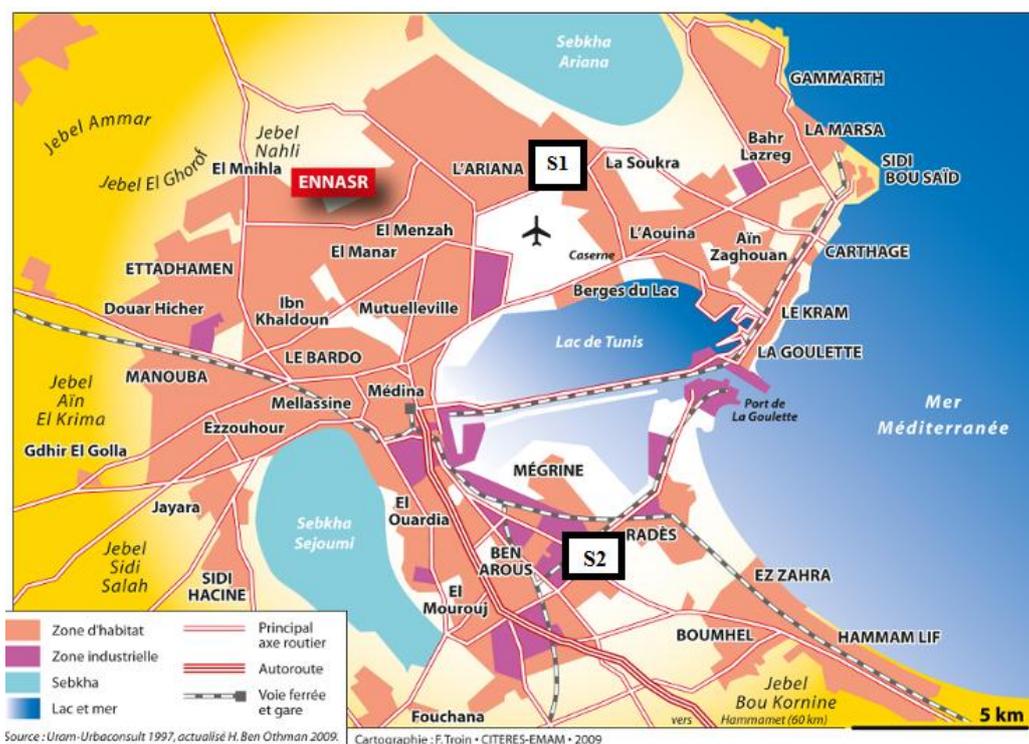


Fig. 1: Studied sites at Tunis, Tunisia. (S1) WWTP of Chotrana 1 Ariana, (S2) WWTP of Médina Jadida-Ben Arous

2.4 Derivatization procedure

For compounds that are thermally unstable, are too low in volatility, or yield poor chromatographic separation due to their high polarity, a derivatization step must be included prior to GC/MS analyses (Nielsen 2014). . 50 μL of the each SPE extract was transferred into micro vials followed by the addition of 50 μL of BSTFA (1% TMCS), then heated in a heating block at 65°C for 90 min. The heated extracts were cooled to room temperature during 15 min prior to GC–MS analysis.

2.5 GC-MS analysis

The GC-MS analysis were performed using a Varian 3900 GC equipped with a deactivated fused-silica guard column (5 m, 0.25 mm i.d.) and a fused-silica capillary Phenomenex XLB (60 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) and coupled with a Varian Ion Trap Saturn 2000 MS. The carrier gas was helium, held at a constant flow rate of 1 mL/min. 1 μL of each sample was injected in the splitless mode at 280°C and the injector was purged with helium after 1 min. The temperature of the GC was programmed as follows: 100°C, held for 2 min, 5°C min^{-1} ramped to 250°C then 3°C min^{-1} ramped to 300°C and held for 2.33 min. The transfer line and the ion trap were respectively held at 280°C and 220°C. Each targeted compound was identified based on the retention time (RT) and the mass spectrum (m/z) from chromatogram of standard solutions acquired in full scan (FS) mode. Quantification was then performed in the single ion storage (SIS) modes for better selectivity. The detailed MS detection parameters for each EDC are presented in Table 1.

3. Results and discussion

3.1 Effect of sorbent type

In order to evaluate the influence of the sorbent type on the extraction recovery of EDCs, three SPE cartridges which were reported to give good efficiency were chosen: Supel-Select HLB (Huang et al., 2011; Grover et al., 2009), Supelclean ENVI-18 (Xu et al., 2014; Gao et al., 2013) and Supelclean LC-18 (Guedes-Alonso et al., 2013; Zhang et al., 2011). The selected cartridges was charged with 500 mL of water sample spiked with 1 μL of EDCs standards solution, then eluted with a 5 mL of acetone and 5 mL oh ethylacetate. The experiment was carried out in triplicate. The fig. 2 presents the recoveries of the 7 EDCs obtained from the three type of

cartridges. The result showed better recovery for the simultaneous extraction of these seven EDCs obtained with HLB cartridge (Fig. 2).

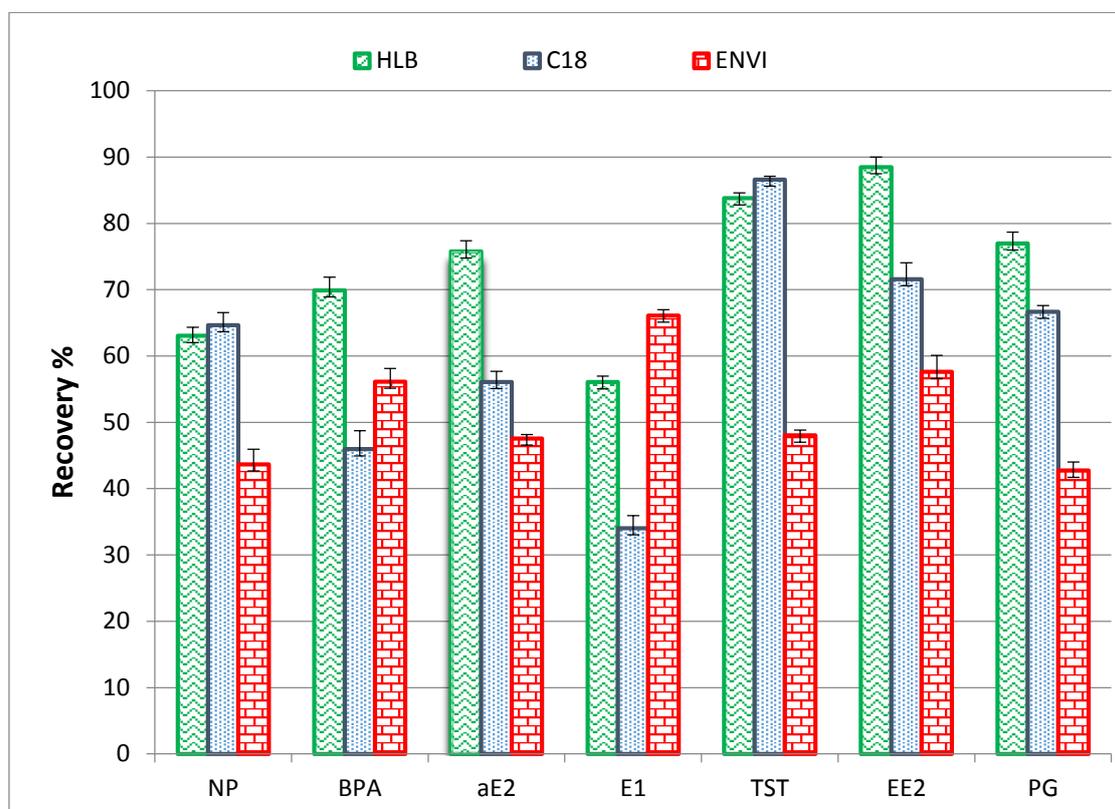


Fig. 2: Influence of the sorbent type on the extraction recovery of studied EDCs

3.2 Determination of the optimal condition for the solid phase extraction of EDCs

A 2^3 full factorial design with the variables, sample volume (U_1), eluent solvent (U_2), and pH sample (U_3) was carried out to determine the influence of selected factors, and their interactions, on the extraction of EDCs. The maximum and minimum values of each factor are listed in table 2. The choice of the limits of the investigated region is based on data available from the literature (Sun et al., 2014; Huang et al., 2009; Guedes-Alonso et al., 2013; Rice et al., 2009; Jin et al., 2013; Aydin et al., 2013; Labadie et al., 2005; Belhai et al., 2015).

Doehlert matrix was used to represent the responses of the three factors in the all experimental studied field. In fact, the Doehlert matrix presents a number of advantages such as a uniform distribution of experimental points in the studied field, the ability to explore the whole of the experimental region, the usefulness of interpolating the response and the possibility of adding new factors defined on the basis of preliminary results factors without altering the quality of the matrix. In order to compare the effects of the different factors in the experimental field, concerned coded variables were used. The factors are given in the form of coded variables (X_i)

without units in order to permit comparison of factors of different natures. The transformation of natural variables (U_i) into coded corresponding variables (X_i) is made on the basis of the equation (1) obtained from NEMROWD software:

$$X_i = \left[\frac{U_i - \bar{U}_i}{\Delta U_i} \right] \alpha \quad (1)$$

where X_i is the value taken by the coded variable i ; U_i is the value taken by the factor i ; \bar{U}_i is the value taken by the factor i in the center of the experimental field; ΔU_i is the range of variation of the factor i and α is the maximum coded value of X_i : $X_1 = 1$; $X_2 = 0.866$; $X_3 = 0.816$.

$$\bar{U}_i = \frac{\text{upper limit of } U_i + \text{lower limit of } U_i}{2} \quad (2)$$

$$\Delta U_i = \frac{\text{upper limit of } U_i - \text{lower limit of } U_i}{2} \quad (3)$$

The factorial design is governed by a function described by the experimental variables that can be approximated by a polynomial function, providing a description of the factors and the response obtained:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 \quad (4)$$

where Y is the experimental response, X_i is the coded variable, b_i is the estimation of the principal effect of the factor i for the response Y , and b_{ij} is the estimation of the interaction effect between factors i and j for the response Y .

Table 2: Investigated variables and their levels studied in the 2^3 factorial design

Coded Variables (X_i)	Factors (U_i)	Experimental field	Coded Variables (X_i)
		Value Min. (-1)	Value Max. (+1)
X_1	U_1 : sample volume (mL)	250	750
X_2	U_2 : volume ratio of ethylacetate/acetone	0.12	9
X_3	U_3 : pH of sample	3	9

The number of experiments required (N) is given by $N = k^2 + k + 1$ where k is the number of variables. In the present case, $k = 3$ and therefore the matrix was constituted of 13 experiments (Table 3). The levels of the independent variable (effective variables U_i) were calculated according to these following relations:

$$U_1 = 250 X_1 + 500 \quad (5)$$

$$U_2 = \frac{4.44}{0.866} X_2 + 4.56 \quad (6)$$

$$U_3 = \frac{3}{0.816} X_3 + 6 \quad (7)$$

N°	Experimental design			Experimental plan			Results Y (%)						
	X ₁	X ₂	X ₃	U ₁	U ₂	U ₃	NP	BPA	αE2	E1	TST	EE2	PG
1	0.0000	0.0000	0.0000	750.0	4.56	6	77.65	72.55	60.20	40.92	58.54	55.56	64.47
2	-1.0000	0.0000	0.0000	250.0	4.56	6	97.78	83.57	78.01	68.86	72.57	89.67	45.46
3	0.5000	0.8660	0.0000	625.0	9.00	6	41.48	80.45	89.95	89.03	44.04	47.99	35.93
4	-0.5000	-0.8660	0.0000	375.0	0.12	6	30.43	84.30	97.07	97.71	33.06	90.42	19.21
5	0.5000	-0.8660	0.0000	625.0	0.12	6	35.45	96.22	97.77	92.16	40.76	92.83	31.60
6	-0.5000	0.8660	0.0000	375.0	9.00	6	27.26	69.71	77.35	82.75	26.50	72.03	32.76
7	0.5000	0.2887	0.8165	625.0	6.04	9	57.04	79.91	97.41	94.30	28.81	90.92	34.40
8	-0.5000	-0.2887	$\frac{-}{0.8165}$	375.0	3.08	3	89.11	70.79	63.11	42.09	58.15	26.07	54.76
9	0.5000	-0.2887	$\frac{-}{0.8165}$	625.0	3.08	3	85.23	88.36	93.32	71.17	26.45	56.83	14.16
10	0.0000	0.5774	$\frac{-}{0.8165}$	500.0	7.52	3	31.38	71.82	89.41	44.11	27.04	81.83	15.99
11	-0.5000	0.2887	0.8165	375.0	6.04	9	37.92	82.68	75.36	88.51	40.79	90.42	31.72
12	0.0000	-0.5774	0.8165	500.0	1.60	9	40.18	93.17	71.78	50.21	78.31	46.90	7.28
13	0.0000	0.0000	0.0000	500.0	4.56	6	85.45	82.14	79.11	64.29	61.74	82.43	93.38

Table 3: Factorial experimental design, experimental plan and results

Replicates at the central level of the variables are performed in order to validate the model by means of an estimate of experimental variance. The experiment at the center (experiment number 13) was carried out in triplicate (Table 4) to estimate the experimental error.

Table 4: Repeated experiments in the center of the investigated region

Sample volume (mL)	Eluent ratio	pH	Results Y (R %)									
			NP	BPA	αE2	E1	TST	EE2	PG	NP	BPA	
500	4.56	6	85.45	82.14	79.11	64.29	61.74	82.43	93.38	85.45	82.14	
500	4.56	6	86.74	83.63	77.23	66.35	61.52	82.17	92.46	86.74	83.63	
500	4.56	6	85.45	82.14	79.11	64.29	61.74	82.43	93.38	85.45	82.14	

According to these results, the coefficients of the polynomial model were calculated using the NEMROD software (Table 5).

Table 5: Coefficients of the polynomial model for the 7 EDCs

	Results Y (R %)						
	NP	BPA	αE2	E1	TST	EE2	PG
b ₀	85.124	83.662	78.600	64.916	61.275	82.711	93.546
b ₁	-0.724	1.927	3.743	-2.532	-5.815	-7.322	1.958
b ₂	-6.382	-9.409	-2.239	0.222	-9.192	-1.541	4.924
b ₃	-14.406	5.058	-0.260	15.441	7.402	12.962	-2.349
b ₁₁	2.590	-5.600	-9.494	-10.026	4.282	-10.097	-38.585
b ₂₂	-69.493	0.542	19.081	37.337	-35.01	-5.827	-72.038
b ₃₃	-25.743	-2.543	2.297	-6.606	-19.342	-21.842	-73.080
b ₁₂	5.307	-0.683	6.874	6.834	5.679	-15.270	-5.331
b ₁₃	12.206	-12.211	-7.425	-16.678	10.069	-13.129	28.390
b ₂₃	19.121	-0.743	12.517	54.722	-33.861	3.911	19.456

Fig. 3 shows typical response surface profiles drawn versus the main factors sample volume, eluent ratio and pH sample and the three-dimensional representation of the same plots using the NEMROD software.

The analysis of the isoresponse curves at the chosen experimental field delimited by a circle show that the maximum extraction recovery was obtained when 540.4 mL of water sample with a pH 8 are loaded on HLB cartridge then eluted with 10 mL of mixture of ethylacetate/acetone with a ratio of (5.67/4.33; v/v).

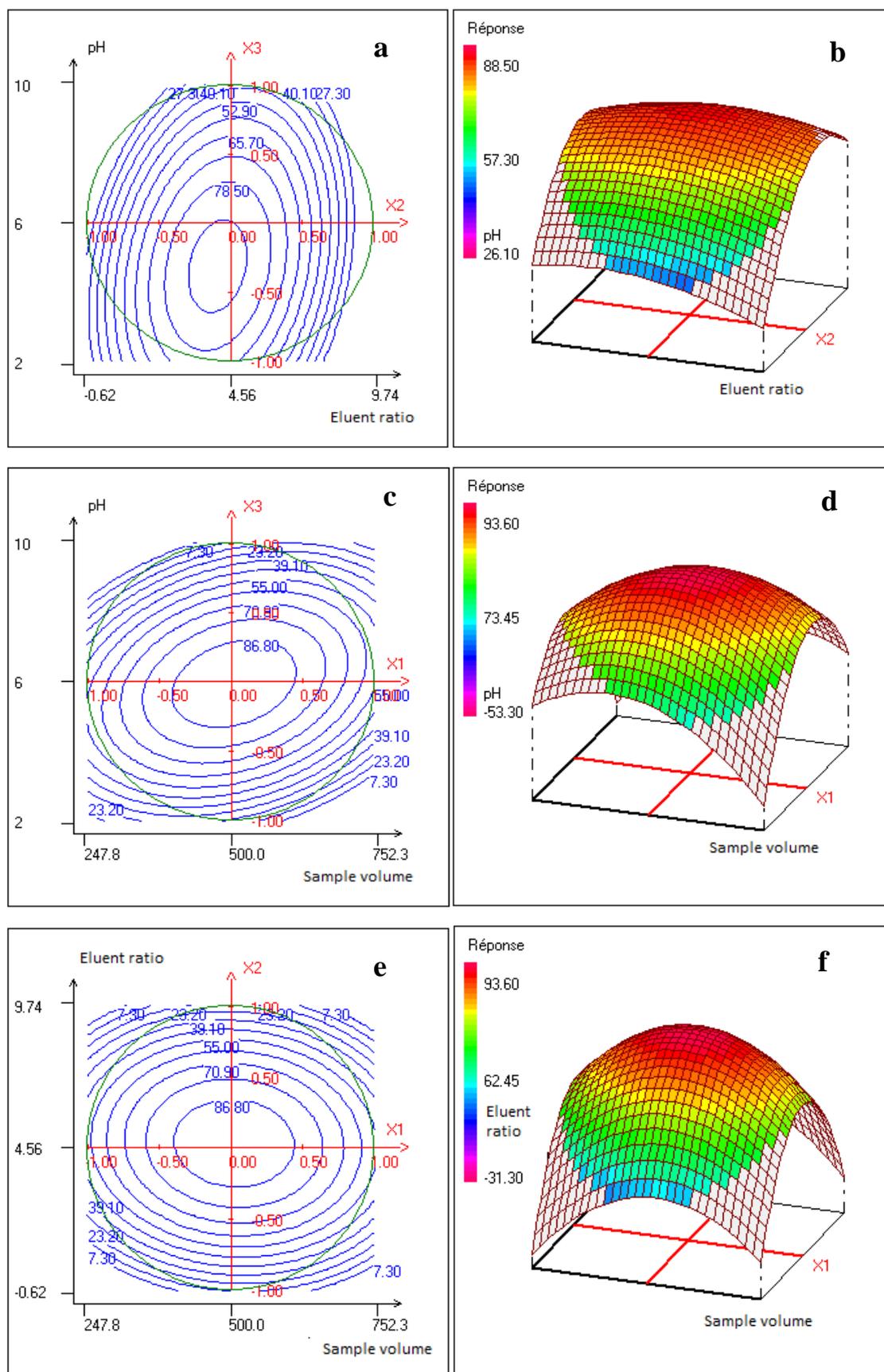


Fig. 3: (a) Contour plots of NP extraction recovery versus eluent ratio and pH at a fixed sample volume (500 mL); (b) corresponding three-dimensional plot; (c) contour plots of PG extraction

recovery versus sample volume (mL) and pH at a fixed eluent ratio (4.56); (d) corresponding three-dimensional plot; (e) contour plots of PG extraction recovery versus sample volume (mL) and eluent ratio at a fixed pH (6); (f) corresponding three-dimensional plot; results obtained from Doehlert matrix (Table 3).

Table 6: Extraction and determination methods of EDCs in liquid samples

EDCs	SPE condition				Detection method	LOD (ng/L)	Recovery (%)	References
	V. Sample (mL)	pH	Type of sorbent	Eluent				
NP, BPA, E1, E2, EE2, E3, TST, PG	500	2	Oasis HLB	9 mL EtOAc/Ac	GC-MS	0.3-3.33	52-71	Sghaier et al., 2017
E3, E2, E1, EE2	2000	2	ENV-18	10 mL ACN	LC-UV	240-510	78-101	Stafiej et al., 2007
E1, E2, E3, EE2	1000	4.5	Oasis HLB	10 mL Ac	GC-MS	0.1-1.3	83-94	Huang et al., 2011
E1, E2, EE2,	500	3.5	C18	3 mL ACN	LC-UV	8-112	106-116	Karnjanapiboonwong et al., 2011
E1, E2, E3, EE2, NP, BPA	400	3	Oasis HLB	10 mL DCM/Ac (7/3, v/v)	GC-MS	0.2-30	71-119	Nie et al., 2012
E1, BPA, NP	200	2	Oasis HLB	3 mL MeOH	GC-MS	0.5-5	65-90	Yu and Wu, 2015
E1, E2, EE2, E3, BPA, NP	500	7-8	HLB oasis	2 x 5 mL MeOH	LC-MS	0.05-125	65-104	Gorga et al., 2013
E1, E2, EE	1000	3	ENVI-18	2x5 EtOAc 2x5 MeOH	GC-MS	0.8-2.2	43-82	Xu et al., 2014
TST, PG	1000	4	HLB oasis	3x5 EtOAc	GC-MS	0.6-0.8	89-101	Jin et al., 2013

3.3 Validation of the optimized method

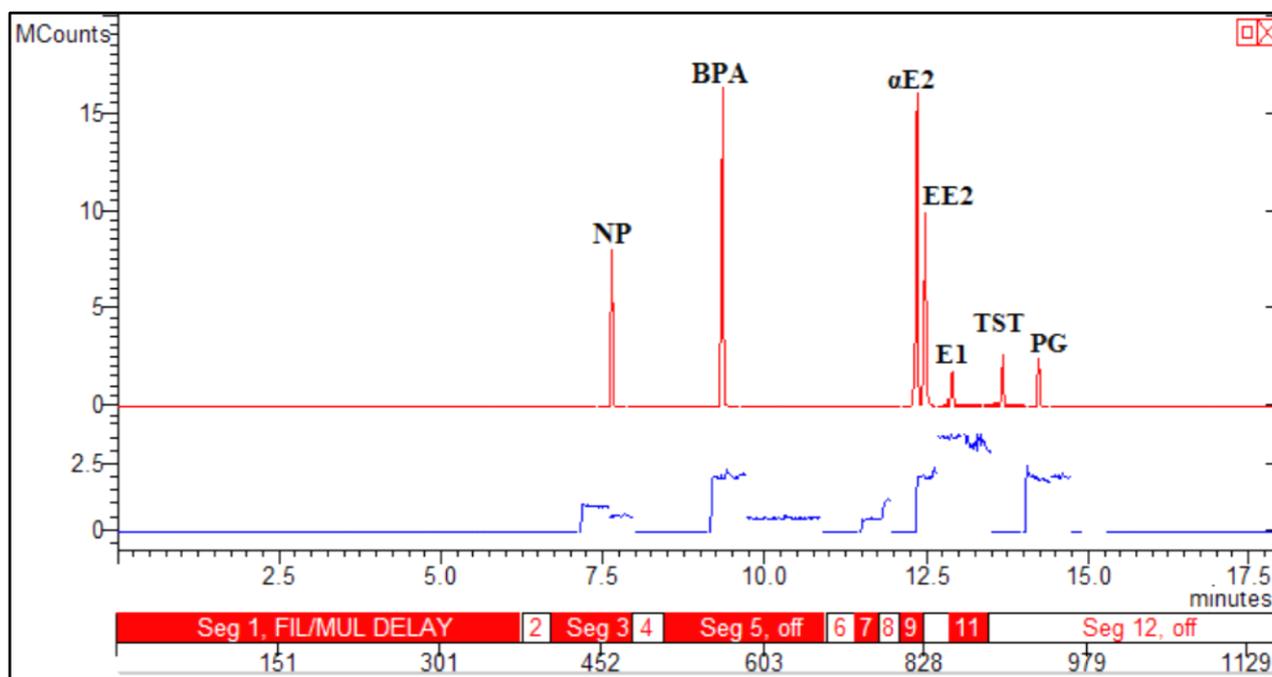
For the validation of the method, selectivity, linearity, precision, accuracy, and detection and quantification limits (LOD and LOQ) were studied. (i) *Selectivity*: Validation parameters were evaluated, and selectivity was confirmed since no interferences were observed in the blank extract when compared to the fortified water samples. Moreover, the chromatograms of the extracts presented satisfactory chromatographic resolution (Fig. 4). (ii) *Linearity*: Linearity of the proposed method was investigated by analyzing six dilutions for each EDC in the range of 0.01-10 µg/mL. Analytical curves were constructed for the selected compounds, and good linearity was observed with R^2 higher than 0.99 for the seven EDCs (Table 7). (iii) *Precision*: Precision was considered at two levels: repeatability and intermediate precision. The repeatability (intraday-precision) study of each EDC was carried out by estimating the

correspondence responses six times on the same day with 10 µg/mL concentration. Inter-day precision study of each EDCs was carried out by estimating the correspondence responses three times on three different days. The precision articulated as inter and intra-day relative standard deviation (% RSD) <2, which indicates that there was no significant difference for the assay which was tested within one day and between days. The extraction recovery percentages (% R) and RSD obtained are presented in (Table 7). (iv) *Accuracy*: The accuracy of the method was evaluated with five repetitions by recovery tests at three concentration levels (10, 30 and 50 µg/mL). Therefore, the recovery tests were performed by extraction of the compound under study, present in water matrices, according to the proposed technique. The results obtained for extraction of the 7 EDCs from water, as well as the respective coefficients of variation, are presented in (Table 7).

Table 7: Correlation coefficients, recovery percentages (% R) and relative standard deviation (% RSD) related to precision and accuracy, LOD and LOQ for the 7 EDCs.

EDCs	R ²	Accuracy									LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
		Intra-day		Inter-day			With different concentrations					
		R (%)	RSD (%)	1d	7d	14d	RSD (%)	10 ng/L	30 ng/L	50 ng/L		
NP	0.99	93.5	0.99	93.5	92.5	92.5	0.60	93.5;	93.9;	94.6;	0.3	1.0
	7	5		5	6	5		0.99	0.78	0.57		
BPA	0.99	92.4	0.87	92.4	91.2	92.4	0.93	92.4;	93.5;	93.9;	0.3	1.0
	7	4		4	2	8		0.87	0.98	0.42		
αE2	0.99	98.7	0.80	98.7	99.2	98.7	0.41	98.7;	99.2;	99.7;	3.3	10.0
	8	7		7	2	4		0.80	1.02	0.99		
E1	0.99	91.9	0.58	91.9	92.4	90.0	1.39	91.9;	92.4;	92.2;	3.3	10.0
	6	9		9	5	0		0.58	0.58	1.17		
EE2	0.99	92.9	0.55	92.9	93.5	91.2	0.88	92.9;	93.5;	93.9;	3.3	10.0
	8	9		9	4	8		0.55	1.23	0.84		
TST	0.99	97.5	1.16	97.5	97.8	97.9	0.67	97.5;	97.8;	97.9;	1.7	5.0
	5	5		5	8	9		1.16	0.87	0.98		
PG	0.99	95.3	0.86	95.3	96.9	96.3	1.29	95.3;	96.9;	97.3;	1.7	5.0
	7	3		3	3	7		1.29	0.96	0.58		

(v) *Detection and quantification limits*: The detection limit (LOD) of the proposed method was determined as being equal to at least 3 times the baseline signal (noise) obtained for water samples free of EDCs (blank), fortified with EDCs, submitted to the SPE technique and



analyzed by GC-MS. The quantification limit (LOQ) was determined as being the signal at least 10 times greater than the noise signal. Detection limits were between 0.3 and 2.0 ng/L and quantification limits were between 1 and 10 ng/L (Table 7). Several authors developed methods for the extraction and detection of some EDCs in liquid samples (Table 6) with LODs and recovery similar to those determined in this work. However, these methods examine only one family of EDCs at a time. For the simultaneous detection of different EDCs, the LOD and recovery founds in the present work showed better results compared to those reported previously (Nie et al., 2012; Gorga et al., 2013; Sghaier et al., 2017).

Fig. 4: Chromatograms obtained from the analysis of water samples by a combine of SPE and GC-MS. (a) Blank extract (b) Spiked water sample

4. Application

The developed method was applied to the samples collected from two WWTPs both the influent and the effluent in Tunis, capital of Tunisia. Table 8 presents the concentration of every individual EDC detected in each sampling station. Among the selected hormones, E1 was detected in all sampling points. Concentration of E1 was found to be 10.3-23.6 ng/L, which was similar to other research reported in Australia, Canada and Japan 17.3-19.6 ng/L (Sun et al., 2014) and was slightly lower than that founded in China 69.3- 280 in ng/L (Xu et al., 2014).

It should be mentioned that in some cases the concentration of EE2 and E1 detected in the effluent was higher than that detected in the influents, which could be explained either by deconjugation or retransformation of conjugated compounds during treatment into the original compounds. α E2 and TST were not detected in the two samples, this may be because there instability and degradation in the WWTP. The concentration of BPA and NP detected in S1 was higher than those founded in S2. It may be due to the type of wastewater. The efficiencies of treatment were for ranged between 8% and 100%. Above all, the result showed that global eliminations yield were $\leq 45\%$ for both Tunis WWTPs with 14% and 45% respectively for Chotrana WWPT (S) and Médina Jadida-Ben Arous (S2). Médina Jadida-Ben Arous WWTP showed better treatment than Chotrana WWPT. However, surprisingly for the case of EE2 detected in Médina Jadida-Ben Arous WWTP, the contamination of EE2 in the output (11.3 ± 1.8 ng/L) was higher than that present in the input (Table 8). This is likely a result of drug residues entering the WWTP in their conjugated form and becoming microbially deconjugated, thus releasing the parent compounds into the treated wastewater (Evgenidou et al., 2015).

Table 8: Concentration of the EDCs in the two station

Sampling points		Concentration of individual EDC (ng/L)						
		NP	BPA	α E2	E1	EE2	TST	PG
Chotrana WWTP (S1)	Influent	23.5 \pm 2.1	39.8 \pm 0.9	NQ	11.3 \pm 0.8	NQ	NQ	NQ
	Effluent	15.0 \pm 1.5	36.8 \pm 0.5	NQ	12.1 \pm 1.6	NQ	NQ	NQ
Médina Jadida-Ben Arous (S2)	Influent	4.5 \pm 0.9	18.3 \pm 1.2	NQ	23.6 \pm 0.9	NQ	NQ	6.2 \pm 2.0
	Effluent	NQ	6.6 \pm 2.0	NQ	10.3 \pm 2.3	11.3 \pm 1.8	NQ	NQ

5. Conclusion

An analytical method for the simultaneous extraction, pre-concentration, and determination of oestrogens (estrone, 17α -estradiol and 17α -ethinylestradiol), androgens (testosterone), progestogens (progesterone) and phenolic compound (bisphenol A and 4-nonylphenol) in wastewater has been optimized. The SPE has been used for the extraction/pre-concentration step and combined with GC-MS for quantification in SIS mode. Doehlert matrix was used to build a mathematical model. The optimized method proved to be effective for the seven endocrine disrupter compounds. The LOQs were satisfied with the value between 1 to 10 ng/L of sample. In addition, the method presented high recoveries, up to 91.9%, with RSD below 2% demonstrating good accuracy and precision. Linearity values were adequate with values of r^2 higher than 0.996. The application of the method to samples from two different WWTPs

showed that the concentrations of EDCs found, ranged from 4.5 to 36.8 ng/L and some of them (17 α -estradiol, 17 α -ethinylestradiol and testosterone) were not detected in the two Wastewater samples, and other, like progesterone only in one sample.

Acknowledgement

The authors are grateful for the support provided by CPER CLIMBIO project. We acknowledge the financial support from the Tunisian Minister of Higher Education and Scientific Research, which provided a PhD scholarship for Rafika Ben Sghaier.

References

- Aydin E, Talinli I (2013) Analysis, occurrence and fate of commonly used pharmaceuticals and hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey. *Chemosphere* 90:2004–2012. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.10.074
- Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D (2009) Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *J Chromatogr A* 1216:449–469. doi: 10.1016/j.chroma.2008.06.037
- Belhaj D, Baccar R, Jaabiri I, et al (2015) Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa). *Sci Total Environ* 505:154–160. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.10.018
- Chang H-S, Choo K-H, Lee B, Choi S-J (2009) The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *J Hazard Mater* 172:1–12. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.06.135
- Evgenidou EN, Konstantinou IK, Lambropoulou DA (2015) Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review. *Sci Total Environ* 505:905–926. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.10.021
- Facco JF, Martins ML, Bernardi G, et al (2015) Optimization and validation of a multiresidue method for pesticide determination in maize using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Methods* 7:359–365. doi: 10.1039/C4AY01970A
- Friedrich MT, Martins ML, Prestes OD, Zanella R (2016) Use of factorial design in the development of multiresidue method for determination of pesticide residues in wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Anal Methods* 9:2541–2551. doi: 10.1007/s12161-016-0447-0
- Gao L, Sun L, Wan S, et al (2013) Degradation kinetics and mechanism of emerging contaminants in water by dielectric barrier discharge non-thermal plasma: The case of 17 β -Estradiol. *Chem Eng J* 228:790–798. doi: 10.1016/j.cej.2013.05.079
- Grover DP, Zhang ZL, Readman JW, Zhou JL (2009) A comparison of three analytical techniques for the measurement of steroidal estrogens in environmental water samples. *Talanta* 78:1204–1210. doi: 10.1016/j.talanta.2008.12.049
- Guedes-Alonso R, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez JJ (2013) Simultaneous determination of hormonal residues in treated waters using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Methods Chem* 2013:1–8. doi: 10.1155/2013/210653
- Hibbert DB (2012) Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J Chromatogr B* 910:2–13. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.01.020

- Huang B, Pan X-J, Wan X, et al (2011) Simultaneous determination of steroid endocrine disrupting chemicals in water by solid phase extraction-derivatization- gas chromatographic-mass spectrometry. *Chin J Anal Chem* 39:449–454. doi: 10.1016/S1872-2040(10)60431-8
- Jiang J-Q, Zhou Z, Sharma VK (2013) Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water — A review from global views. *Microchem J* 110:292–300. doi: 10.1016/j.microc.2013.04.014
- Jin W, Huang B, Wang B, et al (2013) Simultaneous determination of androgens and progesterone in surface water and sediment by gas chromatography-mass spectrometry. *Chin J Anal Chem* 41:205–209. doi: 10.1016/S1872-2040(13)60628-3
- Kemmerich M, Rizzetti TM, Martins ML, et al (2015) Optimization by central composite design of a modified QuEChERS method for extraction of pesticide multiresidue in sweet pepper and analysis by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Anal Methods* 8:728–739. doi: 10.1007/s12161-014-9951-2
- Labadie P, Budzinski H (2005) Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environ Sci Technol* 39:5113–5120. doi: 10.1021/es048443g
- Latrous El Atrache L, Ben Sghaier R, Bejaoui Kefi B, et al (2013) Factorial design optimization of experimental variables in preconcentration of carbamate pesticides in water samples using solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray-mass spectrometry determination. *Talanta* 117:392–398. doi: 10.1016/j.talanta.2013.09.032
- Laurenson JP, Bloom RA, Page S, Sadrieh N (2014) Ethinyl estradiol and other human pharmaceutical estrogens in the aquatic environment: a review of recent risk Assessment Data. *AAPS J* 16:299–310. doi: 10.1208/s12248-014-9561-3
- Lee I-S, Lee S-H, Oh J-E (2010) Occurrence and fate of synthetic musk compounds in water environment. *Water Res* 44:214–222. doi: 10.1016/j.watres.2009.08.049
- Munaretto JS, Ferronato G, Ribeiro LC, et al (2013) Development of a multiresidue method for the determination of endocrine disrupters in fish fillet using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Talanta* 116:827–834. doi: 10.1016/j.talanta.2013.07.047
- Net S, Rabodonirina S, Sghaier RB, et al (2015) Distribution of phthalates, pesticides and drug residues in the dissolved, particulate and sedimentary phases from transboundary rivers (France–Belgium). *Sci Total Environ* 521–522:152–159. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.087
- Nielsen S (2014) Food analysis. Springer Science & Business Media, USA
- Peng X, Wang Z, Yang C, et al (2006) Simultaneous determination of endocrine-disrupting phenols and steroid estrogens in sediment by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1116:51–56. doi: 10.1016/j.chroma.2006.03.017
- Rabodonirina S, Net S, Ouddane B, et al (2015) Distribution of persistent organic pollutants (PAHs, Me-PAHs, PCBs) in dissolved, particulate and sedimentary phases in freshwater systems. *Environ Pollut* 206:38–48. doi: 10.1016/j.envpol.2015.06.023
- Reinen J, Suter MJ-F, Vögeli AC, et al (2010) Endocrine disrupting chemicals—Linking internal exposure to vitellogenin levels and ovotestis in *Abramis brama* from Dutch surface waters. *Environ Toxicol Pharmacol* 30:209–223. doi: 10.1016/j.etap.2010.07.004
- Rice SL, Hale RC (2009) Parameters for ultra-performance liquid chromatographic/tandem mass spectrometric analysis of selected androgens versus estrogens in aqueous matrices. *Anal Chem* 81:6716–6724. doi: 10.1021/ac900134m
- Sghaier RB, Net S, Ghorbel-Abid I, et al (2017) Simultaneous detection of 13 endocrine disrupting chemicals in water by a combination of SPE-BSTFA derivatization and GC-MS

- in transboundary rivers (France-Belgium). *Water Air Soil Pollut*. doi: 10.1007/s11270-016-3195-2
- Sim W-J, Lee J-W, Oh J-E (2010) Occurrence and fate of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and rivers in Korea. *Environ Pollut* 158:1938–1947. doi: 10.1016/j.envpol.2009.10.036
- Sun Y, Huang H, Sun Y, et al (2014) Occurrence of estrogenic endocrine disrupting chemicals concern in sewage plant effluent. *Front Environ Sci Eng* 8:18–26. doi: 10.1007/s11783-013-0573-5
- Thurman EM, Writer JH, Ferrer I (2013) Injection port derivatization for GC/MS–MS. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, pp 115–141
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, et al (2012) Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 33:378–455. doi: 10.1210/er.2011-1050
- Xu Y, Xu N, Llewellyn NR, Tao H (2014) Occurrence and removal of free and conjugated estrogens in wastewater and sludge in five sewage treatment plants. *Env Sci Process Impacts* 16:262–270. doi: 10.1039/C3EM00199G
- Yang S, Hai FI, Nghiem LD, et al (2013) Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: a critical review. *Bioresour Technol* 141:97–108.
- Yang Y, Cao X, Zhang M, Wang J (2015) Occurrence and distribution of endocrine-disrupting compounds in the Honghu Lake and East Dongting Lake along the Central Yangtze River, China. *Environ Sci Pollut Res* 22:17644–17652. doi: 10.1007/s11356-015-4980-y
- Zhang R, Li N, Wang C, et al (2011) Ionic liquid foam floatation coupled with solid phase extraction for separation and determination of hormones by high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 704:98–109. doi: 10.1016/j.aca.2011.08.016
- Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, et al (2012) Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153:4097–4110. doi: 10.1210/en.2012-1422

La présence des perturbateurs endocriniens dans le milieu aquatique a suscité des préoccupations croissantes en raison de leurs effets néfastes potentiels sur les écosystèmes et les humains. Celles-ci sont généralement présents à l'état de trace (ng / L), dans des matrices aqueuses complexes, telles que les eaux de surface ce qui rend leur analyse difficile. Dans ce travail, on a mis au point une méthode analytique pour la détermination simultanée de 13 substances perturbatrices endocriniennes (PE), dont 5 estrogènes stéroïdes, 1 progestérone, 1 androgène et 6 composées phénoliques, dans l'eau, par la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). La méthode a été validée. Les limites de quantification étaient respectivement de 1 ng / L et de 5 à 50 ng / L pour les composés phénoliques et les hormones. La méthode validée a été appliquée pour évaluer le niveau de contamination des PEs ciblées dans de nombreux sites du Nord de la France et de la Tunisie. La majorité des composés considérés ont été détectés dans les sites d'échantillonnage. La dernière partie de ce travail est l'étude de faisabilité de l'élimination du PEs par des techniques d'adsorption sur les résidus d'une brique modifiée et la bio-rémediation par l'algue bleu-vert (*Spiruline*).

Mots clés : Perturbateurs endocriniens, eau, GC-MS, SPE, plan d'expérience, algue, brique

The occurrence of endocrine-disrupting compounds in the aquatic environment has brought increasing concern due to their potential adverse impacts on ecosystems and humans. These compounds are generally present in complex water matrices, such as surface waters at trace levels (ng/L) making their analysis difficult. In this work, an analytical method for the simultaneous determination of 13 endocrine disrupting chemicals (EDCs), including 5 steroid estrogens, 1 progestogen, 1 androgen and 6 endocrine-disrupting phenols in water was developed using solid phase extraction (SPE), derivatization and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The method was validated by spiking the 13 EDCs to the interest matrix. The limits of quantification were 1 ng/L and 5-50 ng/L for phenolic compounds and hormones respectively. The validated method was applied to assess the contamination level of the targeted EDCs in many sites in Northern France and Tunisia. The majority of the considered compounds were detected in the sampling sites. The last part of this work is the feasibility study for the elimination of PE by adsorption techniques on modified brick residues and bio-remediation by blue-green algae (*SPIRULINA*).

Keywords: Endocrine-disrupting, water, GC-MS, SPE, factorial design, alga, brick.

