

École doctorale des sciences de l'environnement

Laboratoire Chimie Environnement – UMR CNRS 7376 – Équipe TRAME

Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Écologie marine et continentale

UMR CNRS 7263 – IRD 237 – Avignon Université

THÈSE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

Spécialité : Chimie de l'environnement

Présentée par **Fanny DESBIOLLES**

Le 29 juin 2018

Devenir photochimique de la carbamazépine et sous-produits dans des eaux naturelles et écotoxicologie à doses environnementales

Devant le jury composé de

Mr Marcello BRIGANTE	Professeur, Université Clermont Auvergne	Rapporteur
Mme Cécile MIÈGE	Ingénieur de recherche, IRSTEA Lyon	Rapporteur
Mr Patrick HOHENER	Professeur, Aix Marseille Université	Examinateur
Mme Séverine JEAN	MCF, Université Toulouse III	Examinateur
Mr Mohamed SAKHA	Professeur, Université Clermont Auvergne	Examinateur
Mme Isabelle LAFFONT-SCHWOB	Professeur, Aix Marseille Université	Co-directrice de thèse
Mme Laure MALLERET	MCF, Aix Marseille Université	Co-directrice de thèse
Mr Pascal WONG-WAH-CHUNG	Professeur, Aix Marseille Université	Directeur de thèse
Mr Christophe TILIACOS	Docteur, Seakalia	Membre invité
Mme Laetitia DE JONG-MOREAU	MCF, HDR, Aix Marseille Université	Membre invité
Mr Xavier MOREAU	MCF, HDR, Aix Marseille Université	Membre invité

Cette thèse est dédiée à la mémoire de mon père,

Remerciements

Ces années de thèse auront été riches à la fois en expériences, découvertes et apprentissages mais elles m'auront également permis de rencontrer de formidables personnes avec lesquelles j'ai eu l'occasion de travailler ou même échanger humainement. Il va de soi que je me dois à présent de tous vous remercier pour avoir contribué de près ou de loin à ce travail.

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury et particulièrement à **Cécile Miège** (Ingénieure de recherche à IRSTEA) et **Marcello Brigante** (Professeur à l'Université de Clermont-Auvergne), pour avoir évalué ce travail de thèse en qualité de rapporteurs. Vos remarques m'ont permis d'améliorer ce manuscrit et je vous suis profondément reconnaissante pour le temps que vous m'avez accordé. Je remercie également **Patrick Höhener** (Professeur à l'Université d'Aix-Marseille) d'avoir accepté de présider ce jury, ainsi que **Séverine Jean** (Maître de conférences à l'Université de Toulouse) et **Mohamed Sarakha** (Professeur à l'Université de Clermont-Auvergne) pour leur intérêt porté à ce travail. Mohamed, merci également pour ton accueil au sein de l'Institut de chimie de Clermont-Ferrand et pour ta formation à la spectrophotométrie résolue en temps. Tes conseils ont été précieux. Et merci d'avoir partagé un délicieux couscous avec Pascal et moi.

Je ne peux continuer ces remerciements sans exprimer mes plus sincères remerciements à mes trois directeurs de thèse : **Pascal Wong-Wah-Chung**, Professeur à l'Université d'Aix-Marseille, **Laure Malleret**, Maître de conférences à l'Université d'Aix-Marseille et **Isabelle Laffont-Schwob**, Professeur à l'Université d'Aix-Marseille. J'ai eu une chance inouïe de travailler avec vous trois et je ne vous remercierai jamais assez pour l'expérience que vous m'avez transmise et vos différentes manières de travailler. Cette codirection n'aura pas toujours été très simple à gérer pour moi notamment lors de réunions « animées » mais votre bonne humeur aura été communicative et m'aura profondément motivée chaque journée.

Pascal, tu as été exceptionnel pendant ces 4 ans, tu as complètement compris ce dont j'avais besoin pour progresser en m'encourageant chaque jour, en t'intéressant aux résultats des manips. Ta disponibilité au sein du laboratoire m'aura permis de me « dépatouiller » de divers problèmes d'appareillages plus ou moins rapidement et je te revois me dire « Fanny contextualise ! » quand j'arrivais paniquée dans ton bureau. Tu as été bienveillant tout au long de cette thèse et je suis sincèrement heureuse de t'avoir côtoyé (presque) tous les jours et de la rigueur que tu m'as transmise. Ta pédagogie m'aura permis d'acquérir des connaissances en photochimie dont je n'avais qu'une très vague notion au départ et j'ai toujours apprécié de connaître ton point de vue. Je suis encore bien loin de ton efficacité mais j'espère un jour réussir à abattre, ne serait-ce qu'un 1/3, de tout le travail que tu effectues en une seule journée. Merci aussi pour

Remerciements

m'avoir permis de travailler avec l'Université de Clermont-Auvergne, de m'avoir accompagnée durant ces deux séjours et d'avoir partagé avec moi de bons restaurants et ta connaissance en œnologie ! Merci pour toute cette bonne humeur communicative durant ces années et pour ton implication jusque pendant tes week-ends et vacances pour m'aider.

Laure, je vous remercie infiniment pour votre soutien durant ces années. J'ai parfois eu du mal à m'adapter à votre manière de travailler, un peu trop au dernier moment à mon goût, sûrement parce que je ne me rendais pas compte que ma thèse n'était pas votre seul travail. Ça m'aura fait stresser quand je voyais les échéances arriver, mais finalement tout se sera dissipé quand je voyais l'apport de votre réflexion au travail. Merci pour tous ces échanges qui m'auront fait évoluer scientifiquement, en particulier sur les expériences analytiques et les automatismes qui me serviront longtemps. Vous m'aurez aussi beaucoup rassurée quand les manip ne fonctionnaient pas comme je le voulais. En particulier, lors de la mise en place des expériences d'écotoxicologie où le matériel nécessaire n'arrivait pas et que j'étais stressée et en perte d'énergie. Ce jour, au téléphone, vous avez réussi à calmer mes pleurs et à me remotiver pour la suite. Merci également pour le temps que vous m'avez consacré pour m'aider à écrire cette review (surtout ce fameux vendredi où on a quitté le labo à 02h30). L'accouchement aura été très compliqué et très fatigant mais je suis tellement contente du résultat et de votre contribution.

Isa, mille mercis pour cette joie de vivre communicative et ton énergie débordante, tu as toujours réussi à me transmettre ta bonne humeur par de nombreux fous-rires lors des repas et à me donner envie de travailler dans cette ambiance. J'imagine que me former à l'écotoxicologie et au monde du « vivant » n'a pas été très simple pour toi puisque je n'avais que des notions mais ça a été un plaisir d'apprendre à tes cotés. Grace à toi, j'ai découvert la définition de la pluridisciplinarité et tu m'as donné l'opportunité d'échanger avec des experts de différents domaines. Tu m'as aussi aidé à la réalisation de protocoles d'écotoxicité, à interpréter les résultats et à prendre conscience des variabilités liées au vivant (ce qui n'était pas gagné !). Parmi les expériences en laboratoire, tu m'auras quand même fait des frayeurs en mettant ton doigt dans un cristalliseur contenant les lentilles et en renversant un peu de solution dans un autre (et tout ça le même jour !)...Tu m'as aussi beaucoup appris humainement et les discussions que l'on a pu avoir entre quelques flash au multiplex (entre-autres) resteront toujours dans un coin de ma tête. Merci de m'avoir fait confiance, de t'être impliquée dans mon encadrement et de t'être rendue disponible quand j'en avais besoin surtout avec ton agenda déjà presque complet en septembre pour toute l'année universitaire suivante...

Dans un second temps, je tiens à remercier les co-financeurs de ce travail, c'est-à-dire la région Provence-Alpes-Côte d'Azur et l'entreprise Seakalia qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans des conditions optimales. Merci à **Nicolas Tiliacos** (Directeur de Seakalia) pour ta confiance et pour m'avoir permis de mener à bien ces travaux de thèse et ton sourire à chaque fois que j'avais l'occasion de te croiser

Remerciements

sur Marseille. Également, un immense merci au Docteur **Christophe Tiliacos**, pour avoir suivi ce travail dès que tu en avais l'occasion. Au-delà du travail, merci de t'être préoccupé de bon bien être mental et d'avoir partagé ces différentes soirées de « remontage de moral ». Tu as été d'un grand soutien pendant ces années. Merci de nous avoir fait découvrir tes talents culinaires... ce fiadone au citron sans gout de citron était merveilleux !!!... Je reviendrai avec plaisir partager un repas chez toi à condition que tes pommes de terre soient parfaitement cuites cette fois et j'espère que tu ne nous feras pas faux bond pour faire les sushi la prochaine fois ! Merci aussi de nous avoir emmenés visiter quelques bouts de la ville de Marseille. Je suis très heureuse de t'avoir rencontré, ta bonne humeur a été communicative et toutes tes conneries auront eu le grand mérite de me faire rire en continu ! Merci Mr le Troll !

Il va de soi, que je me dois de remercier tous les membres du LCE pour m'avoir accompagnée durant ces 4 années et en particulier l'équipe MPO devenue récemment l'équipe TRAME. Professeur **Pierre Doumenq**, merci infiniment de m'avoir acceptée dans votre équipe ! Il est vrai que votre fort caractère est à prendre avec des pincettes et je ne sais pas si j'aurais aimé que vous soyez mon directeur de thèse mais ce dont je suis certaine c'est que votre bienveillance m'aura fait le plus grand bien. Vous avez toujours cherché à savoir comment j'allais et vos blagues nulles (oui il fallait que je vous le dise...) m'auront bien fait rire. Je suis aussi très heureuse de vous avoir arraché des sourires dans des périodes où vous fronciez plutôt les sourcils. Votre voix mécontente qui résonne dans les couloirs me manquera c'est certain. Merci d'avoir partagé vos connaissances et de m'avoir soutenue dans les moments difficiles. Je remercie également **Anne Piram**, pour ton aide précieuse et ta formation rigoureuse sur le Q-ToF, cela a été un réel plaisir de travailler avec toi et de pouvoir échanger et apprendre pendant ces 4 ans. Je ne t'ai pas cassé le Q-ToF mais heureusement que tu étais là pour gérer les différentes crises rencontrées. J'ai été ta « tête de Turque » mais j'avoue avoir pris un grand plaisir à l'être ! Je vais devoir m'essayer au cheesecake maintenant que tu m'as transmise cette recette et j'espère sincèrement être à ta hauteur ! Bien qu'arrivée plus récemment, **Stéphanie Rossignol**, tu as aussi été un grand moteur pour moi. J'ai beaucoup aimé discuter avec toi de ton expérience et de ton ressenti pendant ta thèse, tes post-doc ou même ton nouveau poste de Maître de conférence. Ton calme et ta douceur m'auront réellement fait du bien sur cette fin de thèse, merci ! Je souhaite également remercier le Professeur **Gilbert Mille**, récemment décédé et qui aura laissé un vide sur cette fin d'année. Vous avez toujours été bienveillant avec les étudiants du laboratoire, j'espère qu'on l'est autant avec vous où que vous soyez. Merci à **Jean-François Barbion** pour ton aide informatique et à **Stephanie Lebarillier** pour ton aide sur les différentes LC (et on sait qu'il y en a eu des galères !!!) et merci beaucoup pour ton aide sur mes prélèvements quand je devais gérer le multi-site. Merci à **Cécile Langlois** pour avoir toujours été disponible pour gérer la paperasse administrative des commandes, remboursements et réservations avec efficacité ! Je remercie également **Loloe** pour sa bonne humeur pendant ces 4 ans. Je n'ai pas vraiment eu l'occasion de travailler avec toi mais je te remercie pour m'avoir formée sur le GC pour que je puisse assurer les TP de master. Merci pour ton oreille attentive, ta compassion quand rien n'allait comme je voulais et tes éclats de rire. Je veux également remercier **Maxou**, qui m'a

Remerciements

accompagné lors des campagnes terrain, tu t'es fait un plaisir de me prendre en photo pour te moquer, tu m'as conduit et emmené au resto (pour joindre l'utile à l'agréable). Merci pour ton sourire-moustache (qui a rendu jaloux Fred), c'était vraiment agréable de partager ces moments avec toi, même si tu as cassé ma bouteille de prélèvement... Enfin, je désire remercier chaque membre du LCE que je n'ai pas eu la chance de fréquenter chaque jour mais que j'ai pris grand plaisir à croiser de temps à autres. Plus personnellement, je voudrais remercier **Bruno Coulomb**, **Laurent Vassalo** et **Carine Demelas** pour avoir réalisé les analyses chimiques sur les eaux étudiées dans le cadre de ce travail. Merci pour votre disponibilité et efficacité pour répondre à chacune de mes questions. Je remercie aussi **Laurence Coulomb** pour ta disponibilité et ton sourire à chaque fois que j'avais l'occasion de venir sur Marseille. C'était un plaisir de correspondre avec toi et un grand merci pour ton aide administrative. Pour finir, je tiens à remercier le Professeur **Henri Wortham** (directeur du LCE), pour m'avoir accueillie au sein du LCE en tant que doctorante puis en tant qu'ATER. C'est grâce à vous que j'ai disposé des meilleures conditions pour réaliser ce travail de thèse, merci !

Dans un second temps, je tiens à remercier les petites mains du laboratoire, encore jeunes étudiants ou post-doctorants. Lorsque j'ai commencé ma thèse, **Marie** et **Fred** m'ont aidé à m'intégrer au laboratoire et avec vous j'ai partagé quelques soirées qui m'ont mise dans de bonnes conditions. Merci pour vos conseils. **Mickael**, ton passage au labo aura été important mine de rien, tu n'es resté qu'un an mais ton soutien et ton écoute m'auront fait le plus grand bien (avec les quelques bières partagées évidemment). Merci également à **Clémentine** et **Lauren** avec qui j'aurais partagé le même bureau quelques mois. Lauren merci pour ton aide et ton partage d'expérience pour la rédaction de ma review et Clem, pour toutes les discussions que l'on a eu, j'espère que tu finiras ta thèse en beauté même si c'est parfois difficile, tu verras le sentiment de joie une fois que c'est derrière toi. Merci aussi à **Kévin**, même si tu n'es parmi nous que quelque temps dans l'année, c'était un plaisir de te croiser et de pouvoir discuter avec toi. Merci à **Nuning**, pour cette joie de vivre et ce sourire chaque jour ! Et tu arrêtes de casser le Q-ToF maintenant !! Merci aussi à **El-Mountassir** pour ta gentillesse et ton calme. J'espère que tu vivras de belles années de thèse au sein du laboratoire. Je tiens aussi à remercier mes deux chouchous, fraîchement doctorants depuis 2017 qui m'ont beaucoup soutenue cette dernière année, **Mathilde** dit MathildA, je l'avoue, je t'ai (un peu) bizuté entre ton stage de M2 et ton début de thèse mais continue d'abattre le travail comme tu le fais, tu es une fille bourrée d'énergie et tu la transmets aux autres donc ne change pas! Et mon doudou **Houssein**, tu es un amour et tu as toujours été attentionné envers moi, fais toi confiance (la thèse t'aidera beaucoup pour ça tu verras), et reste cette belle personne que j'ai eu la chance de connaître. A tous les futurs docteurs du labo, j'espère avoir réussi à vous transmettre les points importants avant de partir, surtout éclatez-vous ! Merci également aux autres doctorants pour avoir échangé et partagé quelques instants avec moi, **Rafika**, **Rayene**, **Yudhis** et **Halik**. J'en viens aux différents stagiaires de l'équipe qui auront fait des passages plus ou moins long près de moi, notamment **Loris** et **Mathilde** qui m'auront bien aidée sur certaines expériences d'irradiation et de développement de méthodes. Loris, je te remercie pour ton travail, bien que tu n'aies

Remerciements

été qu'en 1^{ère} année de licence à l'époque, tu as très bien cerné le sujet et c'était un plaisir de te former sur les appareils et je suis contente de t'avoir eu en cours pendant ce poste d'ATER. Mathilde, tu as été une très belle rencontre, il a fallu te canaliser et te rassurer mais je suis très reconnaissante de ton implication pour les manips et pour l'intérêt que tu as porté à ma thèse. C'était un vrai bonheur de te former ces 2 mois et de partager mes connaissances. Merci de m'avoir tant fait rire avec toutes tes expressions. Tu es ma stagiaire pref', t'inquiète pas ! Merci aussi aux stagiaires que je n'ai pas encadrés mais avec qui j'ai eu l'occasion de partager un bureau ou mon expérience. Merci à **Mélanie**, tu as été un rayon de soleil, tu as mis une ambiance que je n'oublierais jamais dans le bureau, ta voix résonne encore dans ma tête quand tu chantais du Disney. J'ai adoré partager avec toi les petites soirées jagger/mojitos à l'appart et tu m'as permis de découvrir l'Ecosse. Merci aussi à **Stella**, la petite Corse du labo pour ton accent et pour m'avoir tenu tête pendant 6 mois. Merci d'avoir payé le loyer du bureau en nounours à la guimauve avec l'aide d'**Axelle**. Merci à **Magali**, qui aura démarré sa licence pro en même temps que ma thèse et qui m'aura bien soutenue pendant cette première année et également pendant son stage de M1. C'était toujours agréable de discuter avec toi. Je souhaite également remercier **Oumar**, stagiaire de M2, que j'ai eu la chance de former sur les appareils de LC et d'irradiation. Tu m'auras aussi débloqué sur une de mes manips que je n'arrivais pas à résoudre depuis 2 mois. Merci pour ton aide et ton calme et je te souhaite du courage pour la suite de ta thèse ! Enfin, je remercie **Arnaud**, mon petit Nono, je n'aurais pas eu l'occasion de te former mais ça aura été un plaisir de passer ces 2 mois avec toi. J'ai trouvé un allié pour taquiner Mathilde, un mec attentionné et souriant ! Ne change pas.

Merci également aux « metteurs d'ambiance » des couloirs ! Vos éclats de rires m'auront permis de passer 4 ans de la manière la plus agréable possible. Merci **Sylvain**, **Lionel** et **Fred** pour ces repas tous plus drôles les uns que les autres, pour vos remontages de moral et votre écoute quand j'avais besoin de m'énerver. Ça y est Fred, elle est finie cette thèse !

J'en viens à remercier les membres de l'IMBE, mon second laboratoire. Merci à **Véronique Masotti** pour ton partage d'expérience (et de bureau ces derniers temps) et également à **Hélène Folzer** pour ton calme et ta douceur que j'ai beaucoup appréciés les fois où je suis venue. Tu as toujours été d'une oreille attentive et tu m'auras beaucoup appris humainement. Merci aussi à **Marie-Dominique Salducci** qui aura toujours été disponible pour m'aider selon les expériences que j'avais besoin de réaliser. Merci pour ton fou-rire communicatif quand tu racontes l'histoire de Marie-Éléonore et la débroussailleuse ! Merci également aux autres doctorantes que j'ai eu l'occasion de croiser régulièrement lors de mes passages à Marseille, **Alma**, **Ahlem** et **Julie**. Je terminerais par remercier **Marie-Éléonore**, mon petit chat de labo. Je suis si heureuse de m'être fait une amie sur qui je peux compter. Tu as été d'un soutien indéfectible depuis que je t'ai rencontrée. On n'a finalement pas été dans la chorale de l'université mais ça nous aura valu des échanges de nombreux mails et fous-rires. Ta culture, ton ouverture d'esprit et ton envie d'apprendre

toujours plus de choses sur les personnes m'ont fait énormément de bien. J'ai adoré discuter des heures avec toi et t'apprendre un langage fleuri comme tu dis si bien. Grâce à cette thèse, j'ai pu partager un congrès, squatter ton appartement, faire des masques « embellissants » à l'argile, mais aussi faire un festival qui aura laissé des traces... Je ne te remercierai jamais assez de ton dévouement, de ta facilité d'accès, de ton affection. Tu es un formidable docteur (et hippie) et je suis heureuse d'avoir vécu ces années à tes côtés. Merci pour tout ma belle !

Pour continuer les remerciements du personnel IMBE, je dois adresser un immense et sincère MERCI à **Xavier Moreau** et **Laetitia de Jong Moreau** pour leur implication à mes côtés afin de développer un test d'écotoxicité sur les hydres. Vous êtes deux personnes joyeuses, douces et très pédagogues. Ma formation au monde du vivant n'a pas dû être simple mais vous n'avez rien laissé paraître. De mon côté, c'était un plaisir de me lever le matin pour venir travailler avec vous, même si j'avoue qu'il m'a fallu du temps pour m'habituer aux lunettes binoculaires. Je ne vous remercierai jamais assez pour la quantité de travail que vous avez abattu pour moi. J'espère sincèrement que cette publication va prochainement être acceptée et qu'on aura l'occasion un jour de travailler à nouveau ensemble. A tous les 2 un très grand merci ! Je tiens aussi à remercier toutes les petites mains qui ont été présentes en stage de master ou de licence et qui m'ont beaucoup aidée dans la réalisation des expériences, **Quentin, Mickael, Florian, Laetitia** et **Juliette**.

J'adresse ensuite mes remerciements à l'équipe Prodibio/Seakalia. Je n'ai pas eu l'occasion de tous vous connaître mais c'était un grand plaisir de vous croiser quand j'avais l'occasion de venir. Merci à **Sovana, Romain, Hervé, Nicolas, Fabien, Benjamin, Eva, Bérengère, Christine, Olivier** et **Audrey** qui m'aura particulièrement fait rire en prenant les plantes pour des talkie-walkie lors d'un repas d'entreprise... (je reviendrais m'occuper de ton bureau, n'aie crainte). Je tiens enfin à remercier **Guillaume** pour m'avoir accompagnée et intégrée à la vie Marseillaise, en me faisant partager ta passion pour la plongée, pour les balades en kayak depuis la Pointe Rouge, ou encore pour cet aioli dégusté avec ton équipe de plongée. Tu as été un vrai cordon bleu (petit bémol pour ta crème pâtissière à la pistache, il faudra retenter ta chance). Merci d'avoir été bienveillant avec moi et de m'avoir écouté quand « il fallait que ça sorte ».

Je remercie également **Isabelle Hammad**, qui m'a guidé au sein de ces 4 années et qui a prêté attention et a apporté des réponses à chaque question que je me posais vis-à-vis de l'Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement.

Je remercie l'**Institut de Chimie de Clermont-Ferrand** et particulièrement l'équipe de Photochimie pour leur accueil lors de mes deux visites même si certains avaient des doutes sur les résultats que l'on obtiendrait. Finalement ça a marché ! Je remercie aussi **Laurent** (ami de Pascal), pour m'avoir hébergé et pour avoir partagé quelques anecdotes croustillantes sur mon directeur de thèse lors de mes séjours professionnels en Auvergne!

Remerciements

Merci également au personnel de PerkinElmer (**Philippe Boniteau, Eric Muron, Nicolas Bongard** et **Christian Missitch**) pour leur conseils, formations et interventions sur les appareils à chaque nouveau problème rencontré (surtout la première année) !

J'ai aussi une pensée pour **Eva** et **Fabienne**, mes responsables de stage de master au sein de l'IRSTEA. Vous m'avez transmis le goût de la recherche et si j'en suis là aujourd'hui vous n'y êtes pas pour rien, alors merci beaucoup !

Enfin je remercie la cellule de culture scientifique et technique de l'Université d'Aix-Marseille, en particulier **Hannah, Isabelle, Alix** qui m'ont fait découvrir le merveilleux monde de la vulgarisation grâce à l'atelier EXPÉRIMENTARIUM, au doc' en clip (avec l'aide de **Benoit** et **François**), et diverses fêtes de la Science ou nuit Européenne des chercheurs.

D'un point de vue plus personnel, je tiens à remercier certaines personnes bienveillantes comme **Adrien**, qui a toujours été d'un soutien. Je suis bien contente d'avoir partagé ce saut en parapente avec toi. Merci aussi aux sportifs des salles Keepcool (**Élo, Margaux, Caro, Alex**) et plus particulièrement, **Océane, Céline, Justine** qui m'auront poussée dans mes retranchements juste avant de finir le manuscrit en participant à la Mudday sans entrainement, « des monstres fada ! ». Vous avez été géniales et des grosses sources de motivation pendant ces années. Merci les filles ! Merci aussi à **Sylvie** pour tes encouragements et ta bienveillance, tu as été une vraie maman ici et merci à ma gatounette, **Christelle** pour toute l'affection que tu m'as apportée et ces sessions de zumba qui m'ont tant fait rire après certaines journées compliquées. Merci à mes amis de master, dit « **la meule** » qui m'ont soutenue et supportée pendant ces 4 ans. Vous n'imaginez pas le bien que ça me faisait les quelques mariages, week-ends et virées que l'on a partagé ces dernières années. Merci à mes amis de DUT et plus particulièrement du BDE, pour avoir pris de mes nouvelles et pour vos encouragements, en particulier **Sophie, Elise, Caro, Jules, Julien** et **Rémi** ! Et merci aux amis de plus longues dates pour leur soutien en particulier **Jennifer**. Bien que ce soit plutôt récent, je voudrais aussi remercier **Léa**, tu n'as vécu que cette dernière année de thèse et pourtant je crois que c'est bien assez ! Merci pour ton soutien de chaque instant, merci de m'avoir reboostée à chaque fois que je baissais les bras et d'avoir supporté mes râleries quotidiennes. Tu n'imagines pas comme ton calme et ta compassion ont été importants pour mon moral. Merci d'avoir été là et pour tout ce que tu as fait pour moi.

Pour terminer de remercier les amis, je crois qu'il me reste la personne qui m'a le plus soutenue et supportée durant ces 4 ans, **Camille**. Difficile de passer après tes remerciements parce que tu as déjà parfaitement décrit ce qu'on a vécu mais je vais faire de mon mieux. Quand j'ai su qu'une autre personne allait démarrer une thèse quelques jours après moi et qu'on serait dans le même bureau, j'ai espéré m'entendre avec... et si je fais le bilan après ces 4 ans, partager un bureau n'aura pas suffi puisqu'on est allées jusqu'à faire une colocation. Je t'ai (re)découverte dans une constante retenue, à cacher tes émotions

Remerciements

jusqu'à ce que tu explodes et je suis heureuse que tu ais eu assez confiance pour ne pas te cacher face à moi. Tu n'imagines pas comme je suis heureuse d'avoir rencontré quelqu'un comme toi, je te suis sincèrement reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu m'as (entre-autres) nourrie ces derniers longs mois, détendue, encouragée, supportée, écoutée râler et tu as râlé avec moi aussi. Au-delà de cette thèse, l'aventure humaine à tes côtés aura été inoubliable en allant de visites de la région dans les calanques, à la Sainte Victoire (j'en dirais pas plus mais je sais ce que tu penses...) mais aussi à Aix et Marseille. On aura aussi connu des moments de partage sur ou dans la mer Méditerranée notamment quand je ramais pour 2 au kayak ou lorsqu'on a fait de la plongée. Tu m'auras fait découvrir ta passion pour les voyages en me trainant en Ecosse et dans tout Londres (25 km à pied en une journée avec une tendinite, je m'en souviendrai...) et dans Vienne après un super congrès ensemble où tu m'auras saoulée avec tes photos (soleil, pas soleil, contraste, pas contraste, jour ou nuit). Merci de t'être livrée à moi, de m'avoir écoutée. Tu es une merveilleuse amie et je pense qu'aujourd'hui tu es une des personnes qui me connaît le mieux. Ma tête de cul préférée, je ne te remercierai jamais assez pour ces 4 ans et j'espère que d'autres belles années nous attendent...

Je ne peux terminer cette section remerciements sans citer ma famille. **Maman**, merci pour tout ce que tu m'as transmis et partagé depuis tant d'années. Merci pour cette éducation qui m'a grandement aidé à réussir personnellement et professionnellement. Merci de m'avoir poussée et soutenue quels que soit mes choix et d'avoir répondu à mes appels en pleurs ces 4 dernières années. Tu as été une éponge, je sais que tu as souffert aussi mais tu n'as (presque) rien laissé paraître. Comme tu l'as si bien dit le jour de la soutenance, on revient de loin depuis toutes ces années alors merci d'avoir été là et de nous avoir donné cette force. Tu es une maman formidable et aucun mot n'est assez fort pour te dire combien je te remercie pour tout et combien je t'aime. **Robin**, mon petit frère, on a souvent eu des moments compliqués mais merci d'avoir été là et de m'avoir raconté des conneries pour me remonter le moral ou de m'avoir remis à ma place quand c'était nécessaire. Je veux remercier aussi **Christophe**, beau-papa, merci pour ton sourire et tous tes encouragements depuis le début. Je pense aussi très fort à mes **grands-parents** qui ont toujours été soucieux de moi. Merci pour votre présence et vos appels motivants ! Merci aussi à mes **tantes et oncles** et à **mes cousines** pour leur soutien quotidien. Vous êtes une famille en or et je suis heureuse d'en faire partie.

Je finirai par remercier mon **Papa**, même si tu n'as pas été là pour vivre ces instants, je sais que mes études te tenaient à cœur. La vie ne nous a pas gâté et chaque jour a été difficile sans toi mais j'espère que 10 ans après ton décès, je peux dire que j'ai pris ma revanche et que tu es fier. Tu es ma bonne étoile depuis 10 ans et je me souviendrai toute ma vie qu'en visitant le laboratoire, le jour de mon entretien pour cette thèse, est passée à la radio, la chanson qui me ramenait à toi « Puisque tu pars ». Merci pour m'avoir transmis la force, le courage et la détermination, je t'aime.

Table des matières

Remerciements.....	ii
Table des matières.....	x
Liste des illustrations.....	xvi
Liste des tables.....	xxii
Liste des abréviations.....	xxiv
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....	5
1. Bilan de la contamination du bassin méditerranéen par les produits pharmaceutiques	7
1.1 La problématique environnementale des produits pharmaceutiques et particularités du bassin méditerranéen	7
1.2 Sélection des composés d'intérêt et construction de la base de données de présence dans le bassin méditerranéen.....	9
1.3 Consommation des produits pharmaceutiques dans des pays bordant la Méditerranée.....	12
1.4 Présence de produits pharmaceutiques dans le bassin méditerranéen.....	14
1.4.1 Cas des eaux de STEU.....	14
1.4.2 Cas des eaux de surface (rivières et mer).....	18
2. Impact des PP sur les organismes aquatiques	23
2.1 Ecotoxicité aigue et chronique	23
2.2 Construction de la base de données de valeurs d'écotoxicologie des produits pharmaceutiques sur les organismes aquatiques	24
2.3 Ecotoxicités aiguës et chroniques des 43 produits pharmaceutiques étudiés sur divers organismes aquatiques appartenant à différents niveaux trophiques.....	27
2.3.1 Valeurs d'écotoxicologie aigue et chronique des 43 PP.....	27
2.3.2 Sensibilité des espèces aquatiques modèles pour évaluer l'écotoxicité des produits pharmaceutiques	30
2.4 Point de vue critique sur les valeurs écotoxicologiques de la banque de données	32
2.4.1 Limites des tests écotoxicologiques standardisés.....	32
2.4.2 Écotoxicité de mélanges et de produits de dégradation.....	34
2.5 Composés pertinents et évaluation du risque dans le bassin méditerranéen.....	35
2.5.1 Danger potentiel représenté par les effluents de STEU.....	37
2.5.2 Danger potentiel en rivières et mer et priorisation des PP	37
3. Devenir des produits pharmaceutiques dans les milieux aquatiques	38
3.1 Les phénomènes d'atténuation naturelle	38
3.1.1 Le phénomène de dilution	39
3.1.2 Le phénomène d'adsorption	39

3.1.3	Le phénomène de volatilisation.....	42
3.1.4	Le phénomène de biodégradation.....	42
3.1.5	Les réactions chimiques possibles : l'hydrolyse et les réactions d'oxydo-réduction.....	45
3.1.6	Les réactions photochimiques.....	47
3.2	Les processus de phototransformation.....	47
3.2.1	La photolyse (phototransformation directe).....	47
3.2.2	La phototransformation indirecte.....	51
4.	Problématiques abordées dans la thèse et approches proposées.....	61
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes.....		65
1.	Prélèvements des eaux naturelles.....	67
2.	Composés chimiques et solvants utilisés.....	69
3.	Irradiation simulée.....	70
3.1	Système d'irradiation.....	70
3.2	Evaluation des réactions photochimiques.....	72
4.	Identification et réactivité des espèces chimiques transitoires.....	73
4.1	Spectrophotométrie d'absorption résolue en temps.....	73
4.1.1	Principe.....	73
4.1.2	Etude des espèces chimiques transitoires.....	74
4.2	Utilisation de sonde chimique.....	75
4.3	Mesure de la réactivité des espèces radicalaires par réactions de compétition.....	75
5.	Analyses chimiques.....	77
5.1	Caractérisation chimique des eaux.....	77
5.2	Spectres d'absorption UV-Visible des composés et eaux étudiés.....	79
5.3	Dosage des composés par LC-UV-Fluorescence.....	79
5.4	Identification des produits de photodégradation par LC-MSQToF.....	80
6.	Evaluation de l'écotoxicité des 3 composés pharmaceutiques sélectionnés.....	81
6.1	Evaluation de l'écotoxicité aiguë.....	82
6.1.1	Mesure de la diminution de bioluminescence chez <i>Vibrio fischeri</i>	82
6.2	Evaluation de l'écotoxicité chronique.....	84
6.2.1.	Mise au point d'un test par la mesure non-destructive de phytométabolites chez <i>Lemna minor</i>	84
6.2.2	Mise au point d'un test sur <i>Hydra circumcincta</i>	87
6.2.3	Analyses statistiques.....	93
Chapitre 3 : Caractérisation des eaux naturelles.....		95
1.	Propriétés physicochimiques des eaux.....	97
1.1	Propriétés spectroscopiques.....	97
1.2	Les paramètres physicochimiques des eaux naturelles.....	99
2.	Mise en évidence et quantification des radicaux hydroxyles.....	103
2.1	Utilisation de la spectrophotométrie d'absorption résolue en temps.....	103

2.1.1	Approche préliminaire à la mise en évidence de la formation des radicaux hydroxyles dans les eaux de surface naturelles.....	103
2.1.2	Mise en évidence de la formation des radicaux hydroxyles.....	105
2.2	Utilisation d'une sonde chimique : l'acide téréphthalique.....	108
2.2.1	Introduction.....	108
2.2.2	Etude photochimique de TPA et HTPA dans les eaux naturelles.....	111
2.2.3	Détermination des vitesses initiales de formation de $\cdot\text{OH}$ et leur concentration quasi-stationnaire dans les eaux naturelles.....	114
3.	Mise en évidence de la formation d'autres espèces réactives au LFP.....	117
3.1	Radicaux halogénures.....	117
3.1.1	Etude sur les eaux brutes.....	117
3.1.2	Etude sur les eaux filtrées.....	119
3.2	Mise en évidence de la formation des radicaux carbonates.....	120
4.	Conclusion.....	122
Chapitre 4 : Etude du devenir de CBZ, OxCBZ et du produit de transformation 9-CAA dans les compartiments aquatiques.....		125
1.	Etude cinétique de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans l'eau ultrapure.....	127
1.1	Propriétés d'absorption des composés.....	127
1.2	Suivi cinétique des composés à l'obscurité.....	129
1.3	Suivi cinétique des composés sous irradiation.....	130
1.4	Conclusion.....	132
2.	Etude cinétique du devenir de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans les eaux naturelles à l'obscurité.....	133
2.1	Cinétiques de transformation de CBZ, OxCBZ et 9-CAA.....	133
2.1.1	Origine de la dégradation de OxCBZ dans les eaux naturelles.....	134
2.1.2	Cinétique dans l'eau de l'Arc et du Rhône.....	136
2.1.3	Cinétiques dans Berre et la mer Méditerranée.....	137
2.2	Conclusion.....	139
3.....	Etude cinétique du comportement photochimique de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans les eaux naturelles.....	139
3.1	Cinétiques de transformation de CBZ, OxCBZ et 9-CAA sous irradiation lumineuse.....	139
3.1.1	Comportement photochimique de la carbamazépine.....	140
3.1.2	Comportement photochimique de l'acide 9-carboxylique acridine.....	142
3.1.3	Comportement photochimique de l'oxcarbazépine.....	143
3.1.4	Comparaison entre les comportements de CBZ, OxCBZ et 9-CAA.....	144
3.2	Détermination des constantes de réactions.....	145
3.2.1	Spectrophotométrie résolue en temps.....	145
3.2.2	Détermination des constantes de réactions entre les composés sélectionnés et les radicaux chlorures et bromures.....	150
3.3	Conclusion.....	156

4.	Etude analytique de la dégradation de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans les eaux	157
4.1	Etude analytique de la dégradation de CBZ dans les eaux	158
4.1.1	Identification des produits de transformation de CBZ dans les eaux naturelles	158
4.1.2	Comparaison des sous-produits de CBZ identifiés dans les différents milieux.....	164
4.1.3	Cinétique de formation et quantification des TP de CBZ	164
4.2	Processus de dégradation de 9-CAA dans les eaux naturelles.....	167
4.2.1	Identification des TP de 9-CAA	167
4.2.2	Comparaison des sous-produits de 9-CAA identifiés dans les différents milieux	169
4.2.3	Cinétique de formation et quantification des TP de 9-CAA.....	170
4.2.4	Comparaison avec les résultats obtenus lors de la photolyse de 9-CAA.....	171
4.3	Processus de dégradation de OxCBZ dans les eaux naturelles	173
4.3.1	Identification des TP de OxCBZ.....	173
4.3.2	Comparaison des TP de OxCBZ identifiés dans les différents milieux.....	175
4.3.3	Comparaison avec les résultats obtenus à l'obscurité et lors la photolyse de OxCBZ	175
4.4	Conclusion	176
5.	Mécanismes de dégradation de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans les eaux naturelles	177
5.1	Mécanisme de dégradation de CBZ dans les eaux naturelles.....	177
5.2	Mécanisme de dégradation de 9-CAA dans les eaux naturelles	181
5.3	Mécanisme de dégradation de OxCBZ dans les eaux naturelles.....	183
5.4	Conclusion	185
6.	Conclusion générale	186
Chapitre 5 : Évaluation de l'écotoxicité de la carbamazépine et de sous-produits : mise au point pour aborder les effets à faibles doses et en mélange		189
1.	Évaluation de l'écotoxicité lors d'une exposition aiguë.....	192
1.1	Bioluminescence chez <i>V. fischeri</i>	192
1.1.1	Détermination des EC ₅₀ sur les substances isolées.....	192
1.1.2	Détermination de l'EC ₅₀ de mélanges à faible dose	193
1.2	Évaluation des potentielles modifications d'écotoxicité avant et après irradiation	194
1.2.1	Évaluation par utilisation du Screening test 81,9 %.....	194
1.2.2	Évaluation par utilisation du Basic test 81,9 %.....	195
1.3	Discussion sur les résultats obtenus avec le bioessai sur <i>V. fischeri</i>	196
2.	Évaluation de l'écotoxicité pour une durée d'exposition chronique.....	197
2.1...	Mise au point de biomarqueurs précoces pour l'évaluation d'une écotoxicité chez <i>Lemna minor</i> L.	198
2.1.1	Indice de chlorophylles	198
2.1.2	Indice des composés phénoliques	199
2.1.3	Rapport azote/carbone (N/C).....	201
2.1.4	Discussion sur les résultats obtenus chez <i>L. minor</i>	203
2.2	Mise au point de bioessais multi-réponses chez <i>Hydra circumcincta</i>	204

2.2.1	Analyse morphologique	205
2.2.2	Taux de reproduction, taux de bourgeonnement et comportement alimentaire	206
2.2.3	Mesure du stress oxydant	208
2.2.4	Distribution des neuromodulateurs.....	209
2.2.5	Discussion sur les résultats obtenus chez <i>Hydra circumcincta</i>	212
3.	Discussion et Conclusion.....	217
	Conclusion générale et perspectives.....	221
	Références.....	227
	Annexes.....	259
	Annexe 1 : Concentrations mesurées en entrée et sortie de STEU méditerranéennes en ng.L ⁻¹ (moyenne, médiane, minimum-maximum)	261
	Annexe 2 : Concentrations mesurées en rivières et dans la mer Méditerranée en ng.L ⁻¹ (moyenne, médiane, minimum-maximum).....	271
	Annexe 3 : Références utilisées pour la base de donnée d'écotoxicité pour chaque composé	283
	Annexe 4 : Immuno-localisation de la dopamine dans les différentes régions du corps de l'hydre d'eau douce après 14 jours d'exposition à CBZ, OxCBZ, 9CAA et au mélange (cock) à 23°C.....	285
	Annexe 5 : Immuno-localisation de la sérotonine dans les différentes régions du corps de l'hydre d'eau douce après 14 jours d'exposition à CBZ, OxCBZ, 9CAA et au mélange (cock) à 23°C.....	287
	Annexe 6 : Publication : Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: Is there a risk for the Mediterranean aquatic environment?	289
	Résumé.....	304

Liste des illustrations

Figure 1-1: Évolution du nombre d'articles scientifiques traitant des contaminations de l'environnement par les produits pharmaceutiques*	7
Figure 1-2 : Emplacement géographique des stations de prélèvement dans les STEU (■), rivières (○) et mer (★) référencées dans les 67 articles publiés entre 2002 et 2018.....	11
Figure 1-3 : Concentrations en ng.L ⁻¹ des antibiotiques, anti-inflammatoires et analgésiques et des hormones en entrée (□) et sortie (✱) de STEU dans la phase dissoute d'échantillons filtrés des pays méditerranéens (Espagne, France, Italie, Grèce, Turquie, Israël, Liban, Tunisie, Algérie, Croatie, Palestine) et fréquence de détection en entrée (gris clair) et sortie (gris foncé) de STEU selon 67 articles scientifiques de 2002 à 2018. Les étiquettes de données sur le graphique à barres représentent les limites de détection des méthodes en ng.L ⁻¹ lorsqu'un composé est détecté en dessous de 50 %	15
Figure 1-4 : Concentrations en ng.L ⁻¹ des régulateurs de lipides, psychotropes, bêtabloquants et autres en entrée (□) et sortie (✱) de STEU dans la phase dissoute d'échantillons filtrés des pays méditerranéens (Espagne, France, Italie, Grèce, Turquie, Israël, Liban, Tunisie, Algérie, Croatie, Palestine) et fréquence de détection en entrée (gris clair) et sortie (gris foncé) de STEU selon 67 articles scientifiques de 2002 à 2018. Les étiquettes de données sur le graphique à barres représentent les limites de détection des méthodes en ng.L ⁻¹ lorsqu'un composé est détecté en dessous de 50 %	18
Figure 1-5 : Concentrations en ng.L ⁻¹ des antibiotiques, anti-inflammatoires et analgésiques et des hormones en rivières (◇) et dans la mer Méditerranée (★) dans la phase dissoute et dans la phase dissoute et particulaire (◁) des pays méditerranéens (Espagne, France, Italie, Grèce, Turquie, Israël, Liban, Tunisie, Algérie, Croatie, Palestine) et fréquence de détection en entrée (gris clair) et sortie (gris foncé) de STEU selon 67 articles scientifiques de 2002 à 2018. Les étiquettes de données sur le graphique à barres représentent les limites de détection des méthodes en ng.L ⁻¹ lorsqu'un composé est détecté en dessous de 50 %.....	20
Figure 1-6 : Concentrations en ng.L ⁻¹ des régulateurs de lipides, psychotropes, bêtabloquants et autres en rivières (◇) et dans la mer Méditerranée (★) dans la phase dissoute et dans la phase dissoute et particulaire (◁) des pays méditerranéens (Espagne, France, Italie, Grèce, Turquie, Israël, Liban, Tunisie, Algérie, Croatie, Palestine) et fréquence de détection en entrée (gris clair) et sortie (gris foncé) de STEU selon 67 articles scientifiques de 2002 à 2018. Les étiquettes de données sur le graphique à barres représentent les limites de détection des méthodes en ng.L ⁻¹ lorsqu'un composé est détecté en dessous de 50 %.....	22
Figure 1-7 : Valeurs écotoxicologiques obtenues pour une exposition aiguë (gauche) (EC ₁₀ , EC ₅₀ , IC ₁₀ , IC ₅₀ , LC ₅₀) et chronique (droite) (NOEC, LOEC) groupées par niveau trophique (crustacés, bactéries, poissons, algues et cyanobactéries, lentilles d'eau et autres), des 43 produits pharmaceutiques issus de 98 articles scientifiques entre 1993 à 2018 et leur PNEC associée	29
Figure 1-8 : Pourcentage de chaque niveau trophique et organisme étudié issus des 80 articles scientifiques (1993-2018) traitant de l'écotoxicité des produits pharmaceutiques. Niveaux trophiques et organismes étudiés dans la littérature pour mesurer l'écotoxicité des produits pharmaceutiques (hors hormones)	30

Figure 1-9 : Pourcentage de chaque niveau trophique et organisme étudié issus des 18 articles scientifiques (1993-2018) traitant de l'écotoxicité des hormones.....	31
Figure 1-10 : Boîtes à moustaches représentant les Quotients de Danger (QD ou HQ) et les Indices de Priorisation (IP) dans les effluents de STEU, les rivières et la mer pour 25 à 37 produits pharmaceutiques.....	36
Figure 1-11 : Mécanisme de biodégradation aérobie du kétoprofène (Quintana et al., 2005)	43
Figure 1-12 : Étape initiale de la dégradation microbienne du naproxène	44
Figure 1-13 : Hydrolyse de l'érythromycine en condition acide ou basique d'après Atkins et al. (1986).....	45
Figure 1-14 : Diagramme de Perrin-Jablonski.....	47
Figure 1-15 : Mécanisme de transformation du diclofénac par photolyse directe (Agüera et al., 2005).....	51
Figure 1-16 : Mécanisme de transformation de la carbamazépine en présence de radicaux $\cdot\text{OH}$ (Lam et Mabury, 2005).	58
Figure 2-1 : Carte de localisation des sites de prélèvement des eaux naturelles	68
Figure 2-2 : Dispositif d'irradiation (gauche) et spectres d'émission du système d'irradiation non corrigé (noir) et corrigés (Laszakovits: tiret, Dulin: pointillé).....	71
Figure 2-3 : Appareillage utilisé Applied Photophysics type LKS 60.....	73
Figure 2-4 : Schéma de principe de l'appareillage de spectrophotométrie d'absorption résolue en temps.....	74
Figure 2-5 : Visualisation de la bioluminescence de la bactérie <i>Vibrio fischeri</i>	82
Figure 2-6 : Luminomètre thermostaté Microtox 500	84
Figure 2-7 : Lentilles sans nutriment (gauche) et lentilles après une semaine d'acclimatation (droite).....	85
Figure 2-8 : Expérience sur les lentilles d'eau en phytotron.....	86
Figure 2-9 : Equipement portatif pour la mesure de la fluorescence des phytométabolites (Multiplex, FORCE-A®, Orsay).....	87
Figure 2-10 : Morphologie et histologie de l'hydre d'eau douce (d'après Fujisawa, 2003).....	88
Figure 2-11 : <i>Hydra circumcincta</i>	89
Figure 2-12 : 6 stades morphologiques d' <i>Hydra circumcincta</i> observés par de Jong et al. (2016)	90
Figure 3-1 : Spectre d'absorption des eaux de surface non filtrées (ligne pleine) et filtrées (pointillé) Arc (gris), étang de Berre (orange), fleuve du Rhône (bleu), mer Méditerranée (rouge) et spectre d'émission du système d'irradiation (noir), cellule en quartz de 1 cm	98
Figure 3-2 : Evolution de l'absorbance à 500 nm d'échantillons d'eau de surface (noir), avec SCN^- (bleu), avec SCN^- et IPA (rouge).....	107
Figure 3-3 : Réaction d'hydroxylation de TPA (gauche). Spectre d'absorption de TPA (trait plein) et de HTPA (tirets) dans l'eau et spectre d'émission du système d'irradiation Xe (pointillés) (droite). [TPA] = $4,9 \times 10^{-5}$ M et [HTPA] = $5,2 \times 10^{-5}$ M, longueur de cellule = 1 cm	109
Figure 3-4 : Cinétique de formation de HTPA au cours de l'irradiation d'eau naturelle dopée en TPA : rivière Arc (\square), étang de Berre (Δ), Rhône (\circ), mer Méditerranée (\blacktriangledown).	112
Figure 3-5 : Cinétique de formation de HTPA sous irradiation lumineuse dans l'eau de la rivière Arc (gauche) et dans le Rhône (droite) : (\bullet) brute, (\blacktriangle) filtrée, [TPA] = $1,38 \times 10^{-3}$ M (Arc) et [TPA] = $1,66 \times 10^{-3}$ M (Rhône), lampe Xe 300W	115

Figure 3-6 : Evolution de l'absorbance à 350 nm d'échantillons d'eau de surface (noir), avec HClO ₄ (rouge). Etang de Berre (gauche) et mer Méditerranée (droite).....	118
Figure 3-7 : Evolution de l'absorbance à 350 nm d'échantillons d'eau de surface (noir), avec HClO ₄ et acrylamide (rouge), avec HClO ₄ , acrylamide et IPA (bleu). Etang de Berre (gauche) et mer Méditerranée (droite).....	119
Figure 3-8 : Evolution de l'absorbance à 350 nm d'échantillons d'eau de surface brute (noir), filtrée (rouge). Etang de Berre (gauche) et mer Méditerranée (droite).....	119
Figure 3-9 : Spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon d'eau de l'Arc enregistré 60 ns après l'impulsion laser. Excitation à 266 nm, énergie laser = 44 mJ.....	121
Figure 3-10 : Evolution de l'absorbance à 600 nm de l'eau de l'Arc en fonction du temps (gauche) et absorbance à 60 ns après le pulse (droite) pour l'eau brute (noir), en présence d'acrylamide (bleu), d'acrylamide et d'IPA (rouge).....	122
Figure 4-1 : Spectre d'absorption UV-visible dans H ₂ O de CBZ (5 mg.L ⁻¹ , tirets), OxCBZ (5 mg.L ⁻¹ , trait plein) et 9-CAA (5 mg.L ⁻¹ , pointillés), pH = 5,75.....	128
Figure 4-2 : Evolution de la concentration en composé organique, concentration au temps t (C _t) divisée par la concentration initiale C ₀ , dans l'eau ultrapure à l'obscurité : (●) CBZ, (☆) OxCBZ, (△) 9-CAA, concentration = 5 mg.L ⁻¹ , pH = 5,75 et T = 25°C (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique).....	130
Figure 4-3 : Evolution de la concentration en composé organique, concentration au temps t (C _t) divisée par la concentration initiale C ₀ , sous irradiation : (●) CBZ, (☆) OxCBZ, (△) 9-CAA. pH = 5,75, concentration égale à 5 mg.L ⁻¹ et lampe Xe 300 W (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique).....	131
Figure 4-4 : Evolution des concentrations de CBZ (A) et de 9-CAA (B) dans les eaux naturelles à l'obscurité : Arc (▼), Berre (*), Rhône (◇), Mer (○). [PP] ₀ = 5 mg.L ⁻¹ , T = 25°C et pH ≈ 8 (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique).....	133
Figure 4-5 : Cinétique à l'obscurité de OxCBZ dans les eaux naturelles : Arc (▼), Berre (*), Rhône (◇), Mer (○). [OxCBZ] ₀ = 5 mg.L ⁻¹ , T = 25°C et pH ≈ 8 (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique).....	134
Figure 4-6 : Cinétique à l'obscurité de OxCBZ dans l'eau de l'Arc (gauche) et du Rhône (droite) : brute (▼), filtrée (●), NaN ₃ (△), filtrée et NaN ₃ (◇). [OxCBZ] ₀ = 5 mg.L ⁻¹ , T = 25°C et pH ≈ 8, (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique).....	136
Figure 4-7 : Cinétique à l'obscurité de OxCBZ dans l'eau de l'étang de Berre (gauche) et de la mer Méditerranée (droite): brut (▼), filtrée (●), NaN ₃ (△), filtrée et NaN ₃ (◇). c = 5 mg.L ⁻¹ , T = 25°C, pH ≈ 8 (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique).....	138
Figure 4-8 : Cinétique sous irradiation de CBZ (A), du 9-CAA (B) et de OxCBZ (C) dans les eaux naturelles : Arc (▼), Berre (*), Rhône (◇), Mer (○), concentration égale à 5 mg.L ⁻¹ , lampe Xe de 300 W, (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique).....	140
Figure 4-9 : Tracé de la corrélation entre la vitesse initiale de disparition de CBZ et la concentration en ions bromure (gauche) et en azote total (TN, droite). [CBZ] ₀ = 5 mg.L ⁻¹ , lampe Xe 300 W.....	142

Figure 4-10 : A) Evolution de l'absorbance à 500 nm en fonction du temps et de la concentration de SCN ⁻ ; B) Evolution de la constante de vitesse observée, k_{obs} , en fonction de la concentration de SCN ⁻ . [CBZ] = $8,46 \times 10^{-5}$ M, [H ₂ O ₂] = $3,75 \times 10^{-2}$ M et $\lambda_{exc} = 266$ nm.	147
Figure 4-11 : A) Evolution de l'absorbance à 500 nm en fonction du temps et de la concentration de SCN ⁻ ; B) Evolution de la constante de vitesse observée, k_{obs} , en fonction de la concentration de SCN ⁻ . [OxCBZ] = $8,32 \times 10^{-5}$ M ; [H ₂ O ₂] = $3,75 \times 10^{-2}$ M et $\lambda_{exc} = 266$ nm.	148
Figure 4-12 : A) Evolution de l'absorbance à 500 nm en fonction du temps et de la concentration de SCN ⁻ ; B) Evolution de la constante de vitesse observée, k_{obs} , en fonction de la concentration de SCN ⁻ . [9-CAA] = $8,06 \times 10^{-5}$ M ; [H ₂ O ₂] = $3,75 \times 10^{-2}$ M et $\lambda_{exc} = 266$ nm.	149
Figure 4-13 : A) Evolution du signal à 600 nm correspondant au radical CO ₃ ^{•-} en présence (gris clair) et absence (noir) de CBZ, [CBZ] = $2,9 \times 10^{-4}$ M ; [H ₂ O ₂] = $3,75 \times 10^{-2}$ M, [CO ₃ ²⁻] = 0,1 M et $\lambda_{exc} = 266$ nm),	150
Figure 4-14 : Spectres d'absorption UV-Visible de HQ en pointillés (9×10^{-5} M) et de AQ2S en noir (1×10^{-4} M) dans l'eau ultrapure	151
Figure 4-15 : Cinétiques et vitesse de disparition (gauche) de CBZ ($4,2 \times 10^{-5}$ M) en absence (▼) et présence de HQ à $9,1 \times 10^{-7}$ M (□) et $4,5 \times 10^{-6}$ M (△) et avec AQ2S (2×10^{-4} M) et Cl ⁻ (4×10^{-2} M) et rapport des vitesses en fonction de la concentration de HQ (droite).	153
Figure 4-16 : Cinétiques et vitesse de disparition (gauche) de OxCBZ ($4,0 \times 10^{-5}$ M) en absence (▼) et présence de HQ à $9,1 \times 10^{-7}$ M (□) et $4,5 \times 10^{-6}$ M (△) et avec AQ2S (2×10^{-4} M) et Cl ⁻ (4×10^{-2} M) et rapport des vitesses en fonction de la concentration de HQ (droite).....	154
Figure 4-17 : Cinétiques et vitesse de disparition (gauche) de 9-CAA ($4,5 \times 10^{-5}$ M) en absence (▼) et présence de HQ à $9,1 \times 10^{-7}$ M (□) et $4,5 \times 10^{-6}$ M (△) et avec AQ2S (2×10^{-4} M) et Cl ⁻ (4×10^{-2} M) et rapport des vitesses en fonction de la concentration de HQ (droite).....	155
Figure 4-18 : Cinétiques et vitesse de disparition (gauche) de OxCBZ ($4,0 \times 10^{-5}$ M) en absence (▼) et présence de HQ à $9,1 \times 10^{-7}$ M (□) et $4,5 \times 10^{-6}$ M (△) et avec AQ2S (2×10^{-4} M) et Br ⁻ (4×10^{-2} M) et rapport des vitesses en fonction de la concentration de HQ (droite).....	155
Figure 4-19 : Chromatogrammes de solutions préconcentrées de CBZ avant irradiation (pointillé) et après 24 h d'exposition (ligne pleine) dans l'Arc (gauche) et dans Berre (droite), pH ≈ 8, [CBZ] = 5 mg.L ⁻¹ et lampe Xe 300 W	158
Figure 4-20 : Spectre MS-MS du composé DiOH-CBZ à $m/z = 271$ (EC = 10 eV)	161
Figure 4-21 : Structures chimiques de composés ayant une masse m/z égales à 253 d'après la littérature	162
Figure 4-22 : Spectre MS-MS du composé $m/z = 253$ ($t_{rét} = 6,6$ min) (EC = 10 eV)	163
Figure 4-23 : Spectre MS-MS du composé $m/z = 226,0858$ (EC = 20 eV)	163
Figure 4-24 : Cinétiques de formation des produits de transformation de CBZ dans les eaux naturelles : (▼) Arc, (◇) Rhône, (○) Méditerranée, (✱) Berre, pH ≈ 8, [CBZ] = 5 mg.L ⁻¹ et lampe Xe 300 W	165
Figure 4-25 : Chromatogrammes de solutions préconcentrées de 9-CAA avant irradiation (pointillé) et après 48 h d'exposition (ligne pleine) dans l'Arc (gauche) et dans Berre (droite), pH ≈ 8, [9-CAA] = 5 mg.L ⁻¹ et lampe Xe 300 W.....	167

Figure 4-26 : Cinétiques de formation des produits de transformation de 9-CAA dans les eaux naturelles : (▼) Arc, (◇) Rhône, (○) Méditerranée, (*) Berre.....	170
Figure 4-27 : Cinétiques de formation des TP issus de la photodégradation de 9-CAA dans l'eau ultrapure : acridone (■), acridine (○), acide carboxylique quinoléine (△), dihydroxy-acridine (□), pH = 5,75, lampe Xe 300 W, [9-CAA] = 5 mg.L ⁻¹	172
Figure 4-28 : Chromatogrammes de solutions de OxCBZ de référence (pointillé) et après 4 h d'exposition dans Berre (gauche) et dans Rhône (droite), pH ≈ 8, [OxCBZ] = 5 mg.L ⁻¹ et lampe Xe 300 W.	173
Figure 4-29 : Mécanismes de phototransformation de CBZ dans les eaux naturelles d'après la littérature et les résultats obtenus au cours de la thèse.....	180
Figure 4-30 : Hypothèses mécanistiques de photodégradation du sous-produit 9-CAA dans les eaux naturelles : (▼) Arc, (◇) Rhône, (○) Méditerranée, (*) Berre d'après les résultats obtenus dans la thèse.....	182
Figure 4-31 : Mécanismes de phototransformation de OxCBZ dans les eaux naturelles d'après la littérature et les résultats obtenus dans la thèse	184
Figure 5-1 : Courbe dose-effet représentant le pourcentage d'inhibition de bioluminescence de <i>Vibrio fischeri</i> en fonction du pourcentage de concentration maximale testée pour CBZ, OxCBZ et 9-CAA	193
Figure 5-2 : Courbe dose-effet représentant le pourcentage d'inhibition de bioluminescence de <i>Vibrio fischeri</i> en fonction du pourcentage de concentration testée pour le mélange	194
Figure 5-3 : Courbe dose-effet représentant le pourcentage d'inhibition de bioluminescence de <i>Vibrio fischeri</i> en fonction du pourcentage de concentration initiale testée pour l'eau de l'Arc dopée à 5 mg.L ⁻¹ (concentrée par 10) et pour l'eau de l'Arc dopée à 5 mg.L ⁻¹ après 25 h d'irradiation (concentrée par 10).....	196
Figure 5-4 : Boîtes à moustaches représentant l'indice de chlorophylle mesuré au Multiplex® pendant 17 jours chez les lentilles d'eau <i>Lemna minor</i> après contact avec le témoin (en blanc), CBZ, OxCBZ, 9-CAA au ng.L ⁻¹ (vert), µg.L ⁻¹ (orange) et mg.L ⁻¹ (rouge) et le mélange à faible dose (ng.L ⁻¹).....	199
Figure 5-5 : Boîtes à moustaches représentant l'indice phénolique mesuré au multiplex pendant 17 jours chez les lentilles d'eau <i>Lemna minor</i> après contact avec le témoin (en blanc), CBZ, OxCBZ, 9-CAA au ng.L ⁻¹ (vert), µg.L ⁻¹ (orange) et mg.L ⁻¹ (rouge) et le mélange à faible dose (ng.L ⁻¹).	200
Figure 5-6 : Boîtes à moustaches représentant la balance azotée mesurée au multiplex pendant 17 jours chez les lentilles d'eau <i>Lemna minor</i> après contact avec le témoin (en blanc), CBZ, OxCBZ, 9-CAA au ng.L ⁻¹ (vert), µg.L ⁻¹ (orange) et mg.L ⁻¹ (rouge) et le mélange à faible dose (ng.L ⁻¹).	202
Figure 5-7 : Histogrammes cumulés des stades morphologiques (a : pas d'intoxication et b, c, d, e : signes d'une intoxication croissante) observés chez <i>Hydra circumcincta</i> en conditions contrôles (TEM) et exposées à CBZ, OxCBZ, 9-CAA et leur mélange à A) 19,5°C et B) 23°C.....	205
Figure 5-8 : Taux de reproduction (RHR) chez <i>Hydra circumcincta</i> en exposées au témoin (TEM) et exposées à CBZ, OxCBZ, 9-CAA et leur mélange pendant 14 jours à A) 19,5°C et B) 23°C.	207
Figure 5-9 : Taux de bourgeonnement (Ktot) chez <i>Hydra circumcincta</i> exposées au témoin (TEM), à CBZ, OxCBZ, 9-CAA et leur mélange pendant 14 jours à A) 19,5°C et B) 23°C.	208
Figure 5-10 : Capacité antioxydante totale (AOC exprimée en mM de Trolox par mg de protéines) (A) et peroxydation lipidique (LPO exprimée en µM MDA/mg de protéines) (B) chez <i>Hydra circumcincta</i> en conditions	

contrôles (TEM) et après exposition à CBZ, OxCBZ, 9-CAA et leur mélange pendant 14 jours à 19,5°C (noir) et 23°C (gris).	209
Figure 5-11 : Immuno-localisation de la 5-HT dans la région de la cavité gastrique de l'hydre d'eau douce témoin (gauche) et après 14 jours d'exposition à OxCBZ (droite) à 19,5°C.....	211
Figure 5-12 : Immuno-localisation de la DA dans la région de la cavité gastrique de l'hydre d'eau douce témoin (A) et après 14 jours d'exposition au 9-CAA (B) et à CBZ (C) à 19,5°C.....	211
Figure 5-13 : Comparaison de l'immunomarquage dopaminergique aux deux températures testées A) 19,5°C et B) 23°C dans les tentacules des hydres témoins.....	212

Liste des tables

Tableau 1-1 : Classes thérapeutiques et molécules ciblées dont 2 dérivés de PP (en italique).....	10
Tableau 1-2 : Prescription des classes thérapeutiques sélectionnées dans les pays méditerranéens en 2013 (OECD, 2016).....	13
Tableau 1-3 : Inventaire des bioessais normalisés pour évaluer l'impact écotoxicologique aigu d'une substance sur les écosystèmes aquatiques.....	25
Tableau 1-4 : Inventaire des bioessais normalisés pour évaluer l'impact écotoxicologique chronique d'une substance sur les écosystèmes aquatiques.	26
Tableau 1-5 : Facteurs correctifs utilisés pour calculer les PNEC de chaque composé.....	27
Tableau 1-6 : Propriétés physico-chimiques de certains produits pharmaceutiques.....	41
Tableau 1-7 : Rendement quantique de photolyse de produits pharmaceutiques.....	50
Tableau 1-8 : Liste de radicaux libres et leur potentiel d'oxydation (E^0).....	52
Tableau 2-1 : Localisation des sites de prélèvements.....	67
Tableau 2-2 : Paramètres mesurés sur site après échantillonnage et références des sondes utilisées.....	68
Tableau 2-3 : Propriétés physico-chimiques des composés étudiés.....	69
Tableau 2-4 : Caractéristiques des solvants utilisés.....	69
Tableau 2-5 : Caractéristiques des autres produits chimiques utilisés.....	70
Tableau 2-6 : Paramètres d'analyse des différents composés par LC.....	80
Tableau 2-7 : Concentrations testées sur les lentilles d'eau.....	86
Tableau 2-8 : Concentrations en composés pharmaceutiques testés sur les Hydres.....	90
Tableau 3-1 : Flux de photons absorbés par les eaux filtrées ($I_{a,f}$) et non filtrées ($I_{a,nf}$) et paramètres mesurés <i>in situ</i> après prélèvement à l'aide du multimètre portable HACH, HQ40d équipé de différentes sondes.....	99
Tableau 3-2 : Caractérisation chimique des échantillons d'eau.....	101
Tableau 3-3 : Constante de vitesse de piégeage de $\cdot\text{OH}$ ($k_{s,\text{OH}}$) dans la phase dissoute et particulaire et pourcentage de contribution de piégeage de $\cdot\text{OH}$ avec CDOM, HCO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , NO_3^- , Br^- et POC dans chaque échantillon d'eau naturelle.....	104
Tableau 3-4 : Vitesses initiales de disparition de HTPA, $R_{d, \text{HTPA}}$, et valeurs de α et β dans les eaux naturelles..	113
Tableau 3-5 : Vitesse initiale de formation de $\cdot\text{OH}$ ($R_{p, \text{OH}}$) et concentration quasi-stationnaire de $\cdot\text{OH}$ ($[\cdot\text{OH}]_{ss}$) dans les eaux naturelles brutes (police normale) et filtrées (en italique).....	115
Tableau 4-1 : Propriétés d'absorption de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans l'eau ultrapure, pH = 5,75.....	129
Tableau 4-2 : Vitesses initiales (v), constantes de vitesse (k), pourcentages de dégradation après 3 et 50h, temps de demi-vie ($t_{1/2}$) et rendements quantiques de disparition (ϕ) pour CBZ, OxCBZ et 9-CAA lors de leur irradiation dans l'eau ultrapure, $[\text{PP}]_0 = 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Xe 300 W et pH = 5,75.....	132
Tableau 4-3 : Bilan des dégradations (deg) de OxCBZ à l'obscurité dans l'Arc, le Rhône, Berre et la Méditerranée.....	134
Tableau 4-4 : Bilan des dégradations de OxCBZ à l'obscurité dans l'Arc et le Rhône.....	136
Tableau 4-5 : Bilan des dégradations de OxCBZ à l'obscurité dans Berre et dans la mer.....	138

Tableau 4-6 : Bilan des cinétiques de dégradation de CBZ ($2,1 \times 10^{-5}$ M) sous irradiation dans les différentes eaux, lampe Xe 300W.....	141
Tableau 4-7 : Bilan des cinétiques de dégradation de 9-CAA ($2,24 \times 10^{-5}$ M), sous irradiation dans les différentes eaux, lampe Xe 300W.....	142
Tableau 4-8 : Bilan des cinétiques de dégradation de OxCBZ ($2,46 \times 10^{-5}$ M) sous irradiation dans les différentes eaux, lampe Xe 300W.....	144
Tableau 4-9 : Temps de rétention, masses exacte théorique (m/z) _t et expérimentale (m/z) _e , erreur sur la masse (Δm), formule brute, structure chimique des produits de transformation, ion parent fragmenté et formules des ions fils obtenus en MS/MS, suite à l'analyse des eaux naturelles dopées en CBZ et irradiées, pH \approx 8, [CBZ] = 5 mg.L ⁻¹ et lampe Xe 300 W.....	159
Tableau 4-10 : Concentration en acridine, acridone, 9-CAA et DiOH-CBZ après 24 h d'irradiation de CBZ dans les différentes eaux, pH \approx 8, [CBZ] = 5 mg.L ⁻¹ et lampe Xe 300 W	167
Tableau 4-11 : Sous-produits formés au cours de l'irradiation de 9-CAA dans les eaux naturelles.....	168
Tableau 4-12 : Concentration en acridine et acridone après 24 h d'irradiation de 9-CAA dans les différentes eaux, pH \approx 8, [9-CAA] = 5 mg.L ⁻¹ et lampe Xe 300 W.....	171
Tableau 4-13 : Sous-produits formés lors de l'irradiation de OxCBZ dans les eaux naturelles.....	174
Tableau 4-14 : Concentrations en 9-CAA, acridine et acridone à partir de OxCBZ dans les différentes eaux et dans les différentes conditions expérimentales, pH \approx 8, [OxCBZ] = 5 mg.L ⁻¹ et lampe Xe 300 W.....	176
Tableau 5-1 : Estimation de l'intensité de l'immunomarquage de la dopamine et de la sérotonine chez <i>Hydra circumcincta</i> après 14 jours d'exposition aux produits à 19,5°C et 23°C.....	210
Tableau 5-2 : Données écotoxicologiques obtenues dans la littérature pour la carbamazépine à partir de tests normalisés	220

Liste des abréviations

λ : Longueur d'onde	LC-MSQToF : Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse haute résolution en tandem
ϕ : Rendement quantique	LC₅₀ ou CL₅₀ : Concentration létale qui provoque la mort de 50% des individus
9-CAA : Acide 9-carboxylique acridine	LD : Limite de détection
AC : Anticorps	LFP : Spectrophotométrie d'absorption résolue en temps (Laser Flash Photolysis)
AOC : Capacité antioxydante totale	LOEC ou CMEO : Concentration Minimale provoquant un effet
AQ2S : Anthraquinone 2 sulfonate	LPO : Peroxydation des lipides membranaires
BSA : Albumine sérique bovine	LQ : Limite de quantification
CBZ : Carbamazépine	m/z : Rapport masse sur charge
CDOM : Matière organique dissoute chromophorique	MEC : Concentration environnementale mesurée
CI : Conversion interne	MES : Matière en suspension
CID : Carbone inorganique dissous	MOD : Matière organique dissoute
CIS : Conversion inter-système	MOP : Matière organique particulaire
COD : Carbone organique dissous	NOEC ou CSEO : Concentration Sans Effet Observable
CT : Carbone total	NT : Azote total
DDD : Dose thérapeutique quotidienne	OxCBZ : Oxcarbazépine
EC₁₀ ou CE₁₀ : Concentration effective qui provoque 10 % d'effet sur un organisme	PFA : <i>Para</i> -formaldéhyde
EC₅₀ ou CE₅₀ : Concentration effective qui provoque 50 % d'effet sur un organisme	PNA : <i>Para</i> -nitroanisole
FD : Fréquence de détection	PNEC ou CPSE : Concentration Prédite Sans Effet
HQ : Quotient de danger	PP : Produit pharmaceutique
HTPA : Acide hydroxytéréphtalique	RHR : Taux de reproduction de l'hydre
IC₁₀ ou CI₁₀ : Concentration qui provoque 10 % d'inhibition d'une fonction sur un organisme	RV : Relaxation vibrationnelle
IC₅₀ ou CI₅₀ : Concentration qui provoque 50 % d'inhibition d'une fonction sur un organisme	SD : Seuil de détection
IHC : Immunohistochimie	STEU : Station de Traitement des Eaux Usées
IP : Indice de priorisation	t_{1/2} : Temps de demi-vie
K_{oc} : Coefficient de partage carbone organique / eau	TPA : Acide téréphtalique
K_{ow} : Coefficient de partage octanol / eau	TPS : Tampon phosphate salin
K_{tot} : Taux de bourgeonnement de l'hydre	
LC : Chromatographie liquide	

Introduction

Une grande variété de micropolluants organiques a été détectée dans les compartiments aquatiques environnementaux dans le monde entier au cours des dernières décennies par de nombreuses équipes de recherche. Parmi ces composés, on retrouve certains pesticides ou hydrocarbures mais également des composés dits émergents, tels que les produits pharmaceutiques (PP). En effet, ces derniers sont de plus en plus fréquemment quantifiés à des concentrations de l'ordre du ng.L⁻¹ au µg L⁻¹ dans divers plans d'eau récepteurs, tels que les eaux douces, les eaux souterraines, les ressources en eau potable et l'eau de mer (Arpin-Pont et al., 2016; Benotti et al., 2009; Ebele et al., 2017; Kolpin et al., 2002; Liu et Wong, 2013; Pal et al., 2010; Watkinson et al., 2009; Yang et al., 2017).

Les PP sont devenus un sujet préoccupant notamment du fait de l'utilisation, en constante augmentation, de médicaments visant à améliorer la santé des populations humaines et animales. Ces composés, suite à leur ingestion, sont excrétés dans les urines et les fèces (en partie sous leur forme originale) et se retrouvent dans les influents de stations de traitement des eaux usées (STEU). Or, dans les STEU, les traitements biologiques secondaires (procédés à boues activées) ont été conçus à l'origine pour éliminer les matières organiques et les solides en suspension, afin de respecter les exigences minimales de rejet (Barraqué, 2004; Blösch, 2005). Leurs efficacités d'élimination des produits pharmaceutiques sont du coup très variables ; par exemple, supérieure à 80 % pour l'acétaminophène (ou paracétamol) et l'ibuprofène (anti-inflammatoire), mais inférieure à 20 % pour la carbamazépine (antiépileptique) et l'aténolol (bêta-bloquant) (Miège et al., 2009). La consommation généralisée et l'efficacité parfois limitée des procédés de traitement des eaux usées ont conduit à une large diffusion des produits pharmaceutiques dans l'environnement aquatique faisant d'eux des polluants «pseudo-persistants» (Daughton, 2003).

La présence dans l'environnement de substances thérapeutiques, ayant donc un effet sur l'homme ou les animaux, est considérée, depuis peu, comme présentant un danger à la fois pour les organismes aquatiques mais également pour la santé humaine (Comber et al., 2018; Daughton, 2016; Ebele et al., 2017). De ce fait, sept produits pharmaceutiques ont été récemment ajoutés sur la liste de priorisation de la réglementation Européenne sur la qualité des masses d'eaux. Ainsi, on retrouve sur cette liste : le diclofénac, le 17 α -éthynilestradiol, le 17 β -estradiol, l'estrone, l'érythromycine, la clarithromycine et l'azithromycine (EU, 2015). Cependant, cette liste est bien sûr incomplète du fait de la détection de nombreux autres produits pharmaceutiques dans les compartiments aquatiques, voire même discutable car elle ne prend pas en compte le devenir de ces composés dans l'environnement et donc leurs produits de transformation, qui sont pour la plupart inconnus.

C'est dans ce contexte qu'intervient ce travail de thèse, dont l'objectif est d'étudier l'évolution des PP une fois rejetés dans l'environnement, précisément sous l'influence de la lumière solaire. Pour cela, trois composés ont été pris comme modèles pour étudier leur réactivité photochimique à la fois dans une eau ultrapure mais surtout dans des masses d'eaux réelles d'origine diverses provenant de rivière, fleuve, étang et mer. Un des objectifs de ce travail était de corrélérer leur réactivité aux propriétés photoinductrices des milieux aquatiques ainsi qu'à leur contenu chimique. Pour appréhender le devenir des polluants ciblés dans l'environnement, le travail a aussi porté sur les réactions mises en jeu, leur importance et leurs origines. Un autre objectif était de caractériser l'impact des PP sur l'écosystème aquatique en prenant en compte les niveaux de concentrations environnementales et les effets mélange liés à la présence concomitante des PP et de leurs sous-produits photochimiques, en l'occurrence. Pour ce faire, le but était d'adapter ou développer des tests d'écotoxicologie originaux pour les appliquer à notre problématique, et comparer les résultats à ceux fournis par des tests classiques.

Pour aborder ce travail, le premier chapitre présente une synthèse bibliographique approfondie du bilan de la contamination par les produits pharmaceutiques à l'échelle du bassin méditerranéen. Ceci nous a permis d'identifier les composés les plus fréquents et de connaître les niveaux de concentrations mesurés dans différents compartiments aquatiques. De plus, l'effet des PP sur divers organismes aquatiques a été recensé, afin d'identifier les composés les plus problématiques sur un plan écotoxicologique. Ensuite, les connaissances sur le devenir des composés dans les milieux aquatiques ont été rassemblées avec la prise en compte des différents phénomènes d'atténuation naturelle, en particulier les réactions photochimiques. Les réactions par absorption directe de la lumière et celles photoinduites ont été décrites ainsi que les espèces chimiques réactives susceptibles de se former dans les milieux aquatiques.

Dans le second chapitre, sont détaillés les matériels et méthodes employés dans ce travail pour les essais de réactivité photochimique, pour les caractérisations physico-chimiques et analytiques, et pour les bioessais aigus et chroniques.

Le chapitre 3 présente les résultats sur la caractérisation des eaux naturelles sélectionnées pour les travaux de thèse. Dans un premier temps, les propriétés physico-chimiques de chacune des eaux déterminées sur les sites de prélèvement et en laboratoire sont présentées. Dans un second temps, les propriétés photoinductrices des eaux sont détaillées, notamment la mise en évidence et la quantification d'espèces chimiques réactives (radicaux) grâce à deux méthodes, à savoir la

spectrophotométrie d'absorption résolue en temps et l'utilisation d'une sonde chimique, l'acide téréphthalique.

L'étude du devenir des trois composés sélectionnés (carbamazépine (CBZ), oxcarbazépine (OxCBZ) et l'acide 9-carboxylique acridine (9-CAA)) dans les différents milieux aquatiques a été réalisée par la suite et fait l'objet du chapitre 4. Les résultats des études cinétiques de transformation des PP dans les eaux (ultrapure ou naturelles) sous irradiation ou à l'obscurité sont présentés, ainsi que les constantes de réactions entre les PP et les espèces chimiques réactives, qui ont été déterminées en mettant en œuvre des réactions de compétition. Ces deux aspects ont permis la compréhension des différences de comportements observées dans les eaux. De plus, les PP se dégradant, on a cherché à identifier les sous-produits formés dans chacune des eaux. Et par suite, des mécanismes et voies de dégradation des 3 composés sont proposés.

Les aspects écotoxicologiques abordés dans cette thèse sont traités dans le chapitre 5. Trois tests d'écotoxicité aiguë et chroniques en utilisant trois organismes modèles (*Vibrio fischeri*, *Lemna minor* et *Hydra circumcincta*) ont été sélectionnés afin d'être adaptés ou développés pour mesurer les effets à faibles doses des composés d'intérêt pris seul ou en mélange. Enfin, l'évolution de l'écotoxicité des trois composés au cours de l'irradiation lumineuse a été mesurée dans le but d'évaluer les effets des PP au cours de leur devenir environnemental.

Ce travail de recherche a été mené entre deux laboratoires universitaires : le Laboratoire de Chimie de l'Environnement (UMR 7376, France) et l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et Ecologie marine et continentale (UMR 7263, France) et financé par la Région Provence-Alpes-Côte d'Azur et l'entreprise Seakalia (Marseille, France) (DEB n°141198/2014). Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet éco-industries MICROPOL, dont l'objectif est de trouver des solutions pour anticiper les évolutions de la réglementation européenne sur les rejets de micropolluants dans l'environnement.

Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

Ce premier chapitre dresse un bilan de la contamination aquatique du bassin méditerranéen par les produits pharmaceutiques, en examinant d'une part la pollution en entrée et sortie de stations de traitement des eaux usées (STEU) et d'autre part dans les réceptacles naturels (rivières, mer). La qualité des eaux du bassin méditerranéen est discutée en regard des effets écotoxicologiques des composés pharmaceutiques dans la deuxième partie. En troisième partie, le devenir de ces composés dans les milieux aquatiques, lié aux phénomènes d'adsorption, de biodégradation et de photodégradation est présenté.

1. Bilan de la contamination du bassin méditerranéen par les produits pharmaceutiques

1.1 La problématique environnementale des produits pharmaceutiques et particularités du bassin méditerranéen

Depuis deux décennies, la problématique du rejet des PP dans l'environnement naturel et l'impact potentiel de ces composés sur la santé humaine est devenue une préoccupation majeure comme le montre la figure 1-1 représentant l'évolution du nombre d'articles scientifiques traitant des contaminations environnementales par les produits pharmaceutiques entre 1998 et 2016.

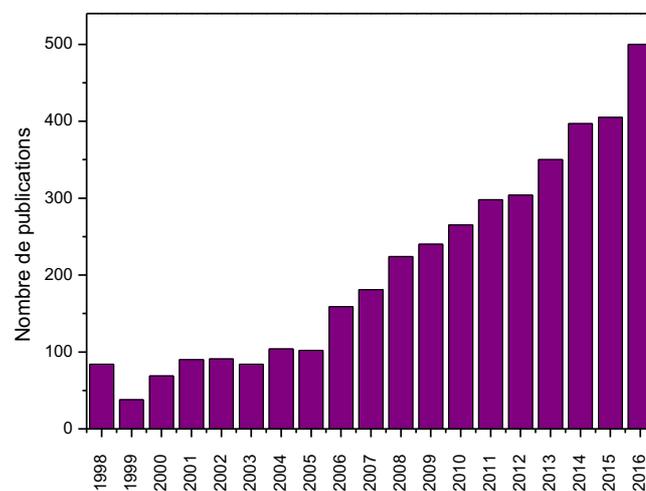


Figure 1-1: Évolution du nombre d'articles scientifiques traitant des contaminations de l'environnement par les produits pharmaceutiques*

*Résultats obtenus après une recherche dans la base de données Sciencedirect en utilisant les termes «pharmaceutical» et «environment» dans le titre, le résumé ou les mots clés; en sélectionnant les thèmes suivants: «pharmacology, toxicology and pharmaceuticals », «environmental science», «chemistry», «biochemistry, genetic and molecular biology», «agricultural and biological sciences»; et en ne tenant pas en compte des revues médicales, pharmacologiques ou de synthèse chimique : «Drug Discovery Today», «International Journal of Pharmaceutics», «Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis», «Advanced Drug Delivery Reviews».

Au cours de ces dernières années, la présence des produits pharmaceutiques a été principalement étudiée au niveau international (Gogoi et al., 2018; Li, 2014; Tran et al., 2018; Wilkinson et al., 2017; Yang et al., 2017). Seuls quelques articles récemment publiés ont examiné l'impact des produits pharmaceutiques à l'échelle locale, par exemple en Inde (Balakrishna et al., 2017), ou encore en Chine (Bu et al., 2013; Liu et Wong, 2013). Le recensement à l'échelle mondiale des produits pharmaceutiques est intéressant pour évaluer l'étendue de cette problématique tandis que les études de cas par pays peuvent constituer un outil d'aide à la gestion économique et politique de ce problème. Et, d'un point de vue environnemental, il est particulièrement intéressant de considérer un bassin hydrogéographique complet. C'est ce que nous nous sommes proposés de faire en dressant un état des lieux à l'échelle du bassin versant correspondant à la Méditerranée et ces tributaires.

Le bassin méditerranéen comprend des pays développés et des pays en voie de développement avec des différences importantes en termes de population, de démographie, de croissance économique, d'industrialisation, de fabrication et prescriptions pharmaceutiques et de réutilisation et de traitement des eaux usées (Gürlük, 2009; Kookana et al., 2014). Une gestion de l'eau et des politiques nettement différentes induisent un traitement des eaux usées dans 70 % des cas en moyenne dans les pays à revenus élevés, comme la France, l'Italie et Israël, suivis par les pays à revenus intermédiaires (38 % des cas) tels que l'Algérie, la Croatie, la Turquie et les pays à faibles revenus (28 % des cas) comme le Maroc, la Syrie et la Tunisie (Madikizela et al., 2017; Sato et al., 2013; "World bank list of economies," 2017). Dans les pays d'Afrique du Nord, la connectivité des égouts est généralement faible et, dans certaines zones, les déchets sont principalement collectés dans les fosses septiques (Bouchaala et al., 2017; Plan bleu pour la Méditerranée, 2009; Salama et al., 2014). D'autre part, le bassin méditerranéen comprend des pays classés parmi les 10 premiers producteurs et exportateurs européens de produits pharmaceutiques, tels que la France, l'Italie et l'Espagne avec respectivement 10, 5 et 4 % du total des exportations de médicaments en Europe (Eurostat, 2017). On retrouve également plusieurs pays qualifiés de grands consommateurs de médicaments, tels que la Grèce, la France, l'Italie, l'Espagne et la Slovénie. En comparaison avec des pays à revenus élevés, les indicateurs utilisés montrent que les pays à faibles revenus consomment moins de médicaments que la population mondiale moyenne (World Health Organization, 2004), mais ces indicateurs n'intègrent pas les taux plus élevés d'automédication pour les médicaments en vente libre et de prescriptions liées aux maladies infectieuses (Segura et al., 2015).

La mer Méditerranée présente également un intérêt particulier car elle constitue le réceptacle ultime des rivières et des eaux usées de pays fortement urbanisés et industrialisés et elle est presque totalement fermée, ce qui en fait un écosystème aquatique plus sensible que les autres mers et océans.

Ces observations soulèvent une série de questions concernant l'impact des médicaments sur l'environnement aquatique particulier du bassin versant méditerranéen.

1.2 Sélection des composés d'intérêt et construction de la base de données de présence dans le bassin méditerranéen

Afin de réaliser un bilan de contamination du bassin méditerranéen par les produits pharmaceutiques, notre étude a considéré les 19 pays bordant la mer Méditerranée et une liste de 43 composés appartenant à différentes classes pharmaceutiques.

L'ensemble de ces 43 substances pharmaceutiques actives a été initialement sélectionné en fonction de plusieurs critères. Premièrement, toutes les substances sélectionnées ont été régulièrement mises en évidence dans un contexte international (Santos et al., 2010), notamment dans les effluents de STEU. Deuxièmement, chaque molécule choisie devait également répondre à au moins l'un des trois critères suivants : (1) faible efficacité d'élimination dans une STEU (comme la carbamazépine et l'aténolol) ; (2) principalement trouvées en phase dissoute ($\text{LogK}_{ow} < 3$, par exemple la norfloxacine, le métronidazole et l'acétaminophène), (3) ayant montré un impact écotoxicologique à des concentrations environnementales (dans la gamme des dizaines de $\mu\text{g.L}^{-1}$, par exemple le propranolol, la fluoxétine) (Fent et al., 2006). Cette liste comprend 7 analgésiques et anti-inflammatoires (dont un dérivé: l'acide salicylique, métabolite urinaire humain de l'acide acétylsalicylique (aspirine) (Hutt et al., 1986)), 5 régulateurs de lipides (dont un dérivé : l'acide clofibrique, métabolite plasmatique actif du clofibrate (Du et al., 2003), 4 médicaments psychiatriques, 10 antibiotiques, 4 bêta-bloquants, 7 hormones (5 œstrogènes, 1 progestatif et 1 androgène) et 6 autres composés appartenant aux classes des stimulants cardiovasculaires, diurétiques, produits de contraste, antihistaminiques et bronchodilatateurs (tableau 1-1).

Pour construire notre base de données, les publications ont été sélectionnées à partir de banques de données d'articles scientifiques, telles que ScienceDirect, PubMed, TitaneScience et des moteurs de recherche tels que Google Scholar et Web of science. Une recherche a été effectuée avec les mots clés suivants : « pharmaceuticals », chaque classe de produits pharmaceutiques (antibiotiques, bêta-bloquants, hormones, ...), « occurrence », « wastewater treatment plants », « sewage », « surface water », « seawater », « Mediterranean Sea » et chacun des 19 pays riverains de la mer Méditerranée. De plus, lorsqu'aucune ou très peu de références ont été trouvées pour un composé, son nom spécifique a été directement recherché.

Tableau 1-1 : Classes thérapeutiques et molécules ciblées dont 2 dérivés de PP (en italique)

Classe thérapeutique	Molécules
Analgésiques et anti-inflammatoires	Diclofénac, Ibuprofène, Kétoprofène, Naproxène, Acétaminophène, Acide salicylique, <i>Acide acétylsalicylique</i>
Régulateurs lipidiques	Bézafibrate, Gemfibrozil, Atorvastatine, Fénofibrate, <i>Acide clofibrrique</i>
Psychotropes	Carbamazépine, Fluoxétine, Venlafaxine, Amitriptyline
Bétabloquants	Propranolol, Aténolol, Sotalol, Métoprolol
Antibiotiques	Sulfaméthoxazole, Triméthoprime, Ofloxacine, Norfloxacine, Clarithromycine, Azithromycine, Erythromycine, Ciprofloxacine, Métronidazole, Amoxicilline
Produits de contraste	Iopromide
Antihypertenseurs	Enalapril
Antihistaminiques	Ranitidine
Diurétiques	Furosémide
Bronchodilatateurs	Salbutamol
Antidiabétiques	Metformine
Hormones	17 β -estradiol, Estriol, Estrone, Estrone-3-sulfate, 17 α -éthynylestradiol, Progestérone, Testostérone

Ainsi, 67 articles (Annexes 1 et 2) publiés entre 2002 et 2018 dans des revues internationales ont été utilisés pour constituer la base de données recensant la présence des 43 PP sélectionnés autour du bassin méditerranéen. Elle comprend 6072 valeurs de concentrations, soit 904 valeurs pour les influents de STEU, 1451 pour les effluents de STEU, 2964 pour les rivières et 753 pour les eaux de mer. Toutes les données concernant les STEU proviennent de structures conventionnelles domestiques et municipales (comprenant le traitement primaire suivi éventuellement d'un traitement biologique secondaire). De plus, toutes les données prises en compte pour les eaux de surface ont été mesurées dans des échantillons d'eau de mer ou dans des tributaires de la mer Méditerranée (c'est-à-dire des effluents de STEU et des rivières se déversant dans la mer Méditerranée). Les concentrations recueillies correspondent à la phase dissoute (d) à l'exception de la mer Méditerranée (phase dissoute et particulaire, d + p). Enfin, pour les données obtenues par échantillonnage passif, seules celles converties et exprimées en masse par litre d'eau ont été conservées pour permettre la comparaison entre toutes les valeurs de concentration, tandis que les valeurs rapportées en masse par gramme d'échantillon ont été écartées.

La figure 1-2 représente l'emplacement géographique des STEU, des rivières et des échantillons d'eau de mer des différents points d'échantillonnage évoqués dans les 67 articles. La figure 1-2 montre clairement que les PP ont principalement été recherchés dans les pays

méditerranéens européens, à savoir l'Espagne (28 articles), la France (15 articles), l'Italie (14 articles), la Grèce (11 articles) représentant 83 % des données. Inversement, cette carte met en évidence le manque de données publiées dans des articles scientifiques internationaux pour des pays comme le Maroc, l'Albanie, la Libye et très peu de données dans d'autres pays du sud de la Méditerranée : Turquie (4 articles), Croatie (2 articles), Palestine et Israël (2 articles), Tunisie (1 article), Liban (1 article) et Algérie (1 article). Cet écart peut s'expliquer notamment par l'obligation de surveillance de l'état chimique du milieu aquatique et donc un certain nombre de substances, imposé par la directive-cadre sur l'eau aux pays européens (EU, 2015). Cette disparité peut également s'expliquer en partie par le fait que certains pays disposent de plus de fonds pour la recherche ainsi que des laboratoires universitaires dotés d'une instrumentation sophistiquée (Madikizela et al., 2017). De plus, seuls les articles scientifiques publiés en anglais ont été sélectionnés dans cette étude excluant de ce bilan des potentielles publications écrites dans les langues respectives des pays méditerranéens.

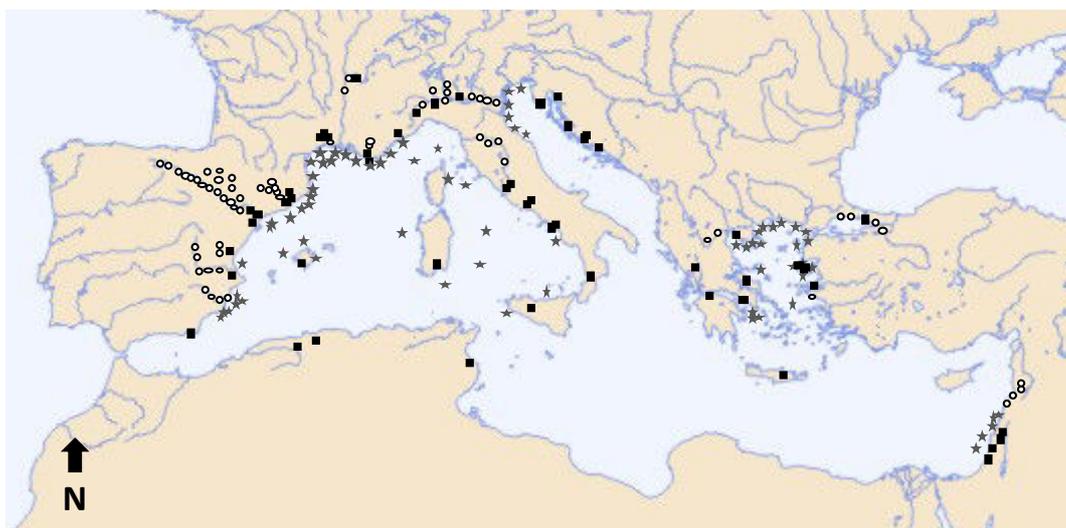


Figure 1-2 : Emplacement géographique des stations de prélèvement dans les STEU (■), rivières (○) et mer (★) référencées dans les 67 articles publiés entre 2002 et 2018.

Les études présentant des valeurs individuelles de concentrations ont été privilégiées, quelle que soit la taille de l'échantillon. Néanmoins, lorsque seules les données statistiques étaient accessibles, nous avons décidé d'utiliser aussi les concentrations individuelles minimales (min, quand supérieures à la limite de détection de la méthode, LD), maximales (max), médianes et moyennes en considérant une taille d'échantillons égale à 4. Les tableaux en annexe 1 (STEU) et annexe 2 (eau de surface) présentent les concentrations minimales et maximales mesurées pour un composé pharmaceutique dans chaque pays. Ensuite, les valeurs moyennes et médianes (respectivement en gras et en italique) ont été calculées sur toutes les valeurs non nulles obtenues pour une molécule

dans tous les pays confondus. Pour limiter les valeurs nulles et tenir compte des faibles niveaux dans le calcul de la moyenne, une concentration à la limite de quantification (LQ) / 3 a été utilisée comme une estimation pour un composé mentionné comme détecté, mais inférieur à la LQ. Pour éviter une mauvaise interprétation, lorsqu'un composé est recherché mais non détecté, l'indication <SD (inférieur au seuil de détection) est notée, tandis qu'un manque de données, pour un composé non recherché, est indiqué comme « aucune donnée » dans les figures et les tableaux.

Enfin, la fréquence de détection (FD) pour chaque molécule a été calculée comme le rapport du nombre de valeurs supérieures à la limite de détection spécifique à chaque molécule et à chaque étude sur le nombre total d'échantillons où la molécule a été recherchée. Lorsque le nombre total d'échantillons était inférieur à 3, la fréquence de détection n'a pas été calculée. Lorsque seules les valeurs statistiques ont été rapportées (min, max, médiane, moyenne) sans spécifier la taille de l'échantillon, si la valeur min était supérieure à la limite de détection, un ratio de 4 valeurs positives sur un total de 4 échantillons a été considéré. Si la valeur minimale était inférieure à la limite de détection, cet ensemble de données n'a pas été pris en compte dans le calcul de la fréquence de détection, puisque le nombre d'échantillons négatifs enregistré n'était pas connu.

1.3 Consommation des produits pharmaceutiques dans des pays bordant la Méditerranée

Afin d'évaluer les usages, la consommation des produits pharmaceutiques dans les différents pays a été considérée en s'appuyant sur des données de l'OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development), qui recense la prescription de toutes les classes de produits pharmaceutiques pour chaque pays à l'échelle mondiale.

Le tableau 1-2 présente la prescription de diverses classes thérapeutiques en 2013 dans différents pays méditerranéens (à l'exception de la France en 2009 et d'Israël en 2014), selon les données de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) (WHO. Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, 2012).

Tableau 1-2 : Prescription des classes thérapeutiques sélectionnées dans les pays méditerranéens en 2013 (OECD, 2016)

Classes thérapeutiques	Code ATC	Dose thérapeutique quotidienne pour 1000 habitants en 2013							
		France*	Grèce	Israël**	Italie	Slovénie	Espagne	Turquie	Total
Analgésiques	N02	-	4,3	7,9	17,0	18,2	37,0	8,3	93
Anti-inflammatoires	M01A	54,2	12,0	12,5	48,6	39,6	49,5	47,6	264
Antidépresseurs	N06A	49,8	44,7	42,1	42,5	53,3	65,2	36,3	334
Régulateurs lipidiques	C10	91,7	102,9	109,3	82,6	109,9	96,2	18,3	611
Bétabloquants	C07	56,8	44,1	26,3	50,3	42,9	21,5	16,6	249
Médicaments du système rénine-angiotensine	C09	144,8	176,1	115,1	233,1	263,3	162,6	74,4	1169
Diurétiques	C03	-	23,2	20,8	44,1	35,5	41,6	7,0	172
Antidiabétiques	A10	65,7	85,0	55,3	66,7	73,2	66,6	58,4	471
Antihistaminiques	A02	66,4	57,8	62,0	94,0	58,8	121,8	53,0	514
Bronchodilatateurs	R03	-	50,0	20,9	40,7	38,5	45,2	28,8	224
Antibiotiques	J01	29,6	18,0	22,1	30,1	14,5	19,5	41,1	175
Hormones	G03	-	3,7	17,1	41,8	44,4	16,9	22,8	147
Total		559	622	511	791	792	744	413	4432

*Données en 2009 ; ** Données en 2014

Valeurs pour les antibiotiques en 2013 (DDD) : Croatie : 21,1 ; Malte : 23,8 ; Chypre : 28,2

http://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=HEALTH_PHMC

La dose quotidienne définie (DDD pour Defined Daily Dose en anglais) est spécifiée par l'OMS comme étant « la dose moyenne journalière supposée d'un médicament utilisé pour son indication principale chez l'adulte ». Le total de DDD pour tous les pays confondus montre de loin que la plus forte prescription correspond aux agents agissant sur le système rénine-angiotensine, et appartenant à la classe ATC C (système cardiovasculaire). Leurs prescriptions élevées peuvent être liées à un problème de santé publique mondial lié aux maladies cardiovasculaires. Les régulateurs de lipides, les antidiabétiques et les antihistaminiques montrent également des taux de prescription significatifs et équivalents. Les analgésiques quant à eux représentent la classe de médicaments la moins prescrite, mais la prescription n'est pas une source fiable de consommation pour cette classe de composés, qui sont pour la plupart en vente libre dans les pharmacies. Pour les hormones également, la prescription n'est pas la seule source puisqu'elles sont produites naturellement par le métabolisme humain et se retrouvent dans les eaux usées.

1.4 Présence de produits pharmaceutiques dans le bassin méditerranéen

Pour avoir un meilleur aperçu des niveaux de contamination autour de la mer Méditerranée, nous avons examiné chaque classe de produits pharmaceutiques et chaque composé individuellement, en prenant en compte quatre types de masse d'eau (influent et effluent de STEU, rivières et eau de mer), comme présenté dans les paragraphes suivants.

1.4.1 Cas des eaux de STEU

Les concentrations aqueuses des composés et leur fréquence de détection en phase dissoute en entrée et sortie de STEU sont représentées sur les figures 1-3 (antibiotiques, analgésiques / anti-inflammatoires et hormones) et 1-4 (régulateurs lipidiques, psychotropes, bêta-bloquants et autres). Lorsque la fréquence de détection calculée était inférieure à 50 %, la gamme des LD des méthodes rapportées dans les études est donnée comme étiquette de données (ng.L^{-1}) sur le graphique à barres.

Comme le montre le grand nombre de points sur la figure 1-3, de nombreuses études ont été menées pour mesurer la présence des antibiotiques dans les pays méditerranéens. La FD a révélé que 5 composés sur 10 ont été quantifiés dans plus de 90 % des cas à des valeurs médianes comprises entre 90 et 461 ng.L^{-1} dans les eaux de STEU. Cette classe est omniprésente à l'échelle mondiale également avec des concentrations allant jusqu'à plusieurs $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Deblonde et al., 2011; Miège et al., 2009; Van Doorslaer et al., 2014; Verlicchi et al., 2012). On retrouve notamment la triméthoprime, la ciprofloxacine, le sulfaméthoxazole, l'ofloxacine et la norfloxacine comme les composés les plus concentrés ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dans les eaux de STEU européennes (Pal et al., 2010) asiatiques (Balakrishna et al., 2017; Li, 2014; Liu et Wong, 2013; Pal et al., 2010; Yang et al., 2017), africaines (Madikizela et al., 2017) et américaines (Li, 2014; Vidal-Dorsch et al., 2012).

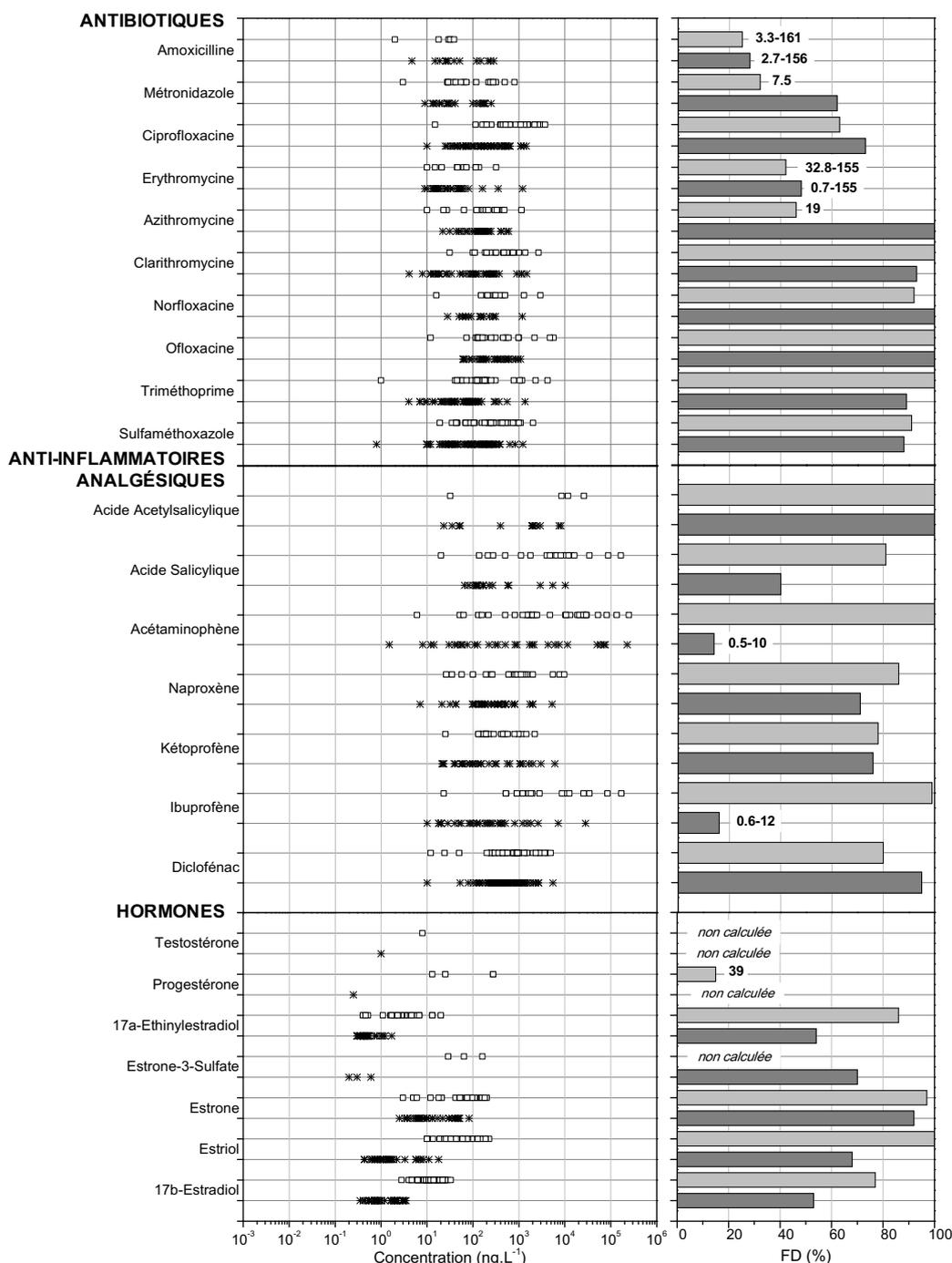


Figure 1-3 : Concentrations en ng.L⁻¹ des antibiotiques, anti-inflammatoires et analgésiques et des hormones en entrée (□) et sortie (*) de STEU dans la phase dissoute d'échantillons filtrés des pays méditerranéens (Espagne, France, Italie, Grèce, Turquie, Israël, Liban, Tunisie, Algérie, Croatie, Palestine) et fréquence de détection en entrée (gris clair) et sortie (gris foncé) de STEU selon 67 articles scientifiques de 2002 à 2018. Les étiquettes de données sur le graphique à barres représentent les limites de détection des méthodes en ng.L⁻¹ lorsqu'un composé est détecté en dessous de 50 %.

Dans le bassin méditerranéen, comme dans le monde entier (Balakrishna et al., 2017; Deblonde et al., 2011; Liu et Wong, 2013; Miège et al., 2009; Pal et al., 2010; Verlicchi et al., 2012; Yang et al., 2017), les antalgiques et les anti-inflammatoires se révèlent être les produits

pharmaceutiques les plus abondants dans les eaux usées. Ces médicaments sont largement consommés même si le chiffre de prescription ne le reflète pas, puisqu'une grande majorité d'entre eux est en vente libre. Les concentrations médianes calculées variaient de 410 (kétoprofène) à 10 000 ng.L⁻¹ (acide acétylsalicylique) et les FD de 80 à 100 %, sauf pour l'acétaminophène et l'ibuprofène avec une FD égale à environ 10-15 %, justifiée par des rendements d'élimination en STEU élevés (> 80 % par boues activées, (Miège et al., 2009)). Les concentrations retrouvées sur le continent africain (Madikizela et al., 2017), américain (Li, 2014; Pal et al., 2010; Vidal-Dorsch et al., 2012) et asiatique (Balakrishna et al., 2017; Li, 2014; Liu et Wong, 2013; Pal et al., 2010; Yang et al., 2017) sont sensiblement les mêmes et les composés ayant les plus fortes concentrations reportées sont le diclofénac, le naproxène, l'ibuprofène et l'acide salicylique principalement en Asie. A l'inverse, les concentrations mesurées en acétaminophène sont bien inférieures à celles trouvées en STEU méditerranéennes (inférieures au µg.L⁻¹).

Les hormones, bien que médiatisées pour leurs effets perturbateurs endocriniens, ont été moins fréquemment recherchées dans les eaux de STEU, puisque leur LogK_{ow} compris entre 3 et 4,2 ont orienté leurs mesures plutôt dans les boues. Néanmoins, les estrogènes ont été trouvés dans les eaux usées avec des FD d'environ 70-80 %, mais à des niveaux assez bas comme prévu (environ 50 ng.L⁻¹ et moins de 10 ng.L⁻¹, respectivement dans les influents et les effluents). La testostérone et la progestérone, quant à elles, ont rarement été recherchées. Les estrogènes, également recherchés dans des eaux de STEU tchèques, sont généralement pas ou peu quantifiés (< 41 ng.L⁻¹) (Yang et al., 2017). La recherche d'hormones est également plus rare de par le monde, toutefois, certains articles de synthèse (Li, 2014; Madikizela et al., 2017) ont montré que les concentrations sur d'autres continents (Amérique, Afrique, Europe) sont bien plus élevées qu'à l'échelle du bassin méditerranéen (plus d'une centaine de ng.L⁻¹).

En ce qui concerne les psychotropes (figure 1-4), comme la carbamazépine largement étudiée, les concentrations dans les STEU méditerranéennes (une centaine à 1000 ng.L⁻¹, avec des concentrations presque identiques en entrée et en sortie) corroborent les résultats antérieurs publiés en Europe, Amérique et Afrique (Deblonde et al., 2011; Madikizela et al., 2017; Pal et al., 2010; Verlicchi et al., 2012). Parmi les produits pharmaceutiques du système cardiovasculaire de classe C de l'ATC, les régulateurs lipidiques sont recherchés aussi souvent que les bêtabloquants et sont détectés dans 70 à 85 % des cas. Le gemfibrozil et l'aténolol ont été les produits pharmaceutiques les plus étudiés dans la classe C, ce qui explique leur présence aux niveaux les plus élevés (des centaines à 1000 ng.L⁻¹ tout comme en Amérique et en Asie (Pal et al., 2010)) dans leurs classes respectives. Étonnamment, le métoprolol et le propranolol, excrétés sous leur forme initiale à seulement 10 % (Godoy et al., 2015), étaient encore détectés dans les eaux usées à des concentrations non

négligeables (environ 200 et 50 ng.L⁻¹ respectivement pour le métoprolol et le propranolol). En conséquence, il semblerait pertinent d'inclure les métabolites urinaires connus de ces médicaments, tels que l' α -hydroxymétoprolol (Xu et al., 2013), dans les analytes ciblés et d'élucider plus avant les autres voies de métabolisation. Dans la même lignée, la recherche de l'acide fénofibrique pourrait être plus appropriée que celle de son composé parent le fénofibrate (Verlicchi et al., 2012). Toutefois, les acides clofibrique et fénobrique ont été peu détectés comme déjà indiqué par Deblonde et al. (2011).

Certains composés, tels que la carbamazépine, la venlafaxine ou le propranolol, ont révélé des concentrations médianes plus élevées dans les effluents que dans les influents. Ceci a déjà été observé et expliqué par le clivage des conjugués glucuronides par des processus enzymatiques dans les STEU (Ternes, 1998; Vieno et al., 2007), conduisant à l'augmentation des concentrations tout au long du traitement.

Trois médicaments appartenant à trois classes différentes, à savoir la ranitidine, le furosémide et la metformine, sont également présents à des teneurs aussi élevées que les analgésiques et semblent mal éliminés dans les STEU. Un nombre restreint de données a été trouvé pour l'iopromide, le metformine et l'énalapril. Notons que la recherche de l'iopromide, qui est un produit de contraste, est certainement plus appropriée dans les effluents hospitaliers que dans les STEU municipales et domestiques considérées ici. Le metformine a toujours été décelé lorsqu'il a pu être recherché (FD de 100 % dans les influents et effluents de STEU). C'est un composé très polaire avec un LogK_{ow} de -2,4, qui est encore particulièrement difficile à extraire des eaux. Ainsi, les laboratoires effectuant cette analyse sont encore rares. L'énalapril est le seul antihypertenseur inclus dans notre étude. Pourtant, cette classe pharmaceutique regroupe un grand nombre de composés, très peu (valsartan, losartan) voire même non étudiés, alors que leurs consommations ont fortement augmenté depuis deux décennies dans de nombreuses régions du monde (Godoy et al., 2015; Pereira et al., 2016).

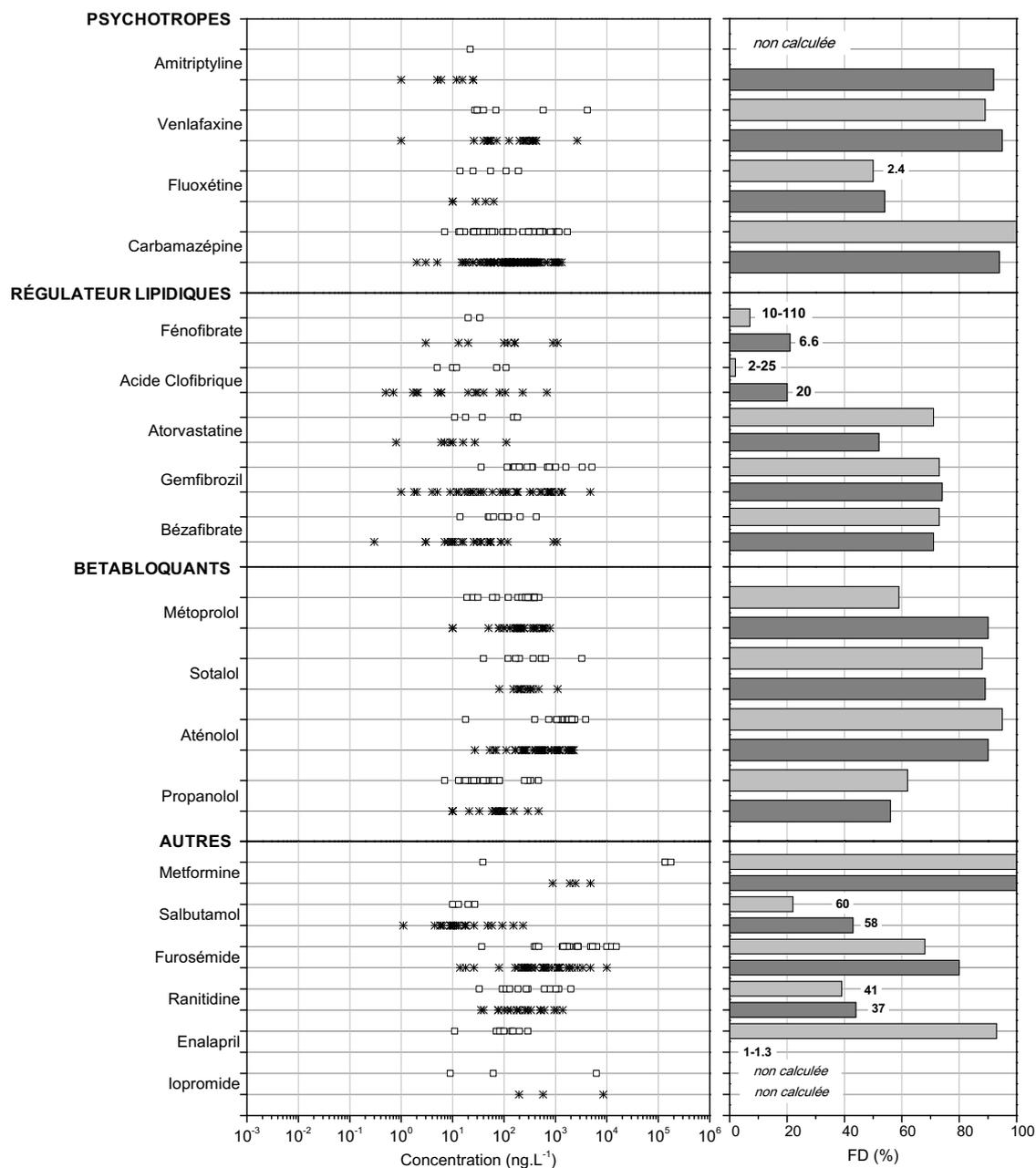


Figure 1-4 : Concentrations en ng.L⁻¹ des régulateurs de lipides, psychotropes, bêtabloquants et autres en entrée (□) et sortie (*) de STEU dans la phase dissoute d'échantillons filtrés des pays méditerranéens (Espagne, France, Italie, Grèce, Turquie, Israël, Liban, Tunisie, Algérie, Croatie, Palestine) et fréquence de détection en entrée (gris clair) et sortie (gris foncé) de STEU selon 67 articles scientifiques de 2002 à 2018. Les étiquettes de données sur le graphique à barres représentent les limites de détection des méthodes en ng.L⁻¹ lorsqu'un composé est détecté en dessous de 50 %.

1.4.2 Cas des eaux de surface (rivières et mer)

Les concentrations des produits pharmaceutiques et leur fréquence de détection dans la phase dissoute pour les rivières et dans les phases dissoute et particulaire pour l'eau de mer sont

présentées sur les figures 1-5 (antibiotiques, analgésiques / anti-inflammatoires et hormones) et 1-6 (régulateurs lipidiques, psychotropes, bêtabloquants et autres).

Les fréquences de détection calculées dans les rivières et l'eau de mer étant souvent inférieures à 60 %, ceci montre que dans de nombreux cas, les composés étaient présents à des concentrations inférieures aux limites de détection des méthodes. Globalement, 41 des 43 produits pharmaceutiques sélectionnés ont été détectés dans les eaux de surface du bassin méditerranéen. Comme attendu, les concentrations médianes trouvées dans les rivières étaient significativement plus faibles que dans les effluents de STEU, allant d'environ 1 (atorvastatine, métronidazole, œstrone-3-sulfate) à 43 ng.L⁻¹ (acide salicylique), en raison de l'effet de dilution. Des transformations biotiques et abiotiques, telles que la biodégradation (Quintana et al., 2005), la sorption par les sédiments et les particules en suspension, la photolyse (Baena-Nogueras et al., 2017), l'hydrolyse (Białk-Bielińska et al., 2012) et la volatilisation (Tissier et al., 2005), sur lesquelles nous reviendrons en partie 3 de ce chapitre, peuvent également être responsables de la diminution des concentrations en micropolluants organiques dans les eaux naturelles (Banjac et al., 2015).

Néanmoins, les concentrations retrouvées dans les rivières couvrent une très large gamme (6 unités de log à base 10). Des niveaux de concentration étonnamment élevés ont été mesurés dans des eaux de rivières ou de mer prélevées à proximité d'émissaires de STEU ou sur le front de mer de grandes villes. Par exemple, l'azithromycine a été mesurée à 16633 ng.L⁻¹ dans un affluent de la rivière El Albuñón (Moreno-González et al., 2014) et l'acétaminophène a été mesuré à 3000 ng.L⁻¹ près de Thessalonique, une grande ville grecque (Nödler et al., 2014). Des concentrations élevées ont également été mesurées sur d'autres continents, par exemple dans des étangs en Arabie Saoudite proche des sorties de STEU, notamment pour le diclofénac, la metformine et l'acétaminophène (respectivement 10,2 ; 4,8 ; et 2,3 µg.L⁻¹) ou encore en rivière à proximité d'une grande ville indienne (Chennai) pour l'ibuprofène et l'aténolol (respectivement 2,3 et 3,2 µg.L⁻¹).

Certaines classes de médicaments, comme les analgésiques, les antibiotiques et les bêtabloquants, étaient encore quantifiées à des concentrations comprises entre 0,3 (métoprolol) et des centaines de ng.L⁻¹ (azithromycine) dans l'eau de la mer Méditerranée. En particulier, six substances (azithromycine, amoxicilline, venlafaxine, acide salicylique, acétaminophène et ibuprofène) ont été quantifiées à des concentrations médianes supérieures à 20 ng.L⁻¹. Des produits pharmaceutiques ont également été trouvés dans les eaux côtières et océaniques adjacentes au détroit de Gibraltar (Biel-Maeso et al., 2018), le long de la côte nord du Portugal (Lolić et al., 2015), ou sur les côtes Norvégiennes (Weigel et al., 2004) à des concentrations très similaires à celles présentées ici (de l'ordre du ng.L⁻¹). Dans la mer du Nord, Wille et al. (2010) ont montré que seuls l'acide salicylique et la carbamazépine étaient retrouvés (jusqu'à respectivement 660 et 19 ng.L⁻¹). Dans l'océan pacifique

(Californie), Vidal-Dorsch et al. (2012), ont mesuré des concentrations médianes pour le gemfibrozil, l'aténolol, le naproxène, le sulfaméthoxazole et le triméthoprime proches de celles calculées en Méditerranée, avec une fréquence de détection supérieure à 60 %.

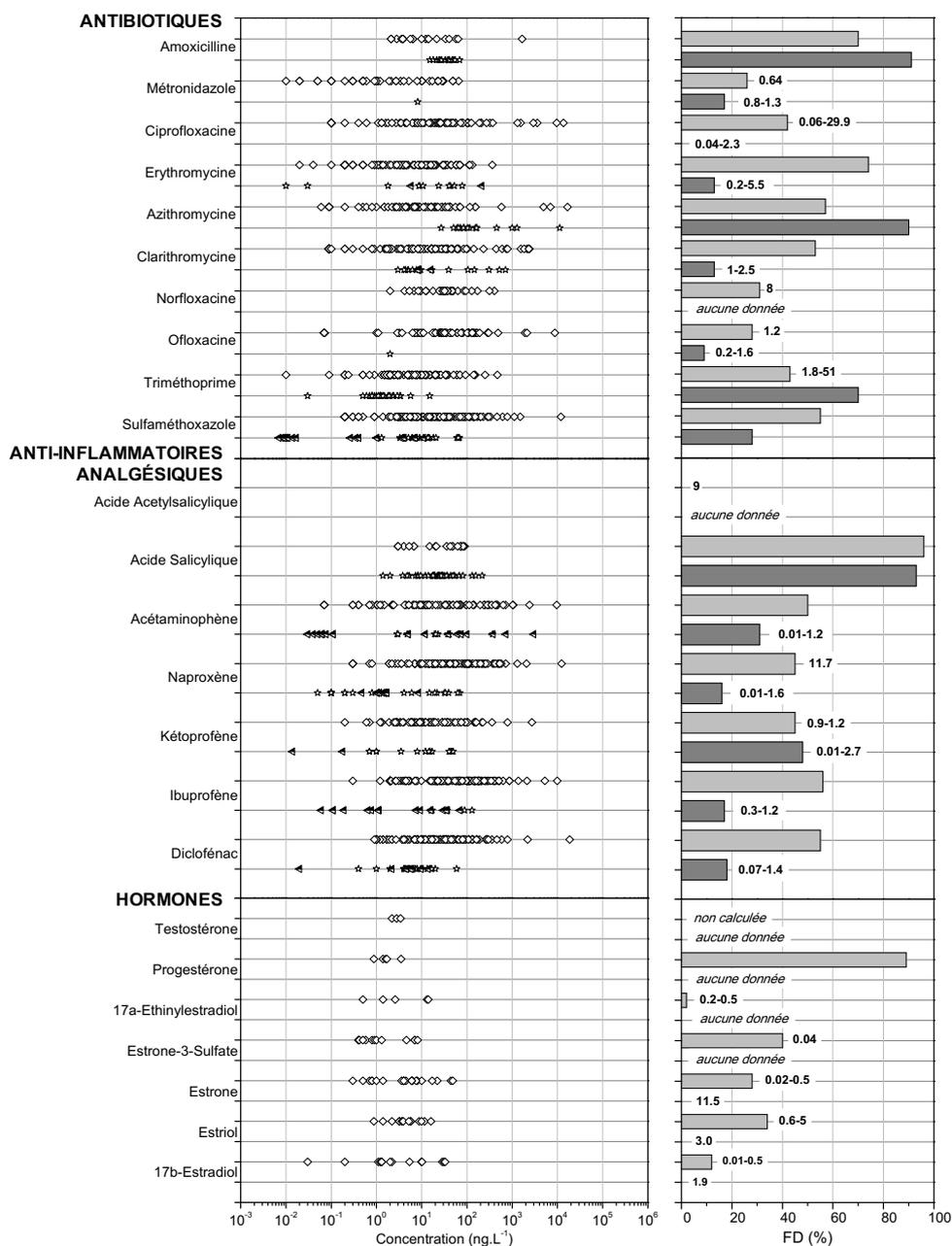


Figure 1-5 : Concentrations en ng.L⁻¹ des antibiotiques, anti-inflammatoires et analgésiques et des hormones en rivières (◇) et dans la mer Méditerranée (☆) dans la phase dissoute et dans la phase dissoute et particulaire (◁) des pays méditerranéens (Espagne, France, Italie, Grèce, Turquie, Israël, Liban, Tunisie, Algérie, Croatie, Palestine) et fréquence de détection en entrée (gris clair) et sortie (gris foncé) de STEU selon 67 articles scientifiques de 2002 à 2018. Les étiquettes de données sur le graphique à barres représentent les limites de détection des méthodes en ng.L⁻¹ lorsqu'un composé est détecté en dessous de 50 %.

Cette présence de produits pharmaceutiques confirme que la mer Méditerranée est devenue un écosystème vulnérable, en raison de sa position en tant que réceptacle ultime des polluants et du fait que cette mer est enclavée. Cette constatation avait déjà été établie pour d'autres micropolluants organiques, tels que les hydrocarbures (Guigue et al., 2011; Mille et al., 2007), les pesticides (Moreno-González et al., 2013; Sánchez-Avila et al., 2012; Syakti et al., 2012), les alkylphénols (Robert-Peillard et al., 2015; Zoller, 2006) et les métaux lourds (El-Serehy et al., 2012; Lopes-Rocha et al., 2017), qui ont été retrouvés en mer Méditerranée (eau ou sédiments) et également dans des organismes aquatiques, tels que les moules et les huîtres (Maurice, 1996).

Il manque encore de nombreuses données pour un examen plus approfondi de la pollution de la mer Méditerranée, puisqu'aucune valeur de concentration en mer n'a été trouvée pour 10 composés sur les 43 étudiés. De plus, la majorité des données provenaient principalement des eaux marines au large de l'Espagne, de la France, de l'Italie et de la Grèce. De plus, des améliorations sont encore nécessaires, notamment en ce qui concerne la sensibilité des méthodes analytiques et la représentativité des données, grâce à des techniques innovantes d'échantillonnage passif, dans le but d'établir des politiques environnementales robustes et d'améliorer la qualité des milieux, afin de préserver la biodiversité (Daumalin et Laffont-Schwob, 2016).

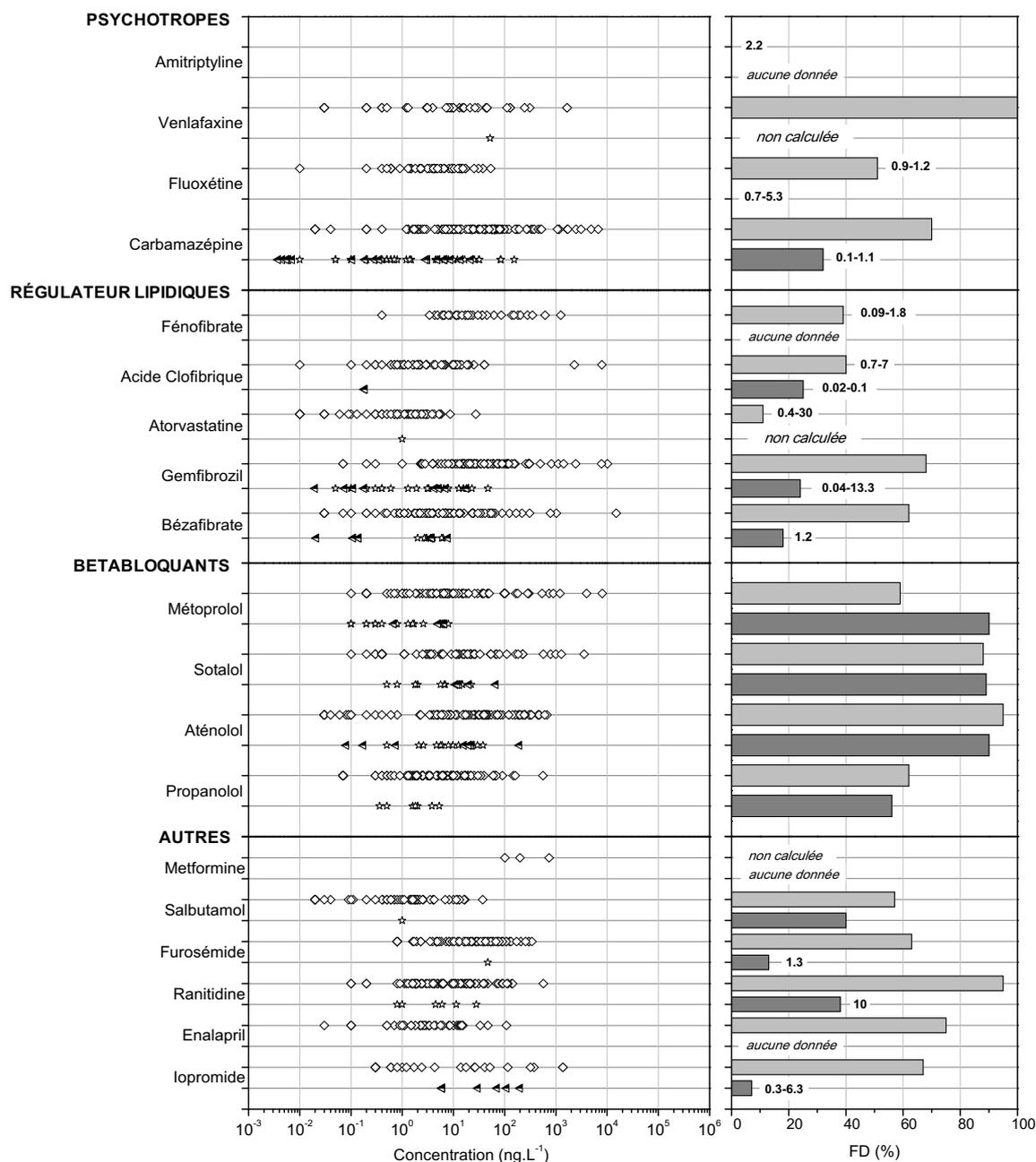


Figure 1-6 : Concentrations en ng.L^{-1} des régulateurs de lipides, psychotropes, bêtabloquants et autres en rivières (◇) et dans la mer Méditerranée (☆) dans la phase dissoute et dans la phase dissoute et particulaire (◁) des pays méditerranéens (Espagne, France, Italie, Grèce, Turquie, Israël, Liban, Tunisie, Algérie, Croatie, Palestine) et fréquence de détection en entrée (gris clair) et sortie (gris foncé) de STEU selon 67 articles scientifiques de 2002 à 2018. Les étiquettes de données sur le graphique à barres représentent les limites de détection des méthodes en ng.L^{-1} lorsqu'un composé est détecté en dessous de 50 %.

2. Impact des PP sur les organismes aquatiques

La présence avérée des PP dans différents milieux aquatiques et leurs rejets continus pourraient avoir des effets néfastes sur l'environnement et sur les organismes aquatiques, comme l'a révélé par exemple l'observation de la féminisation des poissons sous l'influence d'hormones féminines au début des années 2000. Il convient donc d'étudier leurs effets sur différents organismes, afin de faire ressortir la dangerosité de certains PP. Différents bioessais permettant d'évaluer l'écotoxicité aiguë ou chronique sont disponibles.

2.1 Ecotoxicité aiguë et chronique

Les essais biologiques d'écotoxicité aiguë étudient l'exposition de courte durée, en général de quelques heures à quelques jours selon la durée de vie de l'organisme (soit 15 min à 96 h). Les concentrations des polluants chimiques pour lesquelles on observe un effet chez les organismes aquatiques sont souvent peu réalistes et bien supérieures aux teneurs retrouvées dans les milieux aquatiques (supérieures à 1 mg.L⁻¹). Ces tests sont donc généralement utilisés en cas de pollution accidentelle où les micropolluants sont détectés à de fortes concentrations. L'écotoxicité aiguë peut être exprimée par 4 concentrations seuils en polluant pour lesquelles on constate un effet sur un pourcentage des individus testés, EC₅₀, EC₁₀, IC₅₀ et LC₅₀ (Ramade, 2007) :

- L'EC₅₀ (ou CE₅₀) est la concentration effective pour laquelle la molécule aura un impact sur la croissance ou la reproduction de 50 % des organismes étudiés. C'est le premier critère d'écotoxicité aiguë et le plus mesuré.
- L'EC₁₀ (ou CE₁₀) est le même critère que l'EC₅₀ mais induit 10 % d'effet sur un organisme. Cette valeur est plus rarement donnée dans les publications.
- L'IC₅₀ (ou CI₅₀) est une mesure de 50 % d'inhibition d'une fonction chez un organisme par un polluant. Par exemple une inhibition de luminescence d'une bactérie ou une inhibition de mobilité chez un crustacé. Cette donnée est très souvent confondue avec l'EC₅₀.
- La LC₅₀ (ou CL₅₀) est la concentration létale en polluant pour laquelle la mort de 50 % des individus est observée.

L'écotoxicité chronique est mesurée par une exposition prolongée (au moins 1/10 de la durée de vie de l'organisme) à des concentrations, en général, plus faibles qu'en test aigu et pour une exposition à un ou plusieurs composés simultanément ou en mélange. Cependant, bien que plus représentatifs, ces essais biologiques chroniques sont moins utilisés pour des raisons pratiques, puisqu'ils exigent un

suivi des organismes sur une durée plus longue. Deux critères permettent d'exprimer l'écotoxicité chronique d'un polluant : NOEC et LOEC (Ramade, 2007) :

- La NOEC (No Observed Effect Concentration ou CSEO, Concentration Sans Effet Observable) représente la plus forte concentration d'un polluant pour laquelle aucun effet n'est observé sur les individus étudiés. Ce critère constitue souvent le point de départ des réglementations environnementales (European Commission, 2011).
- La LOEC (Lowest Observed Effect Concentration ou CMEC, Concentration Minimale avec Effet Observé) est la plus faible concentration testée qui entraîne une différence significative par rapport au contrôle.

Dans le cas des algues unicellulaires, le temps d'exposition dans les tests standardisés (72 ou 96 h) correspond à une durée permettant le développement de plusieurs générations. Par conséquent, ces tests sont considérés comme de l'écotoxicité chronique. Cependant, presque toutes les publications mesurent des EC₅₀ sur l'inhibition de croissance des algues. Dans ce contexte le test des algues peut être considéré comme un test d'écotoxicité aiguë. Il en est de même pour les expériences sur les lentilles d'eaux. Les EC₅₀ obtenues en mesurant l'inhibition de leur croissance peut donc être considérée comme un test d'écotoxicité aiguë.

2.2 Construction de la base de données de valeurs d'écotoxicologie des produits pharmaceutiques sur les organismes aquatiques

Pour l'état de l'art sur l'écotoxicité des PP dans les milieux aquatiques, les publications ont été sélectionnées à partir des bases de données de recherche scientifique précédemment citées (cf 1.2). Les mots « pharmaceuticals » ainsi que chaque classe de produits pharmaceutiques indépendamment (« antibiotics », « lipid regulator », ...) ont été croisés avec « ecotoxicology » et chaque espèce utilisée dans des essais biologiques standardisés. De plus, quand aucun article ou un nombre restreint d'articles ont été trouvés pour un composé donné, une recherche supplémentaire a été effectuée en utilisant son nom spécifique.

Les études comprises dans la base de données d'écotoxicité devaient répondre aux quatre critères suivants : (1) test sur une molécule isolément (pas de mélange), (2) appliquant au moins un des bioessais normalisés listés dans les tableaux 1-3 et 1-4, (3) étudiant les effets comme la mortalité ou l'altération fonctionnelle (reproduction, croissance, bioluminescence ou mobilité) ou même les effets perturbateurs chez les poissons (ponte, parade nuptiale, proportion des sexes, fécondité), (4) exprimant leurs résultats en EC₁₀, IC₁₀, LC₅₀, EC₅₀, IC₅₀, LOEC ou NOEC. Ainsi, les effets délétères au niveau moléculaire ou génotoxique ont été écartés en raison de leur grande diversité et de leur

hétérogénéité, bien qu'ils puissent potentiellement permettre de mettre en évidence des effets à des concentrations plus faibles. Ces filtres ont été appliqués pour permettre la comparaison des valeurs écotoxicologiques obtenues pour un composé, et entre les composés ainsi que pour rapporter les impacts de chaque produit à différents niveaux trophiques, afin de définir une PNEC (Predicted No Effect Concentration ou CPSE pour Concentration Prédite Sans Effet).

Tableau 1-3 : Inventaire des bioessais normalisés pour évaluer l'impact écotoxicologique aigu d'une substance sur les écosystèmes aquatiques.

	Espèces	Normes	Date	Durée d'exposition	Critère
Crustacés	<i>Daphnia magna</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i>	OCDE 202	1984	24 h	Mobilité
		ISO 6341:1989	1989 - 1996 - 1998 - 2012	24 - 48 h	Mobilité
		EPA Test Method 1002.0	2002	24 - 48 - 72 - 96 h	Mortalité
	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	ISO 14380:2011	2011	24 h	Mortalité
Rotifères	<i>Brachionus calyciflorus</i>	ASTM E1440 - 91(2012)	1998 - 2004 - 2012	24 h	Mortalité
		ISO 19827:2016	2016	24 h	Mortalité
Poissons	<i>Brachydanio rerio</i> <i>Oryzias latipes</i> <i>Poecilia reticulata</i> <i>Pimephales promelas</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i>	ISO 7346-1:1996	1984 - 1996	24 - 48 - 72 - 96 h	Mortalité
		ISO 7346-2:1996	1984 - 1996	24 - 48 - 72 - 96 h	Mortalité
		ISO 7346-3:1996	1984 - 1996	24 - 48 - 72 - 96 h	Mortalité
		ISO 15088:2007	2007	48 h	Mortalité
		OCDE 236	2013	24 - 48 - 72 - 96 h	Mortalité
		OCED 210	2013	24 - 48 - 72 - 96 h	Mortalité
Bactéries	<i>Vibrio fischeri</i>	ISO 11348-1:2007	1998 - 2007	5 - 15 - 30 min	Inhibition de luminescence
		ISO 11348-2:2007	1998 - 2007	5 - 15 - 30 min	Inhibition de luminescence
		ISO 11348-3:2007	1998 - 2007	5 - 15 - 30 min	Inhibition de luminescence

Ainsi, 98 publications de revues scientifiques internationales indexées, publiées entre 1993 et 2018, ont été utilisées pour appréhender l'impact des PP. L'évaluation de l'écotoxicité de ces PP repose sur un total de 691 valeurs obtenues à différents niveaux trophiques par des essais biologiques d'écotoxicité aiguë ou chronique, soit 356 EC₅₀, 101 LC₅₀, 22 IC₅₀, 5 IC₁₀ et 7 EC₁₀ pour l'écotoxicité aiguë d'une part et 110 NOEC et 90 LOEC, pour l'écotoxicité chronique. Ces chiffres montrent comme évoqué plus haut, que les tests d'écotoxicité aiguë sont bien plus souvent appliqués que les tests d'exposition chroniques.

Tableau 1-4 : Inventaire des bioessais normalisés pour évaluer l'impact écotoxicologique chronique d'une substance sur les écosystèmes aquatiques.

Espèces	Normes	Date	Durée d'exposition	Critère	
Crustacés	<i>Daphnia magna</i> <i>Ceriodaphnia dubia</i>	OCDE 202	1984 - 1998	7 - 14 j	Reproduction
		ISO 10706:2000	2000	7 - 14 j	Reproduction
		EPA Test Method 1002.0		7 j	Reproduction
		ISO 20665:2008	2008	7 j	Reproduction
	<i>Hyalella azteca</i>	ISO 16303:2013	2013	14 - 28 j	Inhibition de la croissance
Rotifères	<i>Brachionus calyciflorus</i>	AFNOR T90-377 (2000b)	2000	48 h	Reproduction
		ISO 20666:2008	2008	48 h	Inhibition de la croissance
Algues et Cyanobactéries	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (syn. <i>Selenastrum capricornutum</i>) <i>Desmodesmus subspicatus</i> (syn. <i>Scenedesmus subspicatus</i>) <i>Synechococcus leopoldensis</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Aphanizomenon flosaquae</i>	OCDE 201	1984 - 2002	Jusqu'à 96 h	Inhibition de la croissance
		ISO 8692:2012	2004-2012	Jusqu'à 96 h	Inhibition de la croissance
Lentilles d'eau	<i>Lemna gibba</i> <i>Lemna minor</i>	OCDE 221	2002	7 j	Inhibition de la croissance
		ISO 20079:2005	2005	7 j	Inhibition de la croissance
Poissons	<i>Brachydanio rerio</i> <i>Oryzias latipes</i> <i>Poecilia reticulata</i> <i>Pimephales promelas</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i>	OCDE 299	2012	21 j	Reproduction
		ISO 10229:1994	1994		Taux de croissance
Bactéries	<i>Pseudomonas putida</i>	ISO 10712:1995	1995	40 j	Inhibition de la croissance
Escargots	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	OCDE 242	2016	28 j	Reproduction

La PNEC est la concentration d'une substance dans tout environnement pour laquelle des effets indésirables ne se produiront probablement pas pendant une exposition à court ou long terme. Les PNEC sont généralement calculées en divisant les concentrations obtenues grâce aux tests écotoxicologiques (EC₅₀, NOEC, LOEC) par un facteur de correction. Ainsi, la PNEC d'un composé peut être calculée en utilisant l'EC₅₀ obtenue pour l'espèce la plus sensible de 3 niveaux trophiques (écotoxicité aiguë) divisée par le facteur de correction de 1000 donné dans le tableau 1-5 (TGD, 2003). Lorsque les données pour trois niveaux trophiques différents n'étaient pas disponibles, la NOEC ou, si elle manquait, la LOEC/2 des espèces les plus sensibles a été considérée et le facteur de correction le plus pertinent a été appliqué en suivant les indications du tableau 1-5.

Tableau 1-5 : Facteurs correctifs utilisés pour calculer les PNEC de chaque composé

Données disponibles	Facteurs de correction
Valeur d'écotoxicité aigue pour 3 niveaux trophiques (LC ₅₀ ou EC ₅₀)	1000
Valeur d'écotoxicité chronique pour 1 niveau trophique (EC ₁₀ , NOEC ou LOEC/2)	100
Valeur d'écotoxicité chronique pour 2 niveaux trophiques (EC ₁₀ , NOEC ou LOEC/2)	50
Valeur d'écotoxicité chronique pour 3 niveaux trophiques (EC ₁₀ , NOEC ou LOEC/2)	10

Afin de répondre à la question du risque potentiel dû aux produits pharmaceutiques dans la mer Méditerranée, la méthode générale consiste ainsi à mesurer l'impact de ces substances sur des organismes aquatiques. Actuellement, une large gamme d'essais écotoxicologiques standardisés est disponible (tableaux 1-3 et 1-4). Si la disponibilité de tests à différents niveaux trophiques peut aider à fournir une évaluation précise et globale de l'écotoxicité d'un composé, il ne faut cependant pas négliger que la multiplicité des tests complique la comparaison des données. De plus, suite aux mises à jour et à l'adaptation des méthodes standardisées, les valeurs écotoxicologiques publiées en utilisant différentes versions d'un même bioessai peuvent conduire à des divergences de résultats et *in fine* à des interprétations erronées.

2.3 Ecotoxicités aiguës et chroniques des 43 produits pharmaceutiques étudiés sur divers organismes aquatiques appartenant à différents niveaux trophiques

Pour fixer rigoureusement les priorités en matière d'amélioration de la qualité de l'eau, il apparaît nécessaire de comparer les valeurs écotoxicologiques d'un produit pharmaceutique donné aux valeurs écotoxicologiques d'autres produits. Cependant, pour être comparés, les résultats d'un bioessai donné doivent être effectués avec les mêmes organismes modèle, les mêmes descripteurs et en appliquant strictement le même protocole expérimental. Par cette démarche, il est possible de proposer une typologie des effets écotoxicologiques des produits pharmaceutiques et de fournir ensuite une base pour les classer en fonction du danger potentiel pour les écosystèmes. Une telle typologie peut être utile pour suggérer une priorisation en matière de gestion des effluents en fonction du type de produits pharmaceutiques.

2.3.1 Valeurs d'écotoxicologie aiguë et chronique des 43 PP

Une synthèse de l'écotoxicité des PP est présentée dans la figure 1-7 pour l'écotoxicité aiguë (partie gauche) et l'écotoxicité chronique (partie droite). La PNEC calculée sur la base de ces

concentrations écotoxiques est donnée dans la partie droite de la figure 1-7 et toutes les références sont présentées en annexe 3.

Les valeurs d'écotoxicité aiguë couvrent une gamme de concentrations allant de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ à $7\,000 \text{ mg.L}^{-1}$, alors que les valeurs d'écotoxicité chronique couvrent une gamme plus large de concentrations de 1 ng.L^{-1} à 100 mg.L^{-1} . Cela met en évidence des niveaux d'impacts très étendus en fonction du produit pharmaceutique testé et de l'organisme modèle utilisé. Selon les valeurs d'écotoxicité aiguë, les classes pharmaceutiques peuvent être grossièrement hiérarchisées en définissant les antibiotiques comme la classe la plus dangereuse, suivis par les psychotropes tandis que les autres classes ont des valeurs d'écotoxicités aiguës à peu près identiques et plus faibles. Le même classement peut être fait pour les valeurs d'écotoxicité chronique mais à des niveaux de concentration inférieurs et en ajoutant également une toxicité avérée pour certaines hormones. Il faut toutefois noter que pour des expositions aiguës comme chroniques, les données publiées souffrent de manque concernant la toxicité des hormones, des composés cardiovasculaires et des bronchodilatateurs.

Les faibles valeurs de PNEC obtenues pour les antibiotiques (environ 10 ng.L^{-1}) et, dans une moindre mesure, pour les hormones (de l'ordre de quelques pg.L^{-1} à centaines de ng.L^{-1}) suggèrent un risque potentiellement élevé de ces derniers composés pour les écosystèmes. Pour les autres classes, les valeurs plus élevées de la PNEC (allant de 1 à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$) indiquent un danger potentiellement plus faible pour les espèces aquatiques.

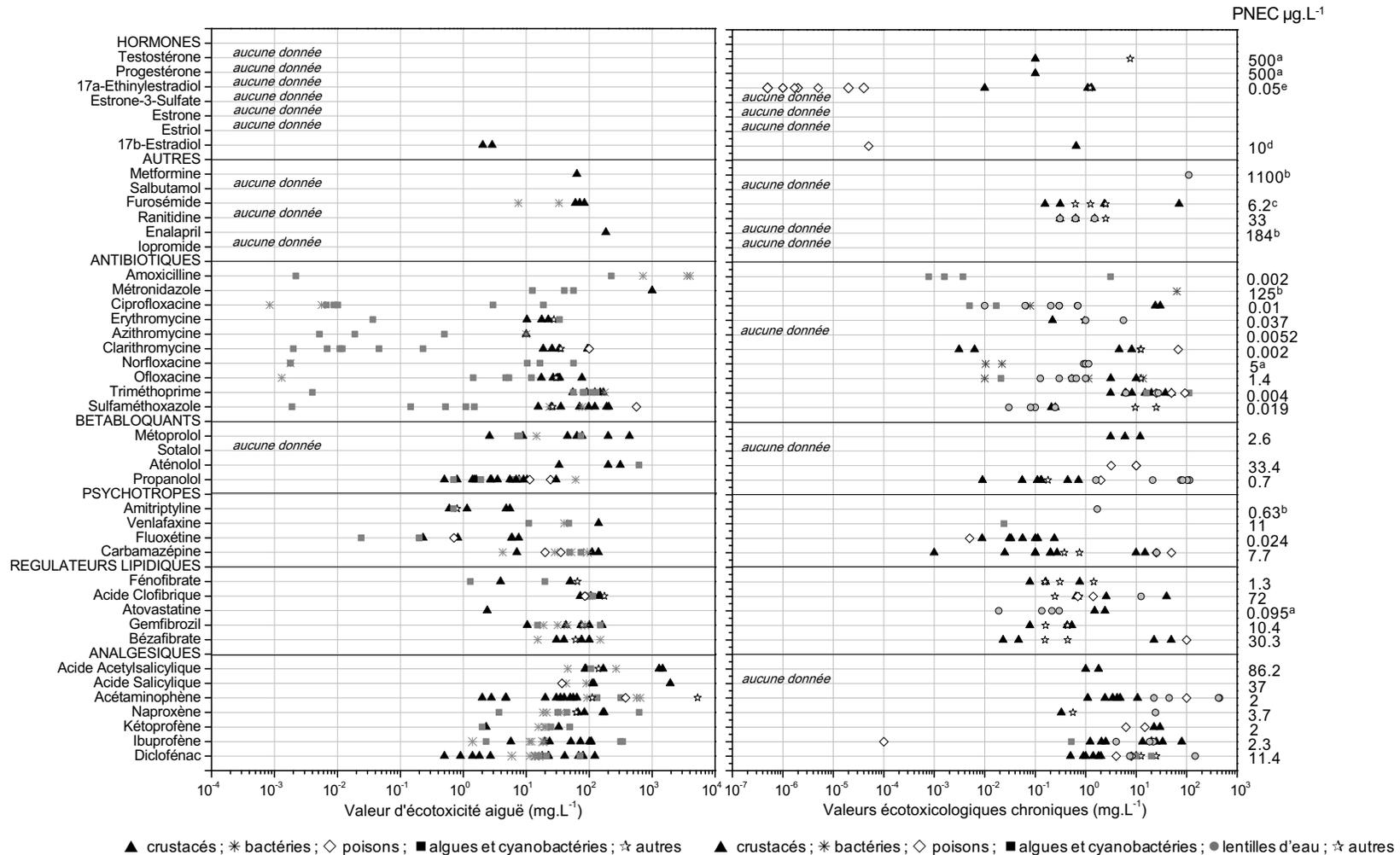


Figure 1-7 : Valeurs écotoxicologiques obtenues pour une exposition aiguë (gauche) (EC_{10} , EC_{50} , IC_{10} , IC_{50} , LC_{50}) et chronique (droite) (NOEC, LOEC) groupées par niveau trophique (crustacés, bactéries, poissons, algues et cyanobactéries, lentilles d'eau et autres), des 43 produits pharmaceutiques issus de 98 articles scientifiques entre 1993 à 2018 et leur PNEC associée

(a : LOEC a un niveau trophique chronique (NOEC= LOEC/2 et PNEC : NOEC/100); b : EC_{50} sur un seul niveau trophique (PNEC : $EC_{50}/100$); c : NOEC sur deux niveaux trophiques chroniques (PNEC : NOEC/50); d : LC_{50} sur un niveau trophique chronique (PNEC : $LC_{50}/100$); e : NOEC sur trois niveaux trophiques chroniques (PNEC : NOEC/10)). Toutes les références sont citées en annexe 3.

2.3.2 Sensibilité des espèces aquatiques modèles pour évaluer l'écotoxicité des produits pharmaceutiques

Toutes les données collectées ont permis de montrer la répartition des tests les plus utilisés pour mesurer l'écotoxicité des produits pharmaceutiques sur les organismes aquatiques. La figure 1-8 représente les niveaux trophiques et les organismes les plus étudiés. Trois niveaux trophiques sont principalement représentés : les crustacés comme taxon majeur (41 %), dont l'organisme le plus étudié est *Daphnia magna* (28 %), les algues (18 %) dont l'espèce *Pseudokirchneriella subcapitata* est la plus souvent étudiée (13 %) et les bactéries (12 %) où l'espèce la plus répandue est *Vibrio fischeri* (12 %).

Ces pourcentages s'expliquent parce que ce sont les essais biologiques les plus faciles et rapides à mettre en œuvre. Dans le cas spécifique de l'évaluation de l'écotoxicité des hormones, 2 niveaux trophiques sont principalement représentés comme le montre la figure 1-9 : les poissons (58 %) en majorité représentés par le poisson zèbre *Danio rerio* (29 %) et les crustacés (21 %) représentés encore une fois par l'espèce *Daphnia magna* (8 %). Ces observations permettent de confirmer que les tests d'écotoxicité aigue sont les plus utilisés à part pour les hormones.

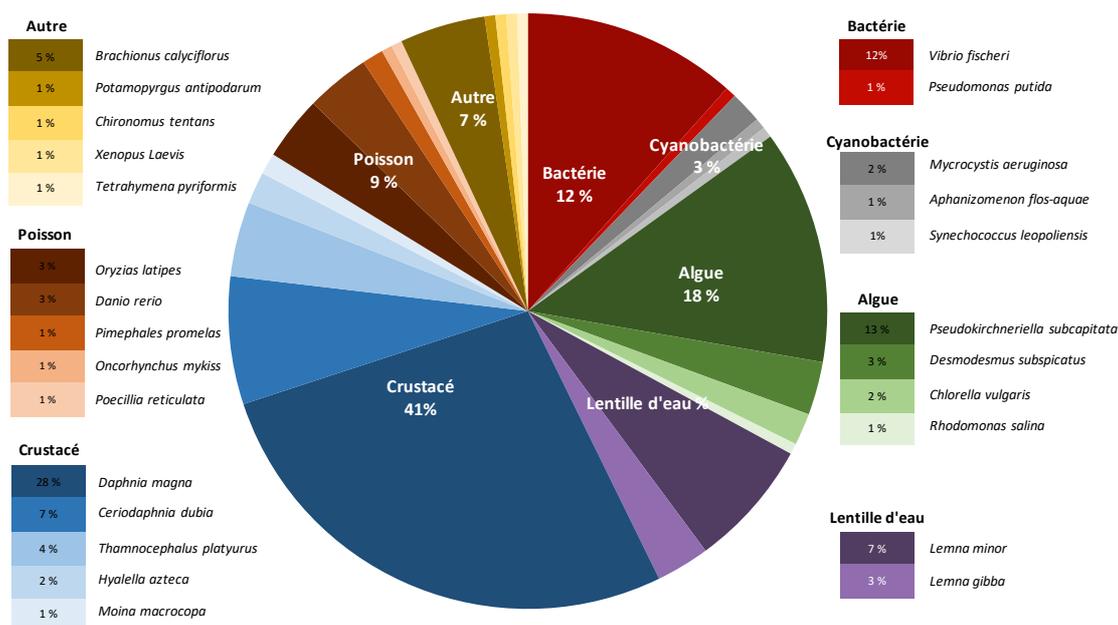


Figure 1-8 : Pourcentage de chaque niveau trophique et organisme étudié issus des 80 articles scientifiques (1993-2018) traitant de l'écotoxicité des produits pharmaceutiques. Niveaux trophiques et organismes étudiés dans la littérature pour mesurer l'écotoxicité des produits pharmaceutiques (hors hormones)

Cependant, malgré ces informations, il n'est pas facile de se faire une idée de l'impact à long terme des produits pharmaceutiques sur la biocénose aquatique puisque 27 espèces sont utilisées

pour représenter au total 9 niveaux trophiques. En outre, 60 % des articles de notre analyse bibliométrique n'utilisent qu'un seul bioessai, 16 % évaluent l'écotoxicité sur deux organismes et seulement 23 % avec trois organismes ou plus, *Daphnia magna* étant l'organisme le plus largement utilisé. De plus, pour effectuer une analyse de risque, il est recommandé d'évaluer l'impact écotoxicologique de la substance étudiée sur au moins trois niveaux trophiques. Un faible impact écotoxicologique d'une molécule (soit un effet observé pour un niveau de concentration élevé) sur un organisme modèle n'est ni une garantie de non-impact ni même une indication de l'impact de cette molécule sur un autre organisme modèle vivant dans le même écosystème.

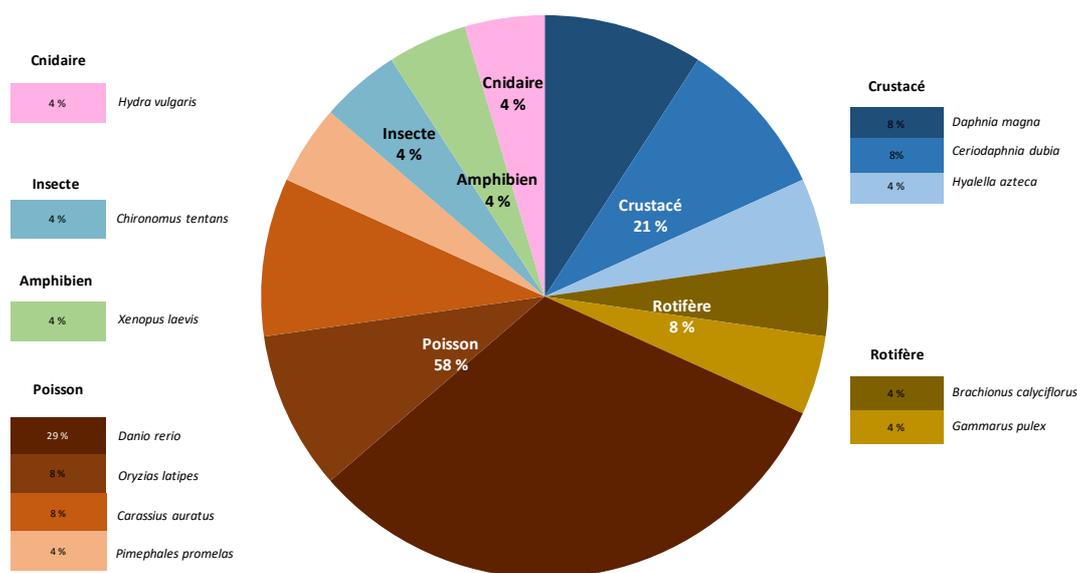


Figure 1-9 : Pourcentage de chaque niveau trophique et organisme étudié issus des 18 articles scientifiques (1993-2018) traitant de l'écotoxicité des hormones

Pour chaque classe de produits pharmaceutiques, les espèces les plus sensibles pour l'exposition aiguë ou chronique ont été étudiées afin d'identifier les organismes les plus pertinents.

Les crustacés semblent être l'espèce la plus sensible pour 4 analgésiques et anti-inflammatoires sur les 7 étudiés. L'ibuprofène et le naproxène ont respectivement la plus faible NOEC (0,1 µg.L⁻¹) (Han et al., 2010) et EC₅₀ (0,33 mg.L⁻¹) (Isidori et al., 2005) mesurées, et sont donc les composés les plus dangereux de cette classe. D'une manière générale, les effets écotoxicologiques sur les poissons sont peu étudiés pour cette classe pharmaceutique, ce qui confirme les travaux de Fent et al. (2006) et montre qu'il n'y a pas eu d'évolution à ce sujet depuis 2006. Dans le cas des régulateurs lipidiques, l'organisme *Ceriodaphnia magna* est aussi le plus vulnérable, et l'atorvastatine se montre être le composé le plus dangereux pour la lentille d'eau *Lemna gibba* avec une LOEC de 0,019 mg.L⁻¹ (Brain et al., 2006). La fluoxétine et la carbamazépine semblent être les substances pharmaceutiques

les plus toxiques de la classe des psychotropes, avec respectivement une NOEC de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sur le poisson *Oryzias latipes* (Foran et al., 2004) et un EC_{50} de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sur *Daphnia magna* (Rivetti et al., 2016). Cette classe de produits pharmaceutiques apparaît comme la plus dangereuse, avec des valeurs d'écotoxicité majoritairement inférieures à 1,7 mg.L^{-1} .

Comme indiqué précédemment par Fent et al. (2006), la toxicité des bêtabloquants n'est pas étudiée de manière homogène avec, par exemple, une seule étude pour le sotalol contre un grand nombre pour le propranolol. Ce dernier est un des composés pharmaceutiques le plus largement étudié sûrement en raison de sa forte toxicité avérée (NOEC = 9 $\mu\text{g.L}^{-1}$), en particulier sur les crustacés (Ferrari et al., 2004).

Les résultats obtenus en mesurant la croissance des algues ont montré la grande sensibilité de ces organismes en particulier aux antibiotiques à faible dose. Notamment la NOEC de la clarithromycine a été mesurée à 3,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Yamashita et al., 2006) et pour l'amoxicilline à 0,78 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Andreozzi et al., 2004). Pour certains composés, on note également un manque de valeurs écotoxicologiques dans la littérature scientifique notamment pour l'iopromide, le salbutamol, métformin et l'énalapril.

Enfin, dans la classe des hormones, les œstrogènes peuvent altérer plusieurs fonctions physiologiques chez les poissons, telles que la détermination du sexe. Le 17β -estradiol et le 17α -éthynylestradiol sont les plus toxiques des 4 hormones testées, avec une NOEC inférieure à 29,3 ng.L^{-1} sur le poisson *Oryzias latipes* (Kang et al., 2002) et une NOEC de 0,5 ng.L^{-1} sur le poisson *Danio rerio* (Nash et al., 2004). Cependant, un manque de données d'écotoxicité pour les progestatifs et les androgènes est à déplorer et il serait nécessaire de le combler.

2.4 Point de vue critique sur les valeurs écotoxicologiques de la banque de données

2.4.1 Limites des tests écotoxicologiques standardisés

Aujourd'hui de nombreux articles de recherche ou de synthèse mesurant ou estimant l'écotoxicité permettent de dresser des listes de priorisation concernant les micropolluants organiques et plus particulièrement les produits pharmaceutiques (Escher et al., 2011; Fent et al., 2006; Halling-Sørensen et al., 1998; Orias et Perrodin, 2013). Pourtant, une comparaison entre chaque donnée écotoxicologique est pratiquement impossible. Les réglementations sont nombreuses et différentes pour un même organisme (OCDE, US EPA, ISO, AFNOR) conduisant à une grande disparité des résultats. Dans certains cas, où la même norme a été appliquée, les résultats diffèrent d'un facteur 10 par

exemple pour l'espèce *Daphnia magna* en suivant les lignes directrices de l'OCDE, l' EC_{50} de l'acide salicylique varie de 118 mg.L⁻¹ (Henschel et al., 1997) à 1945 mg.L⁻¹ (Marques et al., 2004) ou encore pour la carbamazépine la NOEC sur les algues varie de de 0,5 mg.L⁻¹ (Harada et al., 2008) à plus de 100 mg.L⁻¹ (Ferrari et al., 2004, 2003). Cette différence peut venir d'une application non stricte de la norme à cause de contraintes qui ne sont pas toujours faciles à respecter, notamment en travaillant sur des organismes ayant un stade de vie plus avancé que celui répertorié dans la norme. De plus, avec l'augmentation des connaissances sur l'écotoxicité, les tests standardisés sont régulièrement mis à jour ou optimisés, entraînant parfois la coexistence de plus de deux versions pour un même bioessai et provoquant ainsi une certaine confusion (tableaux 1-3 et 1-4). Par exemple, pour les algues, les tests standardisés ont été mis à jour 3 fois depuis la première formalisation en 1989 jusqu'en 2012 pour la norme ISO 8692, et deux fois entre 1984 et 2002, pour la norme OCDE 201. Par conséquent, cette divergence des résultats peut conduire à une difficulté à évaluer de façon reproductible l'écotoxicité de certains produits chimiques. Il existe aussi des incohérences entre les tests d'écotoxicité aiguë et chronique. Cela s'explique par le fait que les mêmes critères d'évaluation sont utilisés dans les deux essais, en particulier l' EC_{50} . Ce problème conduit à des interprétations peu claires et ne permet pas toujours des comparaisons entre les espèces.

En général, la mise en œuvre de tests biologiques normalisés implique l'utilisation d'au moins un solvant, par exemple le DMSO (diméthylsulfoxyde) ou l'éthanol. Ce solvant permet une meilleure dissolution des polluants et permet d'exposer les organismes à de plus fortes concentrations. Cependant, même si des contrôles sont réalisés avec le même niveau de DMSO, cette expérience n'est pas représentative des conditions environnementales où le DMSO n'est pas présent. De plus, dans certains cas, des espèces comme les algues ou les lentilles d'eau sont désinfectées en surface avec de l'éthanol (Pomati et al., 2004) afin d'éviter diverses contaminations. Bien que cette technique évite la prolifération d'espèces indésirables, elle peut induire un stress sur ces plantes avant l'exposition aux polluants, qui n'est jamais évalué.

Enfin, les résultats écotoxicologiques peuvent être influencés par des eaux artificielles représentatives des eaux de STEU (généralement appelées "moderately hard water" et "reconstituted hard water" dans la littérature) à la place d'eau ultrapure (US EPA 2002 et US EPA 1991). L'intérêt de ces approches est de montrer les effets synergiques possibles lorsqu'un organisme est en contact avec les composés d'intérêt dans une matrice réelle incluant d'autres pollutions potentielles. Cependant, ces extensions par rapport à la norme ne sont pas toujours mentionnées, et cela génère des incohérences visibles dans les résultats obtenus. Certains chercheurs font également des « modifications mineures » de la méthode standard et appliquent un test sans détailler clairement les changements opérés dans la partie matériels et méthodes. De plus, Hernando et al. (2004) ont testé

l'écotoxicité de produits pharmaceutiques dans différentes matrices telles que des milieux de culture ou des échantillons d'eaux usées. Les résultats ont montré que dans les eaux usées, la toxicité est augmentée par rapport au milieu de culture. L'approche qui consiste à utiliser une eau reconstituée semble être la plus réaliste par rapport aux conditions environnementales.

2.4.2 Écotoxicité de mélanges et de produits de dégradation

Les effets des mélanges de polluants sont encore mal illustrés et peu compris même si la plupart des écotoxicologues ont souligné la pertinence de ces recherches pour évaluer le risque environnemental. Actuellement, la mise en place d'essais écotoxicologiques devient plus représentative des conditions environnementales avec des études croisées de mélanges de polluants. Dans les articles sélectionnés pour cet état de l'art, l'évaluation des molécules isolées avait été ciblée pour permettre une hiérarchisation des résultats obtenus sachant cependant que cela ne pouvait pas représenter les conditions environnementales avec une exposition à un polluant à des concentrations souvent largement supérieures (mg.L^{-1}) à celles de l'environnement (ng.L^{-1} et $\mu\text{g.L}^{-1}$). Cleuvers (2005, 2003) a montré que les mélanges d'anti-inflammatoires et bêtabloquants sont vraiment plus toxiques avec des effets synergiques notables en comparaison aux effets mesurés pour un polluant seul et des études ont décrit que le concept d'addition de concentration était le meilleur moyen de prédire la toxicité d'un mélange pour des composés ayant le même mode d'action (Backhaus et al., 2000; Quinn et al., 2008; Watanabe et al., 2016). Par exemple, un mélange de 10 quinolones, ne provoquant que 1 % d'effet sur *Vibrio fischeri* lorsqu'elles sont seules, conduit à plus de 50 % d'effet lorsqu'elles sont en mélange. En revanche, Christensen et al. (2006) a montré que les mélanges 2 à 2 d'antibiotiques pouvaient avoir un effet antagoniste (érythromycine et flumequine), synergique (oxytétracycline et érythromycine) et / ou additif (florfenicol et érythromycine) sur l'algue *Pseudokirchnerella subcapitata*. Láng et Kőhidai (2012) ont étudié la toxicité de mélanges binaires sur des cnidaires (*Tétrahymena pyriformis*) et ont montré que les interactions antagonistes étaient les principales (59 %) suivies d'effets additifs (37 %) et enfin synergique (4 %) mais que ces interactions dépendaient des concentrations testées. Par exemple, le mélange ibuprofène / métoprolol, en faibles concentrations (0,5 à 0,75 unité toxique (TU)) montre des effets additifs alors qu'en plus forte concentration (1,5 à 2 TU) des effets antagonistes sont observés.

Certaines études mettent aussi en lumière l'écotoxicité des produits de transformation des PP. Par exemple, Isidori et al. (2009) ont étudié 2 photoproduits de la ranitidine et ont montré que les EC_{50} étaient plus faibles pour ces 2 produits sur les rotifères et crustacés que la molécule mère. Les produits de transformation montrent un effet jusqu'à 200 fois plus important que la ranitidine seule. De même,

un produit de phototransformation du furosémide a été étudié et montre une écotoxicité 4 fois plus importante que le composé parent sur l'espèce *Daphnia dubia* (Isidori et al., 2006). Toutefois il faut à nouveau souligner la sensibilité des espèces et l'importance de prendre en compte plusieurs tests d'écotoxicité avant d'affirmer que les produits de transformation peuvent être plus toxiques. En effet, l'écotoxicité de composés appartenant à la classe des régulateurs lipidiques a été étudiée (bézafibrate, fénofibrate et gemfibrozil) ainsi que leurs produits de transformation. Il s'avère que selon les espèces les produits de transformation sont plus ou moins toxiques que le composé parent. Par exemple, un sous-produit du gemfibrozil possède un EC_{50} 5 fois plus grande que le gemfibrozil sur l'espèce *P. subcapitata* mais 1,2 fois plus faible sur l'espèce *B. calyciflorus*. On peut toutefois noter que les 2 produits de transformation du bézafibrate étudiés dans cet article sont moins toxiques que le composé parent pour les 3 tests écotoxicologiques réalisés (*P. subcapitata*, *B. calyciflorus* et *C. dubia*) (Isidori et al., 2007). L'acridine et l'acridone, identifiés comme produits de dégradation de la carbamazépine se sont avérés avoir une écotoxicité plus grande que la carbamazépine sur *V. fischeri*, *P. subcapitata*, et *D. magna*. De plus l'acridine est également plus toxique que l'acridone (Donner et al., 2013).

2.5 Composés pertinents et évaluation du risque dans le bassin méditerranéen

Les concentrations en produits pharmaceutiques dans le bassin méditerranéen ont été croisées avec les données écotoxicologiques rassemblées, afin d'évaluer le risque au niveau du bassin méditerranéen et de faire ressortir les composés qui méritent une attention plus particulière dans cette zone géographique. Le quotient de danger (Hazard Quotient en anglais, HQ) a été calculé dans ce but en prenant en compte toutes les concentrations relevées dans chaque compartiment du bassin pour chaque composé. Selon l'U.S. EPA (2009), le HQ est défini comme étant le rapport entre la concentration environnementale mesurée (MEC) du composé et la concentration prédite à laquelle aucun effet indésirable n'est attendu (PNEC). Le but du HQ est donc de déterminer quelles substances sont les plus dangereuses pour l'écosystème du bassin méditerranéen. Plus la valeur du HQ est élevée, plus le danger est grand pour l'organisme testé. Ainsi, trois classes de danger ont été définies. Si le HQ est inférieur à 0,1, aucun effet indésirable n'est attendu mais des effets indésirables potentiels doivent être pris en compte, si $0,1 < HQ \leq 1$, le danger est faible, mais les effets indésirables doivent être pris en compte ; et si $1,0 < HQ \leq 10$, un effet indésirable ou un danger modéré est probable. Enfin, si HQ est supérieur à 10, un danger élevé est à prévoir (U.S. EPA 1989e). Les valeurs calculées de HQ, sont dépendantes des concentrations mesurées, et ont été représentées par des boîtes à moustaches, afin de représenter au mieux la forte variation entre les valeurs (figure 1-10), pour les 43 PP sélectionnés à

l'exception de l'estriol, de l'estrone, de l'estrone-3-sulfate, de l'iopromide, du sotalol et du salbutamol (les données écotoxicologiques n'étant pas disponibles).

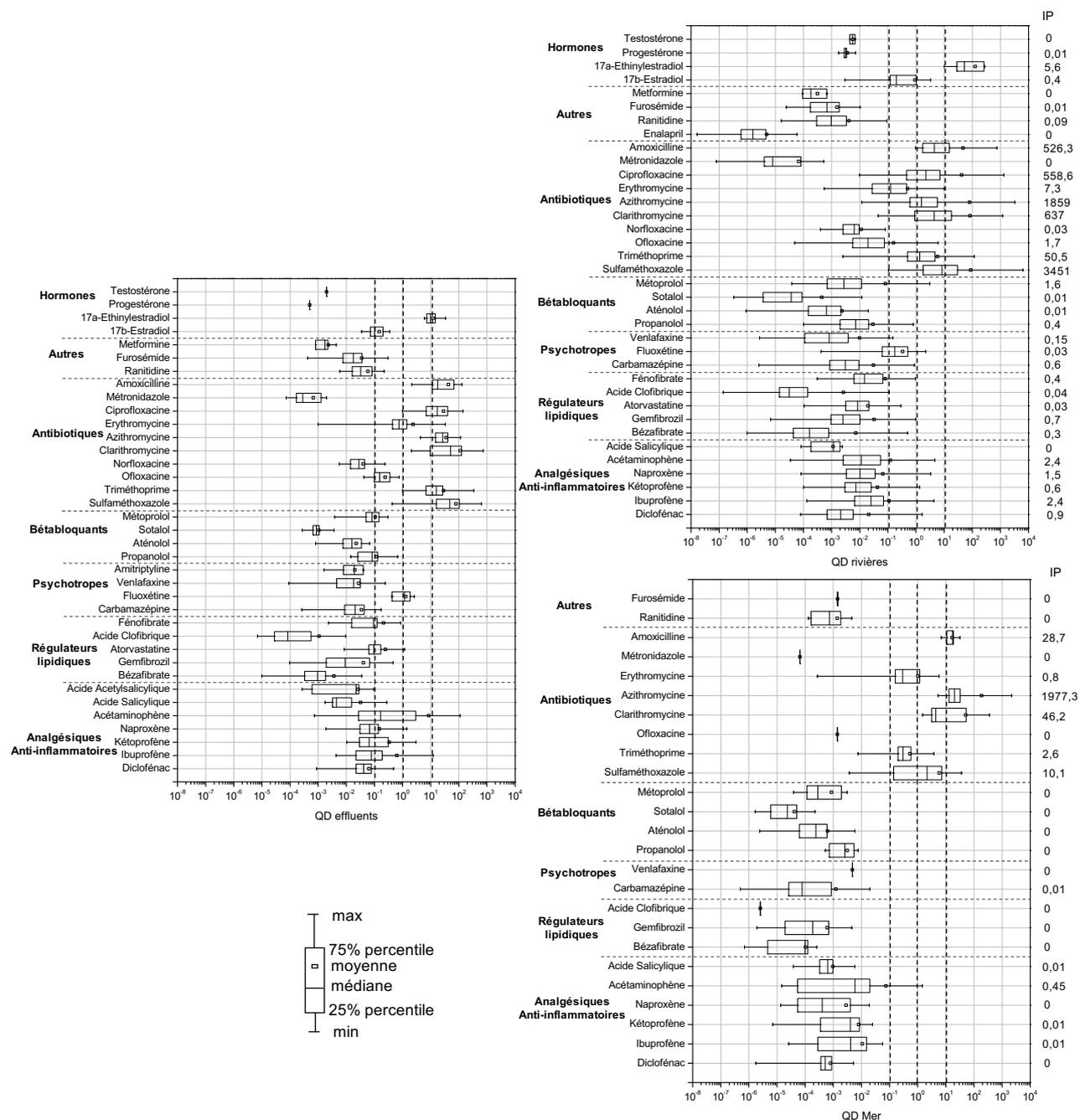


Figure 1-10 : Boites à moustaches représentant les Quotients de Danger (QD ou HQ) et les Indices de Priorisation (IP) dans les effluents de STEU, les rivières et la mer pour 25 à 37 produits pharmaceutiques.

De plus, pour mettre en évidence les produits pharmaceutiques les plus préoccupants dans le bassin versant méditerranéen et classer les substances les plus dangereuses, un indice de priorisation (IP) a été calculé pour les eaux naturelles (rivières et mer). L'IP correspond au HQ le plus élevé d'un composé

dans un compartiment (correspondant à la MEC la plus élevée) multiplié par la fréquence de détection du composé dans le compartiment étudié. Les IP sont reportés sur la partie droite de la figure 1-10.

2.5.1 *Danger potentiel représenté par les effluents de STEU*

Six antibiotiques (amoxicilline, ciprofloxacine, azithromycine, clarithromycine, triméthoprim, sulfaméthoxazole) et une hormone (17α -éthinyloestradiol) apparaissent comme étant les produits pharmaceutiques les plus dangereux, représentant un risque élevé ($HQ > 10$) dans 75 % des échantillons des STEU méditerranéennes. En comparaison, la ciprofloxacine, la clarithromycine et le sulfaméthoxazole se sont révélés être les substances les plus dangereuses également dans les STEU asiatiques (Ashfaq et al., 2017, Liu et al., 2017). De plus, le sulfaméthoxazole et le triméthoprim ont été identifiés comme des produits pharmaceutiques potentiellement dangereux au Mexique (Amérique du Sud) (Rivera-Jaimes et al., 2018). Dans une zone proche de la mer Méditerranée (effluents espagnols près du golfe de Cadix et affluents de l'océan Atlantique), l'ofloxacine était le seul antibiotique posant un risque élevé (Biel-Maeso et al., 2018). Dans une moindre mesure, l'érythromycine et la fluoxétine ($1 < HQ < 10$ dans 50 % des échantillons de STEU) présentent un risque modéré et plusieurs analgésiques (acétaminophène, naproxène, kétoprofène et ibuprofène) ainsi que l'atorvastatine pourraient causer des effets indésirables potentiels ($0,1 < HQ < 1$ dans 50 % des échantillons de STEU). L'acétaminophène, le naproxène, l'ibuprofène et le diclofénac comptaient parmi les substances les plus dangereuses mises en évidence au Pakistan (Ashfaq et al., 2017).

2.5.2 *Danger potentiel en rivières et mer et priorisation des PP*

Les mêmes six antibiotiques que dans les effluents de STEU peuvent également représenter un risque modéré pour les organismes non ciblés de l'écosystème méditerranéen dans 50 à plus de 75 % des échantillons de rivière. Plus surprenant, le 17α -éthinyloestradiol présente un risque élevé dans 100 % des échantillons. L'érythromycine, la fluoxétine et le 17β -estradiol peuvent générer des effets indésirables potentiels dans 50 à 75 % des échantillons prélevés dans les rivières. Dans l'eau de mer, l'amoxicilline, l'azithromycine, la clarithromycine représentent un risque élevé et le triméthoprim, le sulfaméthoxazole et l'érythromycine peuvent causer certains effets indésirables. Le triméthoprim, l'érythromycine, la clarithromycine, la ciprofloxacine et le sulfaméthoxazole se sont également avérés problématiques dans les eaux douces en Chine et en Amérique du Sud (Rivera-Jaimes et al., 2018; Z. Wang et al., 2017; Wu et al., 2014; Zhang et al., 2018). Dans une revue internationale, Godoy et al. (2015) ont démontré que les bêtabloquants, en particulier l'aténolol et le propranolol, peuvent induire un danger modéré à élevé aussi bien dans les eaux douces que dans l'eau de mer. A l'opposé, dans les

bassins versants méditerranéens, cette classe de produits pharmaceutiques ne présente apparemment aucun risque.

À un autre niveau, le risque que les produits pharmaceutiques peuvent poser pour les espèces aquatiques est non seulement directement lié à la toxicité des substances dissoutes, mais aussi à une possible bioaccumulation par la chaîne trophique (Ruhí et al., 2016; Zenker et al., 2014). C'est un autre facteur important à approfondir et à prendre en compte dans l'évaluation des risques environnementaux dus aux produits pharmaceutiques.

L'indice de priorisation qui a été élaboré à la suite prend en compte MEC, PNEC et FD. Cet indice permet de lisser l'impact des composés à haut HQ mais rarement détectés. Inversement, il permet d'inclure des composés ayant un faible HQ mais une FD élevée. Treize produits pharmaceutiques, sur les 43 étudiés, avec un IP > 1 peuvent être signalés dans les eaux du bassin méditerranéen : 17 α -éthynylestradiol, amoxicilline, ciprofloxacine, érythromycine, azithromycine, clarithromycine, ofloxacine, triméthoprime, sulfaméthoxazole, métoprolol, acétaminophène, naproxène et ibuprofène. En plus des antibiotiques et des hormones, certains analgésiques et anti-inflammatoires ainsi que des bêtabloquants doivent être inclus dans cette liste de priorisation, et ont également été signalés comme dangereux dans d'autres parties du monde (Godoy et al., 2015; Mutiyar et al., 2018). Il convient de souligner que quatre de ces substances (17 α -éthynylestradiol, érythromycine, azithromycine, clarithromycine) ont récemment été ajoutées à la liste de surveillance de la communauté européenne dans le domaine des politiques de l'eau (EU, 2015).

3. Devenir des produits pharmaceutiques dans les milieux aquatiques

L'élimination partielle de nombreux produits pharmaceutiques dans les STEU implique donc le rejet de ces derniers, et la présence aussi de leurs métabolites biologiques et autres produits de transformation, dans les milieux récepteurs. Les composés organiques sont ainsi soumis à différents phénomènes d'atténuation naturelle, décrits dans les paragraphes suivants en prenant soin de les définir, d'expliquer leurs origines et de les illustrer par des exemples issus de la littérature scientifique traitant des produits pharmaceutiques.

3.1 Les phénomènes d'atténuation naturelle

L'atténuation naturelle est définie par l'ASTM (American Society for Testing and Materials) comme la « réduction de la masse ou de la concentration d'un composé dans les eaux souterraines au cours du temps ou à distance de la source de contamination par des processus physiques, chimiques

et biologiques naturels comme la biodégradation, la dispersion, la dilution, l'adsorption et la volatilisation ». Nous réserverons une partie plus détaillée à l'atténuation naturelle liée aux processus photochimiques, puisque ces travaux de thèse s'y sont plus particulièrement intéressés, et qu'ils représentent l'ensemble des transformations liés à l'exposition à la lumière solaire.

3.1.1 *Le phénomène de dilution*

Ce phénomène est le premier pouvant se produire après le rejet des composés organiques (produits non transformés, métabolites, produits de transformation) en sortie de STEU. En effet, les teneurs en ces composés diminuent de la source vers le milieu récepteur, puis du milieu récepteur vers un milieu marin ouvert. Cette dilution est plus ou moins importante selon le débit des cours d'eau, ce dernier étant fonction des saisons (crues, étiages).

3.1.2 *Le phénomène d'adsorption*

Le second phénomène est l'adsorption sur les particules en suspension dans les milieux. L'adsorption physique ou physisorption repose sur la capacité des surfaces solides à fixer certaines molécules de manière réversible, par des liaisons de type Van der Waals (liaisons de type électrostatique de faible intensité, avec des énergies d'interaction entre 5 et 40 kJ.mol⁻¹). Cette propriété est liée à la structure du solide où subsistent, en surface, des forces non équilibrées par suite des dissymétries dans la répartition des atomes : la formation d'une couche de molécules adsorbées compense en partie ce déséquilibre.

Le phénomène d'adsorption de composés organiques a été particulièrement étudié en STEU sur les boues (Ternes et al., 2004a), cependant, dans le milieu naturel, certains composés sont aussi susceptibles de s'adsorber sur les sédiments ou sur la phase particulaire. Le paramètre principal exprimant le potentiel de rétention d'une substance sur la matière organique du sol notamment est le coefficient K_{oc} (tableau 1-6) sans dimension ou exprimé en L.kg⁻¹, qui est le coefficient de partage carbone organique/eau, et qui donne une indication sur l'aptitude de la molécule à être adsorbée ou désorbée de la matière organique. Selon le ministère de l'Agriculture, une valeur de K_{oc} supérieure à 500 ($\log k_{oc} > 2,7$) signifie que le composé étudié est fortement adsorbé sur les sols ou la matière organique alors qu'une valeur de K_{oc} inférieure à 100 ($\log K_{oc} < 2,0$) signifie que le composé est mobile dans les sols (Tissier et al., 2005). Un autre paramètre jouant sur l'adsorption d'un composé sur les particules solides (sols, sédiments, matières en suspension) est le coefficient de partage octanol-eau (k_{ow}) (tableau 1-6). Il renseigne sur la capacité d'un composé à se partager entre l'octanol (qui

représente le caractère lipophile) et l'eau (caractère hydrophile). Si le $\log K_{ow}$ est supérieur ou égal à 3, le composé est susceptible d'être bioaccumulé et il est dit liposoluble (Tissier et al., 2005).

D'après les valeurs de $\log K_{ow}$ des PP présentées dans le tableau 1-6, il est raisonnable de penser que l'adsorption de composés appartenant à certaines classes thérapeutiques est non négligeable. C'est notamment le cas pour les hormones, les antidépresseurs, les hypolipémiants voire pour une grande majorité des anti-inflammatoires. Pour les autres classes thérapeutiques, l'adsorption relève davantage du composé lui-même avec néanmoins, la classe des antibiotiques pour laquelle l'adsorption devrait être relativement faible. Les valeurs de $\log K_{oc}$ quant à elles indiquent une forte adsorption des psychotropes et des hormones sur la matière organique présente dans les sols et sédiments, tandis que certains antibiotiques et anti-inflammatoires seront majoritairement mobiles.

Concernant la phase particulaire, les études sont plus rares notamment à cause de la faible teneur en matière en suspension dans les eaux, avec des teneurs comprises entre 2,1 et 70,5 mg.L^{-1} pour les eaux les plus chargées. Ainsi, les travaux menés par Togola (2006) montrent une faible présence de composés pharmaceutiques dans cette phase avec des concentrations inférieures à 22 ng.g^{-1} pour le naproxène, doxépine, imipramine, diclofénac, kétoprofène et salbutamol par exemple. A l'inverse, la concentration en carbamazépine et aspirine dans les particules s'est révélée assez importante (respectivement < 6 - 771 ng.g^{-1} et < 6 - 357 ng.g^{-1}) contrairement aux concentrations mesurées dans les sédiments (respectivement < 12 - 24 ng.g^{-1} et < 8 - 62 ng.g^{-1}). Toutefois étant donné la faible teneur en particules, ces concentrations ramenées en ng.L^{-1} sont négligeables (< 1,3 ng.L^{-1}) par rapport à la teneur en phase dissoute. Le kétoprofène, le diclofénac et le gemfibrozil comptent parmi les composés pharmaceutiques les moins polaires ($\log K_{ow} = 3,1 ; 4,5$ et $4,1$), ce qui peut justifier leur présence dans la phase particulaire. A l'inverse l'aspirine, avec un $\log K_{ow}$ de 1,19, est fortement polaire, et ne devrait pas être retrouvée dans les phases solides. Cependant, au-delà des caractères lipophiles et apolaires, d'autres phénomènes, comme des interactions électrostatiques, tels que l'échange de cations, le pontage cationique sur les surfaces d'argile, la complexation de surface et les liaisons hydrogène (Tolls, 2001), peuvent entrer en jeu dans les mécanismes d'adsorption.

Tableau 1-6 : Propriétés physico-chimiques de certains produits pharmaceutiques

Famille	Molécules	Log K _{ow}	Log K _{oc}	Pka	Solubilité eau mg.L ⁻¹ à 25°C	H à 25°C* Atm.m ³ .mol ⁻¹
Antibiotiques	Clarithromycine	3,2	2,2	9,0	0,34	1,7 × 10 ⁻²⁹
	Erythromycine	3,1	2,8	8,9	1,44	5,4 × 10 ⁻²⁹
	Azithromycine	4,0	3,5	8,7	7,1	5,3 × 10 ⁻²⁹
	Norfloxacine	-1,0	1,3	6,3 - 8,8	1,7 × 10 ⁵	8,7 × 10 ⁻¹⁹
	Ofloxacine	-0,4	1,1	6,0 - 8	2,8 × 10 ⁴	5,0 × 10 ⁻²⁰
	Sulfaméthoxazole	0,9	2,4	5,7	610	6,4 × 10 ⁻¹³
	Triméthoprime	0,9	2,9	7,1	400	2,4 × 10 ⁻¹⁴
	Ciprofloxacine	0,3	1,0	6,1	3,0 × 10 ⁴	5,1 × 10 ⁻¹⁹
	Tétracycline	-1,3	1,6	3,3	231	4,7 × 10 ⁻²⁴
	Oxytétracycline	-0,9	1,9	3,27	313	1,7 × 10 ⁻²⁵
Antidépresseurs	Carbamazépine	2,5	3,1	13,9	17,7	1,1 × 10 ⁻¹⁰
	Amitriptyline	4,9	5,3	9,4	9,71	6,9 × 10 ⁻⁸
	Fluoxétine	4,1	5,0	10,5	60,3	8,9 × 10 ⁻⁸
	Venlafaxine	3,3	2,9	8,9 - 14,4	230	2,9 × 10 ⁻¹¹
	Diazépam	2,8	3,9	3,4	50	3,6 × 10 ⁻⁹
Anti-inflammatoires	Paracétamol	0,5	1,7	9,4	1,40 × 10 ⁴	6,4 × 10 ⁻¹³
	Kétoprofène	3,1	2,6	4,5	51	2,1 × 10 ⁻¹¹
	Diclofénac	4,5	2,7	4,1	2,37	4,7 × 10 ⁻¹²
	Naproxène	3,2	2,5	4,2	15,9	3,4 × 10 ⁻¹⁰
	Acide acétylsalicylique	1,2	1	3,5	4600	1,3 × 10 ⁻⁹
	Acide salicylique	2,3	1,3	3,0	2240	7,3 × 10 ⁻⁹
	Ibuprofène	4,0	2,6	4,9	21	1,5 × 10 ⁻⁷
Bêtabloquants	Métoprolol	1,9	2,1	9,7	1,7 × 10 ⁴	1,4 × 10 ⁻¹³
	Propranolol	3,5	3,2	9,4	61,7	8,0 × 10 ⁻¹³
	Aténolol	0,2	1,8	9,6	1,3 × 10 ⁴	1,4 × 10 ⁻¹⁸
	Sotalol	0,2	1,8		5510	2,5 × 10 ⁻¹⁴
Bronchodilatateurs	Salbutamol	0,6	1,5	5,9	1,43 × 10 ⁴	6,4 × 10 ⁻¹⁶
Benzodiazépines	Oxazépam	2,2	2,8	1,7 - 11,3	179	5,53 × 10 ⁻¹⁰
Diurétiques	Furosémide	2,0	2,0	3,9 - 4,2	73,1	3,94 × 10 ⁻¹⁶
Produits de contraste	Iopromide	-2,1	1	2,2 - 4,2	23,8	1,00 × 10 ⁻²⁸
Cardiovasculaires	Enalapril	2,5	2,5	3,5 - 5,2	1,64 × 10 ⁴	3,5 × 10 ⁻¹⁶
Antihistamines	Ranitidine	0,3	3,8	8,1	2,47 × 10 ⁴	3,42 × 10 ⁻¹⁵
Anti-diabétiques	Metformin	-2,6	1,4	12,3	1,4 × 10 ³	7,6 × 10 ⁻¹⁶
Hypolipémiants	Bezafibrate	4,3	2,6	3,6	1,55	2,2 × 10 ⁻¹⁵
	Atorvastatin	6,4	4,5	-2,7 - 4,3	0,63	2,4 × 10 ⁻²³
	Gemfibrozil	4,8	2,6	4,8	27,8	1,2 × 10 ⁻⁸
	Acide clofibrrique	2,6	1,6	2,84	583	2,2 × 10 ⁻⁸
Hormones	17β-estradiol	3,3	4,2	10,4	23,4	3,5 × 10 ⁻⁹
	Estriol	2,5	3,1		441	1,33 × 10 ⁻¹²
	Estrone	3,1	4,4		30	3,80 × 10 ⁻¹⁰
	Estrone-3-sulfate	4,01	4,1		960	2,0 × 10 ⁻¹²
	17α-éthinyloestradiol	3,7	4,7	10,4	11,3	7,94 × 10 ⁻¹²
	Progestérone	3,9	4,0	Aucun	8,8	6,49 × 10 ⁻⁸
	Testostérone	3,3	3,4	17,4	23,4	3,53 × 10 ⁻⁹

* Constante de Henry

Références : ChemIDplus 2014; DrugBank; Pal et al. (2010) ; EPI suite

3.1.3 *Le phénomène de volatilisation*

La volatilisation des micropolluants par un transfert de la phase aqueuse vers la phase gazeuse peut également se produire. La propriété intrinsèque à considérer est la constante de Henry (H). Cette valeur tient compte de la tension de vapeur saturante du composé et de sa solubilité dans l'eau. Les constantes de Henry supérieures à 10^{-5} atm.m³.mol⁻¹ permettent de prévoir une volatilisation de la substance à partir des rivières (Tissier et al., 2005). En dessous de 3×10^{-7} atm.m³.mol⁻¹, la substance est essentiellement non volatile. Comme le montre le tableau 1-6, les constantes de Henry des produits pharmaceutiques sont très faibles puisqu'elles sont inférieures à 10^{-8} atm.m³.mol⁻¹. L'acide clofibrique, la fluoxétine, l'amitriptyline et la progestérone sont les composés avec les constantes les plus élevées (de l'ordre de 10^{-8} atm.m³.mol⁻¹) alors que l'érythromycine, la clarithromycine et l'azithromycine ont, quant à elles, les plus faibles constantes de Henry (10^{-29} atm.m³.mol⁻¹)

De ce fait, il est logique de penser que la probabilité pour que les composés pharmaceutiques se volatilisent et se retrouvent dans la phase atmosphérique est faible, si ce n'est peut-être en étant adsorbés sur des particules solides subissant une érosion éolienne.

3.1.4 *Le phénomène de biodégradation*

La biodégradabilité d'une substance est une propriété intrinsèque d'une substance mais elle dépend aussi de la présence ou pas de microflore de biodégradation compétentes dans le milieu considéré. La biodégradation est une suite de réactions enzymatiques qui simplifie progressivement la structure de la molécule. On distingue la biodégradation en aérobie de celle en anaérobie par le taux d'oxygène, la nature des microorganismes dégradateurs et celle des produits de dégradation. La biodégradation en aérobiose entraîne une oxydation où le carbone organique est transformé en dioxyde de carbone tandis que la biodégradation en anaérobie produit en grande partie du méthane, du dioxyde de carbone et de l'eau. Il s'agit d'une réduction.

Au cours de la biodégradation, les composés pharmaceutiques peuvent être transformés de trois manières différentes : la minéralisation, la transformation hydrophobe ou hydrophile. Une minéralisation complète conduit à la formation de dioxyde de carbone, de méthane, d'eau, de dérivés minéraux ou de substances métabolisables par les micro-organismes. Si le médicament est transformé en un composé plus hydrophobe, il s'adsorbera potentiellement sur les matières en suspension, les sols et sédiments, tandis qu'il restera probablement dans l'eau s'il devient plus hydrophile.

Les micro-organismes bactériens sont les principaux acteurs de la biodégradation mais les enzymes isolées, les champignons et certains protozoaires peuvent également initier ce processus. Les

conditions de l'environnement doivent aussi permettre l'activité microbienne : une humidité dans les sols et sédiments supérieure à 20 % (en masse), un pH proche de la neutralité, un taux d'oxygène permettant l'aérobiose, et une température comprise entre 10 et 40°C. Dans le milieu naturel, les conditions sont en général aérobies dans les eaux de surface avec la présence d'oxygène dissous.

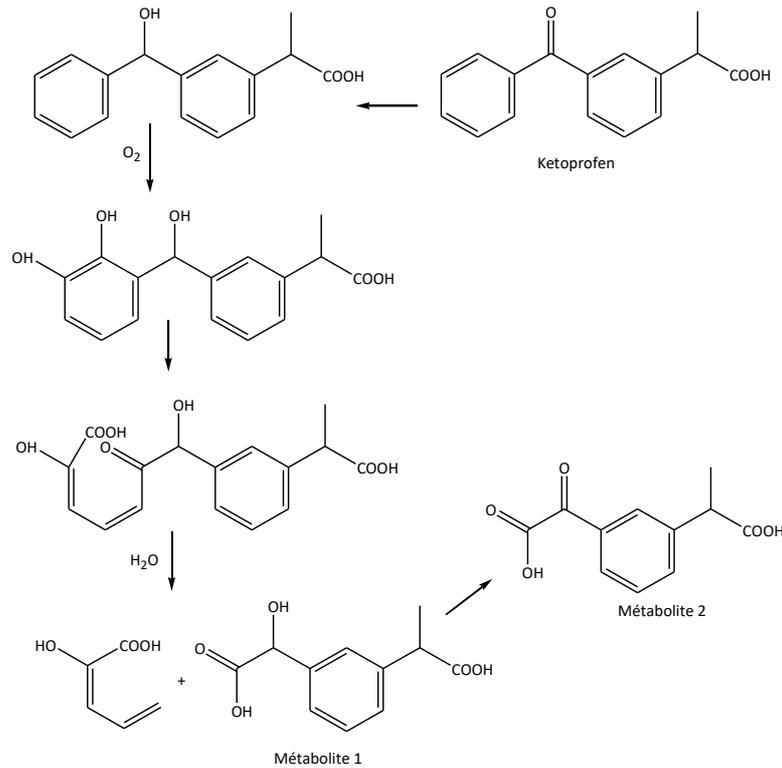


Figure 1-11 : Mécanisme de biodégradation aérobie du kétoprofen (Quintana et al., 2005)

Deux types de biodégradation peuvent se produire. La biodégradation directe, où le composé sert de substrat aux populations microbiennes. C'est par exemple le cas du kétoprofen dans les boues activées qui est partiellement minéralisé en tant que seule source de carbone et d'énergie (Quintana et al., 2005). La biodégradation du kétoprofen entraîne notamment la formation de deux métabolites (figure 1-11), identifiés en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, avec la présence de deux groupements carboxylates et d'une fonction hydroxyle dans leur structure chimique (métabolite 1 et 2).

Cependant, la biodégradation directe ne semble pas être la voie la plus efficace pour les composés pharmaceutiques. Le co-métabolisme en revanche apparaît l'être. Dans ce processus, les micro-organismes ont besoin d'une source primaire de substrat, et le polluant est considéré comme

un substrat secondaire. C'est par exemple le cas du bézafibrate, du naproxène et de l'ibuprofène dans un système de boues activées. La première étape de la dégradation microbienne du bézafibrate semble être la coupure hydrolytique de la liaison amide, générant ainsi l'acide 4-chlorobenzoïque lui aussi biodégradable. Dans le cas du naproxène, la coupure de la fonction éther (ou encore sa déméthylation) pour former le desméthylnaproxène est l'étape initiale de la dégradation microbienne (figure 1-12).

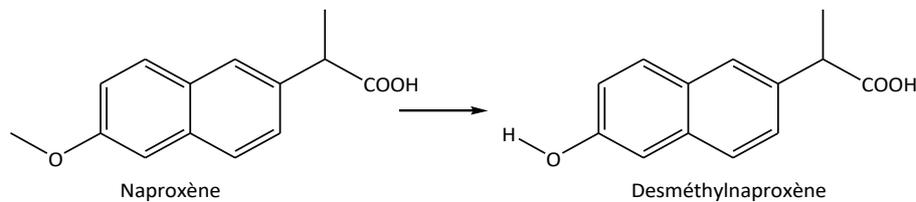


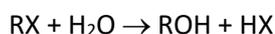
Figure 1-12 : Étape initiale de la dégradation microbienne du naproxène

Enfin, l'hydroxy-ibuprofène (métabolite majeur en conditions oxygènes), le carboxy-ibuprofène (métabolite majeur en conditions anoxiques) et l'acide carboxy-hydratropique (formé en conditions oxygènes et anoxiques) ont été détectés comme des intermédiaires dans la minéralisation de l'ibuprofène (Quintana et al., 2005; Zwiener et al., 2002).

Dans les eaux naturelles, Yamamoto et al. (2009) ont montré que les produits pharmaceutiques avaient une faible biodégradabilité dans les eaux douces avec des temps de demi-vie ($t_{1/2}$) supérieurs à 120 h pour l'aténolol, le propanolol, la carbamazépine et l'ibuprofène contrairement à l'acétaminophène dont la durée de vie s'est avérée plus courte ($t_{1/2} = 50$ h). De plus, une étude menée par Baena-Nogueras et al. (2017) a montré que l'origine et la composition de l'eau pouvaient avoir un impact significatif sur l'élimination des composés pharmaceutiques. Ainsi, la biodégradation de certains produits (dont la concentration initiale est égale à $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) semble plus importante dans des eaux marines après 28 jours que dans les eaux douces : l'acétaminophène (89 % contre 50 %), la sulfaméthoxazole (89 % contre 0 %) et le triméthoprime (100 % contre 0 %). À l'inverse, l'acide salicylique se dégrade plus rapidement dans une eau douce avec un temps de demi-vie de 4 h contre 116 h dans une eau salée. Ceci peut s'expliquer par la présence de microorganismes différents dans les milieux. Les composés les plus récalcitrants à la biodégradation, et ce quel que soit le type d'eau naturelle, sont : la carbamazépine, l'amitriptyline et le kétoprofène qui ne subissent aucune transformation, et le gemfibrozil avec une transformation partielle d'environ 14 %. Ils sont donc considérés comme étant des composés biorécalcitrants ou faiblement biodégradables.

3.1.5 Les réactions chimiques possibles : l'hydrolyse et les réactions d'oxydo-réduction

L'hydrolyse est la coupure d'une liaison covalente d'une espèce chimique RX par une molécule d'eau qui entraîne un échange du groupement X par une fonction OH selon la réaction :



Puisque l'eau est constamment présente dans l'environnement (atmosphère, sols, compartiments aqueux), les produits pharmaceutiques sont régulièrement en contact avec des molécules d'eau et des réactions d'hydrolyse peuvent avoir lieu.

Cependant, les substances ont plus ou moins d'aptitude à l'hydrolyse et parmi les groupes sensibles à l'hydrolyse, on trouve notamment les acétals (érythromycine), les imines (diazépam), les halogénures d'alkyle, les esters et les amides (acétaminophène, oxazépam) (Jiang et al., 2010; Papp, 2010; Waterman et al., 2002). L'hydrolyse de certains composés pharmaceutiques est très lente avec des constantes de vitesse (k) très faibles (par exemple, égales respectivement à 1×10^{-9} et $7,32 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ pour l'acétaminophène et l'aténolol (Wang et al., 2012)), rendant ce phénomène négligeable selon les durées d'exposition. A l'inverse, la constante de réaction élevée de l'érythromycine ($1,3 \text{ s}^{-1}$) fait de cette molécule un composé sensible à l'hydrolyse avec des voies de transformation dépendantes du pH. Dans des solutions plutôt acides (pH = 6,3), l'érythromycine se dégrade en éther d'énol, en érythromycine anhydre et en érythromycine 6,9-hémiacétal alors qu'à pH basique (pH = 7,8), elle se transforme en érythromycine dihydratée comme le montre la figure 1-13 (Atkins et al., 1986; Tsuji et Goetz, 1978) .

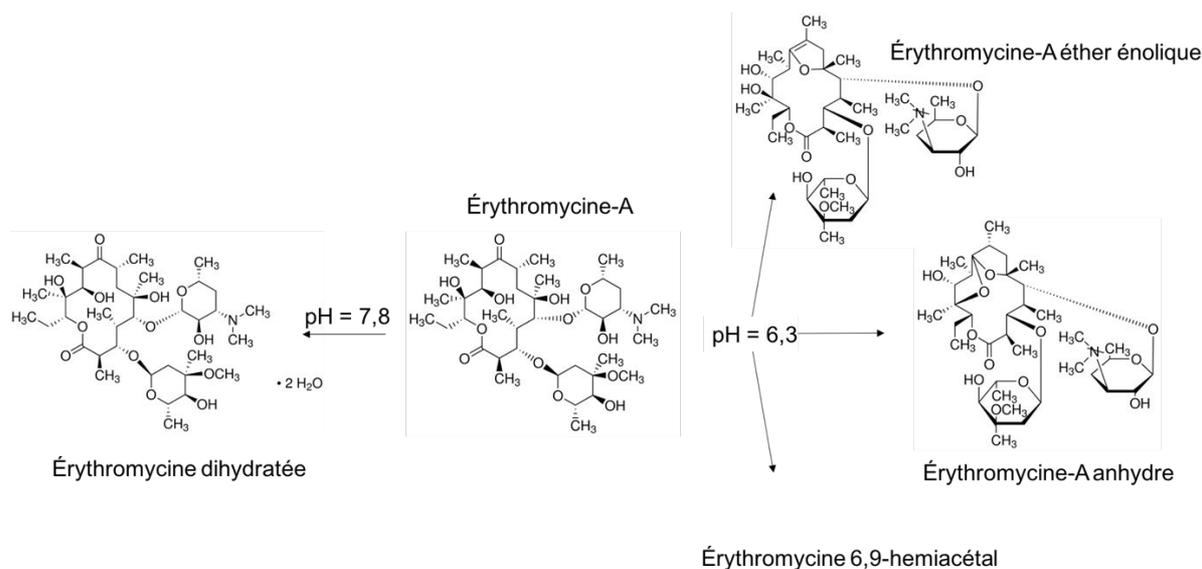


Figure 1-13 : Hydrolyse de l'érythromycine en condition acide ou basique d'après Atkins et al. (1986)

Certains antibiotiques (tétracycline, chlortétracycline, β -lactamine) sont peu stables dans l'eau (Halling-Sørensen, 2000 ; Jiang et al., 2010b). Les β -lactamines se dégradent partiellement dans des eaux naturelles stérilisées (entre 20 et 80 % de transformation) après 168 h à l'obscurité avec des constantes de vitesse comprises entre 0,032 à 0,28 j⁻¹.

A l'inverse, des études ont montré que d'autres PP étaient stables dans l'eau comme le diclofénac ou ceux appartenant à la classe des sulfonamides (sulphadiazine, sulfaméthoxazole) à plusieurs pH (acides et basiques). La stabilité du diclofénac a été démontrée sur 72 h dans une eau ultrapure et une eau douce reconstituée à deux pH différents (7 et 9). Cependant, il a été montré que ce composé peut précipiter à pH acide (pH < 4) (Agüera et al., 2005). Les sulfonamides quant à eux sont relativement stables quel que soit le pH. Toutefois un pH acide semble favoriser l'hydrolyse (Białk-Bielińska et al., 2012) car, dans ces conditions, les sulfonamides sont principalement présents sous forme cationique (Graafland et al., 1979). Les taux de dégradation restent tout de même faibles, avec moins de 15 % de la concentration initiale (1 mg.L⁻¹) dégradés à pH 4, à 20°C, en 30 jours, et des constantes de vitesse faibles et des temps de demi-vie élevés ($k = 0,0027 \text{ j}^{-1}$ et $t_{1/2} = 257$ jours pour la sulfadiméthoxine).

Des réactions d'oxydo-réduction peuvent également se produire, impliquant le transfert d'un électron (gain ou perte). Dans les eaux naturelles et les sédiments, le potentiel d'oxydo-réduction est directement lié à la quantité d'oxygène disponible. En effet, dans les environnements aérés (comme les eaux de surface ou la surface des sédiments), le potentiel d'oxydo-réduction est élevé puisque l'oxygène est disponible comme accepteur d'électron, alors qu'en conditions anoxiques, le potentiel redox est faible. C'est le cas notamment des eaux ou des sédiments profonds.

Plusieurs études se sont intéressées à la dégradation de certains composés dans des conditions aérobiques ou anaérobiques. Ainsi, des composés tels que le 17 β -estradiol (Ternes et al., 2004b), l'estrone (Ternes et al., 2004b), la phénazone (Greskowiak et al., 2006) et la tylosine (Ali et al., 2013; Kolz et al., 2005) sont plus facilement dégradables dans des conditions aérobiques avec par exemple une dégradation de la tylosine (20 mg.L⁻¹) de 90 % en 12 à 26 h contre 30 % à 120 h en condition anaérobiques. A l'inverse, des composés comme le 17 α -ethynilestradiol et la classe des sulfonamides seront dégradés dans des conditions réductrices et donc dépourvues d'oxygène (Holm et al., 1995; Ternes et al., 2004b).

3.1.6 Les réactions photochimiques

Dans l'environnement et en particulier dans les eaux naturelles de surface, les produits pharmaceutiques sont susceptibles de subir des dégradations photochimiques. Deux types de processus photochimiques sont observés : la photolyse directe qui se produit par absorption des rayonnements UV-visible par les molécules organiques et la photodégradation indirecte, qui est le processus de transformation initié par l'absorption des rayonnements UV-visible par des éléments chimiques présents dans le milieu comme la matière organique, les ions inorganiques ou encore les métaux, qui vont ensuite pouvoir réagir avec les molécules d'intérêt.

Comptes tenus des expériences réalisées au cours de cette thèse, les deux paragraphes suivants sont consacrés à la description de ces processus de phototransformation.

3.2 Les processus de phototransformation

3.2.1 La photolyse (phototransformation directe)

Pour qu'une molécule chimique se transforme par le biais d'un processus de photolyse, elle doit être capable d'absorber un ou plusieurs photons lumineux. Le diagramme de Perrin- Jablonski permet d'expliquer les états électroniques d'une molécule et les transitions entre ces états (figure 1- 14). Après absorption d'un photon de longueur d'onde (λ), il se produit un apport d'énergie (E), défini par la relation de Planck-Einstein, que les électrons absorbent. Cette relation est donnée ci-après : $E = h\nu = h\frac{c}{\lambda}$ où h est la constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J.s), ν est la fréquence de l'onde électromagnétique associée au photon en s^{-1} et c correspond à la célérité de la lumière dans le vide ($2,998 \times 10^8$ m.s $^{-1}$).

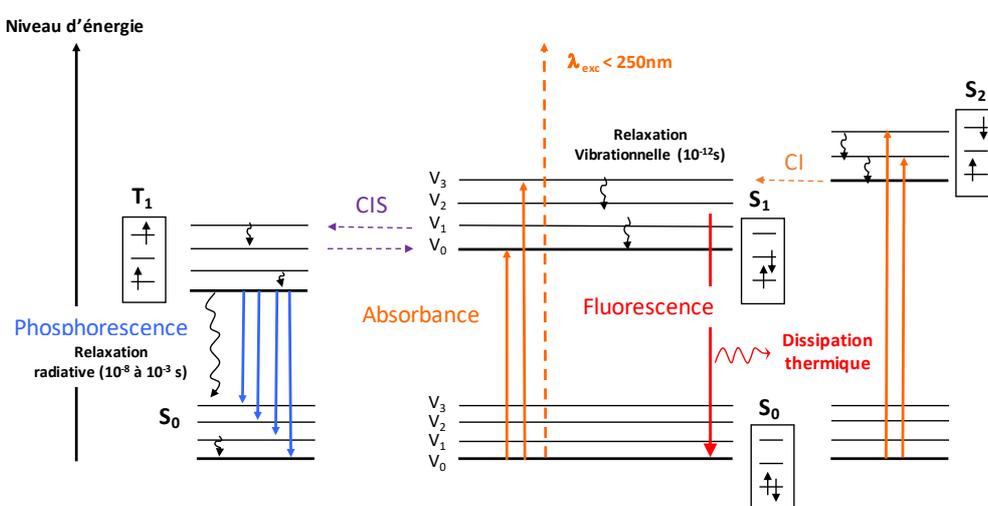


Figure 1-14 : Diagramme de Perrin-Jablonski
(CIS : conversion inter-système ; CI : conversion interne)

Ainsi, les électrons du niveau électronique fondamental S_0 accèdent à un niveau d'énergie plus élevée (S_1, S_2) et la molécule se trouve dans un état dit excité. Cette transition se fait sur un temps très court (10^{-17} à 10^{-15} s) et verticalement sur le diagramme car elle correspond à une transition sans modification de la distance internucléaire (règle de Franck Condon). Les niveaux d'énergie atteints étant, par nature, instables, la durée de vie d'un électron sur un tel niveau est de l'ordre de 10^{-15} s. Plusieurs processus peuvent avoir lieu à partir de cet état, parmi lesquels la relaxation vibrationnelle, la conversion interne, la fluorescence, la conversion inter-système ou encore la photolyse.

La relaxation vibrationnelle et la conversion interne : La relaxation vibrationnelle (RV) est un processus non radiatif entre les niveaux vibrationnels ($v = n$ vers $v = n-1$ ou vers $v = 0$) qui permet la dissipation d'une partie de l'énergie généralement sans changement de niveau électronique. Ce processus est très rapide, il prend place en 10^{-14} à 10^{-11} s. Cependant, si les niveaux d'énergie vibrationnels chevauchent les niveaux d'énergie électroniques, il peut y avoir RV d'un état électronique à un état électronique inférieur (de S_2 vers S_1). Ce processus s'appelle la conversion interne (CI). CI se produit sur la même échelle de temps que RV. Cependant, CI est très lente pour qu'un électron retourne à S_0 ce qui permet à d'autres processus de se produire.

La fluorescence ou la phosphorescence : Ces phénomènes correspondent au retour à l'état fondamental d'une molécule à un état électroniquement excité avec émission de photons à partir du niveau vibrationnel le plus bas ($v = 0$) (règle de Kasha). Ce phénomène est appelé la fluorescence lorsque la transition se fait à partir de S_1 (état excité singulet) et la phosphorescence quand la transition est issue de T_1 (état excité triplet). La longueur d'onde réémise par la molécule excitée peut être de même longueur d'onde (fluorescence de résonance) ou de longueur d'onde plus grande (appelé décalage de Stokes). La fluorescence est un processus un peu plus lent qui se produit en 10^{-9} à 10^{-7} s.

Le croisement inter-système : Le croisement inter-système (CIS) est le passage d'un état excité singulet à un état excité triplet (S_1 vers T_1). C'est le processus le plus lent (10^{-8} - 10^{-3} s). Ensuite, 2 voies permettent le retour à l'état électronique fondamental : la phosphorescence (T_1 vers S_0) et la fluorescence retardée. En effet, par une nouvelle CIS, les électrons peuvent peupler à nouveau S_1 , ce qui permet la transition émettrice S_1 vers S_0 .

La photolyse directe : L'absorption d'un rayonnement par un composé permet de l'exciter électroniquement et de conduire à sa dégradation d'une façon irréversible soit à partir de l'état excité singulet mais le plus souvent à partir de l'état excité triplet de plus grande durée de vie. Pour quantifier ce phénomène de transformation photochimique d'un composé organique, il est possible de s'appuyer sur la valeur du rendement quantique.

Le rendement quantique, $\phi(\lambda)$, a été défini comme étant le nombre de molécules du composé soumis au rayonnement, ayant donné lieu à une réaction photochimique par photon absorbé. Généralement, le rendement quantique est défini par l'équation ci-dessous et il est en général inférieur à 1 :

$$\phi_i(\lambda) = \frac{\text{nombre de molécules } i \text{ photodégradées subissant la réaction d'intérêt}}{\text{nombre total de photons (pour une longueur d'onde } \lambda) \text{ absorbés par le composé } i}$$

Une autre façon d'évaluer quantitativement ce phénomène de photolyse est d'utiliser une approche cinétique. En effet, les cinétiques de dégradation des polluants sont généralement exprimées à l'aide d'une cinétique d'ordre 1 ou de pseudo-ordre 1 et il est possible alors de déterminer le temps de demi-vie du polluant ($t_{1/2}$) c'est-à-dire le temps pour lequel la concentration initiale du composé est divisée par 2. Néanmoins, cette constante va être dépendante de différents paramètres : source de lumière, intensité, saison (Andreozzi et al., 2003), pH (Boreen et al., 2004). Afin de s'en rendre compte, les rendements quantiques de photolyse et les temps de demi-vie de quelques composés pharmaceutiques ont été rassemblés dans le tableau 1-7.

Il est important de noter que les rendements quantiques de photolyse directe sont parfois différents pour un composé donné (cas du sulfaméthoxazole) mais parfois du même ordre de grandeur (cas du naproxène). Cette variabilité peut être attribuable à la nature de la source lumineuse et donc à l'excitation de différentes bandes d'absorption du composé (et donc de transitions électroniques $n-\pi^*$ ou $\pi-\pi$). Dans le cas de sources polychromatiques (lumière solaire ou dans l'ultraviolet), les rendements quantiques sont dépendants des classes de composés pharmaceutiques voire même des composés eux-mêmes. En effet, des rendements quantiques de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-2} ont été mesurés pour les hormones, faisant d'elles des composés assez facilement dégradables par photolyse directe ($t_{1/2}$ inférieurs à quelques heures). A l'inverse, les antidépresseurs, dont la carbamazépine, présentent des rendements quantiques compris entre 10^{-3} et 10^{-6} et peuvent être considérés comme faiblement photodégradables ce qui laisse présager un long temps de résidence dans les milieux naturels ($t_{1/2}$ supérieurs à quelques dizaines voire centaines d'heures dans les études référencées).

Tableau 1-7 : Rendement quantique de photolyse de produits pharmaceutiques

Famille	Molécules	ϕ	$t_{1/2}$ (h)	Plage λ (nm)	Référence
Antibiotiques	Norfloxacine	$4,3 \times 10^{-2}$		296 - 450	(Wammer et al., 2013)
	Ofloxacine	$7,79 \times 10^{-5}$		LS	(Andreozzi et al., 2003)
	Sulfaméthoxazole	$3,3 \times 10^{-2}$ 0,5 (pH = 5,3)		254 LS	(Boreen et al., 2004; Carlson et al., 2015)
	Triméthoprime	$6,2 \times 10^{-3}$ (pH = 8)		Suntest	(Ryan et al., 2011)
Antidépresseurs	Carbamazépine	$4,77 \times 10^{-5}$		LS	(Andreozzi et al., 2003)
	Amitriptyline	$7,6 \times 10^{-3}$		254	(Nassar et al., 2017)
	Diazépam	$4,3 \times 10^{-6}$	28	290 - 400	(Calisto et al., 2011b)
	Alprazolam	$3,4 \times 10^{-6}$	865	290 - 400	(Calisto et al., 2011b)
Anti-inflammatoires	Paracétamol	$6,0 \times 10^{-3}$		254	(Carlson et al., 2015)
	Diclofénac	0,094 - 0,18 0,28	0,07	LS 254	(Meite et al., 2010; Packer et al., 2003; Poiger et al., 2001)
	Naproxène	$3,6 \times 10^{-2}$ $2,4 \times 10^{-2}$		LS 254	(Meite et al., 2010; Packer et al., 2003)
	Ibuprofène	$8,6 \times 10^{-2}$	3,2	centrée 312* 254	(Carlson et al., 2015)
Bétabloquants	Propranolol	$2,22 \times 10^{-3}$		LS	(Andreozzi et al., 2003)
Benzodiazépines	Oxazépam	$4,45 \times 10^{-6}$	15,1	290 - 400	(Calisto et al., 2011b)
Hypolipémiants	Acide clofibrique	$5,53 \times 10^{-3}$ 2×10^{-3}		LS LS	(Andreozzi et al., 2003; Packer et al., 2003)
Hormones	17 β -estradiol	$6,7 \times 10^{-2}$		254 centrée 312*	(Mazellier et al., 2008) Meite et al., 2010)
	Estrone	$3,5 \times 10^{-1}$		254	(Carlson et al., 2015)
	17 α -éthynylestradiol	$8,0 \times 10^{-2}$ $6,02 \times 10^{-2}$		254 254	(Carlson et al., 2015; Mazellier et al., 2008)
	Progesterone	$2,2 \times 10^{-2}$	5,9	centrée 312*	(Meite et al., 2010)
	Testostérone	$3,3 \times 10^{-2}$	6,6	centrée 312*	(Meite et al., 2010)
				11,2	centrée 312*

*Lumière polychromatique centrée à 312 nm ; LS : Lumière solaire

Pour les autres classes thérapeutiques, les données sont soit trop dispersées, soit insuffisantes pour que des généralités puissent apparaître. Néanmoins, ces classes de composés semblent avoir une photodégradabilité moyenne à faible (ϕ de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-5}) hormis quelques cas particuliers. Le diclofénac, apparaît facilement photodégradable avec des rendements quantiques de photolyse compris entre 0,1 et 0,3 ($t_{1/2} = 4,3$ min (Meite et al., 2010)) et à l'inverse l'oxazépam est plutôt photostable avec un rendement de l'ordre de 10^{-6} .

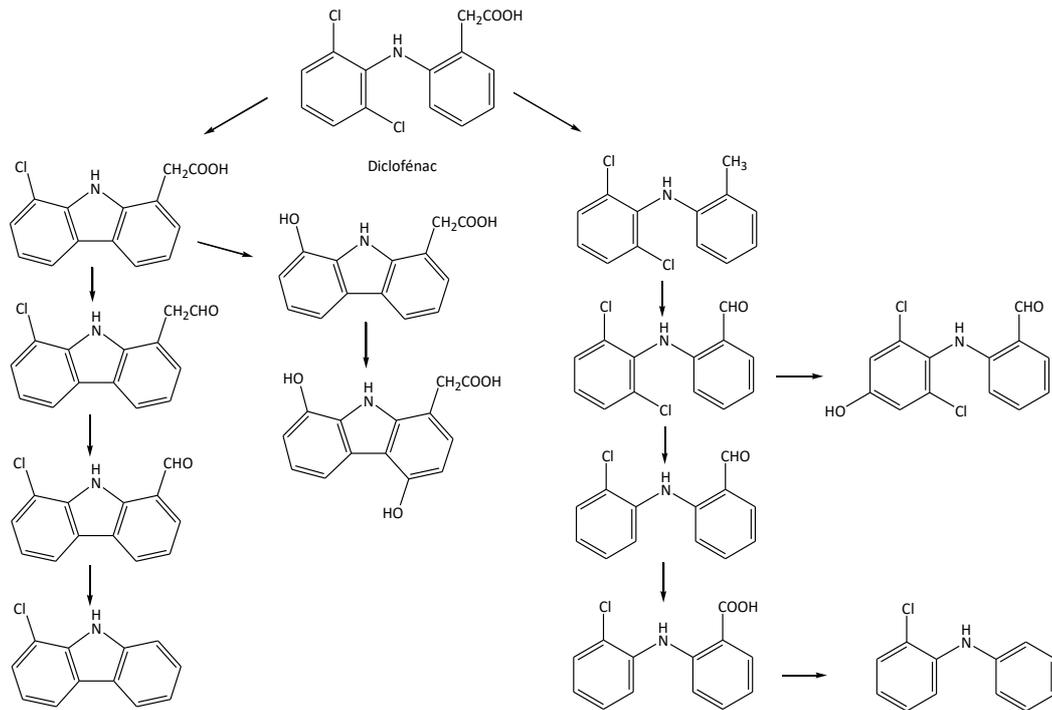


Figure 1-15 : Mécanisme de transformation du diclofénac par photolyse directe (Agüera et al., 2005)

Cette forte dégradation du diclofénac par absorption de la lumière a fait l'objet de nombreuses études cinétiques mais aussi analytiques. Ainsi, plusieurs produits de dégradation ont été identifiés, permettant de comprendre les mécanismes de transformation du diclofénac (figure 1-15). On observe notamment une photocyclisation, une déshalogénéation (déchloration), une substitution d'un atome de chlore par un groupement hydroxyle (responsable de la formation de dimères), une décarboxylation, et enfin une oxydation du composé.

3.2.2 La phototransformation indirecte

Dans les compartiments aquatiques, le phénomène de photodégradation indirecte doit être pris en compte car il conduit également à la transformation des composés. Il implique une espèce photosensible, présente naturellement dans le milieu, qui en absorbant la lumière, produit des espèces chimiques réactives qui réagiront avec le polluant. Parmi ces espèces réactives, on retrouve des états excités réactifs mais aussi de nombreux radicaux libres dont les principaux sont répertoriés dans le tableau 1-8 suivant.

Tableau 1-8 : Liste de radicaux libres et leur potentiel d'oxydation (E^0)

Radicaux	HO•	•O ⁻	H ₂ O ₂	HOO•	O ₂ • ⁻	NO ₃ •	SO ₃ • ⁻	SO ₄ • ⁻	Cl ₂ • ⁻	Br ₂ • ⁻	I ₂ • ⁻	ClO•	BrO•	CO ₃ • ⁻
E^0 (V)	2,6- 2,9	1,6- 1,9	1,8	1,5	0,25	2,3- 2,7	0,6	2,5- 3,1	2,09	1,5	1,1	1,5- 1,8	- 0,24	1,59

(Faust, 1999; Huie et al., 1991; Sun et al., 1997)

D'après ce tableau, il est possible de se rendre compte que de nombreuses espèces sont susceptibles de se former dans les milieux aquatiques, mais leurs sources ainsi que leurs voies de formation sont multiples. En conséquence, nous avons choisi de présenter dans un premier temps, les constituants des milieux aquatiques susceptibles de produire après absorption de la lumière des états excités réactifs et des espèces réactives oxygénés. Et dans un second temps, nous nous attarderons sur la formation d'espèces radicalaires halogénés et inorganiques.

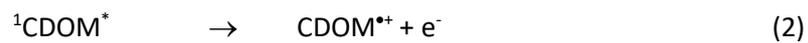
3.2.2.1 États excités réactifs et espèces réactives oxygénées

Dans les milieux aquatiques naturels, de nombreux constituants sont susceptibles de produire des états excités réactifs triplet ou singulet et des espèces réactives oxygénées ($^{\bullet}\text{OH}$, $^1\text{O}_2$...), dont les plus connus sont : la matière organique dissoute, les ions nitrite, les ions nitrate ou encore les oxydes de fer. Après une présentation concise de la nature et de la concentration de ces constituants dans les milieux aquatiques naturels, leur réactivité photochimique sera détaillée. En parallèle, la production et la concentration quasi-stationnaire des nombreuses espèces réactives susceptibles de se former seront présentées en fonction des compartiments aquatiques (lacs, rivières, côtes, mers ou encore océans), ainsi que leurs interactions avec les PP.

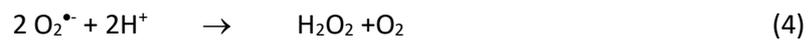
La matière organique dissoute (MOD). La MOD est définie comme un matériau organique de taille généralement inférieure à 0,7 μm , de masse inférieure à 3 kDa, englobant aussi les colloïdes (Xu et Guo, 2017). La MOD est constituée de deux classes de composés : les composés autochtones et les substances humiques. Les premiers sont facilement dégradables ou assimilables et de structures simples (lipides, sucres, polysaccharides, peptides, protéines, etc.) (Xu et Guo, 2017) qui proviennent de la dégradation des organismes, des algues ou de la synthèse microbienne. Les substances humiques sont quant à elles, des molécules comportant principalement des groupements phénoliques et carboxyliques. Ces substances dissoutes (chromophores) donnent selon leur concentration, une couleur jaunâtre à marron aux eaux naturelles.

Dans les compartiments aquatiques, la MOD est associée à la quantité de carbone organique dissous, les concentrations (en mg.L⁻¹) varient dans l'ordre suivant : zone humide (39,0) > lac (9,6) > rivière (7,2) > eaux côtières (3,6) > estuaires (1,2) > océans (0,6) (Massicotte et al., 2017). Ces données ont été confirmées par d'autres études ((Brezonik et Fulkerson-Brekken, 1998; Brinkmann et al., 2003; Chin et al., 2004; Housari et al., 2010; Marchisio et al., 2015; Matamoros et al., 2009; Minero et al., 2007; Vione et al., 2006; Xu et Guo, 2017).

La réactivité photochimique de la MOD est principalement liée à sa partie chromophore (ou Chromophoric Dissolved Organic Matter (CDOM) en anglais). Sous excitation lumineuse, CDOM va passer à un état excité singulet (¹CDOM*), de très courte durée de vie (< 150 ps) (Boyle et al., 2009) et donc négligeable dans les réactions de photochimie (eq. 1). ¹CDOM* peut former un radical cation CDOM** et un électron solvaté (e ou e_{aq}) par photoéjection (eq. 2). L'oxygène moléculaire présent dans les eaux va capter l'électron par réduction (Rasburn et Michaels, 1977) et produire le radical anion superoxyde O₂* (eq. 3).



L'anion superoxyde étant instable, il se dismute en peroxyde d'hydrogène selon la réaction 4 suivante :



¹CDOM* peut également revenir à l'état fondamental par fluorescence et conversion interne ou générer l'état excité triplet de la matière organique (³CDOM*) par conversion inter-système (eq. 5).



³CDOM* a une durée de vie d'environ 2 µs (McNeill et Canonica, 2016) et se forme 15 à 100 fois plus lentement que ¹CDOM*. La concentration quasi-stationnaire de ³CDOM* est d'environ 10⁻¹⁴ à 10⁻¹² M dans les eaux de surface. Dans les lacs, cette concentration a été estimée à 4-5 x 10⁻¹⁵ M (Minella et al., 2013). Néanmoins, Housari et al. (2010) ont montré que la production de ³CDOM* augmentait d'une eau douce à une eau salée.

Dans des conditions environnementales, la désactivation par l'oxygène moléculaire est très efficace pour limiter la durée de vie de $^3\text{CDOM}^*$ et peut conduire à la formation d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) selon l'équation 6.



Cet oxydant ($E = 1,23 \text{ V}$), malgré sa courte durée de vie ($< 1 \mu\text{s}$) dans l'eau, est capable d'oxyder un grand nombre de composés organiques (eq.7).



Les concentrations de $^1\text{O}_2$ mesurées dans des eaux de rivière sont comprises entre $5,4 \times 10^{-14}$ et $2,2 \times 10^{-12} \text{ M}$ et entre 2 à $3 \times 10^{-13} \text{ M}$ dans des eaux salines (Housari et al., 2010; Santoke et Cooper, 2017; Zepp et al., 1977).

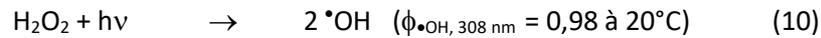
Des études sur l'interaction de $^1\text{O}_2$, susceptible d'être généré par CDOM, avec les PP a montré que la paroxétine et la fluvastatine réagissent efficacement avec cette espèce réactive à l'inverse du sulfaméthoxazole (Santoke et Cooper, 2017; Y. Wang et al., 2017).

Par ailleurs, $^3\text{CDOM}^*$ peut également réagir avec les contaminants organiques soit par transfert d'énergie triplet-triplet (eq. 8) soit par une réaction de photooxydo-réduction (eq. 9) conduisant à un CDOM réduit (CDOM^*) et un contaminant organique oxydé (P^{**}).



Deux comportements opposés ont été observés dans la littérature : une accélération ou un ralentissement de la dégradation des PP en présence de MOD et plus exactement d'acides humiques. Lors de leur ajout dans de l'eau ultrapure, le temps de demi-vie de plusieurs PP a été diminué, comme c'est le cas pour la carbamazépine, l'aténolol, le métoprolol et le 17β -estradiol (Mathon et al. 2016; Andreozzi et al. 2003; Grebel et al., 2012). Cependant, pour d'autres PP, tels que le naproxène ou le diclofénac, le comportement inverse a été observé (Koumaki et al. 2015).

Dans les eaux naturelles, CDOM est également responsable de la formation de radicaux hydroxyles HO[•] (Vione et al., 2006) soit à partir de H₂O₂ (eq. 1 à 4 et eq. 10) (Zellner et al., 1990), soit par réaction directe (eq. 11) :



Toutefois, la MOD est aussi dégradée par les radicaux [•]OH. Une étude de Mopper et Zhou (1990) a montré que la matière organique dissoute est dégradée 6 à 15 fois plus rapidement par [•]OH dans une eau de mer profonde qu'en surface.

Les ions Fe(II). Le fer est le métal de transition le plus abondant dans la croûte terrestre. Il est aussi présent, en plus faibles quantités, dans les systèmes aqueux (dissous ou en suspension). Généralement le fer se retrouve dans la phase solide sous forme d'oxydes ou d'oxyhydroxydes, parmi lesquels les plus fréquents sont l'hématite, la magnétite, la limonite, la goethite et la lépidocrocite (Calza et al., 2016). Le Fe(III) est la forme la plus stable dans les eaux naturelles et on le retrouve généralement sous la forme de complexes solubles (aquacomplexes) tels que [Fe(H₂O)₆]³⁺, [Fe(H₂O)₅(OH)]²⁺ ou Fe(OH)²⁺, [Fe(H₂O)₄(OH)₂]⁺ ou Fe(OH)₂⁺ [Fe(H₂O)₃(OH)₃], etc.

Dans les compartiments aquatiques, les plus faibles concentrations de fer dissous ont été mesurées dans les eaux salées (entre 0,2 et 4 nM), alors que dans les eaux continentales des concentrations allant jusqu'au µM (voire jusqu'à 150 mM) ont été rapportées (Calza et al., 2016).

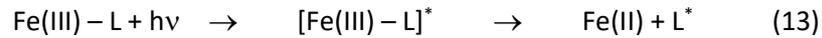
Les ions Fe(III) sont responsables de la formation de radicaux hydroxyles par photodissociation du complexe Fe(OH)²⁺ selon la réaction suivante (eq.12)



L'efficacité de cette réaction dépend fortement de la spéciation du Fe(III) et de la longueur d'onde d'irradiation (Calza et al., 2016; Feng et Nansheng, 2000). A une longueur d'onde d'irradiation de 313 nm, le rendement quantique de formation de OH[•] est de 0,140 à partir de Fe(OH)²⁺ (Faust et Hoigné, 1990) et de 0,3 à partir de l'espèce Fe(OH)₂⁺ sous excitation à 280 nm (Calza et al., 2016).

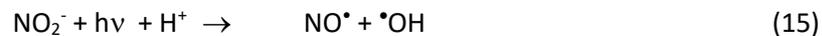
Certains ligands organiques (L) présents dans les eaux de surface tels que le citrate, le malonate et l'oxalate peuvent former des complexes très stables avec le Fe(III). Ces complexes de Fe(III) peuvent absorber le rayonnement à des longueurs d'onde beaucoup plus grandes que les autres constituants

chimiques ($\lambda > 500$ nm) et générer des espèces oxydantes (eq.14) (Faust et Zepp, 1993; Panias et al., 1996) :



Les ions nitrate et nitrite. Ces ions sont des éléments du cycle de l'azote que l'on retrouve dans de nombreux compartiments aquatiques environnementaux. La concentration en nitrates (en mg.L⁻¹) mesurée dans les rivières est comprise entre 3 et 37, pour les lacs entre 0,13 à 6 et enfin entre 0,04 et 1,8 pour les eaux de mer (Baena-Nogueras et al., 2017; Brezonik et Fulkerson-Brekken, 1998; Huertas et al., 2006; Li et al., 2016b; Marchisio et al., 2015). La concentration en ions nitrite mesurée dans les eaux est plus faible que celles des ions nitrate. Par exemple, il a été montré que ces concentrations étaient (en mg.L⁻¹) de 0,073 pour les rivières, 0,003 dans les lacs et 0,004 pour l'eau de mer (Baena-Nogueras et al., 2017; Marchisio et al., 2015).

Les ions nitrite ($\lambda_{\text{max}} = 355$ nm, $\varepsilon = 22 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et nitrate ($\lambda_{\text{max}} = 303$ nm, $\varepsilon = 7 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) en solution aqueuse peuvent absorber la lumière solaire et être à l'origine de la formation de radicaux hydroxyles selon les réactions suivantes (Vione et al., 2006) :



Dans l'eau ultrapure, sous excitation à 308 nm et à 20°C, le rendement quantique de formation des radicaux $\text{}^*\text{OH}$ à partir des nitrates est de 0,017 et de 0,07 à partir des nitrites (Zellner et al., 1990). Cette formation privilégiée a aussi été confirmée dans les eaux naturelles (Takeda et al., 2004; Zepp et al., 1987 ; Mopper et Zhou, 1990).

La présence des ions nitrate améliore la dégradation de certains PP (ibuprofène, carbamazépine, aténolol, métoprolol, acide salicylique) par rapport à la photolyse mais n'affecte pas celle du diclofénac ou du kétoprofène (Mathon et al., 2016; Gangwang et al., 2012; Zafiriou et True, 1979) du fait de leur photolyse importante. L'ajout d'ions nitrite n'a qu'une faible influence sur la dégradation des PP comme cela a été démontré pour l'acide salicylique (Gangwang et al., 2012). Cette plus faible réactivité s'explique par la capacité des nitrites à piéger les radicaux $\text{}^*\text{OH}$ pour produire NO_2 qui peut produire ensuite NO_2^- et NO_3^- .

Le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$). Ces radicaux sont omniprésents dans les eaux naturelles (rivières, lacs et eau de mer) (Haag et Hoigné, 1985; Qian et al., 2001; Takeda et al., 2004; Vione, 2016; Vione et al., 2006; Zhou et Mopper, 1990). Leurs concentrations quasi stationnaires en eaux douces ont été mesurées entre $0,1\text{-}5 \times 10^{-16}$ M (Mill, 1980; Russi et al., 1982), dans les lacs entre $2,5\text{-}3 \times 10^{-16}$ M (Haag et Hoigné, 1985; Zepp et al., 1987), dans les étangs et estuaires entre $1\text{-}8,4 \times 10^{-16}$ M (Housari et al., 2010; Zhou et Mopper, 1990) dans les eaux côtières entre $1,2\text{-}13,7 \times 10^{-17}$ M (Housari et al., 2010; Mopper et Zhou, 1990). De plus, les vitesses de formation initiales de $\bullet\text{OH}$ varient de $2,6\text{-}4,3 \times 10^{-19} \text{ M}\cdot\text{s}^{-1}$ dans l'eau de l'Antarctique (Qian et al., 2001), de $0,28\text{-}3,1 \times 10^{-11} \text{ M}\cdot\text{s}^{-1}$ dans les eaux côtières et de $0,32\text{-}4,2 \times 10^{-10} \text{ M}\cdot\text{s}^{-1}$ dans les étangs riches en matières organique.

L'origine des radicaux hydroxyles dans ces différents milieux incombe à la MOD, aux ions nitrate et nitrite et au peroxyde d'hydrogène. Dans les eaux douces, la MOD contribuerait à plus de la moitié des $\bullet\text{OH}$ produits et l'autre moitié en majorité à H_2O_2 puis aux anions avec une part plus importante attribuable aux nitrites (Minero et al., 2007 ;Takeda et al., 2004; Nakatani et al., 2007; Page et al., 2011; Vione et al., 2006). Dans les eaux salées, la MOD serait le constituant principal responsable de la production des $\bullet\text{OH}$ (à plus de 80 %), ensuite les ions nitrate et enfin d'une façon négligeable les ions nitrite et le peroxyde d'hydrogène (Mopper et Zhou, 1990; Takeda et al., 2004). Néanmoins, des résultats opposés ont été obtenus par Takeda et al. (2004) qui ont montré que dans des eaux de mer, les principales sources de radicaux hydroxyles provenaient des nitrites, et dans une moindre mesure, des nitrates.

Par son fort pouvoir oxydant, le radical hydroxyle est l'espèce réactive qui dégrade le mieux la majorité des PP avec des constantes de réaction élevées comprises entre $10^9\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (Packer et al., 2003; Lam et Mabury, 2005; Boreen et al., 2004) pour la sulfaméthoxazole, l'atorvastatine, la carbamazépine, le naproxène, l'acide clofibrique et l'ibuprofène. Cette forte réactivité a été étudiée d'un point de vue mécanistique pour la carbamazépine avec la mise en évidence du dérivé époxyde et cétonique de CBZ. Leur formation est expliquée par une première réaction du radical hydroxyle sur la double liaison de l'azépine, suivi par la formation de deux radicaux hydroperoxydes qui par élimination génèrent l'époxyde et le dérivé énolique (ou cétonique) de CBZ (figure 1-16).

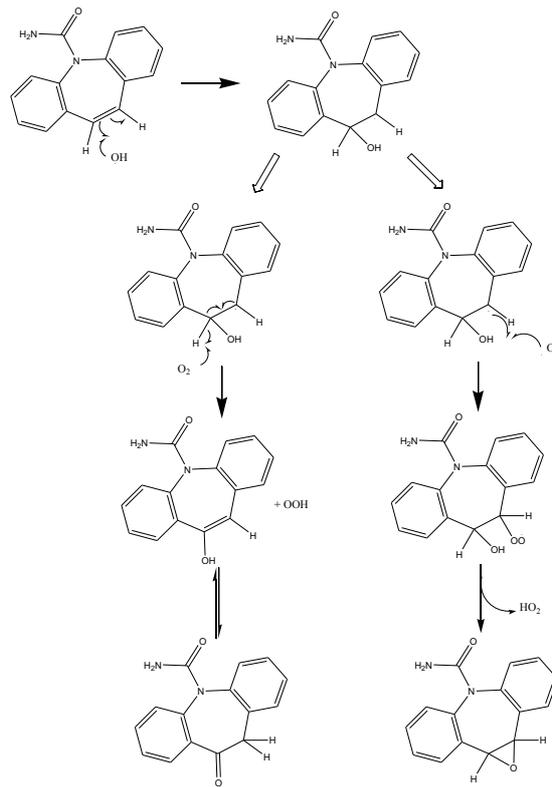


Figure 1-16 : Mécanisme de transformation de la carbamazépine en présence de radicaux $\bullet\text{OH}$ (Lam et Mabury, 2005).

3.2.2.2 Espèces réactives halogénées et inorganiques

Dans cette partie, nous avons choisi de présenter les radicaux halogénés et inorganiques pouvant être formés dans les milieux aquatiques naturels, en particulier les radicaux bromures, chlorures, carbonates et sulfates. Après une introduction concise des ions dont ils sont issus, leurs voies de formation seront détaillées ainsi que leur présence dans les compartiments aquatiques et leur réactivité avec les PP.

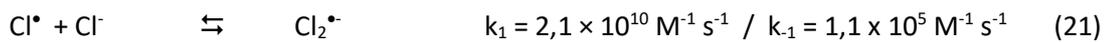
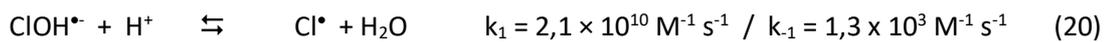
Les radicaux halogénés (Cl_2^\bullet , Br_2^\bullet). Les ions halogénés sont très abondants dans l'environnement aquatique marin. Les anions prédominants sont les chlorures que l'on trouve à des concentrations comprises entre 14200 et 19400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ suivi des bromures entre 0,695 et 71,9 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Li et al., 2016b, 2016a; Parker et Mitch, 2016). Dans les lacs, les concentrations en ions chlorure sont très faibles (0,1 à 8,8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) et souvent en dessous de la limite de détection pour les ions bromure (Marchisio et al., 2015; Vione et al., 2006).

CDOM peut être impliquée dans la formation de radicaux halogénés par transfert d'électron entre l'état excité triplet et les ions chlorure (Brigante et al., 2014; Jammoul et al., 2009; Loeff et al.,

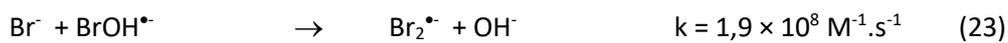
1993) et bromure en solution (De Laurentiis et al., 2012; Jammoul et al., 2009; Loeff et al., 1993; Parker et Mitch, 2016) comme le montre les équations 17 et 18 :



Par ailleurs, les radicaux $\text{Cl}_2^{\bullet-}$ peuvent être générés dans les eaux naturelles par l'oxydation des ions chlorure par les radicaux hydroxyles dans des conditions acides (eq. 19-21) (Jayson et al., 1973).



De la même façon, les radicaux $\text{Br}_2^{\bullet-}$ peuvent être formés par réaction avec ${}^\bullet\text{OH}$ à pH neutre (eq. 22, 23, 24) (Zehavi et Rabani, 1972). Les réactions mises en jeu sont les suivantes (Buxton et al., 1988; Rafi et Sutton, 1965; Treinin et Hayon, 1975; Westerhoff et al., 1998; Zehavi et Rabani, 1972)



Enfin, les radicaux chlorures et bromures peuvent également être générés par d'autres voies, notamment par le biais des radicaux sulfates ou encore par l'intermédiaire de semi-conducteurs oxydants comme le Fe(III) (Anipsitakis et al., 2006; Lutze et al., 2014; Redpath et Willson, 1975; Yang et al., 2014 ; Jayson et al., 1973).

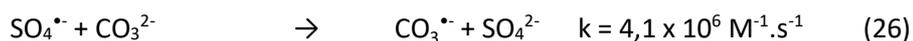
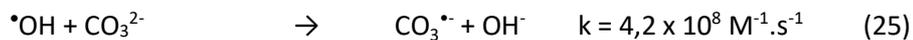
Leur formation est 2 à 3 fois plus importante dans les eaux salées que dans les eaux douces (Parker et Mitch, 2016) mais aucune concentration n'a pu être mesurée. Par contre, il a été montré que les radicaux bromures sont formés par les radicaux hydroxyles qui réagissent irréversiblement et

presque exclusivement avec les ions bromure à hauteur de 93 % dans les eaux salées (Mopper et Zhou, 1990; Zafiriou, 1974; Zafiriou et al., 1987).

La réactivité entre les radicaux halogénés et certains antibiotiques a été étudiée par Li et al. (2016a). Il a été montré que les radicaux halogénés accélèrent la disparition de la sulfaméthazine, que les radicaux Cl_2^\bullet réagissent faiblement avec le sulfaméthoxazole et la sulfapyridine, et que les radicaux Br_2^\bullet inhibent leur dégradation. Cette inhibition a été attribuée à la formation d'exciplexes entre les ions halogénures et les composés excités (Geddes, 2001; Hurley et al., 1988; Loeff et al., 1993). De plus, ces mêmes auteurs ont montré la formation de produits de transformations bromés ou chlorés.

Les radicaux carbonate (CO_3^\bullet). La formation de ces radicaux est liée à la présence des ions carbonate dans les milieux aquatiques. Le pH des rivières est généralement compris entre 6,5 et 8,5 et sa stabilité est majoritairement due à la présence d'ion hydrogénocarbonates, HCO_3^- , qui est la forme la plus abondante. Les concentrations en HCO_3^- ont été mesurées dans des eaux douces à 170 mg.L^{-1} et 146 mg.L^{-1} dans des eaux de mer (Baena-Nogueras et al., 2017) et 158 mg.L^{-1} dans les lacs (Vione et al., 2006).

Le radical carbonate est produit dans des systèmes aqueux naturels principalement par piégeage des radicaux hydroxyles par les ions carbonate ou bicarbonate (Buxton et Elliot, 1986) ou par oxydation avec les radicaux SO_4^\bullet selon les réactions suivantes (eq. 25, 26) (Canonica et al., 2005) :

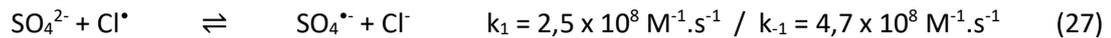


D'autres processus peuvent conduire à leur formation : la photoionisation ou encore par réaction avec le radical halogéné Br_2^\bullet (Huie et al., 1991). La concentration en CO_3^\bullet dans les eaux naturelles irradiées a été mesurée entre 10^{-13} et 10^{-15} M (Faust, 1999; Huang et Mabury, 2000a).

La réactivité des radicaux carbonates a été démontrée sur de nombreux composés aromatiques (Larson et Zepp, 1988; Huang et Mabury, 2000b), mais compte tenu de leur faible réactivité par rapport aux radicaux hydroxyles (Canonica et al., 2005), un nombre restreint d'études a été mené sur leur réactivité avec les produits pharmaceutiques. Néanmoins, la réactivité du radical CO_3^\bullet avec quelques PP (Jasper et Sedlak, 2013) a été déterminée montrant que ce radical réagit assez efficacement avec le sulfaméthoxazole ($k = 4,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$), l'aténolol et le propranolol ($k = 5,9 - 46 \times 10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) mais beaucoup moins avec la carbamazépine ($k = 2,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)

Les radicaux sulfates ($SO_4^{\bullet-}$). La formation des radicaux sulfates dans les eaux est due à la présence des ions sulfate qui proviennent de l'oxydation des minerais de sulfites, la présence de schistes ou de déchets industriels. Les concentrations en ions sulfate dans les eaux naturelles douces ou salées sont peu étudiées dans la littérature. Marchisio et al. (2015) ont mesuré des concentrations allant de 1,04 à 24,4 mg.L⁻¹ dans les lacs.

Le radical sulfate se forme dans les eaux par réaction avec Cl^{\bullet} (eq. 27) (Huie et al., 1991) ou encore par photolyse des ions persulfate (eq. 28) (Lutze et al., 2014; Wan et al., 2012) :



La dégradation des produits pharmaceutiques par les radicaux sulfates a été étudiée principalement dans les STEU par des procédés d'oxydation avancée (Mahdi Ahmed et al., 2012). Les études réalisées ont mis en évidence une forte réactivité du radical sulfate avec la carbamazépine ($k = 1,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), le sulfaméthoxazole ($k = 12,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et le diclofénac ($k = 9,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Matta et al., 2011; Mahdi Ahmed et al., 2012).

4. Problématiques abordées dans la thèse et approches proposées

Cette synthèse bibliographique a permis de montrer que de nombreuses classes de produits pharmaceutiques, notamment les analgésiques, antibiotiques, psychotropes, diurétiques, hormones et antihistaminiques sont présentes dans les différents compartiments aquatiques du bassin Méditerranéen mais aussi à l'échelle mondiale. Les niveaux de concentration s'étendent du ng.L⁻¹ au µg.L⁻¹ dans les eaux usées, en partie liés à un faible pourcentage d'élimination en STEU pour certains PP. Dans les rivières et dans la mer, les concentrations sont de l'ordre du ng.L⁻¹ voire inférieures, principalement dû à un effet de dilution mais aussi aux phénomènes d'atténuation naturelle. Ces derniers regroupent la biodégradation, l'adsorption, des réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse et également des réactions photochimiques, auxquelles ce travail s'intéresse plus précisément.

La littérature a montré que la dégradation des PP était dépendante non seulement des propriétés physicochimiques des composés mais également des milieux étudiés. Ainsi, des travaux ont déjà été réalisés concernant le devenir des PP dans des eaux souvent ultrapure, parfois reconstituées mais rarement naturelles. Certains composés se sont avérés très sensibles au processus de photolyse

comme le diclofénac, l'estrone ou encore le sulfaméthoxazole avec des rendements quantiques de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-1} tandis que d'autres semblent photostables comme la carbamazépine, le diazépam ou encore l'ofloxacine (ϕ compris entre 10^{-6} et 10^{-5}). De nombreux travaux ont également étudié le comportement des PP dans des eaux synthétiques (en maîtrisant donc leur contenu chimique) et ont mis en évidence des constituants tels que MOD, NO_3 , NO_2 , et Fe(III) pouvant générer des espèces chimiques réactives telles que $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, $^3\text{CDOM}^*$, Br_2^* , Cl_2^* , CO_3^* , SO_4^* . Ces espèces chimiques sont potentiellement capables de dégrader, par réaction photoinduite, les composés pharmaceutiques avec des constantes de réactions comprises entre 10^6 à $10^{10} \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, diminuant ainsi les temps de demi-vie de ces composés. Toutefois, ce premier chapitre souligne aussi que le devenir des produits pharmaceutiques dans des milieux aquatiques naturels n'a été que très peu abordé et, par conséquent, il n'existe que de rares comparaisons sur leur comportement en fonction du type d'eaux étudiées. La complexité des matrices aqueuses est donc à prendre en compte, afin de mieux appréhender les réactions qui auront lieu à l'échelle environnementale aussi bien d'un point de vue cinétique pour évaluer la persistance des PP, que d'un point de vue mécanistique, pour identifier les espèces réactives impliquées et les sous-produits susceptibles de s'accumuler dans le compartiment aquatique. Bien que de nombreuses études aient été conduites pour déterminer des constantes de réactions entre les PP et des espèces chimiques réactives formées au cours de l'irradiation (principalement des radicaux hydroxyles), des lacunes persistent encore notamment sur la réactivité avec les radicaux halogénés ou carbonates. Egalement, malgré l'intérêt récent porté aux sous-produits de certains polluants, l'étude de leur devenir n'a pratiquement jamais été étudié. Il semble donc primordial de s'intéresser aux produits de transformation de PP susceptibles de se former dans l'environnement, afin de déterminer leur persistance, d'identifier leurs sous-produits et de prédire leur toxicité globale.

Cette synthèse bibliographique a également permis de répertorier les différents tests écotoxicologiques normalisés existants. L'analyse des données a révélé que les tests d'écotoxicité aiguë sont les plus utilisés notamment ceux utilisant *D. magna*, *P. subcapitata*, et *V. fischeri*. Ces derniers sont appliqués pour des PP pris individuellement et à des concentrations généralement très supérieures à celles retrouvées dans l'environnement. Ces données montrent les limites de ces tests en termes de représentativité environnementale du fait d'une sensibilité inadaptée mais aussi de temps de contact courts peu comparables à une exposition chronique.

C'est dans ce cadre que s'inscrivent ces travaux de thèse avec pour premier objectif l'étude du devenir de la carbamazépine et de deux de ses sous-produits dans différents milieux aquatiques. La carbamazépine qui est une substance active utilisée dans les produits pharmaceutiques à usage

humain pour traiter l'épilepsie a été choisie du fait de : (1) sa détection fréquente dans l'environnement compte tenu de sa faible élimination en STEU, (2) sa photostabilité dans l'eau ultrapure, et (3) la connaissance de certains de ses sous-produits. En effet, l'oxcarbazépine (OxCBZ) ainsi que l'acide 9-carboxylique acridine (9-CAA) sont deux métabolites ou sous-produits de CBZ déjà identifiés dans des travaux de recherches (Bahlmann et al., 2014; Brezina et al., 2017; Kaiser et al., 2014; Leclercq et al., 2009). Néanmoins, l'oxcarbazépine (OxCBZ) est également un produit pharmaceutique antiépileptique ainsi qu'un thymorégulateur et sa structure se rapproche fortement de la carbamazépine. L'acide 9-carboxylique acridine (9-CAA) est un métabolite commun de la carbamazépine et de l'oxcarbazépine. Leur devenir a été envisagé aussi bien d'un point de vue cinétique, mécanistique que réactionnel dans des eaux d'origines variées (salée, douce, saumâtre) en portant une attention particulière aux différences observées entre les composés et selon le type d'eau.

Le second objectif consiste à étudier l'écotoxicité des trois composés ciblés. Pour ce faire trois organismes aquatiques ont été sélectionnés pour répondre à plusieurs critères. Dans un premier temps, le test normalisé sur la bactérie *Vibrio fischeri* (ISO 11348-1:2007) été sélectionnée pour son applicabilité à l'évaluation de la toxicité des composés dans des milieux de salinité différentes et parce qu'il s'agit d'un test normalisé validé et éprouvé. Dans un second temps, deux organismes modèles originaux, ayant une durée de vie assez longue permettant d'appréhender les effets chroniques (jusqu'à 14 jours), et également supposés sensibles afin d'évaluer l'impact de produits pharmaceutiques à des concentrations environnementales (centaine de ng.L^{-1}) ont été choisis : la macrophyte, *Lemna minor* et le métazoaire, *Hydra circumcincta*. Bien que le premier modèle biologique (*L. minor*) soit utilisé dans un test normalisé (OCDE 221, 2006), un nouveau protocole a été mis au point consistant à mesurer les phytométabolites, afin de tenter de détecter de manière précoce et non destructive les effets des PP. Le second modèle, les hydres, n'est pas utilisé dans un test normalisé pour l'instant, mais permet le suivi de nombreux paramètres biologiques, tels que la morphologie, la reproduction, la balance oxydative, etc, afin de déceler des effets potentiels liés à l'exposition aux polluants à des niveaux biologiques très divers.

Chapitre 2 :
Matériels et Méthodes

Les deux premières parties de ce chapitre 2 s'attachent à présenter les différents sites et milieux aqueux ainsi que chacun des composés étudiés dans le cadre de ces travaux de thèse. Les parties 3-5 présentent les principaux outils, instruments et méthodes utilisés pour effectuer les analyses chimiques et évaluer les devenir photochimiques des molécules. Enfin, la dernière partie décrit, les bioessais mis en œuvre ainsi que les méthodes de mesure de l'écotoxicité des composés.

1. Prélèvements des eaux naturelles

Quatre eaux naturelles de salinités différentes ont été échantillonnées régulièrement dans la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (France), afin de pouvoir travailler sur différents types d'eaux de surface. Les prélèvements ont été effectués à l'aide d'une perche à une profondeur de -15 à -20 cm sous la surface dans des bouteilles en pyrex préalablement pyrolysées à 400°C pendant 12 h.

Les bouteilles ont été stockées au laboratoire à l'abri de la lumière et à 4°C pendant une durée maximale de 14 jours en accord avec la stabilité de paramètres physicochimiques (cités ci-après). Les coordonnées GPS (Global Positionning System) de chaque site sont indiquées dans le tableau 2-1 ainsi que quelques caractéristiques, et la figure 2-1 donne une vue d'ensemble de la localisation de ces sites.

Tableau 2-1 : Localisation des sites de prélèvements

Site	Latitude (N)	Longueur (E)	Remarques
1	43° 30' 59,36''	5°18'49,19''	Rivière Arc, proche de l'aqueduc de Roquefavour, 127 km de longueur et un débit de 50 m ³ s ⁻¹
2	43°31'34,91''	5°4'29,5''	Étang de Berre, proche de la centrale hydroélectrique EDF à Saint-Chamas
3	43°23'8,28''	4°48'10,54''	Rivière Rhône à Port-Saint-Louis-du-Rhône, 812 km de longueur et un débit de 1 690 m ³ s ⁻¹
4	43°21'7,38''	4°52'53,81''	Mer Méditerranée, plage Napoléon, 10 km de longueur, entre le Golfe de Fos et l'embouchure du Rhône



Figure 2-1 : Carte de localisation des sites de prélèvement des eaux naturelles
 ❶ Rivière Arc ❷ Etang de Berre ❸ Rivière Rhône ❹ Mer Méditerranée

Des paramètres physicochimiques globaux ont été mesurés sur le terrain en utilisant un multimètre portable de la marque HACH (modèle HQ40d) équipé de différentes sondes. Ces paramètres et les sondes utilisées sont référencés dans le tableau 2-2. La mesure systématique de ces paramètres a permis d'observer leur faible évolution au cours du temps, témoignant d'une relative stabilité de ces eaux et donc la possibilité de les utiliser d'une façon reproductible sur la durée de la thèse.

Tableau 2-2 : Paramètres mesurés sur site après échantillonnage et références des sondes utilisées.

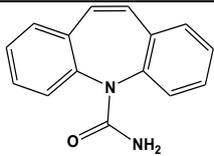
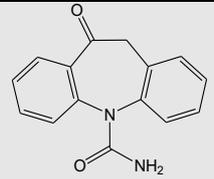
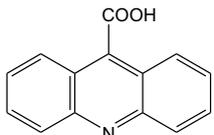
Paramètres	Matériel
pH	Electrode IntelliCAL PHC101
Température (°C)	
Potentiel redox (mV)	Electrode IntelliCAL MTC101 ORP
Conductivité (ms.cm ⁻¹)	IntelliCAL CDC401 Conductivité
Oxygène dissous (mg.L ⁻¹)	IntelliCAL LDO101 LDO

D'autres analyses ont également été réalisées au laboratoire, afin de déterminer la quantité de matière en suspension, les concentrations en carbone dissous, en ions et métaux (chlorure, sulfate, nitrate, fer, etc.) dans la phase dissoute et particulaire. Les techniques employées sont décrites dans la partie 5.

2. Composés chimiques et solvants utilisés

La carbamazépine et l'acide 9-carboxylique acridine proviennent de Sigma-Aldrich et l'oxcarbazépine de VWR et sont disponibles sous forme de poudre avec une pureté supérieure à 97 %. Quelques propriétés physico-chimiques de ces composés sont reportées dans le tableau 2-3.

Tableau 2-3 : Propriétés physico-chimiques des composés étudiés

Nom commercial Nom IUPAC	Formule	Solubilité dans l'eau (mg.L ⁻¹ à 25°C)	pKa	LogK _{ow}	Masse molaire g.mol ⁻¹	pH* à 25 °C
Carbamazépine (CBZ) 5H-dibenzo[b,f]azépine-5-carboxamide		17,7 ^a 100,0 ^b	13,9	2,5	236,27	5,83
OxCarbazépine (OxCBZ) 5-oxo-6H-benzo[b][1]benzazépine-11-carboxamide		202,8 ^a 30,0 ^b	13,7	1,44	252,27	7,93
Acide 9-carboxylique acridine (9-CAA) acridine-9-acide carboxylique		4,7 ^a 20,0 ^b	0,9 4,1**	3,08	223,227	5,54

a : valeur prédite (EPIsuite) ; b : valeur expérimentale dans ce travail
* à une concentration de 5 mg.L⁻¹ dans l'eau milliQ ; ** pKa de l'acridine

Les solutions mères de chaque composé ont été préparées dans l'eau ultrapure (Direct-Q 5UV, Millipore) à des concentrations respectives de 100, 40 et 20 mg.L⁻¹ pour CBZ, OxCBZ et 9-CAA après 2 jours sous agitation magnétique, à l'obscurité et à température ambiante (25°C). Les solutions ont été stockées à l'obscurité à 4°C et l'absence de dégradation des composés dans ces conditions, validée par un suivi en chromatographie liquide (LC) détaillé en partie 5.3, a permis de conserver ces solutions pendant 2 mois.

Les solvants et autres produits chimiques sont répertoriés dans les tableaux 2-4 et 2-5 suivants.

Tableau 2-4 : Caractéristiques des solvants utilisés

Solvant	Pureté/Qualité	Fournisseur
Acétonitrile Optima LC-MS	> 99 %	Fisher Chemical
Eau Optima LC-MS	Qualité LC-MS	
Acétonitrile	Hipersolv Chromanorm	VWR

Tableau 2-5 : Caractéristiques des autres produits chimiques utilisés

Produit chimique	Pureté/Qualité	Fournisseur
Hydroquinone		Prolabo.
NaCl	99 %	VWR
NaBr	99 %	
Acide formique	AnalaR Normapur	
Sodium anthraquinone-2-sulfonate	> 98 %	Sigma Aldrich
NaN ₃	> 99,5 %	
NaOH	> 99,8 %	
NH ₄ SCN	> 99,8 %	
Acide téréphtalique	98 %	
Acide hydroxytéréphtalique	97 %	
HClO ₄ à 70%	≥ 99,9 %	
Acridine	> 97 %	
9-(10)H-acridone	> 97 %	
10-hydroxy-10,11-dihydrocarbamazépine	> 97 %	LGC
Composé trans/cis C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃	> 97 %	Provence Technologies
Acrylamide	> 99,9 %	Fluka AG Chem Fabrik
Isopropanol	> 99,7 %	
H ₂ O ₂	≥ 30 % w/w	Fluka Analytical
CaCO ₃	≥ 99,5 %	

3. Irradiation simulée

3.1 Système d'irradiation

Le système d'irradiation est distribué par LOT Quantum Design (France). Ce système est équipé d'une lampe Xénon (300 W) et de deux filtres. Le filtre à eau supprime les rayonnements infrarouges ($\lambda > 900$ nm) et permet de réduire la charge thermique sur les autres filtres et les optiques. Le filtre d'atténuation atmosphérique supprime les rayonnements ultra-violet inférieurs à 290 nm. Le faisceau incident est dévié en sortie du filtre à eau avec un angle de 45° grâce à un miroir dichroïque avant de passer au travers du filtre d'atténuation et d'arriver sur le réacteur (figure 2-3).

Le réacteur de 130 mL est fermé hermétiquement. Il est équipé d'une double enveloppe qui permet une circulation d'eau afin de réguler la température (20°C) durant toute l'expérience. Un disque en quartz positionné dans sa partie supérieure permet le passage de la totalité du

rayonnement. L'homogénéité du milieu est assurée par une agitation magnétique. Les expériences d'irradiation ont été réalisées pour chaque composé placé individuellement dans un volume de 30 mL d'eau. Pour les suivis, les prélèvements ont été effectués à l'aide d'une aiguille (Sterican 70mm, VWR) et d'une seringue (Norm-ject, VWR) insérées dans le réacteur.

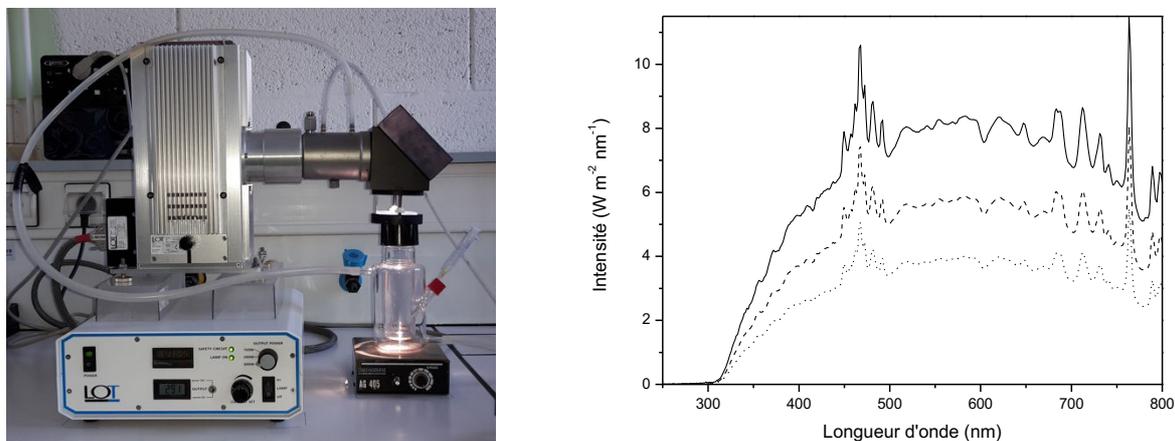
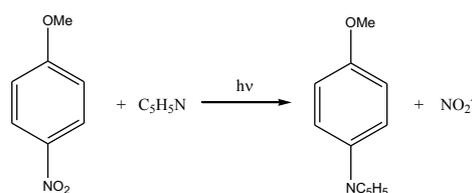


Figure 2-2 : Dispositif d'irradiation (gauche) et spectres d'émission du système d'irradiation non corrigé (noir) et corrigés (Laszakovits: tiret, Dulin: pointillé)

Le spectre d'émission du système d'irradiation, présenté sur la figure 2-2, a été obtenu à l'aide d'un radiomètre distribué par LOT-Oriel, modèle SR-501. Pour connaître avec exactitude le flux de la lumière reçu par les solutions, le flux de photons incidents a été déterminé par actinométrie chimique en utilisant le *para*-nitroanisole (PNA) en présence de pyridine (pyr).

Sous irradiation, la solution contenant PNA (10,69 μM) et pyr (10,3 mM) donne un photoproduit, le *p*-pyridinium anisole, selon la réaction suivante :



Il a été montré que le rendement quantique de transformation de PNA ($\phi_{\text{PNA/pyr}}$) dépend de la concentration en pyridine, selon les équations suivantes :

$$\phi_{\text{PNA/pyr}} = 0,44 \times [\text{pyr}] + 0,00028 \quad (\text{Dulin et Mill, 1982}) \quad (1)$$

$$\phi_{\text{PNA/pyr}} = 0,29 \times [\text{pyr}] + 0,00029 \quad (\text{Laszakovits et al., 2017}) \quad (2)$$

Or $\phi_{\text{PNA/pyr}}$ dépend directement du nombre de molécules N de PNA disparues par unité de surface et de temps ($\text{molécule}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), ΔN_{PNA} , et de l'intensité du flux photonique absorbé par PNA entre 290 et 400 nm, P_{abs} , comme le montre l'équation 3.

$$\frac{\Delta N_{\text{PNA}}}{\phi_{\text{PNA/pyr}}} = P_{\text{abs}} \quad (3)$$

ΔN_{PNA} a été calculé en déterminant la vitesse initiale de disparition de PNA par LC dans les conditions suivantes : élution en mode isocratique (MeOH/Eau : 60/40), colonne Eclipse plus C₁₈ (Agilent, 2,1 x 150 mm, 3,5 μm), débit fixé à 0,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, température du four à 40°C et longueur d'onde de détection égale à 315 nm. Après calcul de $\phi_{\text{PNA/pyr}}$, on détermine P_{abs} qui correspond à la somme des intensités du flux photonique absorbé pour chaque longueur d'onde sur l'ensemble du spectre d'absorption du PNA (eq. 4) :

$$P_{\text{abs}} = \int_{\lambda} P_a(\lambda) d(\lambda) = \int_{\lambda} P_0(\lambda)(1 - 10^{-A(\lambda)}) d(\lambda) \quad (4)$$

Avec $P_0(\lambda)$, l'intensité réelle du flux photonique pour une longueur d'onde λ donnée, en $\text{photon}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et $A(\lambda)$, l'absorbance de la solution de PNA à la longueur d'onde donnée. Si l'on considère que $P_0(\lambda)$ est proportionnel d'un facteur de correction k, à I_0 mesuré avec le radiomètre, il en découle l'équation 5 suivante :

$$P_{\text{abs}} = \int_{\lambda} k \times I_0(\lambda)(1 - 10^{-A(\lambda)}) d(\lambda) \quad (5)$$

Et le facteur de correction peut alors être calculé par l'équation 6 :

$$k = \frac{P_{\text{abs}}}{\int_{\lambda} I_0(\lambda)(1 - 10^{-A(\lambda)}) d(\lambda)} \quad (6)$$

Ces facteurs de correction k déterminés par actinométrie ($k_{\text{Dulin}} = 2,096$ et $k_{\text{Laszakovits}} = 1,427$) permettent de prendre en compte les phénomènes de réflexion et de réfraction pouvant avoir lieu dans le réacteur de travail. Les spectres d'émission corrigés sont présentés sur la figure 2-2.

3.2 Evaluation des réactions photochimiques

Afin de quantifier les processus photochimiques, les rendements quantiques de transformation ont pu être calculés en appliquant la relation (7) suivante :

$$\phi = \frac{\Delta C}{\Delta t} \frac{N_A \cdot 10^{-3}}{\sum I_0(\lambda)(1 - 10^{-DO_{\lambda}})\ell} \quad (7)$$

Avec $\Delta C/\Delta t$, la vitesse initiale de disparition du composé (encore appelé v) en $M.s^{-1}$, N_A , nombre d'Avogadro, DO_λ , l'absorbance du composé ou du milieu à la longueur d'onde λ , $I_0(\lambda)$, le flux de photons corrigé à chaque longueur d'onde en $photons.cm^{-2}.s^{-1}$, et l , le trajet optique de la solution dans le réacteur en cm.

4. Identification et réactivité des espèces chimiques transitoires

La mise évidence et la quantification des espèces chimiques transitoires susceptibles de se former et leur réactivité vis-à-vis des composés sélectionnés ont été envisagés selon trois approches : par spectrométrie d'absorption résolue en temps (échelle de la nanoseconde), par l'utilisation de sondes chimiques et par la mise en œuvre de réactions de compétition.

4.1 Spectrophotométrie d'absorption résolue en temps

4.1.1 Principe

La spectrophotométrie d'absorption résolue en temps (ou Laser Flash Photolysis (LFP) en anglais) permet l'étude par mesure directe ou indirecte d'espèces chimiques transitoires de courtes durées de vie, telles que des radicaux ou des états excités. Cette technique consiste à perturber le système étudié par une excitation lumineuse brève et intense pour peupler les états excités intervenant dans le mécanisme et à suivre l'évolution du système vers un nouvel état d'équilibre ou vers un retour à l'état initial. Elle permet ainsi d'effectuer des mesures cinétiques et spectroscopiques dans l'échelle de temps de la réaction élémentaire (fs à μs).

Les études par spectrophotométrie d'absorption résolue en temps ont été réalisées à l'aide d'un ensemble Applied Photophysics type LKS 60 présentée sur la figure 2-3.



Figure 2-3 : Appareillage utilisé Applied Photophysics type LKS 60.

Le laser est un Quanta Ray GCR 130-1 Nd:YAG de Spectra Physics (largeur d'impulsion ≈ 5 ns, $E \approx 44$ mJ par impulsion à 266 nm). Nd-YAG est l'acronyme pour néodymium-yttrium aluminum garnet solid-state laser. C'est un « minéral » synthétique, qui, excité, produit de la lumière dans la région infrarouge du spectre électromagnétique à 1064 nm. Pour convertir la lumière infrarouge dans la

région du visible, puis dans l'UV, un système optique est utilisé. Il est ainsi possible de doubler puis tripler et enfin quadrupler les fréquences du photon. Quatre harmoniques peuvent donc être obtenues à 1064, 532, 355 et 266 nm. Pour nos expériences, les échantillons ont été excités à l'aide de la quatrième harmonique du laser c'est-à-dire à 266 nm. Les absorptions transitoires ont été mesurées avec un système de détection détaillé sur la figure 2-4.

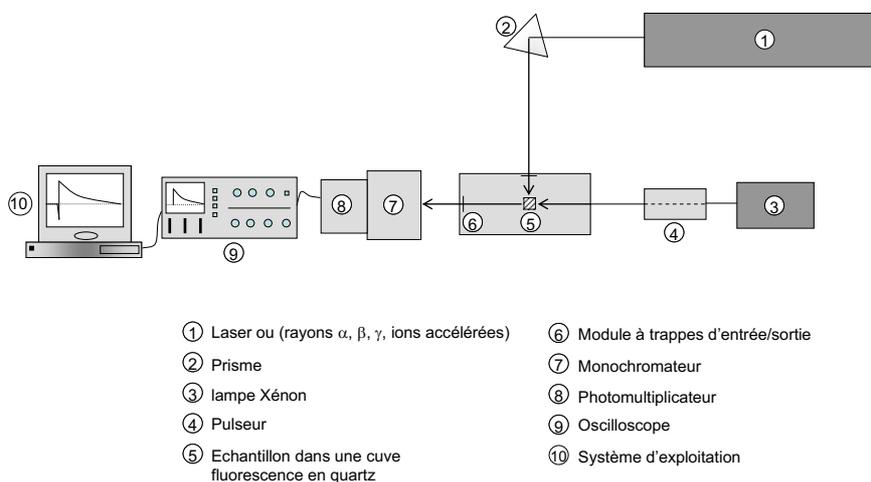


Figure 2-4 : Schéma de principe de l'appareillage de spectrophotométrie d'absorption résolue en temps.

Ce système est constitué d'une lampe Xénon pulsée (150 W), permettant de lire les densités optiques immédiatement après l'excitation par le laser. La lumière d'analyse traverse la cellule perpendiculairement au faisceau d'excitation. Le signal polychromatique passe ensuite dans un monochromateur pour aboutir à un signal monochromatique, dont l'intensité est amplifiée dans un photomultiplicateur (type 1P28). L'intensité du signal est alors mesurée par un oscilloscope digital (HP54522A), qui transmet le signal à un ordinateur. Un module permet de gérer l'ouverture et la fermeture des trappes permettant l'excitation par le laser et la lecture de l'absorption (figure 2-4).

Préalablement à toute analyse, les valeurs S_0 correspondant à 0 % de transmission (absorbance toutes trappes fermées), et S_{100} correspondant à 100 % de transmission (absorbance de l'échantillon sans excitation laser) sont enregistrées. Les variations de la transmission optique à une longueur d'onde donnée peuvent ainsi être converties en variation de l'absorbance ΔA_t à un instant t donné par la relation : $\Delta A_t = \log[(S_{100} - S_0) / (S_t - S_0)]$ où S_t représente la valeur du signal à un instant t après excitation.

4.1.2 Etude des espèces chimiques transitoires

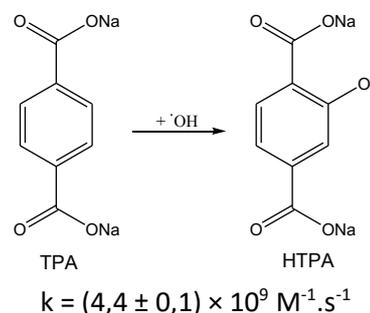
Dans un premier temps, les spectres d'absorption des eaux allant de 300 à 720 nm avec un pas de 20 nm ont été réalisés pour chacune des eaux en utilisant une cellule de 1 cm en quartz surmontée

d'un réservoir de 15 mL. Toutes les 10 expériences, la solution a été homogénéisée en agitant le réservoir afin de ne pas changer de solution pendant l'expérience.

Dans un second temps, l'identification des espèces chimiques transitoires a été menée en plaçant les solutions étudiées dans une cellule en quartz de 1 cm de trajet optique (d'un volume environ égal à 3 mL) et a été agitée après chaque flash d'excitation. Les espèces chimiques transitoires étant faiblement concentrées dans les eaux naturelles, une série de 5 expériences moyennées a dû être réalisée pour chaque longueur d'onde afin de diminuer le bruit de fond et d'avoir une lecture mieux résolue du signal.

4.2 Utilisation de sonde chimique

Pour mesurer la quantité de radicaux hydroxyles formée dans les eaux naturelles, un piège chimique a été utilisé : l'acide téréphtalique (TPA). Ce produit est connu pour réagir avec les radicaux hydroxyles d'une façon sélective pour donner l'acide hydroxytéréphtalique (HTPA) qui peut être détecté par fluorescence à 425 nm en LC, selon la réaction suivante (Page et al., 2010) :



Les solutions mères de concentrations 0,049 mM (8,2 mg.L⁻¹) pour TPA et 0,052 mM (9,5 mg.L⁻¹) pour HTPA ont été réalisées dans l'eau ultrapure à pH 8 pour aider à la solubilisation. Les paramètres d'analyses de TPA et HTPA par LC-UV-Fluo sont décrits dans la partie 5.3. A l'aide des cinétiques de dégradation de TPA et HTPA déterminées dans les différentes eaux (à l'obscurité et sous irradiation), il a été possible de quantifier les radicaux hydroxyles.

4.3 Mesure de la réactivité des espèces radicalaires par réactions de compétition

Les constantes de réactions entre les produits organiques (P) et les radicaux (X^{*}) ont été déterminées en mettant en œuvre des réactions de compétition. La méthode mise en place consiste à faire varier la concentration d'un compétiteur (C) ou alors la concentration de P et de suivre la disparition de P, de C ou encore de X^{*}. Deux méthodes ont été employées : sous excitation continue et sous excitation de courte durée de vie (LFP pour laser flash photolysis).

Sous **excitation continue**, si on suit la disparition du composé P, sa constante de vitesse de réaction (k_p) vis à vis du radical X^{*} en présence du compétiteur (C) (dont on connaît par la littérature la

constante de réaction (k_c) vis-à-vis de X^*) a pu être déterminée en s'appuyant sur les réactions et équations suivantes :

- En absence de C : $X^* + P \rightarrow$ photoproduits de P

Alors la vitesse de disparition de P (v_p) en absence de compétiteur est $v_p = k_p[X^*][P]$

avec $[X^*]$ la concentration en radicaux X^* et $[P]$, celle du composé P.

- En présence de C : $X^* + C + P \rightarrow$ photoproduits de C + photoproduits de P

Alors la vitesse de disparition de P (v'_p) en présence de compétiteur est $v'_p = k_p[X^*][P] - k_c[X^*][C]$

soit encore $v'_p = [X^*](k_p[P] - k_c[C])$

avec $[C]$ la concentration en compétiteur.

Le rapport des vitesses de disparition de P en présence et en absence de C s'exprime alors de la façon suivante :

$$\frac{v'_p}{v_p} = \frac{k_p[P] - k_c[C]}{k_p[P]} = 1 - \frac{k_c}{k_p[P]}[C]$$

La constante k_p est alors déterminée à partir du tracé du rapport $\frac{v'_p}{v_p}$ en fonction de la concentration du compétiteur $[C]$ et de la valeur de la pente ($\frac{k_c}{k_p[P]}$), k_c et $[P]$ étant connues. Il est à noter que, dans cet exemple, la concentration de C est celle que nous avons fait varier et l'ordonnée à l'origine doit être proche de 1 pour vérifier cette relation.

Sous **excitation de courte durée de vie**, la méthode est basée sur le suivi de la formation d'une espèce de courte durée de vie (C^*) issus de la réaction d'un compétiteur C avec le radical X^* (dont on connaît par la littérature la constante de réaction (k_c) vis-à-vis de X^* , selon l'équation suivante :

- En absence de P : $C + X^* \rightarrow C^* + X$

Alors la vitesse de disparition de X^* sera égale à $k_c[C][X^*]$

avec $[C]$ la concentration du compétiteur et $[X^*]$ celle des radicaux.

- En présence du composé P : $X^* + P \rightarrow$ produits de P

Alors la vitesse de disparition de X^* sera égale à $k_p [P][X^*]$

avec $[P]$ la concentration du composé P.

Soit alors une vitesse de disparition de X^* en présence de C et de P égale à $k_c[C][X^*] + k_p[P][X^*]$. Or, ce radical ne pouvant être détecté directement, la formation de C^* nous a permis d'obtenir une constante de vitesse observée, k_{obs} , égale à $k_c[C] + k_p[P]$.

Le tracé de k_{obs} en fonction de $[C]$ nous permet de déterminer l'ordonnée à l'origine ($k_p[P]$) et donc d'accéder à la constante de vitesse de réaction (k_p) du composé P vis à vis du radical X^* .

5. Analyses chimiques

5.1 Caractérisation chimique des eaux

Les phases dissoute et particulaire des eaux naturelles ont été analysées séparément afin de déterminer différents paramètres globaux et contenus inorganiques, à savoir : le carbone organique dissous (COD), le carbone inorganique dissous (CID), le carbone total (CT), l'azote total (NT), la matière organique particulaire (MOP), les matières en suspension (MES), la concentration en anions (chlorure, bromure, sulfate, nitrate, nitrite, carbonate), et la concentration en fer.

Détermination de CID, CT, COD et NT. Ces valeurs ont été mesurées grâce à un analyseur C/N Analytik Jena. La concentration en CID a été mesurée par analyse infrarouge des gaz de CO_2 libérés après acidification de l'échantillon (500 μ L) par du H_3PO_4 à 10 %. Les mesures de COD et NT ont été réalisées à l'aide d'une technique d'oxydation catalytique à haute température. L'échantillon (500 μ L) a été injecté dans un four garni de billes de catalyseur à base de platine (Pt) pré-conditionnées. La combustion a été réalisée à 800 °C et les gaz de combustion ont été transportés par un gaz vecteur d'oxygène pur (Linde Gas) vers un détecteur infrarouge non dispersif (NDIR) pour la mesure du CO_2 pour le paramètre carbone total dissous (CD) puis vers un détecteur de chimiluminescence (CLD) pour la mesure du NT. La concentration de COD a été calculée en soustrayant la concentration de carbone inorganique dissous (CID) de la concentration en carbone total (CT). Chaque échantillon a été analysé en triplicat. Le NDIR a été préalablement calibré par de l'hydrogénophthalate de potassium pour le COD et par un mélange de carbonate de sodium et d'hydrogencarbonate de sodium pour le CID. Le CLD a été étalonné par un mélange de sulfate d'ammonium et de nitrate de potassium.

Détermination de la MOP. La matière organique particulaire (MOP) a été estimée par la méthode de la perte au feu. Les échantillons ont été filtrés sur des filtres Whatman GF/F (pré-conditionnés par combustion) qui ont ensuite été placés dans une nacelle céramique et chauffés à 550°C toute une nuit. Les échantillons ont alors été mis à refroidir dans un dessiccateur et pesés. La MOP a été calculée par la différence entre la masse initiale et la masse finale.

Détermination de la MES. Les matières en suspension ont été quantifiées suivant la norme NF EN 872:1996. Les échantillons (1 L pour les eaux de rivière et d'étang et 250 mL pour l'eau de mer) ont été filtrés sur des filtres en fibre de verre de type Whatman GF/F préalablement rincés à l'eau déminéralisés et séchés à 105°C. Après filtration, les filtres ont été placés à l'étude à 105°C pendant 1 h puis laissés à refroidir à température ambiante dans un dessiccateur pendant 2 h. Le calcul de MES se fait par différence entre la masse initiale du filtre sec et la masse après filtration du filtre sec.

Analyse des anions minéraux. L'analyse des anions chlorure, sulfate, bromure, nitrate a été réalisée par chromatographie ionique haute performance suivant la méthode EN ISO 10304-2 :1996 sur un système ICS3000 (Dionex, USA) piloté par la logiciel Chromeleon® v6.80. Le système était équipé d'une colonne de garde (Dionex AG11-HC) suivie d'une colonne séparative Dionex AS11-HC (4 × 250 mm), d'un détecteur conductimétrique (Dionex CD-25) et d'une boucle de 25 µL montée sur une électrovanne d'injection. Les analyses ont été réalisées en mode isocratique à l'aide d'un éluant constitué de soude à une concentration de 22,5 mM préparée dans de l'eau déminéralisée préalablement purgée à l'hélium. Le débit d'éluant a été fixé à 1,5 mL.min⁻¹ et l'ensemble du système était régulé à 30°C. Pour améliorer le rapport signal/bruit lors de la mesure de la conductivité, un supprimeur électrochimique (ACRS 500 4 mm) a été ajouté au système analytique. Cependant pour les eaux salées, les mesures ont dû être réalisées à partir de kits colorimétriques.

Analyse du fer. Le fer dissous et particulaire a été quantifié par spectrométrie d'émission atomique à couplage plasma inductif (ICP-AES). Pour les mesurer, tous les échantillons ont été filtrés avant analyse sur une membrane PolyEtherSulfone d'une porosité de 0,45 µm. Pour la détermination du fer particulaire, les filtres ont été minéralisés en four à micro-ondes (Milestone Start D) dans un milieu eau régale (*aqua regia*) composée d'un mélange de 7 mL HCl et de 3,5 mL HNO₃. Les produits de la minéralisation ont été filtrés sur membrane 0,45 µm et complétés à 50 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau déminéralisée (18,2 MΩ de résistivité). Le fer dissous et particulaire a été quantifié à l'aide d'un système JY2000 Ultratrace (Jobin-Yvon, France) équipé d'une chambre de nébulisation en

verre Meinhard TR50-C1. Les analyses ont été réalisées en utilisant les paramètres suivants : puissance 1000 W, débit de pompe 20 mL.min⁻¹, débit de gaz plasma 12 L.min⁻¹, débit de gaz vecteur 0,2 L.min⁻¹, débit du nébuliseur 0,83 L.min⁻¹ à une pression de 3,1 bars.

5.2 Spectres d'absorption UV-Visible des composés et eaux étudiés

Un spectrophotomètre d'absorption UV-visible Perkin Elmer Lambda 35 a été utilisé ainsi que des cellules en quartz de 1 cm de trajet optique afin de réaliser les spectres d'absorption de chacune des eaux mais également de CBZ, OxCBZ et 9-CAA à la fois pour développer les méthodes LC-UV et pour calculer leur rendement quantique de transformation.

5.3 Dosage des composés par LC-UV-Fluorescence

Le dosage des composés a été réalisé par chromatographie liquide ultra haute performance (LC ou LC) sur une chaîne Perkin Elmer (modèle FX 10) équipée de deux détecteurs, l'un à barrettes de diodes (modèle Flexar PDA Plus) disposant d'une cellule haute sensibilité (trajet optique de 50 mm et volume de 5 µL) et l'autre à fluorescence (modèle Flexar). La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne Brownlee SPP (Surficially Porous Particles) RP-amide (150 mm x 2,1 mm ; 2,7 µm) équipée d'une précolonne Brownlee SPP C18 (5 mm x 2,1 mm ; 2,7 µm) distribuée par la société Perkin Elmer. Le débit de la phase éluante a été fixé à 0,5 mL.min⁻¹ et cette phase était composée d'un mélange d'acétonitrile (A) et d'eau ultrapure avec 0,1 % d'acide formique (v/v) (B). Les données sont traitées par le logiciel Chromera. Les paramètres d'analyse des différents composés sont représentés dans le tableau 2-6.

La quantification des composés a été réalisée à partir de droites d'étalonnage allant de 0,05 à 5 mg.L⁻¹ pour CBZ, OxCBZ et 9-CAA et de 1 .10⁻⁸ M à 4,9 .10⁻⁵ M pour TPA et 5 .10⁻⁹ M à 5 .10⁻⁶ M pour HTPA. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été calculées graphiquement sur le plus bas point de gamme à partir de la hauteur du signal (S) sur la hauteur du bruit de fond (N). Ces déterminations ont pu être faites en considérant que la LD correspond à la concentration pour laquelle le rapport S/N est égal à 3 et la LQ, la concentration pour laquelle ce rapport est égal à 10.

Tous les échantillons ont été injectés trois fois et des injections régulières de blanc analytique et d'étalons de contrôle ont été réalisées toutes les 6 injections afin de s'assurer de la stabilité de la réponse des détecteurs et de l'absence de contamination. Pour les expérimentations, les écarts-types et les coefficients de variations ont été calculés à partir de triplicats d'injection et étaient inférieurs à 2,7 %.

Tableau 2-6 : Paramètres d'analyse des différents composés par LC

	CBZ		OxCBZ		9-CAA		TPA		HTPA	
V_{inj} (μL)	2		5		0,5		2			
T_{four} (°C)	30		35		30		30			
t_{ret} (min)	4,4		3,7		2,4		4,3		4,8	
Gradient LC	Temps (min)	% B	Temps (min)	% B	Temps (min)	% B	Temps (min)	% B	Temps (min)	% B
	0	80	0	80	0	95	0	95	0	80
	7	80	7	80	5	95	7	95	7	80
	10	50	10	50			13,5	50	10	50
	12,2	50	12,2	50						
Détecteur DAD	λ_{dét} (nm)		λ_{dét} (nm)		λ_{dét} (nm)		λ_{dét} (nm)		λ_{dét} (nm)	
	285		256 et 304		255 et 355		241 et 247		311	
Détecteur Fluo					λ_{exc} (nm)	λ_{ém} (nm)			λ_{exc} (nm)	λ_{ém} (nm)
					245	431			320	425
LD	7,1 μg.L ⁻¹		6,3 μg.L ⁻¹		9 μg.L ⁻¹		1,3 x 10 ⁻⁷ M		2 x 10 ⁻¹⁰ M	
LQ	23,8 μg.L ⁻¹		20,9 μg.L ⁻¹		30,1 μg.L ⁻¹		4,4 x 10 ⁻⁷ M		6,7 x 10 ⁻¹⁰ M	

λ_{dét} = longueur d'onde de détection, λ_{exc} = longueur d'onde d'excitation et λ_{ém} = longueur d'onde d'émission

V_{inj} = volume injecté, T_{four} = température du four et t_{ret} = temps de rétention

Pour les expériences dans les eaux naturelles, une étape complémentaire de filtration sur filtres en cellulose régénérée (0,2 μm, 15 mm, Agilent Technologies) a été nécessaire avant analyse par chromatographie liquide. Il a été vérifié, au préalable, qu'aucun des composés étudiés n'était retenu sur ce filtre.

Pour chaque expérience, les vitesses de disparition (v, pente de la tangente à l'origine de la courbe C_t/C₀ = f(t)) et les constantes de vitesses d'ordre 1 (k, pente de la tangente à l'origine de la courbe ln(C_t/C₀) = f(t)) ont été déterminées en réalisant une régression linéaire avec le logiciel Origin[®], permettant aussi d'accéder aux incertitudes sur les pentes. Les temps de demi-vie pour des cinétiques d'ordre 1 ont été calculés selon l'équation suivante t_{1/2} = ln(2)/k et en tenant compte des incertitudes sur la constante de vitesse. Les pourcentages de disparition à un instant t, ont été déterminés graphiquement.

5.4 Identification des produits de photodégradation par LC-MSQToF

Les analyses par LC/ESI-MS ont été réalisées par un système LC Agilent 1290 Infinity system, couplé à un spectromètre de masse hybride à haute résolution QToF (quadripôle/temps de vol) (Agilent 6530) équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI). Le pilotage de l'appareil et le retraitement des données sont effectués avec le logiciel Mass Hunter B4.00.

Le gradient d'élution a été modifié afin d'éluer la totalité des produits de transformation tandis que la colonne et le débit sont restés inchangés. Les échantillons de 10 μL sont injectés dans le système

LC utilisant de l'acétonitrile (A) et de l'eau contenant 0,1 % d'acide formique (B) avec le gradient suivant pour CBZ et OxCBZ : 90 % de B (0,5 min), 80 % de B (en 4,5 min), 60 % de B (en 4 min) et 10 % de B (en 5 min). Pour 9-CAA, un gradient différent a été appliqué : 95 % de B (0,5 min), 80 % de B (en 4,5 min), 60 % de B (en 4 min) et 10 % de B (en 5 min).

La calibration en masse du spectromètre a été réalisée dans un premier temps par la pré-acquisition d'un mélange faible concentration provenant d'Agilent Technologies et la correction des masses a été réalisée par l'infusion de molécules de référence pendant l'acquisition hexakis(1H, 1H, 3H, tétrafluoropropoxy) phosphazine et purine de m/z respectivement égaux à 922,0098 et 121,0509 amu.

Les paramètres de la source ont été fixés comme suit : fragmenteur : 140 V, tension du capillaire : 3000 V, skimmer 65 V, pression de nébulisation (30 psi), tension de l'aiguille de nébulisation (500 V), l'azote a été utilisé comme gaz de désolvatation (température 350°C, débit 10 L.min⁻¹), et les température et débit pour le gaz fourreau étaient respectivement fixés à 350°C et 8 L.min⁻¹.

Les solutions étudiées ont été injectées telles quelles ou après reconcentration d'un facteur 5 ou 10 par évaporation sous flux d'air à 40°C et analysées en mode spectrométrie de masse simple (ToF, résolution en masse sur l'ion de $m/z = 922$ de 9382 ± 317) et en mode MS/MS (QqToF) dans certains cas selon l'abondance des fragments. Dans le premier cas, l'acquisition des ions a été effectuée pour des rapports m/z allant de 100 à 1000 amu avec 10000 transients par spectres. Les analytes ont été ionisés en mode positif.

Dans le second cas, les analytes ont été ionisés en mode positif également, les ions précurseurs ont été soumis à trois énergies de collision (10, 20 et 40 eV), et l'acquisition des ions fils a été effectuée pour des rapports m/z allant de 50 à 1000 amu.

6. Evaluation de l'écotoxicité des 3 composés pharmaceutiques sélectionnés

L'écotoxicité des trois composés a été étudiée pour les produits pris individuellement et en mélange sur les trois espèces *Vibrio fischeri* (Beijerinck 1889) Lehmann & Neumann 1896, *Lemna minor* L., 1753 et *Hydra circumcincta* Schulze, 1914. Une étude bibliographique a permis de cibler les gammes de concentrations à tester. Ainsi pour *V. fischeri*, la gamme de concentration est comprise entre une dizaine de mg.L⁻¹ à une centaine de mg.L⁻¹, pour *L. minor* entre une dizaine de ng.L⁻¹ à une dizaine de mg.L⁻¹ et pour l'espèce *H. circumcincta*, une gamme de concentrations environnementales mesurées en sortie de STEU ont été testées (Kaiser et al., 2014). Ces concentrations environnementales sont

également les concentrations testées pour évaluer l'écotoxicité du mélange des 3 composés (27 ng.L⁻¹ pour OxCBZ, 900 ng.L⁻¹ pour 9-CAA et une concentration de 600 ng.L⁻¹ pour CBZ).

6.1 Evaluation de l'écotoxicité aigüe

6.1.1 Mesure de la diminution de bioluminescence chez *Vibrio fischeri*

La bactérie marine *V. fischeri* a été utilisée afin d'étudier l'écotoxicité aigüe des 3 composés pharmaceutiques seuls mais également en mélange.

6.1.1.1 Présentation du modèle

Vibrio fischeri est une bactérie marine, flagellée, bioluminescente, hétérotrophe, Gram-négative non pathogène. Cette bactérie a la particularité d'émettre de la luminescence lors de sa croissance (figure 2-5). Cette bioluminescence est liée à la respiration cellulaire qui est, elle-même, liée au métabolisme cellulaire. L'activité de la cellule induisant une baisse de la bioluminescence en présence de composés toxiques, est donc un très bon indice d'état de la bactérie. L'intérêt de ce bioessai réside dans sa simplicité d'exécution pour évaluer l'écotoxicité de polluants et la rapidité de rendu des résultats (détermination de l'EC₅₀, en 15 ou 30 minutes).

Ce test s'applique aux eaux usées, aux extraits aqueux et aux lixiviats, aux eaux douces (eaux de surface ou souterraines), à l'eau de mer ou aux eaux saumâtres, aux éluats de sédiments (eau douce, eau saumâtre et eau de mer), aux eaux interstitielles et aux substances individuelles diluées dans l'eau. La norme 11348 décrit trois méthodes de détermination de l'inhibition de luminescence émise par la bactérie marine *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177). L'ISO 11348-1:2007 spécifie une méthode utilisant des bactéries fraîchement préparées, l'ISO 11348-2:2007 des bactéries déshydratées et l'ISO 11348-3:2007 des bactéries lyophilisées.

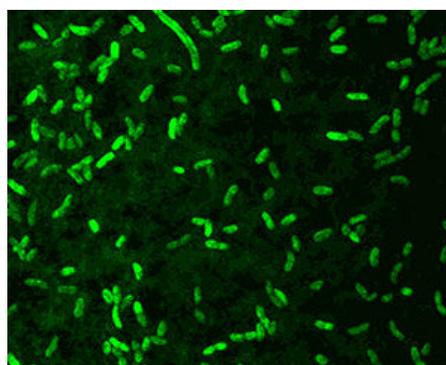


Figure 2-5: Visualisation de la bioluminescence de la bactérie *Vibrio fischeri*

6.1.1.2 Origine de la souche et matériel utilisé

Les cellules procaryotes utilisées dans le biotest Microtox sont obtenues exclusivement à partir d'une souche clonée de la bactérie marine *V. fischeri* NRRL B-1117, isolée, cultivée et entretenue par

le fabricant. Cette souche clonale est déposée par SDI au Northern Regional Research Laboratory, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Peoria, IL, USA. Le luminomètre Microtox ainsi que les réactifs utilisés (solution osmotique (22 % de NaCl), diluant (2 % de NaCl), solution de reconstitution (eau ultrapure non toxique), les cuvettes et les bactéries Microtox proviennent de la société R-Biopharm.

6.1.1.3 Application de la Norme ISO

Le principe de cette méthode est normalisé ISO 11348-3 : Qualité de l'eau – Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri* (Essai de bactéries luminescentes) – Partie 3 : méthode utilisant des bactéries lyophilisées. Cette méthode repose sur la mesure de la variation de luminescence induite par l'exposition des bactéries à une substance.

Lors de l'expérience, un lot de bactéries lyophilisées a été sorti du congélateur (-20 °C) et réhydraté avec une solution de reconstitution pour fournir une suspension mère d'organismes prête à l'emploi (environ un million d'organismes par cuvette). Compte tenu de la culture clonale de cette souche, les différences génétiques sont amoindries et offrent une sensibilité plus importante aux expositions.

Avant d'étudier l'écotoxicité des composés ciblés, un test de contrôle préliminaire a été réalisé sur une substance dite de référence (le phénol) pour rendre compte de la viabilité des bactéries et pour s'assurer de la précision des pipetages. Connaissant l'EC₅₀ de cette substance, il a ainsi été possible de confirmer les bonnes conditions de chaque manipulation.

Les bactéries remises en suspension ont été exposées à une gamme de concentration de chaque produit en partant de leur solubilité maximale dans l'eau. Pour cela, le pH des solutions mères contenant les composés pharmaceutiques dans l'eau ultrapure, a été ajusté entre 6 et 8,5, tout comme l'osmolarité grâce à l'ajout de NaCl. Les 8 dilutions testées ont directement été préparées en suivant la norme ISO donnée par le logiciel d'utilisation MicrotoxOmni (concentrations allant de 6,25 à 80 % de la concentration de la solution mère). Dans le cadre du mélange, une solution contenant CBZ, OxCBZ et 9-CAA à respectivement 4,8 µg/L, 320 ng/L et 7,2 µg/L a été réalisée pour que la dilution à 12,5 % corresponde aux concentrations environnementales en sortie de STEU (soit CBZ: 600 ng/L, OxCBZ: 27 ng/L and, 9-CAA: 900 ng/L). La mesure de luminescence a été effectuée après 15 et 30 min grâce à un luminomètre Microtox 500 (figure 2-6) thermostaté à 15°C. Cet appareil permet de réaliser la lecture du niveau de bioluminescence avec l'aide du logiciel : MicrotoxOmni.

L'appareil Microtox a permis de mesurer des valeurs d'écotoxicité aiguës : EC₅₀, pour chacun des composés individuellement et pour le mélange de polluants à des concentrations environnementales.



Figure 2-6 : Luminomètre thermostaté Microtox 500

6.1.1.4 Screening et basic tests

Afin de mesurer l'écotoxicité des eaux naturelles dopées en CBZ avant et après irradiation, un autre protocole a été testé. Préalablement, le pH des échantillons a été ajusté entre 8 et 8,5 et ces derniers ont été filtrés sur filtre en cellulose 0,2 μm afin de s'affranchir des matières en suspension. Dans un premier temps, un screening test, à 81,9 % de la concentration initiale, a été appliqué afin de définir le degré de toxicité de l'échantillon. Ces derniers s'avérant de faible toxicité, un basic test à 81,9 %, comprenant une série de 8 dilutions, a été réalisé pour définir les EC_{50} des eaux naturelles dopées avec CBZ avant et après irradiation.

6.2 Evaluation de l'écotoxicité chronique

6.2.1 *Mise au point d'un test par la mesure non-destructive de phytométabolites chez Lemna minor*

6.2.1.1 Présentation du modèle

Cette espèce cosmopolite *Lemna minor* L. (figure 2-7) est utilisée dans les essais de détection de la phytotoxicité depuis les années 30. Le test d'inhibition de la croissance de population de *Lemna minor* est un test normalisé de toxicité simple et standardisé (OCDE 221, 2006) qui mesure la toxicité chronique de solutions aqueuses en mesurant l'inhibition de la croissance. Cependant, les effets sur la croissance reflètent la somme d'altérations métaboliques qui ne peuvent devenir détectables qu'à partir d'un temps suffisant ou de concentrations en polluants au-dessus d'un certain seuil. Notre

hypothèse est que le suivi de phytométabolites peut informer de manière précoce sur les effets de ces expositions.

6.2.1.2 Origine de la souche et conditions de culture

Les lentilles d'eau de l'espèce *L. minor* ont été prélevées dans un bassin d'eau douce dans le jardin botanique de l'Université d'Aix-Marseille, campus de Saint-Jérôme. Après prélèvement, les lentilles ont été placées dans un bac d'eau désionisée contenant 10 % de milieu de culture de Hoagland modifié (Sigma-Aldrich). Le milieu de culture a été ajouté toutes les 1 à 2



Figure 2-7 : Lentilles sans nutriment (gauche) et lentilles après une semaine d'acclimation (droite)

semaines pour garantir une bonne prolifération des lentilles (figure 2- 7). Afin d'optimiser le développement des lentilles d'eau et d'éviter la prolifération algale, les bacs de culture ont été placés dans un phytotron (enceinte régulée en température, lumière et humidité) présentant un éclairage d'intensité lumineuse faible pour éviter la prolifération algale et limiter l'évaporation de $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de 7 h à 18 h et aucun entre 18 h et 7 h, 60 % d'humidité et une température assez basse de 15°C.

6.2.1.3 Mise au point du protocole et étude des phytométabolites

L'expérience d'exposition des lentilles d'eau a été réalisée avec les 3 composés (CBZ, OxCBZ et 9-CAA) dans des cristallisoirs en verre. Les solutions mères des composés ont été réalisées dans l'eau désionisée. Dans des fioles de 100 mL, 10 % de milieu de Hoagland a été ajouté pour un bon développement des lentilles, ainsi que le composé à la concentration désirée et de l'eau désionisée. Le pH a également été ajusté entre 6 et 7 avec KOH ou HCl. Une gamme de 3 concentrations a été testée pour chaque composé et chaque expérience a été répliquée 5 fois (tableau 2-7). Un témoin avec uniquement de l'eau désionisée et la solution de Hoagland a également été répliqué 5 fois.

Tableau 2-7 : Concentrations testées sur les lentilles d'eau

Composés	Concentrations étudiées		
CBZ	600 ng.L ⁻¹	600 µg.L ⁻¹	60 mg.L ⁻¹
OxCBZ	27 ng.L ⁻¹	270 µg.L ⁻¹	24 mg.L ⁻¹
9-CAA	900 ng.L ⁻¹	900 µg.L ⁻¹	15 mg.L ⁻¹
Mélange	$\Sigma_{\text{CBZ+OxCBZ+9CAA}}$	-	-

Chaque dilution de 100 mL a été répartie par volume de 30 mL dans des cristallisoirs numérotés pour avoir chaque concentration en triplicat. L'équivalent de 15 mL de lentilles d'eau a été récupéré puis transvasé dans une passoire avant d'être égoutté délicatement sur un papier absorbant. Les lentilles ont ensuite été pesées dans une boîte de pétri, préalablement tarée, pour obtenir une masse fraîche proche de 1,15 g puis transférées dans les cristallisoirs. Les lentilles étaient ainsi à confluence. Les cristallisoirs ont ensuite été placés dans un phytotron suivant les conditions indiquées précédemment (figure 2-8). Une évaporation du milieu ayant quand même été constatée, le niveau d'eau de chaque cristallisoir a été ajusté chaque jour. L'expérience a été menée sur 17 jours. Chaque jour, 3 mesures avec un équipement de mesure non-destructive des phytométabolites par fluorescence (Multiplex, Force-A®) ont été réalisées sur chaque réplicat de chaque concentration.



Figure 2-8 : Expérience sur les lentilles d'eau en phytotron

Le multiplex est un appareil de mesure optique portable (fluorimètre, figure 2-9) et non destructif qui renseigne sur l'état physiologique des plantes en donnant des indices proportionnels à la présence de métabolites primaires (chlorophylles) et secondaires (composés phénoliques). Cet

appareil nous a permis de mesurer ces paramètres au niveau des tissus superficiels des feuilles de lentilles d'eau de manière non-destructive chaque jour pendant l'expérience sur une durée de 17 jours et de faire un suivi de plusieurs indices :

- ANTH, indice des anthocyanes
- SFR (simple fluorescence ratio), indice de chlorophylles
- FLAV, indice des flavonols
- NBI (nitrogen balance index), marqueur de la balance azote/carbone



Figure 2-9 : Equipement portable pour la mesure de la fluorescence des phytométabolites (Multiplex, FORCE-A®, Orsay)

6.2.2 Mise au point d'un test sur *Hydra circumcincta*

6.2.2.1 Présentation du modèle

Ce Cnidaire suscite un intérêt grandissant chez les écotoxicologues, bien qu'il n'existe pas de test normalisé utilisant cet organisme. Les Cnidaires sont des organismes diploblastiques à la base des Métazoaires, c'est-à-dire que le corps de l'animal est formé de deux feuillets cellulaires, ectoderme et endoderme, composés d'une vingtaine de types cellulaires différents (Martínez, 1998; Müller, 1995). Les feuillets sont séparés par une mésoglée qui est une couche aqueuse contenant du collagène, de la fibronectine, de la laminine et des protéoglycanes (Pachura-Bouchet, 2005). Leur caractère diploblastique implique un échange constant de l'ensemble de leurs cellules avec le milieu, ainsi, lors des expositions toutes les cellules de l'hydre sont en contact direct avec les substances à tester, ce qui confère une certaine « sensibilité » à cet animal. De plus, la reproduction asexuée par bourgeonnement permet un élevage simple et rapide avec l'obtention de nouveaux individus génétiquement identiques en seulement quelques jours. Enfin, la population exposée, issue d'un clone, permettra de minimiser les variations individuelles.

Ils représentent le premier phylum animal possédant un système nerveux organisé en relation avec un comportement actif et complexe permettant par exemple à l'hydre d'eau douce de capturer ses proies. Le plan d'organisation simple d'*Hydra circumcincta* (figure 2-10) et les capacités de régénération et de reproduction asexuée font de cet organisme un modèle prometteur dans une multitude de champs de recherches (Galliot, 2012).

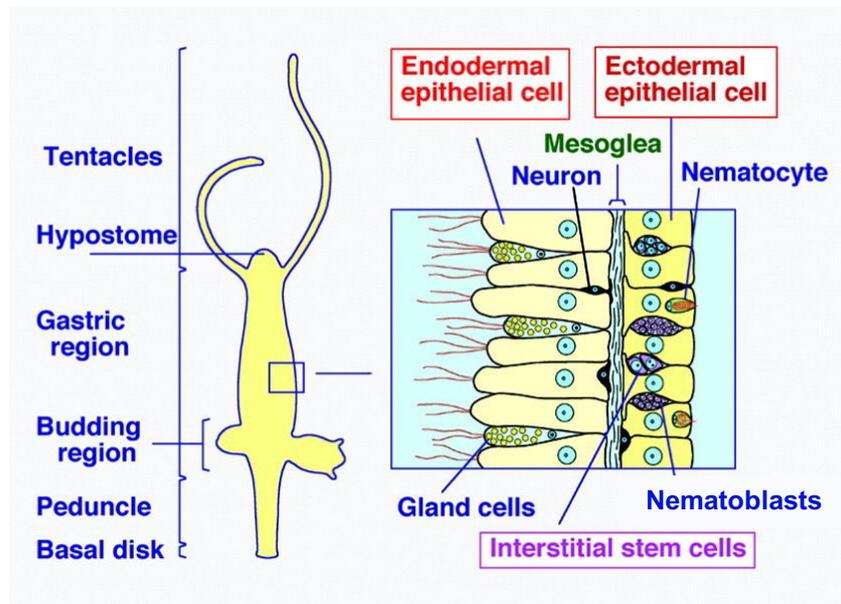


Figure 2-10 : morphologie et histologie de l'hydre d'eau douce (d'après Fujisawa, 2003).

Traduction des légendes : *Basal disk* = sole pédieuse ; *Budding region* = zone de bourgeonnement ; *Ectodermal epithelial cell* = cellule épithéliale de l'ectoderme ; *Endodermal epithelial cell* = cellule épithéliale de l'endoderme ; *Gastric region* = région gastrique ; *Gland cells* = cellules glandulaires ; *Hypostome* = hypostome ; *Interstitial stem cells* = cellules souches interstitielles ; *Mesoglea* = mesogléa ; *Nematoblasts* = cnidoblaste ; *Nematocyte* = cnidocyte ; *Neuron* = neurone ; *Peduncle* = pédoncule ; *Tentacles* = tentacules

Parmi le large panel de réponses biologiques que nous pouvons étudier, nous avons choisi : (1) d'évaluer les changements morphologiques des polypes exposés reflétant directement la toxicité pendant l'exposition aux pharmaceutiques ; (2) la capacité de reproduction asexuée qui, si elle est modifiée, peut avoir des répercussions sur la *fitness* de la population ; (3) les capacités de capture et d'ingestion des proies qui influencent directement la capacité de reproduction asexuée ; (4) la distribution de deux neuromodulateurs, la dopamine et la sérotonine, tous deux impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques ; (5) l'état de la balance oxydative pouvant traduire la mise en place de mécanismes de résistance et également des dommages sur les membranes cellulaires.

6.2.2.2 Origine de la population et conditions de culture

La population d'*Hydra circumcincta* (figure 2-11) provient d'un seul individu issu d'une population gracieusement donnée par le Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (Université Lorraine, Metz, France). Tous les spécimens utilisés dans cette expérience ont été obtenus par une reproduction asexuée (bourgeonnement d'un seul individu). Son élevage a été réalisé selon le protocole de Trottier et al. (1998) modifié par de Jong et al. (2016). Le milieu de culture est composé de 0,11 g.L⁻¹ de tampon TES (Acide 2-[[1,3-dihydroxy-2-(hydroxyméthyl)-2-propanyl]amino]-éthanesulfonique) ainsi que de 0,004 g.L⁻¹ d'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) et de 0,147 g.L⁻¹ de CaCl₂, 2H₂O. Le pH du milieu est maintenu à 7 ± 0,1. L'élevage de polypes a été réalisé à une température constante de 19,5 ± 0,1°C avec une photopériode de 12 : 12 h, obscurité : lumière, dans des plats en pyrex recouverts pour éviter toute évaporation. Les polypes ont été nourris tous les deux à quatre jours avec des nauplii d'*Artemia sp.*



Figure 2-11 : *Hydra circumcincta*
(oculaire : x10 ; objectif : x1)

Les expériences ont été menées sur une période de 2 semaines à deux températures. La première à 19,5°C, conditions optimales pour les hydres (Pachura et al., 2005; Trottier et al., 1998) et la seconde à 23°C afin de simuler un effet lié à une augmentation de température de 3,5°C prévue dans le scénario le plus pessimiste lié au réchauffement climatique. Aux cours de ces expériences, plusieurs paramètres ont été suivis : la morphologie des polypes, le taux de reproduction, la distribution de deux neuromodulateurs (dopamine et sérotonine) et deux paramètres de la balance oxydative, la capacité antioxydante totale (AOC) et la peroxydation des lipides membranaires (LPO).

L'expérience a été réalisée dans des puits de microplaques en polycarbonate de 10 mL. Dans chaque puits, ont été placées 12 hydres. Ces dernières ont été nourries 24 h avant le début des expérimentations et ne devaient pas présenter de bourgeons. Huit millilitres de chaque solution ont été ajoutés par puits en suivant les concentrations indiquées dans le tableau 2-8. Les concentrations ont été testées en triplicats. Tous les 3 jours, les hydres ont été nourries avec des artémias avec un renouvellement du milieu après digestion et régurgitation des débris de proies.

Tableau 2-8 : Concentrations en composés pharmaceutiques testés sur les Hydres

Condition	Concentration ou composition
Témoin	0 ng.L ⁻¹
CBZ	605 ng.L ⁻¹
OxCBZ	27 ng.L ⁻¹
9CAA	900 ng.L ⁻¹
Mélange	CBZ + OxCBZ + 9CAA

6.2.2.3 Analyse morphologique

Pour évaluer la toxicité des composés, les stades morphologiques de l'hydre ont été déterminés par une observation à la loupe binoculaire. Les stades morphologiques sont décrits par Pachura et al. (2005). Brièvement, 6 stades ont été définis selon l'état physiologique de l'hydre (figure 2-12) : **a** : stade normal, **b** : premiers signes d'intoxication, apparition de bulbes au bout des tentacules, **c** : seconds signes d'intoxication, rétractation modérée des tentacules et du corps, **d** : seconds signes d'intoxication, rétractation très prononcée des tentacules et du corps, **e** : stade tulipe, les tentacules et le corps sont complètement rétractés. Ce dernier stade conduit à la mort des animaux, stade **f**. Les stades **b** à **d** sont considérés comme sublétaux et donc réversibles contrairement aux stades **e** et **f**.

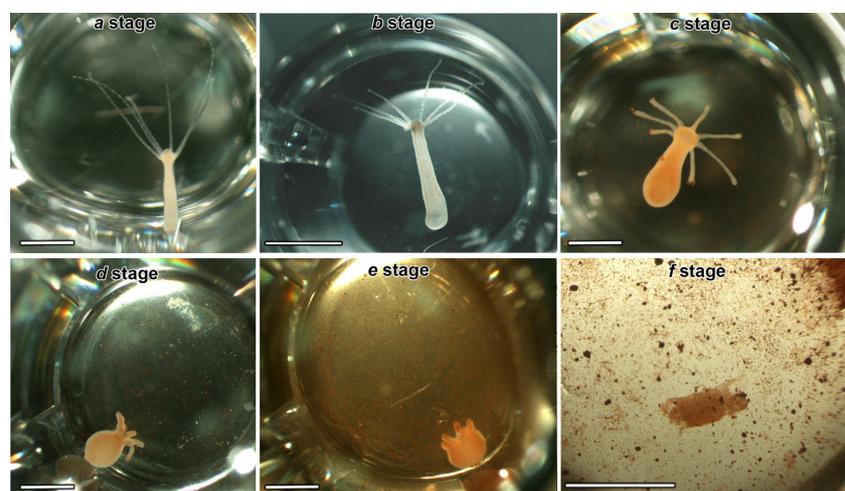


Figure 2-12: 6 stades morphologiques d'*Hydra circumcincta* observés par de Jong et al. (2016)

6.2.2.4 Taux de reproduction des hydres

Au cours des expositions à CBZ, OxCBZ, 9-CAA ainsi qu'à leur mélange, les hydres et les bourgeons ont été dénombrés tous les 3 jours avant le nourrissage. Le taux de reproduction de l'hydre

(RHR) a été calculé en tenant compte uniquement des individus détachés et est donné par la formule suivante :

$$RHR = \frac{N_t - N_0}{N_0} \times 100$$

où N_t est le nombre d'hydres à l'instant t et N_0 le nombre d'hydres au jour 0 (Arkhipchuk et al., 2006).

6.2.2.5 Mesure des paramètres de la balance oxydative

Après les expositions à CBZ, OxCBZ, 9-CAA ainsi qu'à leur mélange, les hydres ont été asséchées puis congelées à -80 °C. La capacité antioxydante totale, AOC, a été mesurée selon les instructions données par le fournisseur (kit de dosage AOC, Cayman chemical®, Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France). La peroxydation lipidique (LPO) a été dosée grâce aux substances réagissant à l'acide thiobarbiturique selon les instructions données par le fournisseur (kit TBARS, Cayman chemical®, Bertin Pharma). Le dosage spectrophotométrique de l'AOC consiste en la mesure de la capacité des processus antioxydants de l'organisme à inhiber l'oxydation d'un substrat réduit (incolore, mais coloré une fois oxydé) par un oxydant, puis à la comparer à un antioxydant connu. Le dosage spectrophotométrique de la LPO va quantifier le malondialdéhyde, un produit de la LPO. Ces deux dosages ont été ramenés à la masse de protéines afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux. Ils ont été réalisés pour les témoins, pour chacun des composés testés individuellement et pour le mélange après 2 semaines d'exposition.

6.2.2.6 Distribution de la sérotonine et de la dopamine

L'immunohistochimie (IHC) est une méthode qui permet de détecter des protéines dans des tissus biologiques au moyen d'anticorps spécifiquement dirigés contre celles-ci. Le complexe anticorps-protéine d'intérêt dans les tissus peut ensuite être visualisé à l'aide d'un marqueur, par exemple, un fluorochrome, une enzyme, une molécule radioactive. Cette méthode de détection dite « directe » est cependant moins sensible. La localisation des molécules a donc été réalisée par IHC « indirecte », d'abord en incubant le tissu avec un 1er anticorps spécifique du neuromodulateur recherché, puis en incubant avec un anticorps secondaire spécifiquement dirigé contre l'anticorps primaire. Ainsi, en utilisant des fluorochromes conjugués à l'anticorps secondaire, il a été possible de détecter la liaison anticorps-antigène en observant l'hydre entière sous un microscope à fluorescence.

Après 14 jours d'exposition et aux températures de $19,5$ et 23 °C, les hydres ($n= 5$ minimum) ont été fixées avec du paraformaldéhyde dissout à 4 % (PFA) dans du tampon phosphate salin (TPS, $0,1$ M, pH $7,2$) dans le but de bloquer tout métabolisme et de préserver la structure anatomique du tissu. Les échantillons ont été conservés à 4 °C jusqu'aux expérimentations d'IHC. Ce jour-là, le PFA a

été rincé par du tampon TPS 0,1 M à pH 7,2 pendant 2 h. Puis les sites de liaison non spécifiques des anticorps ont été saturés. Pour cela, les hydres ont été plongées dans du TPS additionné de détergent (Triton X100 à 0,6 %), d'albumine sérique bovine 2 % (BSA) et de sérum de chèvre 10 %. Ces protéines sériques ayant une bonne affinité avec de nombreuses autres protéines, elles permettent par compétition d'assurer la saturation des sites où une réaction croisée avec les anticorps pourrait se réaliser.

- Incubation avec l'anticorps primaire

La solution de saturation a été remplacée par une solution contenant l'anticorps primaire (AC1) produit chez le lapin et dirigé contre la dopamine ou la sérotonine pendant 1 h à 20°C. Cet AC1 a été dilué à 1/200 dans la solution de saturation à partir de la solution du fournisseur (Abcam®, Cambridge, GB ; 1 mg.mL⁻¹).

- Premier rinçage

Pour retirer l'excès d'AC1 non fixé, un rinçage de la solution de l'AC1 a été réalisé avec une solution de rinçage de TPS contenant 0,6 % de Triton x100, 0,2 % de BSA et 1% de sérum de chèvre. Cette étape a été faite 3 fois pendant 5 minutes chacune.

- Incubation avec l'anticorps secondaire

Les hydres ont ensuite été incubées avec une solution contenant l'AC2, anti-AC1, produit chez l'âne (5 µg.mL⁻¹) et couplé à un fluorochrome (Fluoroprobe® 488, Interchim®, Montluçon, France). Cette étape a été réalisée à l'obscurité. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission du fluorochrome sont respectivement 490-495 nm et 520 nm.

- Second rinçage

Même protocole que le premier rinçage afin de retirer l'excès d'AC2 non fixé.

- Montage entre lame et lamelle

Les polypes ont été placés sur une lame en verre et montés entre lame et lamelle dans un liquide de montage contenant un agent limitant la décroissance de la fluorescence (Cityfluor AF₃®, Euromedex)

- Observation des lames

L'observation des lames a été réalisée à l'aide d'un microscope optique (LEICA DMRB) équipé d'une lampe à vapeur de mercure pour l'observation en fluorescence.

Le microscope est équipé d'un filtre laissant passer les longueurs d'ondes de 480 à 490 nm afin d'exciter le fluorochrome qui va ensuite réémettre un faisceau de lumière à 520 nm. Pour éviter de confondre la fluorescence émise par le fluorochrome et celle provenant des tissus de l'hydre, une autre longueur d'onde d'excitation (515 - 535 nm) a permis de vérifier qu'il ne s'agissait pas de bruit de fond. L'expression des neuromodulateurs et leur distribution a permis d'évaluer de façon subjective l'intensité des immuno-marquages fluorescents dans les trois parties majeures du corps de l'hydre (tentacules, région de l'hypostome et cavité gastrique), comme précédemment réalisé par de Jong et al. (2016).

L'acquisition des images a été faite avec le logiciel KAPPA au niveau des tentacules, de la région de l'hypostome ainsi que celle de la cavité gastrique.

6.2.3 Analyses statistiques

Pour les résultats obtenus chez l'espèce *L. minor*, les études statistiques ont été réalisées avec l'aide du logiciel JMP Pro 12. Les moyennes et écarts types ont été déterminés. Dans un premier temps, les tests non paramétriques de Wilcoxon / Kruskal-Wallis ont été appliqués. Si le résultat au test univarié, approximation de Khi deux, donnait des résultats significativement différents, alors une comparaison multiple des moyennes était réalisée à l'aide du test non paramétrique de Dunn.

Concernant les résultats sur l'espèce *Hydra circumcincta S.*, les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel XLStats 2016 (2.28.815). Les données (stades morphologiques, taux de croissance et paramètres de la balance oxydative) de chaque série d'expositions ont été analysées par des analyses de variances (ANOVA) multifactorielle avec interactions suivis de comparaisons par paires par le test de Tukey. Lorsque les conditions n'étaient pas remplies (distribution non normale, échantillons inférieurs à 30 individus...), les données ont été comparées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons par paires de Dunn. Le risque α utilisé est de 5 %.

Chapitre 3 :

Caractérisation des eaux naturelles

Compte-tenu des objectifs de ce travail de thèse et d'après la littérature, il nous est apparu incontournable d'analyser avec le plus de précision possible le contenu chimique des eaux naturelles de surface (rivière Arc, rivière Rhône, mer Méditerranée, étang de Berre), afin de pouvoir comprendre les processus mis en jeu au cours du suivi du devenir de polluants organiques dans ces milieux et de répondre aux questions suivantes :

- Quelle est la composition physico-chimique de chacune des eaux ? Existe-t-il des différences notables entre ces dernières ?
- Quelles sont les propriétés et capacités photo-inductrices des eaux, c'est-à-dire, pouvons-nous identifier les différentes espèces chimiques réactives formées dans les eaux mais également sommes-nous capables de déterminer leurs origines et de les quantifier ?
- Enfin, peut-on établir une corrélation entre le contenu chimique des eaux et les espèces réactives générées sous irradiation lumineuse ?

De ce fait, ce chapitre de résultats présente les propriétés des différentes eaux de surface utilisées au cours de ce travail. Dans un premier temps, les caractéristiques spectroscopiques et physicochimiques de ces eaux ont été développées et commentées en distinguant les phases dissoute et particulaire. Puis, dans un second temps, la mise en évidence des espèces réactives pouvant potentiellement être produites sous irradiation lumineuse de ces eaux ont été détaillées aussi bien du point de vue de la démarche suivie que des méthodologies mises en place et enfin les résultats obtenus ont été discutés. De la même façon, des études sur les phases dissoute et particulaire sont présentées dans cette seconde partie.

1. Propriétés physicochimiques des eaux

1.1 Propriétés spectroscopiques

Les spectres d'absorption UV-visible des différentes eaux (filtrées et non filtrées) sont présentés sur la figure 3-1. Il est possible de se rendre compte que pour l'ensemble des spectres, il existe une zone de recouvrement non négligeable avec le spectre d'émission de la lumière solaire témoignant de la possible formation d'espèces réactives par réaction photochimique.

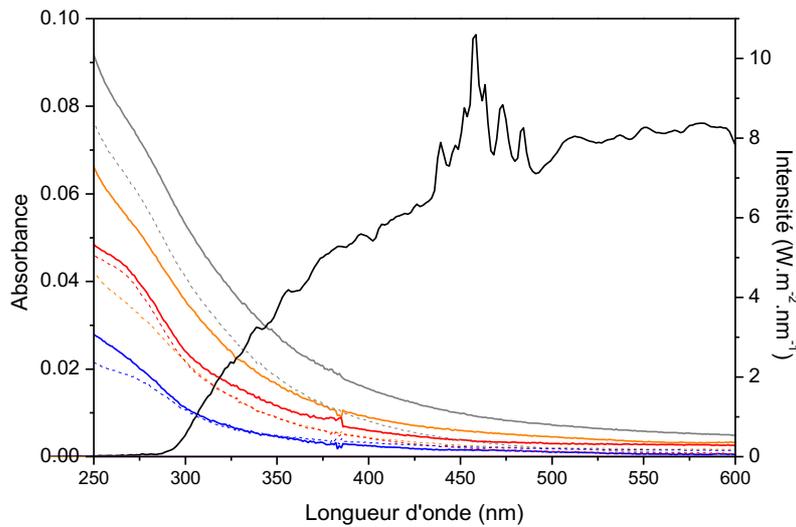


Figure 3-1 : Spectre d'absorption des eaux de surface non filtrées (ligne pleine) et filtrées (pointillé) Arc (gris), étang de Berre (orange), fleuve du Rhône (bleu), mer Méditerranée (rouge) et spectre d'émission du système d'irradiation (noir), cellule en quartz de 1 cm

A partir de ces spectres, il a été possible de calculer le flux de photons absorbé par les échantillons d'eau, I_a (unités de $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), en utilisant l'expression (1) suivante :

$$I_a = \int_{\lambda} I_0(\lambda) (1 - 10^{-A(\lambda).b}) d\lambda \quad (1)$$

où $I_0(\lambda)$ (unités de $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) est la densité de flux de photons spectraux incidents, $A(\lambda)$ est l'absorbance de l'échantillon d'eau avec un trajet optique de 1 cm, et b est la longueur du trajet optique dans le réacteur ($b = 3,0$ cm). Les résultats de calcul utilisant l'équation 1 sur des échantillons d'eau filtrés ($I_{a,f}$) et non filtrés ($I_{a,nf}$) sont présentés dans le tableau 3-1.

Pour les eaux non filtrées, ces flux de photons confirment bien que le recouvrement des spectres est plus important pour l'eau de l'Arc suivi par celle de l'étang Berre, de la mer Méditerranée et enfin celle du Rhône avec des valeurs de flux décroissantes. Pour les eaux filtrées, la filtration permet de s'affranchir de tout phénomène de diffusion lié aux particules en suspension (MES) et les spectres d'absorption UV-visible obtenus correspondent aux substances totalement solubilisées dans les milieux. Il est cependant possible de faire la même observation sur les flux de photons que pour les eaux brutes (non filtrées) avec néanmoins une différence moins marquée notamment pour l'eau du Rhône, de l'étang de Berre et de la Méditerranée.

Tableau 3-1 : Flux de photons absorbés par les eaux filtrées ($I_{a,f}$) et non filtrées ($I_{a,nf}$) et paramètres mesurés *in situ* après prélèvement à l'aide du multimètre portable HACH, HQ40d équipé de différentes sondes

Type d'eau	Mer Méditerranée	Etang de Berre	Rivière Arc	Rivière Rhône
$I_{a,nf} / I_{a,f}$ ($10^5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	1,62 / 0,68	2,25 / 0,77	3,70 / 1,29	0,55 / 0,54
pH	7,8-8,2 7,98 (1,6 %)	7,88-8,4 8,10 (2,0 %)	7,63-8,57 8,02 (2,1 %)	7,8-8,22 7,99 (1,7 %)
T (°C)	10,5-25,3 15,8 (28,6 %)	8,9-26,6 16,9 (33,3 %)	12-23,1 17,8 (26,5 %)	7,5-25,3 14,9 (35,3 %)
Turbidité (FNU)	241,0	0,5	4,4	37,0
Conductivité (mS.cm^{-1})	27,2-58,4 49,3 (20,7 %)	23,5-40,8 35,4 (14,1 %)	0,8-0,9 0,86 (4,6 %)	0,4-6,1 2,32 (101,4 %)
Oxygène ($\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$)	8,41-10,8 9,9 (8,1 %)	7,3-17,7 11,2 (29,8 %)	8,3-12,0 9,5 (11,9 %)	8,7-9,13 10,2 (10,2 %)
Potentiel redox (mV)	101,2-214,2 177,2 (18,7 %)	97,2-193,2 164,1 (18,6 %)	156,9-217 167,7 (18,1 %)	114,9-192,5 166,3 (16,9 %)
Matière en suspension (mg.L^{-1})	427,2	11,2	3,2	26,2

valeurs minimale – maximale ; valeur moyenne (en gras) et coefficient de variation (en italique et entre parenthèses)

1.2 Les paramètres physicochimiques des eaux naturelles

Après le prélèvement manuel des eaux, des paramètres physico-chimiques ont été mesurés sur place et d'autres ont été déterminés ultérieurement au laboratoire. Ainsi, le pH, la température, la concentration en oxygène dissous, la conductivité et le potentiel redox ont été immédiatement déterminés à l'aide de sondes portables décrits dans le tableau 2-2 du chapitre 2. Les valeurs minimale et maximale obtenues sur les différentes eaux au cours des divers prélèvements (entre mai 2015 et octobre 2017) sont indiquées, ainsi que leur moyenne et leur coefficient de variation.

D'après l'ensemble des valeurs répertoriées dans le tableau 3-1, il est possible de constater qu'une seule d'entre elles est plutôt stable au cours du temps avec des coefficients de variation au maximum de 2,1 %. Il s'agit du pH avec des valeurs qui fluctuent peu selon les périodes de prélèvements et qui sont du même ordre de grandeur quel que soit le milieu et comprises entre 7,98 et 8,10, ce qui est en accord avec les données présentées dans la littérature (Brezonik et Fulkerson-Brekken, 1998; Zafiriou, 1990; Zepp et al., 1977).

Pour les autres paramètres, notamment la température, une variation certaine (entre 26 et 35 %) a été mesurée du fait, bien entendu, des changements saisonniers. De la même façon, il est possible de noter que d'autres données (concentration en oxygène dissous, conductivité ou encore potentiel redox) présentent un coefficient de variation conséquent probablement lié à des variations de température ou encore aux afflux d'eau (marée, précipitation ou autres). Néanmoins, les potentiels

redox et concentrations en oxygène dissous sont, quel que soit le type d'eau, du même ordre de grandeur avec des valeurs moyennes respectivement égales à 168,8 mV et 10,2 mg d'oxygène par litre. A l'inverse, la conductivité est le critère le plus discriminant pour les quatre milieux avec des valeurs de l'ordre de quelques dizaines de $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour les eaux salines (mer Méditerranée et étang de Berre) et de quelques $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour les eaux douces. Ceci est principalement dû à la forte concentration en NaCl dans les eaux salines (Li et al., 2016a, 2016b; Parker et Mitch, 2016). Pour l'eau du Rhône, l'apport possible d'eau salée, du fait de la proximité entre le point de prélèvement et l'embouchure, peut expliquer une valeur de conductivité trois fois plus élevée que celle de la rivière Arc (Housari et al., 2010).

Afin de compléter ces mesures de terrain, des analyses complémentaires ont été réalisées au laboratoire, telles que la détermination de la matière en suspension (MES), le contenu en espèces ioniques inorganiques (chlorure, sulfate, nitrate, nitrite, carbonate, bromure), la quantité totale d'azote, de fer et aussi en carbone organique. Ces valeurs ont été déterminées distinctement en phase dissoute ainsi qu'en phase particulaire et sont rassemblées dans les tableaux 3-1 et 3-2.

Dans le tableau 3-1, on peut remarquer que la turbidité des eaux collectées est très variable avec dans l'ordre croissant : l'étang de Berre, la rivière Arc, le fleuve Rhône et la mer Méditerranée. Ce résultat s'explique par une activité hydrodynamique (courant, houle) qui favorise la mise en suspension de particules mais aussi de matières colloïdales et de planctons, augmentant de ce fait, le trouble des eaux. D'ailleurs, cette évolution de la turbidité est en partie corrélée aux valeurs de MES déterminées pour chacun des milieux (cf. tableau 3- 1).

La phase dissoute. Pour les ions carbonate, comme le pH des milieux se situe autour de 8 (tableau 3- 1) et le pKa ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$) étant égal à 10,33, alors le rapport des concentrations en hydrogénocarbonate et carbonate est largement en faveur des ions hydrogénocarbonate (rapport égal à environ 214). Cela signifie que dans notre cas les ions hydrogénocarbonate prédominent avec des concentrations comprises entre 137,2 et 297,4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Ces niveaux de concentration sont en accord avec ceux décrits dans la littérature dans les eaux de rivière, de lac ou de mer, hormis la concentration mesurée dans l'Arc qui est globalement deux fois plus importante que celles mesurées dans des eaux douces (Baena-Nogueras et al., 2017; Vione et al., 2006), probablement à cause de diverses roches carbonatées locales.

Tableau 3-2 : Caractérisation chimique des échantillons d'eau

			Méditerranée	Berre	Arc	Rhône
Phase dissoute	DOC	mg.C.L ⁻¹	2,3	3,7 (5,3 %)	5,1 (2,3 %)	2,6 (1,6 %)
	HCO ₃ ⁻	mg.L ⁻¹	137,2 (2,0 %)	160,6 (2,0 %)	297,4 (2,0 %)	159,6 (2,0 %)
	TN	mg.L ⁻¹	<0,06	<0,06	3,08 (0,9 %)	1,25 (1,6 %)
	Cl ⁻	g.L ⁻¹	23,64 (1,2 %)	16,3 (1,2 %)	0,06 (1,2 %)	0,10 (1,2 %)
	SO ₄ ²⁻	mg.L ⁻¹	3754 (1,4 %)	2987 (1,4 %)	147 (1,4 %)	265 (1,4 %)
	NO ₃ ⁻	mg.L ⁻¹	2,6 (2,5 %)	2,6 (2,5 %)	11,2 (2,5 %)	4,7 (2,5 %)
	Fe	µg.L ⁻¹	<3	<3	14 (10,8 %)	<10
	MES	mg.L ⁻¹	427,2	11,2	3,2	26,2
	Br ⁻	mg.L ⁻¹	73,9 (2,8 %)	57,2 (2,8 %)	0 (2,8 %)	4,7 (2,8 %)
Phase particulaire	POC	mg.C.L ⁻¹	14,9	5,6	2,6	5,5
	Fe	µg.L ⁻¹	5100,8 (2,4%)	96,1 (3,8 %)	101,4 (4,5 %)	839,5 (2,8 %)

Nd : non détecté ; MES : matière en suspension ; DOC : carbone organique dissous ; POC : carbone organique particulaire ; TN : azote total, coefficient de variation sur un triplicat de mesure (en italique entre parenthèse)

Pour les ions nitrate, tout comme pour l'azote total (TN), on retrouve un gradient classique de concentrations avec des teneurs décroissantes des cours d'eau à la mer mais aussi des valeurs du même ordre de grandeur que celles relevées dans la littérature et comprises dans notre étude entre 2,6 et 11,2 mg.L⁻¹ (Baena-Nogueras et al., 2017; Brezonik et Fulkerson-Brekken, 1998; Huertas et al., 2006; Li et al., 2016b; Marchisio et al., 2015). Pour les autres espèces azotées, telles que les ions nitrite et ammonium, au-delà de ne pas avoir mesuré leur concentration (concentrations inférieures aux limites de quantification), on a supposé leurs concentrations comme faibles compte-tenu des valeurs d'azote total mesurées, qui correspondent à plus de 80 % à l'azote présent dans les ions nitrate.

Un autre point à souligner est la différence de concentrations de certaines espèces ioniques et métalliques en fonction de l'origine des échantillons d'eau (douce et salée). En effet, les concentrations en ions chlorure, bromure et sulfate sont plus importantes dans les eaux salées alors que l'observation inverse peut être faite pour le fer en accord avec la littérature (Worsfold et al., 2014). Les concentrations en ions halogénures sont tout à fait conformes à ce qui est décrit dans la littérature pour les eaux marines avec des valeurs intermédiaires, légèrement moins élevées que la mer, pour l'eau de l'étang de Berre (Li et al., 2016a, 2016b; Parker et Mitch, 2016). Il est à noter des traces d'ions bromure mesurées dans l'eau du Rhône qui proviennent peut-être encore une fois de l'apport d'eau salée de la mer Méditerranée. De plus, il est à noter que des concentrations importantes d'ions sulfate et chlorure surtout dans les eaux salées (respectivement environ 3000 mg.L⁻¹ et 23 g.L⁻¹) sont détectés,

en accord avec des valeurs publiées dans la littérature (Nessim et al., 2015). Pour les ions sulfate dans les eaux douces, les valeurs mesurées sont aussi de l'ordre de grandeur de celles trouvées dans la littérature (Canfield et al., 2005).

Enfin, la mesure de carbone organique dissous dans nos échantillons d'eau naturelle nous informe sur la teneur en matière organique dissoute (MOD) qui semble décroître des rivières vers la mer avec une valeur intermédiaire pour l'étang de Berre. Il est à souligner à nouveau une valeur pour le Rhône un peu plus faible que celle de l'Arc peut-être encore lié à la proximité du point de prélèvement à l'estuaire du Rhône. Quel que soit le milieu, les concentrations en carbone organique dissous, i.e. en MOD, sont de l'ordre de grandeur de celles répertoriées dans la littérature (Brezonik et Fulkerson-Brekken, 1998; Brinkmann et al., 2003; Chin et al., 2004; Housari et al., 2010; Marchisio et al., 2015; Massicotte et al., 2017; Matamoros et al., 2009; Minero et al., 2007; Vione et al., 2006; Xu et Guo, 2017).

La phase particulaire. Deux paramètres ont été mesurés sur la phase particulaire, d'une part, le carbone organique et d'autre part, le fer. Les valeurs présentées dans le tableau 3-2 montrent que la phase particulaire est riche en fer et en carbone organique, notamment celle de l'eau de mer. Cette présence plus importante de fer sous forme particulaire à la surface des eaux marines a été précédemment démontrée (Labatut et al., 2014).

Cette analyse des eaux de surface naturelles a permis de mettre en évidence des compositions physicochimiques parfois assez différentes des quatre eaux collectées avec néanmoins la présence systématique de nombreuses espèces ioniques (Cl^- , Br^- , HCO_3^- , NO_3^- ...), de carbone organique (caractéristique de la MOD) et aussi de fer qui suggère la forte probabilité de production d'espèces chimiques réactives comme cela a été abordé dans la partie bibliographique de ce manuscrit. De ce fait, les parties suivantes seront consacrées à la mise en évidence d'espèces chimiques réactives et à l'évaluation de la capacité des eaux naturelles à induire des réactions photochimiques.

Afin de mesurer les propriétés photo-inductrices des eaux naturelles, nous nous sommes donc intéressés à la mise en évidence d'espèces chimiques réactives susceptibles de se former en utilisant deux méthodes. D'une part, la spectrophotométrie d'absorption résolue dans le temps afin de mettre en évidence des espèces réactives de courte durée de vie (de l'ordre de la ns à la μs) et d'autre part,

l'utilisation d'une sonde chimique très connue, l'acide téréphtalique (TPA), afin d'évaluer la quantité des radicaux hydroxyles susceptibles de se former dans le milieu.

2. Mise en évidence et quantification des radicaux hydroxyles

2.1 Utilisation de la spectrophotométrie d'absorption résolue en temps

Cette technique, encore appelée Laser Flash Photolysis en anglais (LFP) est un outil très puissant dans la détermination directe ou indirecte d'espèces de courte durée de vie, notamment lorsque ces espèces sont formés en quantité suffisante. Parmi les espèces réactives, l'électron solvaté, $^3\text{CDOM}^*$ ou $^1\text{O}_2$, par exemple, peuvent être facilement et directement (sans utiliser de sonde) détectés par l'excitation de la matière organique dissoute des plans d'eau naturels ou du sol par absorption ou par luminescence (Cottrell et al., 2013; Paul et al., 2004; Wang et al., 2007). Cependant, la détection directe d'autres espèces de courte durée de vie, telles que les radicaux hydroxyles générés par l'excitation des échantillons d'eau de surface, reste un défi en raison de leur faible absorbance ($\epsilon_{225\text{ nm}} = 600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et de leur très faible production (Rosario-Ortiz et Canonica, 2016; Zellner et Herrmann, 1995). Dans cette partie, sont présentés l'essentiel des résultats obtenus par le biais de cette technique sur les eaux filtrées et non filtrées en portant une attention particulière à la compréhension de l'origine des espèces transitoires, notamment par l'utilisation de pièges chimiques (appelés aussi extincteurs ou quenchers en anglais), tels que l'isopropanol ou encore l'acrylamide.

2.1.1 *Approche préliminaire à la mise en évidence de la formation des radicaux hydroxyles dans les eaux de surface naturelles*

Les espèces organiques et inorganiques comme la CDOM et les espèces ioniques peuvent interférer dans la détermination exacte de la production de radicaux $^{\bullet}\text{OH}$ par réaction de piégeage ou réaction secondaire.

En effet, la matière organique chromophore dissoute (CDOM) présente dans nos échantillons d'eaux et confirmée par les mesures de COT, les spectres d'absorption et les valeurs calculées (I_a , $I_{a,f}$) pourrait entraîner l'inhibition des processus photochimiques et le piégeage des radicaux $^{\bullet}\text{OH}$ avec une constante de vitesse conséquente ($k_{\text{CDOM}, ^{\bullet}\text{OH}} \approx 10^4 \text{ mgC}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) (Brezonik et Fulkerson-Brekken, 1998; Westerhoff et al., 2007).

De plus, une concentration élevée en ions carbonate ou en hydrogénocarbonate dans les eaux échantillonnées peut résulter en une réaction efficace avec $^{\bullet}\text{OH}$ pour donner les radicaux

carbonate $\text{CO}_3^{\bullet-}$ comme décrit dans la littérature avec des constantes de vitesse respectivement égales à $4,0 \times 10^8$ et $8,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour CO_3^{2-} et HCO_3^- (Buxton et al., 1988).

Par ailleurs, dans le cas particulier des échantillons d'eau salée, une réaction compétitive supplémentaire des radicaux hydroxyles avec les ions bromure est envisageable sachant que la concentration en ions Br^- est non négligeable et que la constante de vitesse des radicaux $\bullet\text{OH}$ avec les ions Br^- est importante ($k_{\text{Br}, \bullet\text{OH}} = 1,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Buxton et al., 1988).

Dans les eaux de surface salées, la présence des ions chlorure en forte quantité ($> 16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) suggère la possibilité d'observer la formation de l'anion radical chlorure dimère à partir de la réaction avec les radicaux hydroxyles comme cela a été décrit (Jayson et al., 1973). Toutefois les radicaux chlorures sont générés par les radicaux hydroxyles dans des conditions acides. Cette espèce n'a donc pas été considérée pour le piégeage des radicaux $\bullet\text{OH}$ dans nos eaux naturelles.

Etant donné l'ensemble de ces considérations et les compositions chimiques de nos eaux, nous avons choisi d'estimer la vitesse de réaction présumée pour le piégeage des radicaux $\bullet\text{OH}$ ($k_{s,\text{OH}}$) par les ions bromure, carbonate, hydrogénocarbonate, sulfate ($k = 1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Dorfman et Adams, 1973) et nitrate ($k = 5,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Nakatani et al., 2007) et aussi CDOM dans la phase dissoute. L'équation (2) suivante a été utilisée pour exprimer ($k_{s,\text{OH}}$) :

$$k_{s,\text{OH}} = \sum S_{i,\text{OH}} \quad \text{avec,} \quad S_{i,\text{OH}} = k_{i,\text{OH}} \times [i] \quad (2)$$

avec $k_{i,\text{OH}}$ la constante de vitesse de piégeage individuel avec $\bullet\text{OH}$, $[i]$ la concentration d'un piège individuel donné dans l'échantillon d'eau naturelle. Les valeurs de $k_{s,\text{OH}}$ et les pourcentages de piégeage de $\bullet\text{OH}$ (%) avec toutes les espèces ont été calculés comme étant égaux à $100 \times S_{i,\text{OH}} / \sum S_{i,\text{OH}}$, et sont rassemblés dans le tableau 3-3.

Tableau 3-3 : Constante de vitesse de piégeage de $\bullet\text{OH}$ ($k_{s,\text{OH}}$) dans la phase dissoute et particulaire et pourcentage de contribution de piégeage de $\bullet\text{OH}$ avec CDOM, HCO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , NO_3^- , Br^- et POC dans chaque échantillon d'eau naturelle

Eau	Dissous	Dissous + particulaire	% contribution						
	$k_{s,\text{OH}} (10^5 \text{ s}^{-1})$	$k_{s,\text{OH}} (10^5 \text{ s}^{-1})$	CDOM	HCO_3^-	CO_3^{2-}	SO_4^{2-}	NO_3^-	Br^-	POC
Mer	103,0	104,3	0,22	0,18	< 0,1	0,56	0	97,56	1,43
Berre	79,8	80,4	0,46	0,28	< 0,1	0,56	0	97,94	0,70
Arc	9,7	12,8	39,81	32,19	7,44	0,18	< 0,1	0	20,29
Rhône	7,2	7,56	3,44	2,93	0,7	< 0,1	< 0,1	85,62	7,28

D'après les valeurs rassemblées dans ce tableau, il est possible de se rendre compte que les valeurs de $k_{s,\text{OH}}$ varient fortement en fonction du milieu de 7,6 à $104,3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$. Ces données sont

jusqu'à 100 fois supérieures à celles décrites dans la littérature avec des valeurs de l'ordre de $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ (Housari et al., 2010). Cette différence est principalement liée au fait que dans notre cas, nous avons pris des espèces chimiques supplémentaires en considération, telles que les ions carbonate, hydrogénocarbonate et bromure dont la contribution au piégeage des radicaux $\cdot\text{OH}$ est importante. Ces chiffres démontrent que le piégeage des radicaux hydroxyles sera plus important (quasiment d'un facteur 10) dans les eaux salées par rapport aux eaux douces, du fait de la présence en grande quantité d'ions bromure. Ainsi, dans les eaux de la mer Méditerranée, de l'étang de Berre mais aussi du Rhône, les ions bromure seront les plus forts contributeurs à ce piégeage alors que dans l'eau de la rivière l'Arc, il s'agira majoritairement de la matière organique, des ions hydrogénocarbonate et aussi de la matière organique en suspension.

2.1.2 Mise en évidence de la formation des radicaux hydroxyles

L'anion thiocyanate (SCN^-) a été choisi comme réactif chimique pour mettre en évidence la formation potentielle de radicaux $\cdot\text{OH}$, en s'appuyant sur les réactions suivantes (Buxton et al., 1988; Milosavljevic et LaVerne, 2005; Neta et al., 1988) :



Ces réactions permettent de générer le dimère de l'anion radical thiocyanate ($(\text{SCN})_2^*$ encore désigné par SCN_2^*) qui possède une absorption spécifique et un coefficient d'absorption molaire élevé avec un maximum d'absorption autour de 475 à 500 nm selon la référence et $\epsilon_{480 \text{ nm}} = 7600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Baxendale et al., 1968; Milosavljevic et LaVerne, 2005; Neta et al., 1988). Ainsi, l'absorption à 500 nm a été suivie en présence et en absence d'ions SCN^- pour mettre en évidence la formation de dimères SCN_2^* et donc de radicaux $\cdot\text{OH}$. On suppose que dans nos conditions expérimentales ($[\text{SCN}^-] = 53,3 \text{ mM}$), aucune autre réaction de piégeage des radicaux hydroxyles ne pourrait entrer en compétition avec la réaction des ions thiocyanate et les radicaux hydroxyles à cause d'une vitesse de réaction $k_{\text{SCN},\text{OH}}$ comprise entre $3,7$ et $4,8 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ (calculée à partir de $[\text{SCN}^-] = 53,3 \text{ mM}$ et $k = 7,0-9,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) au moins 30 fois plus élevée que les autres vitesses de réaction (tableau 3-3).

2.1.2.1 Etude sur les eaux brutes

Sur la figure 3-2 (gauche), les évolutions de l'absorbance à 500 nm ont été tracées en fonction du temps pour tous les échantillons d'eau. Il est possible de constater que la présence d'ions thiocyanate augmente l'absorbance et ralentit significativement sa décroissance avec une absorbance

résiduelle après plus de 90 μs en accord avec la durée de vie assez longue de l'anion radical $\text{SCN}_2^{\cdot-}$ (microseconde) (Behar et al., 1972). De plus, les valeurs maximales de l'absorbance calculées en présence de SCN^- , 60 ns après le pulse (corrigée de l'absorbance à 266 nm de chacune des eaux) laissent supposer qu'aux erreurs expérimentales près, la production de radicaux $\text{SCN}_2^{\cdot-}$ *i.e.* $\cdot\text{OH}$ est privilégiée dans l'ordre suivant : Rhône ($A = 0,21$) > Etang de Berre ($A = 0,11$) > Mer Méditerranée ($A = 0,09$) > Arc rivièrè ($A = 0,05$).

Origine des radicaux thiocyanates. Pour s'assurer que la formation de $(\text{SCN})_2^{\cdot-}$ était principalement due à la réaction avec les radicaux $\cdot\text{OH}$, d'autres expériences ont été réalisées en utilisant l'isopropanol (IPA), connu pour sa capacité à piéger efficacement les radicaux hydroxyles ($k_{\text{IPA},\text{OH}} = 1,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Asmus et al., 1973; Buxton et al., 1988; Rosario-Ortiz et Canonica, 2016; Wang et al., 2017). Comme le montre la figure 3-2, l'addition d'IPA modifie, d'une façon générale, la cinétique de l'absorbance à 500 nm : 80 μs après l'impulsion, une inhibition significative de l'absorbance a été observée dans tous les échantillons d'eau. Ce phénomène est très efficace avec l'eau du Rhône avec une inhibition totale de l'absorbance à cette longueur d'onde (superposition des signaux rouge et noir). Ceci suggère une formation des radicaux thiocyanates impliquant essentiellement les radicaux hydroxyles.

Cependant, il est intéressant de noter sur la figure 3-2 que la présence de l'IPA conduit à une diminution moins importante de l'absorbance à 500 nm dans l'Arc, la Méditerranée et dans une moindre mesure dans l'échantillon d'eau de l'étang de Berre (pas de superposition des signaux rouge et noir). Ce résultat pourrait être attribué à la réactivité connue des ions thiocyanate avec des états triplets de cétones (tels que les dérivés de benzophénone) grâce à un mécanisme de transfert d'électrons qui conduit également à la formation du radical dimère anionique du thiocyanate (Hurley et al., 1988). Cette hypothèse est étayée par la présence de matière organique dans les échantillons d'eau naturelle qui pourraient être responsables d'une telle réactivité due à leur composition complexe impliquant des hydrocarbures aromatiques et aliphatiques avec des groupes fonctionnels tels que les amides, carboxyles, hydroxyles et cétones (Leenheer et Croué, 2003; Nebbioso et Piccolo, 2013; Vancampenhout et al., 2009).

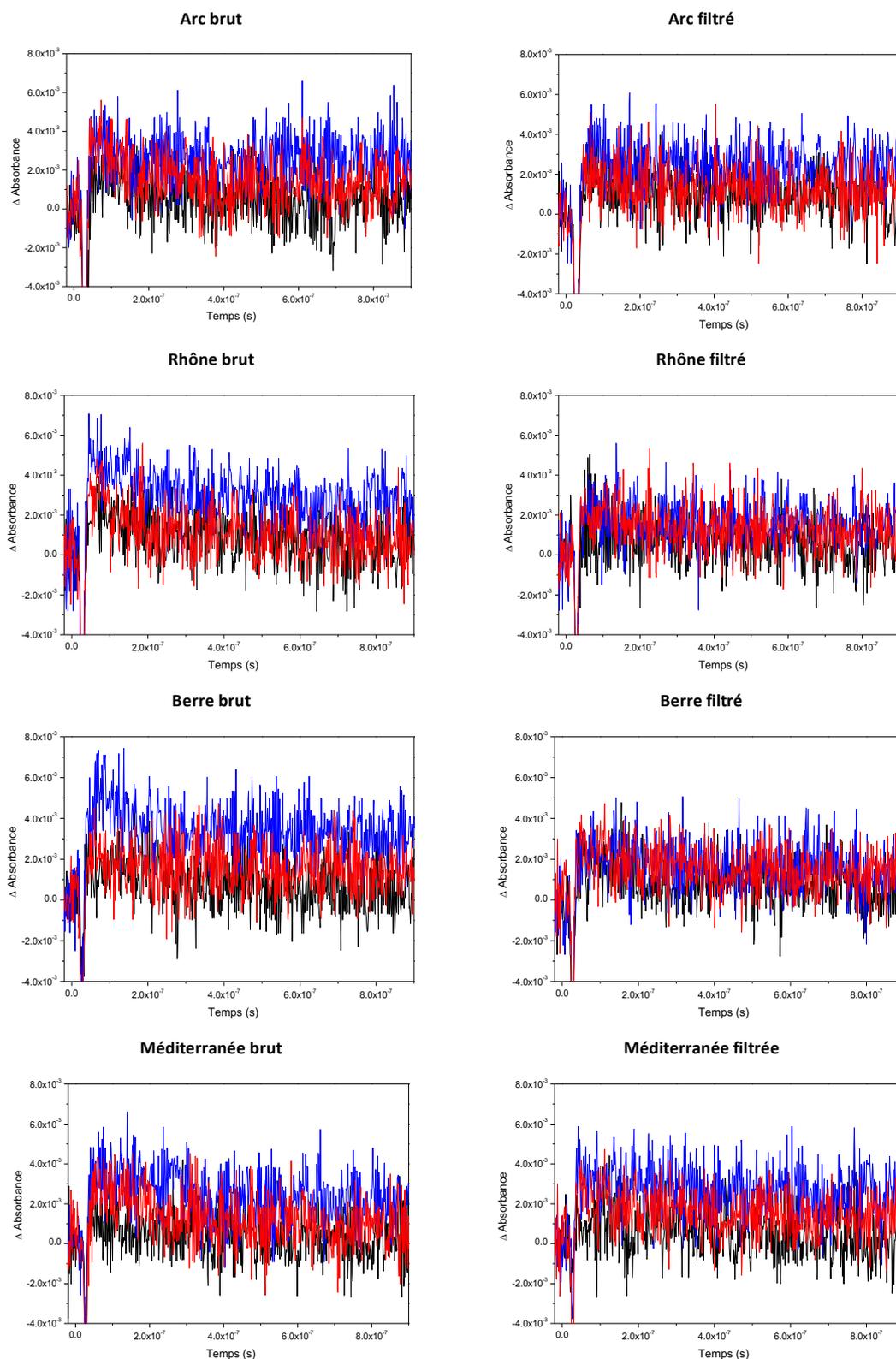


Figure 3-2 : Evolution de l'absorbance à 500 nm d'échantillons d'eau de surface (noir), avec SCN^- (bleu), avec SCN^- et IPA (rouge)
 $[\text{SCN}^-] = 53,3 \text{ mM}$ et $[\text{IPA}] = 750 \text{ mM}$, Excitation à 266 nm , énergie laser = 43,2 mJ

2.1.2.2 Etude sur les eaux filtrées

Sur la figure 3-2 (droite), le signal à 500 nm a été tracé en fonction du temps pour tous les échantillons d'eau filtrée (filtres 0,7 μm). Les résultats montrent que l'élimination des particules en suspension a un impact sur la cinétique des absorbances à 500 nm, mais cet impact semble dépendre de l'origine de l'eau. Ainsi, aucun impact particulier sur l'eau de l'Arc et de mer n'a été observé illustrant probablement l'origine de la formation des radicaux $\bullet\text{OH}$ dans la phase dissoute. Par contre, une diminution très importante de l'absorbance à 500 nm est observée pour l'échantillon d'eau de l'étang de Berre et du Rhône après filtration. De tels résultats ne peuvent pas être attribués uniquement à la diminution de l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation (diminution de l'absorbance à 266 nm respectivement égale à 37 et 19 % par rapport aux eaux brutes) car les deux échantillons d'eau absorbent toujours (respectivement 0,0351 et 0,018) (figure 3-1). Ce résultat met en évidence le rôle majeur de la phase particulaire dans la formation des radicaux thiocyanates, et donc hydroxyles, dans l'eau de l'étang de Berre et du Rhône qui pourrait être attribuée au fer particulaire ou au carbone organique particulaire (et plus particulièrement de $^3\text{POC}^*$) comme suggéré précédemment dans la littérature (Cottrell et al., 2013; Mazellier et Bolte, 2000).

Ces premiers résultats mettent clairement en évidence la formation des radicaux hydroxyles dans les eaux de surface par l'utilisation des ions thiocyanate mais ils montrent aussi que la sélectivité de ces ions est partielle et que les radicaux $\bullet\text{OH}$ formés sont issus de composés présents dans la phase dissoute mais aussi dans la phase particulaire. La seconde approche, utilisant une sonde chimique et une excitation continue, a permis de mesurer la quantité de radicaux hydroxyles formée dans les eaux.

2.2 Utilisation d'une sonde chimique : l'acide téréphtalique

2.2.1 Introduction

La détection dans les eaux de surface naturelles d'espèces chimiques réactives telles que $\bullet\text{OH}$, H_2O_2 , électrons solvatés, $\text{CO}_3^{\bullet-}$, $^1\text{O}_2$, $^3\text{CDOM}^*$ passent souvent par l'utilisation de sondes chimiques (SC). Le choix de ces composés s'explique par le fait qu'ils sont supposés conduire à des produits de transformation plus ou moins spécifiques et photochimiquement stables et non sensibles à la matrice environnante. Pour exemple, le méthanol, l'acide benzoïque, le benzène ou le nitrobenzène ont été utilisés dans ce but (Marchisio et al., 2015; Olasehinde et al., 2012; Qian et al., 2001; Takeda et al., 2004; Vione et al., 2010, 2006; Zhou et Mopper, 1990). Cependant, certaines SC, telles que le nitrobenzène et l'acide benzoïque, se sont révélées être peu sélectives et inadéquates pour estimer

correctement la production de radicaux $\cdot\text{OH}$ en raison d'interférences importantes avec des états excités triplets et/ou avec l'oxygène singulet (Vione et al., 2010).

D'autres sondes pour les radicaux $\cdot\text{OH}$, telles que l'acide téréphtalique (TPA), ont été utilisées pour leur haute sensibilité en raison de la formation d'un produit de transformation (TP) fluorescent lors de la réaction avec les radicaux $\cdot\text{OH}$: l'acide 2-hydroxytéréphtalique (HTPA). En effet, en présence de radicaux hydroxyles, la réaction d'hydroxylation indiquée en figure 3-3 se produit.

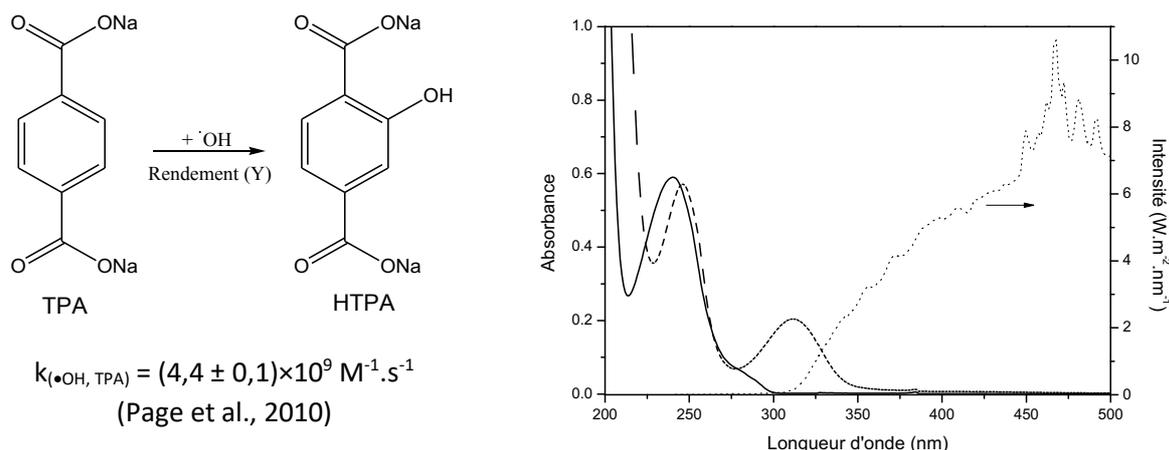


Figure 3-3 : Réaction d'hydroxylation de TPA (gauche). Spectre d'absorption de TPA (trait plein) et de HTPA (tirets) dans l'eau et spectre d'émission du système d'irradiation Xe (pointillés) (droite).
 $[\text{TPA}] = 4,9 \times 10^{-5} \text{ M}$ et $[\text{HTPA}] = 5,2 \times 10^{-5} \text{ M}$, longueur de cellule = 1 cm

Sous une intensité lumineuse constante, il est admis que la concentration en $\cdot\text{OH}$ atteint une concentration quasi-stationnaire et que la vitesse initiale de formation de l'acide 2-hydroxytéréphtalique, $R_{f, \text{HTPA}}$, pourrait être représentative de la vitesse initiale de production de $\cdot\text{OH}$, $R_{p, \text{OH}}$, comme cela est explicité dans l'équation (6) suivante :

$$R_{p, \text{OH}} = R_{f, \text{HTPA}} = d[\text{HTPA}]/dt = k_{(\text{OH}, \text{TPA})} [\cdot\text{OH}]_{\text{ss}} [\text{TPA}] Y = k_{\text{exp}} [\text{TPA}] Y \quad (6)$$

Avec $[\cdot\text{OH}]_{\text{ss}}$, la concentration quasi-stationnaire en $\cdot\text{OH}$, k_{exp} est une constante de pseudo-premier ordre mesurée en s^{-1} en supposant le flux lumineux constant, $[\text{HTPA}]$ et $[\text{TPA}]$ sont respectivement la concentration de HTPA et de TPA, Y est le rendement de la réaction du TPA avec des radicaux hydroxyles pour produire l'acide 2-hydroxytéréphtalique.

Or, dans les solutions saturées en air, il a été précédemment prouvé que le rendement de l'acide 2-hydroxytéréphtalique est de 35 % mais il a aussi été montré que Y dépend du pH selon l'équation suivante : $Y = (0,0248 \pm 0,0059) \text{ pH} + (0,046 \pm 0,035)$ (Charbouillot et al., 2011; Mark et al., 1998). Par conséquent, dans nos conditions expérimentales ($T = 293 \text{ K}$ et $7,9 < \text{pH} < 8,4$), Y a été pris comme la moyenne des valeurs de Y (de 24,2 à 25,4 %) et égale à 25 %.

Néanmoins, il est primordial de considérer soigneusement les conditions d'irradiation, c'est-à-dire le domaine de longueur d'onde, pour éviter la photolyse directe de TPA et surtout de HTPA, compte tenu de leur spectre d'absorption UV-visible présentés sur la figure 3-3 et du rendement quantique de dégradation de HTPA à 365 nm ($\phi_{365 \text{ nm}}(\text{HTPA}) = (6.3 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ (Page et al., 2010)).

De plus, dans l'eau naturelle, la présence de composés chromophores et réactifs pourrait également contribuer à la transformation de TPA et de HTPA par des processus induits. En effet, il est bien connu que la présence de CDOM dans l'eau de surface naturelle pourrait générer de nombreuses espèces chimiques réactives comme l'électron solvaté, le radical anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$), H_2O_2 , $^1\text{O}_2$ et $^{\bullet}\text{OH}$. L'oxygène singulet généré pourrait être impliqué dans cette transformation, cependant, les faibles constantes de vitesse ($k(\text{TPA}/^1\text{O}_2) \ll 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $k(\text{HTPA}/^1\text{O}_2) = (5,0 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et la très faible concentration de $^1\text{O}_2$ dans les eaux naturelles (10^{-15} à 10^{-12} M) impliquent que ces processus ne devraient pas être prépondérants (Rosario-Ortiz et Canonica, 2016). Il a aussi été montré que la réaction entre les radicaux hydroxyles et TPA pourrait être affectée par la présence de H_2O_2 , mais ceci dans des proportions à priori négligeables (Charbouillot et al., 2011). En revanche, il a été clairement établi qu'en présence de radicaux $^{\bullet}\text{OH}$, HTPA était efficacement dégradé avec une constante de vitesse élevée ($k_{(\text{OH}, \text{HTPA})}$) égale à $(6,3 \pm 0,1) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Page et al., 2010). Enfin, certains auteurs ont supposé que CDOM pouvait directement réagir avec TPA pour produire HTPA même en présence de méthanol utilisé comme piège à radicaux hydroxyles libres (Page et al., 2011). Un tel phénomène contribuerait à la formation de HTPA et donc à une surestimation des radicaux $^{\bullet}\text{OH}$ photogénérés. Néanmoins, dans la littérature comme dans notre étude, nous avons considéré, dans une première approche simplificatrice, que seuls les radicaux $^{\bullet}\text{OH}$ libres sont photogénérés et réagissent avec TPA pour donner HTPA. Par conséquent, pour déterminer la vitesse initiale de production de $^{\bullet}\text{OH}$ ($R_{p \text{ OH}}$), l'équation (6) devrait être corrigée comme suit :

$$R_{p \text{ OH}} = d[\text{HTPA}]/dt = k_{(\text{OH}, \text{TPA})} [^{\bullet}\text{OH}]_{ss} [\text{TPA}] Y - k_1[\text{HTPA}] \quad (7)$$

Avec $k_1 = k_{(\text{OH}, \text{HTPA})} [^{\bullet}\text{OH}]_{ss} + k_{\text{deg}, \text{HTPA}}$ où k_{deg} est la constante de vitesse de premier ordre de photolyse de HTPA en s^{-1} .

De ce fait, les processus directs et indirects pourraient conduire à la sous-estimation de HTPA généré et donc des radicaux hydroxyles, limitant ainsi l'utilisation de la sonde chimique TPA. Dans cette partie, la démonstration d'un tel effet est faite sur des échantillons d'eau naturelle en utilisant un système d'irradiation polychromatique représentatif de l'émission solaire, et une procédure appropriée est proposée afin de palier à ces problèmes.

2.2.2 *Etude photochimique de TPA et HTPA dans les eaux naturelles*

2.2.2.1 Etude photochimique préliminaire de TPA et HTPA

A l'obscurité et à température ambiante (20°C), les résultats ont démontré que les concentrations de TPA et HTPA dans les échantillons d'eau naturelle sans processus photochimique sont stables avec un pourcentage de disparition maximal de 3 % après 180 min (non présenté).

Sous irradiation, une faible quantité de TPA ($1,0 \times 10^{-5}$ M) est transformée (maximum de 8 % après 180 min sous irradiation) en fonction du type d'eau, et on constate en parallèle la formation de HTPA en concentration très variable en fonction des eaux : de l'ordre de 6×10^{-9} M dans l'eau de mer jusqu'à environ 3×10^{-8} M dans l'eau du Rhône (figure 3-4). De plus, ces cinétiques mettent en évidence une formation puis une disparition de HTPA dans les eaux salées et de nombreux changements de pente dans les autres eaux représentatives de formation et disparition concomitante. Cette concomitance est validée par la dégradation significative de HTPA lors de son exposition lumineuse dans les eaux naturelles (non présentée ici). De plus, on peut noter que la vitesse et la cinétique de disparition de HTPA dépendent du type d'eau. Les vitesses initiales de disparition de HTPA ($R_{d, \text{HTPA}}$), dans l'eau ultrapure ($R_{d, \text{HTPA,eu}}$), et dans les eaux naturelles ($R_{d, \text{HTPA,en}}$) ont été déterminées et ces dernières sont rassemblées dans le tableau 3-4.

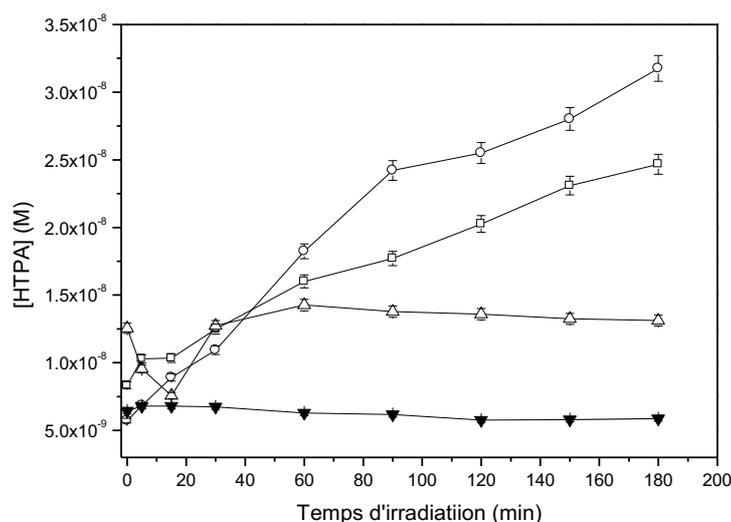


Figure 3-4 : Cinétique de formation de HTPA au cours de l'irradiation d'eau naturelle dopée en TPA : rivière Arc (□), étang de Berre (Δ), Rhône (○), mer Méditerranée (▼).
 $[TPA] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, lampe Xe 300W

D'après ce tableau, la vitesse initiale de disparition de HTPA dans l'eau ultrapure est toujours plus faible (jusqu'à 6 fois) que celles observées dans les eaux naturelles. Il est possible de noter par ailleurs, que la dégradation de HTPA semble légèrement favorisée dans l'eau de Berre et du Rhône par rapport à celle de la Méditerranée et de l'Arc. Ceci montre qu'en plus de la photolyse directe, des processus induits sont responsables de la transformation de HTPA probablement ceux impliquant les radicaux $\bullet\text{OH}$ (avec une vitesse initiale de disparition $R_{d,HTPA/\bullet\text{OH},en}$), et dans une moindre mesure $^1\text{O}_2$ (Page et al., 2010; Rosario-Ortiz et Canonica, 2016).

En raison de la dégradation démontrée de HTPA dans les échantillons d'eau naturelle, il est apparu important de considérer la dégradation de HTPA pour évaluer de manière appropriée sa formation au cours de la dégradation induite de TPA par les radicaux hydroxyles. Par conséquent, l'équation 8 a été systématiquement appliquée pour déterminer la vitesse initiale de formation de $\bullet\text{OH}$, $R_{p,OH}$, dans les échantillons d'eau naturelle :

$$R_{p,OH} = R_{f,HTPA} = R_{f,HTPA,TPA} + R_{d,HTPA,en} = R_{f,HTPA,TPA} + R_{d,HTPA,eu} + R_{d,HTPA/\bullet\text{OH},en} \quad (8)$$

où $R_{f,HTPA}$ est la vitesse initiale corrigée de formation de HTPA, $R_{f,HTPA,TPA}$ est la vitesse de formation de HTPA à partir de l'irradiation de TPA, $R_{d,HTPA,en}$ est la vitesse de disparition de HTPA dans les eaux naturelles, $R_{d,HTPA,eu}$ est la vitesse de disparition de HTPA dans l'eau ultrapure et enfin $R_{d,HTPA/\bullet\text{OH},en}$ est la vitesse de formation de HTPA par les radicaux hydroxyles formés.

Tableau 3-4 : Vitesses initiales de disparition de HTPA, $R_{d, \text{HTPA}}$, et valeurs de α et β dans les eaux naturelles

Milieu	$R_{d, \text{HTPA}}$ $10^{-11} \text{ M.s}^{-1}$	α (%)	β (%)	β (%)*	[TPA] $\times 10^{-3} \text{ M}$
			[TPA] = $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$		
Eau ultrapure	0,39	/	/	/	/
Arc	1,75	2,46	34,3	97,8	1,38
Rhône	2,15	0,42	5,82	90,8	1,66
Berre	2,38	0,039	0,55	92,6	18,0
Méditerranée	2,03	0,030	0,42	93,3	23,5

* Valeurs calculées à partir des concentrations de TPA dans la dernière colonne

Ces premiers résultats montrent que la transformation de TPA est très faible dans nos conditions expérimentales et que la formation de HTPA est fortement affectée par la nature du milieu. De ce fait, nous avons cherché à optimiser nos conditions de travail et à considérer le mieux possible la part de chacune des voies de transformation de HTPA, afin de pouvoir déterminer plus précisément sa vitesse initiale de formation.

2.2.2.2 Optimisation des paramètres de travail

L'optimisation des conditions opératoires a impliqué la prise en compte dans les eaux de nombreuses espèces chimiques (CDOM, ions carbonate, nitrate et bromure...) qui concurrencent la réaction des radicaux hydroxyles avec TPA ou HTPA formé.

Pour un composé P donné (à une concentration [P]), en se basant sur les vitesses de réaction de piégeage de $\cdot\text{OH}$ ($k_{s, \text{OH}}$) présentées dans le tableau 3-3, il a été possible de déterminer la part réelle des radicaux $\cdot\text{OH}$ pouvant réagir avec P (avec une constante de réaction $k_{(\cdot\text{OH}, \text{P})}$). Ce terme, (appelé α pour HTPA et β pour TPA), a été calculé comme étant égal à $([P] \times k_{(\cdot\text{OH}, \text{P})})/k_{s, \text{OH}}$ pour chaque milieu et les valeurs sont présentées dans le tableau 3-4.

Ainsi, il en ressort que très peu de radicaux hydroxyles vont réagir avec HTPA dans les eaux naturelles avec des valeurs de α très faibles et inférieures à 2,5 %.

De plus, on peut se rendre compte qu'avec une concentration en TPA égale à $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, seule une partie des radicaux hydroxyles réagiront avec la sonde chimique : une quantité quasiment nulle dans les milieux salés et un peu plus conséquente dans les eaux douces ($6 < \beta < 34$ %). Ceci explique probablement les faibles quantités de HTPA formées dans les eaux salées.

De ce fait, nous avons optimisé les concentrations de TPA dans chacun des milieux afin d'obtenir une réaction quasi-totale entre TPA et les radicaux hydroxyles (entre 98 et 91 %) dans les

différentes eaux naturelles. Ces conditions sont présentées dans le tableau 3-4 et ont été utilisées dans la suite de cette étude.

Si on considère ce nouveau milieu réactionnel (avec des concentrations en TPA élevées), la valeur de $k_{s,OH}$ incluant la contribution de TPA sera bien supérieure à celle des eaux naturelles sans TPA. Dans ce cas, il est censé de considérer que la dégradation de HTPA susceptible d'être induite par les radicaux hydroxyles sera négligeable et que seul le phénomène de photolyse pourrait avoir lieu. L'équation (8) devient alors :

$$R_{p,OH} = R_{f,HTPA,TPA} + R_{d,HTPA,eu} = R_{f,HTPA,TPA} + k_{deg,HTPA} [HTPA]$$

De plus, aux premiers instants de la réaction, la concentration en HTPA est donc nulle alors cette équation se simplifie et la vitesse initiale de formation des radicaux hydroxyles correspond alors à celle de HTPA ($R_{f,HTPA,TPA}$). Or comme on sait que :

$$R_{p,OH} = R_{f,HTPA/TPA} = k_{(\bullet OH, TPA)} [^{\bullet}OH]_{ss} [TPA]. Y / \alpha$$

Ainsi, à partir de la vitesse initiale de formation de HTPA lors de l'irradiation des eaux naturelles dopées en TPA, il sera aussi possible d'accéder à la vitesse initiale de formation des radicaux $^{\bullet}OH$ mais aussi à leur concentration quasi-stationnaire.

2.2.3 Détermination des vitesses initiales de formation de $^{\bullet}OH$ et leur concentration quasi-stationnaire dans les eaux naturelles

2.2.3.1 Etude sur les eaux naturelles brutes

En se plaçant dans les conditions expérimentales décrites dans la partie précédente, les cinétiques de formation de HTPA ont été établies dans chacune des eaux naturelles. Deux exemples de cinétiques obtenues avec les eaux de l'Arc et du Rhône sont présentés sur la figure 3-5.

Ainsi, les valeurs de $R_{p,OH}$, déterminées à partir des cinétiques de formation de HTPA sont rassemblées dans le tableau 3-5 ainsi que les concentrations quasi-stationnaires en radicaux hydroxyles.

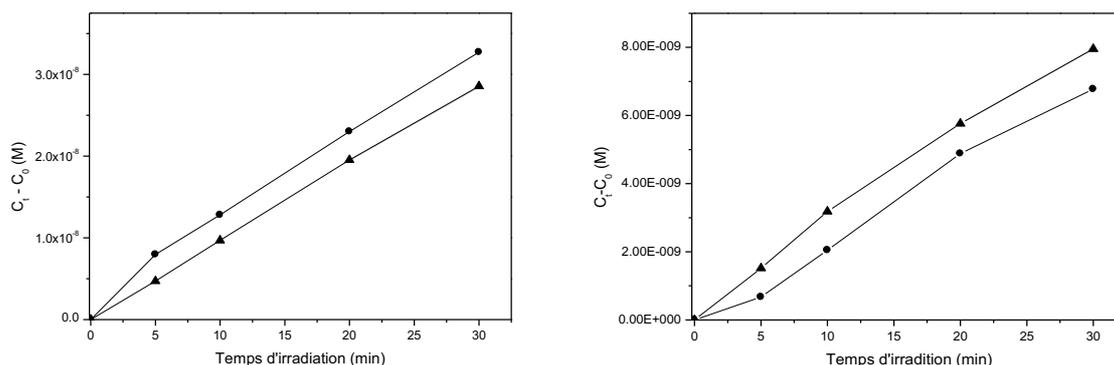


Figure 3-5 : Cinétique de formation de HTPA sous irradiation lumineuse dans l'eau de la rivière Arc (gauche) et dans le Rhône (droite) : (●) brute, (▲) filtrée, [TPA] = $1,38 \times 10^{-3}$ M (Arc) et [TPA] = $1,66 \times 10^{-3}$ M (Rhône), lampe Xe 300W

Les valeurs $R_{p\text{OH}}$ montrent que ces vitesses dans les eaux douces sont comparables à celles citées dans la littérature en utilisant d'autres sondes (principalement du benzène) et un système d'irradiation polychromatique (Marchisio et al., 2015; Takeda et al., 2004; Vione et al., 2006). De plus, les valeurs mesurées dans les eaux salées sont également du même ordre de grandeur (10^{-11} - 10^{-12} $\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$) que celles précédemment mesurées avec le benzène, le méthanol ou l'acide benzoïque, comme sonde chimique, et avec une lampe xénon ou une lampe à mercure moyenne pression (Olasehinde et al., 2012; Qian et al., 2001; Takeda et al., 2004; Zhou et Mopper, 1990). Par ailleurs, lorsque l'on compare ces valeurs entre elles, on peut dire que les radicaux hydroxyles sont formés d'une façon plus efficace dans l'Arc, puis d'une façon assez comparable dans le Rhône et dans la mer Méditerranée, et enfin d'une façon beaucoup plus faible dans l'eau de l'étang de Berre.

Tableau 3-5 : Vitesse initiale de formation de $\cdot\text{OH}$ ($R_{p\text{OH}}$) et concentration quasi-stationnaire de $\cdot\text{OH}$ ($[\cdot\text{OH}]_{ss}$) dans les eaux naturelles brutes (police normale) et filtrées (en italique)

	$R_{p\text{OH}}$ $10^{-11} \text{ M}\cdot\text{s}^{-1}$	$[\cdot\text{OH}]_{ss}$ 10^{-17} M	$R_{p\text{OH}}^*$ $10^{-11} \text{ M}\cdot\text{s}^{-1}$	$[\cdot\text{OH}]_{ss}^*$ 10^{-17} M	Réf.
Arc	2,70 <i>1,60</i>	1,81 <i>0,96</i>	0,08-8,90	9,41	(Takeda et al., 2004) (Vione et al., 2006) (Marchisio et al., 2015)
Rhône	0,324 <i>0,506</i>	0,20 <i>0,30</i>			
Berre	0,064 <i>0,351</i>	0,0035 <i>0,019</i>	0,13-28,4 1,10-1,80	1,20	(Olasehinde et al., 2012) (Zhou et Mopper, 1990) (Takeda et al., 2004) (Qian et al., 2001)
Méditerranée	0,414 <i>0,815</i>	0,017 <i>0,034</i>	0,36-4,95 0,50-0,59	0,11	

* données de la littérature

De plus, on constate que les concentrations quasi-stationnaires en radicaux hydroxyles sont dépendantes du milieu avec des valeurs comprises entre 10^{-17} et 10^{-19} M. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur voire jusqu'à 100 fois plus faibles que celles données dans la littérature (10^{-17} à 10^{-12} M). Enfin, il est important de souligner que nos résultats mettent en évidence des concentrations quasi-stationnaires de radicaux hydroxyles plus faibles dans le cas des eaux salées par rapport aux eaux douces, ce qui est en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature, notamment par Housari et al. (2010) qui avaient utilisé le benzène comme sonde chimique.

2.2.3.2 Etude sur les eaux filtrées

Les effets de la filtration sur la formation de HTPA sont visibles sur les cinétiques présentées sur la figure 3-5 et les valeurs des vitesses initiales de formation des radicaux $\cdot\text{OH}$ ainsi que leur concentration quasi-stationnaire déterminées dans les eaux naturelles filtrées sont rassemblées dans le tableau 3-5 (en italique).

Deux comportements opposés ont été observés : une amélioration de la formation de HTPA (Rhône, mais aussi dans Berre et Méditerranée) et aussi sa formation défavorisée (Arc). Ces deux tendances sont aussi visibles au regard des valeurs présentées dans le tableau 3-5.

Pour l'eau de l'Arc, cette formation défavorisée semble indiquer que les radicaux hydroxyles sont produits majoritairement dans la phase dissoute (60 % de HTPA formés) et plus faiblement dans la phase particulaire (40 % de HTPA formés). Pour les autres eaux, en particulier l'eau du Rhône, un comportement différent est observé avec une nette augmentation de la concentration de HTPA après filtration (figure 3-5) et aussi une augmentation des vitesses initiales de formation, d'un facteur 2 à 5, comme cela est visible dans le tableau 3-5.

Ces variations peuvent s'expliquer par la présence dans la phase particulaire de matière organique ou encore de fer (Cottrell et al., 2013; Mazellier et Bolte, 2000) qui peuvent agir soit comme producteurs de radicaux hydroxyles ou encore comme piègeurs.

Enfin, l'efficacité de production des radicaux $\cdot\text{OH}$ (vitesse initiale et concentration quasi-stationnaire) dans les eaux naturelles filtrées est hiérarchiquement comparable à ce qui a été observé avec les eaux brutes.

Du fait de la production avérée de radicaux hydroxyles dans ces milieux et compte-tenu de leur composition chimique, notamment, en ions inorganiques, nous nous sommes intéressés à la mise en évidence des radicaux halogénés ($\text{Cl}_2\cdot^-$ et $\text{Br}_2\cdot^-$) et carbonates ($\text{CO}_3\cdot^-$).

3. Mise en évidence de la formation d'autres espèces réactives au LFP

3.1 Radicaux halogénures

La réaction des radicaux $\cdot\text{OH}$ avec les ions chlorure pourrait être écartée, dans une première approche, à cause du pH alcalin des échantillons d'eau (partie 3.2.2.2 du chapitre 1). Néanmoins, l'éventuelle formation de Cl^\bullet et donc de Cl_2^\bullet par le biais de la matière organique dissoute doit aussi être pris en considération comme cela a été démontré par (Brigante et al., 2014; Jammoul et al., 2009; Loeff et al., 1993). Le radical Cl_2^\bullet possède des caractéristiques d'absorption connues ($\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$ et $\epsilon_{340\text{nm}} = 8800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Jayson et al., 1973), qui rend possible sa détection par LFP.

De plus, la présence des ions bromure dans les milieux salés suggère la formation possible des radicaux bromures Br_2^\bullet en s'appuyant sur le fait que la réaction des ions bromure avec les radicaux hydroxyles ou encore avec la MOD puisse se produire. Ces réactions sont susceptibles de générer ces radicaux qui présentent un maximum d'absorbance à 360 nm et un coefficient d'extinction molaire égale à $9900 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Hug, 1981; Zehavi et Rabani, 1972).

Etant donné les espèces réactives considérées et les contenus chimiques des quatre échantillons, ces études se sont donc focalisées sur les eaux salées (mer Méditerranée et étang de Berre) en enregistrant l'évolution de l'absorbance à 350 nm en fonction du temps.

3.1.1 Etude sur les eaux brutes

Sur la figure 3-6, les évolutions de l'absorbance à 350 nm ont été tracées en fonction du temps pour les deux eaux sélectionnées non filtrées. Il est possible de noter des évolutions d'absorbance assez comparables pour ces deux eaux. En effet, une très faible absorbance est observée à 350 nm lors de l'excitation des eaux. L'ajout d'acide dans le milieu (censé favoriser la formation de Cl_2^\bullet à partir de $\cdot\text{OH}$) permet de noter la formation plus ou moins importante d'espèces transitoires qui absorbent à cette longueur d'onde avec une durée de vie supérieure à 1 μs . Ceci suggère la formation de radicaux chlorures, en particulier dans l'eau de mer comme cela est présenté sur la figure 3-6. Néanmoins, l'attribution indiscutable de la réponse à 350 nm en absence d'acide aux radicaux Br_2^\bullet ou Cl_2^\bullet n'a pu être faite car le spectre d'absorption UV-visible des espèces transitoires s'est avéré trop imprécis pour les distinguer.

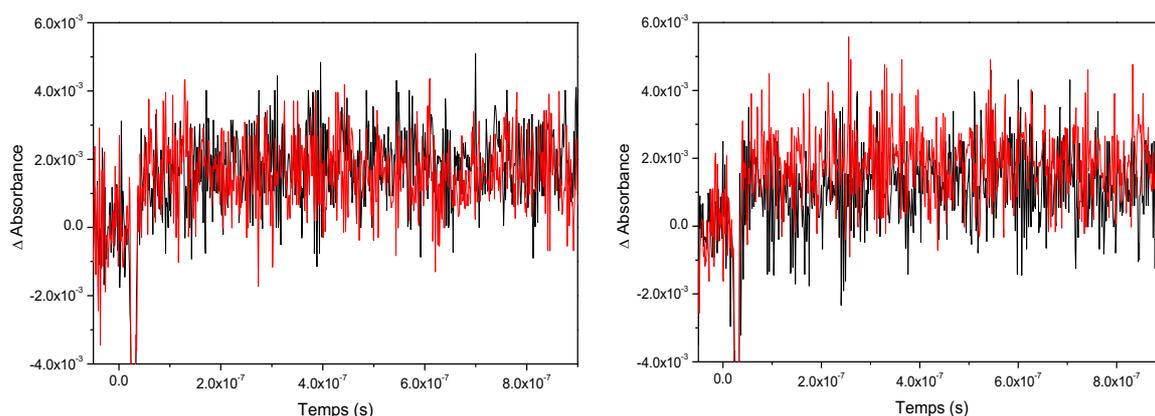


Figure 3-6 : Evolution de l'absorbance à 350 nm d'échantillons d'eau de surface (noir), avec HClO_4 (rouge). Etang de Berre (gauche) et mer Méditerranée (droite).
 $[\text{HClO}_4] = 53,3 \text{ mM}$, Excitation à 266 nm, énergie laser = 43,2 mJ

Ces résultats soutiennent bien que la réaction des radicaux $\cdot\text{OH}$ avec les ions chlorure ne se produit que minoritairement dans nos échantillons à cause de leur pH élevé (pH voisin de 8).

Origine des radicaux halogénés. Afin de préciser l'origine des espèces chimiques transitoires observées à 350 nm, deux pièges chimiques ont été employés : IPA, connu pour piéger efficacement les radicaux $\cdot\text{OH}$ ($k_{(\cdot\text{OH})} = 1,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Asmus et al., 1973; Buxton et al., 1988; Rosario-Ortiz et Canonica, 2016; Wang et al., 2017) et l'acrylamide pour piéger efficacement les états excités triplets (Ghiron et al., 1988). Les mêmes signaux ont été enregistrés dans différentes conditions opératoires comme cela est visible sur la figure 3-7. Ainsi, il est possible de voir que pour l'eau de l'étang de Berre, l'ajout d'acrylamide diminue partiellement l'absorbance à 350 nm alors que l'ajout supplémentaire d'IPA conduit à l'extinction totale de l'absorbance. Ces résultats mettent en évidence la contribution d'états excités triplets et de radicaux $\cdot\text{OH}$ à la formation des radicaux halogénés. Cependant, pour l'eau de mer, l'implication des états excités triplets est négligeable car l'ajout d'acrylamide ne fait pas varier l'absorbance à 350 nm à l'inverse d'IPA. Ceci témoigne de la formation presque qu'exclusive de ces radicaux halogénures par l'intermédiaire des radicaux hydroxyles.

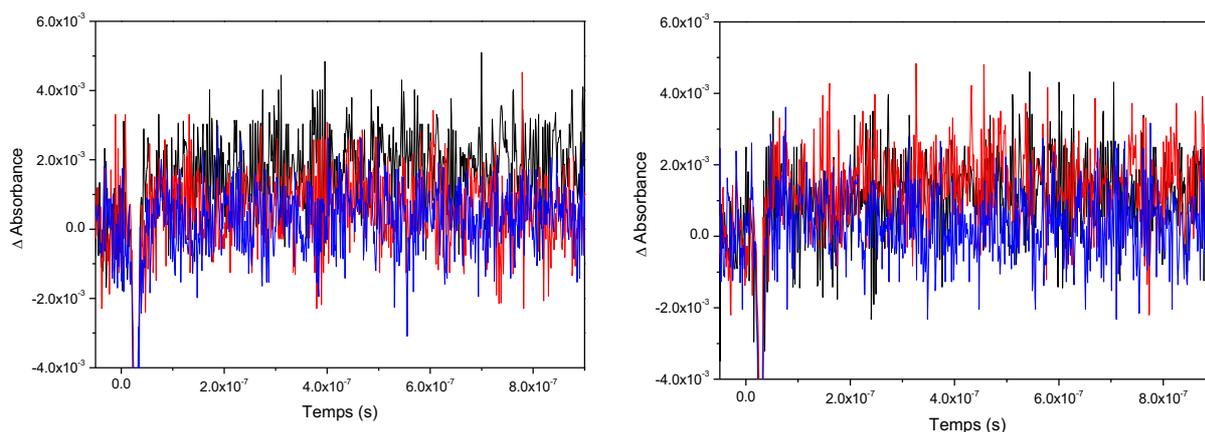


Figure 3-7 : Evolution de l'absorbance à 350 nm d'échantillons d'eau de surface (noir), avec HClO₄ et acrylamide (rouge), avec HClO₄, acrylamide et IPA (bleu). Etang de Berre (gauche) et mer Méditerranée (droite).
 [HClO₄] = 53,3 mM, [acrylamide] = 0,50 mM et [IPA] = 750 mM, Excitation à 266 nm, énergie laser = 43,2 mJ

3.1.2 Etude sur les eaux filtrées

Les mêmes séries d'expériences ont été réalisées sur les eaux filtrées (filtres 0,7 μm) de Berre et de la Mer Méditerranée et des comparaisons ont été faites avec les résultats obtenus sur les eaux brutes.

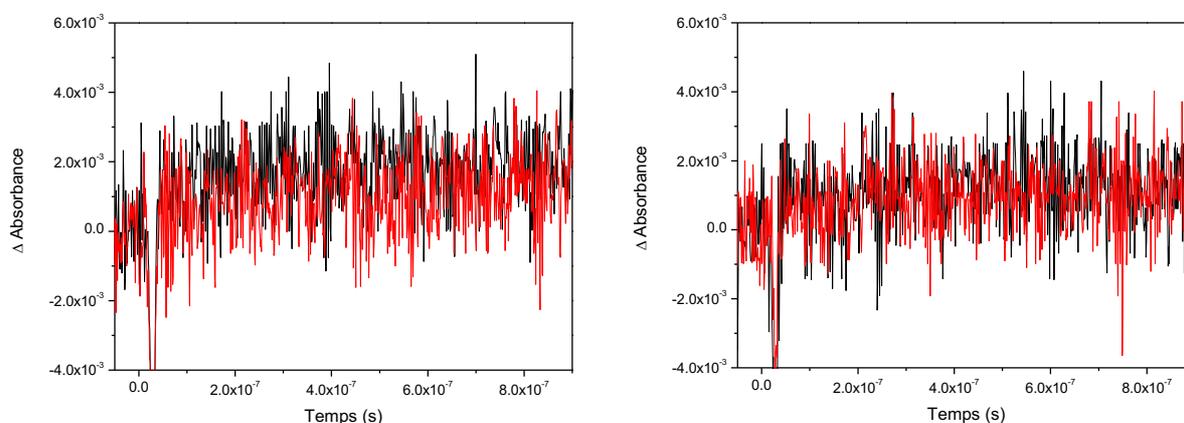


Figure 3-8 : Evolution de l'absorbance à 350 nm d'échantillons d'eau de surface brute (noir), filtrée (rouge). Etang de Berre (gauche) et mer Méditerranée (droite).
 Excitation à 266 nm, énergie laser = 43,2 mJ

La figure 3-8 montre les signaux enregistrés à 350 nm avant et après filtration. Ainsi, la filtration ne semble pas affecter l'absorbance à 350 nm pour l'eau de mer mais agit légèrement sur celle mesurée dans l'eau de l'étang de Berre avec une faible diminution. Ce résultat tend à montrer que la production des radicaux halogénures est liée à des espèces dissoutes et non solubilisées dans le cas de l'eau de l'étang de Berre et totalement dissoutes dans le cas de l'eau de mer. Par ailleurs, les effets

des pièges chimiques ont aussi été évalués sur ces eaux filtrées et il a été montré que les radicaux halogénés sont générés pour l'eau de Berre par des états excités triplets et des radicaux $\bullet\text{OH}$ et pour l'eau de mer essentiellement les radicaux $\bullet\text{OH}$.

En conclusion, cette étude a permis de montrer que les radicaux halogénures sont formés majoritairement à partir des radicaux $\bullet\text{OH}$ générés par des constituants dissous dans l'eau de mer, alors que dans l'eau de Berre, leur formation implique des états excités triplets mais aussi des radicaux $\bullet\text{OH}$, générés à la fois dans la phase dissoute et particulaire.

3.2 Mise en évidence de la formation des radicaux carbonates

La présence importante d'ions carbonate ou hydrogénocarbonate dans les eaux naturelles collectées au cours de ce travail et la formation avérée des radicaux hydroxyles par spectrophotométrie résolue en temps suggère que des radicaux carbonates puissent se former dans le milieu comme cela a été démontré (Buxton et Elliot, 1986).

Dans nos conditions de travail ($7,9 < \text{pH} < 8,4$), la réaction avec les ions hydrogénocarbonate sera privilégiée car ces ions sont majoritaires. Par ailleurs, la formation des radicaux $\text{CO}_3^{\bullet-}$ peut aussi être initiée, mais d'une façon minoritaire, par l'implication des radicaux sulfate ou encore l'état excité triplet d'un photosensibilisateur tel que ${}^3\text{CDOM}^*$ comme cela a été décrit dans la littérature (Canonica et al., 2005).

L'hypothèse de la formation de radicaux $\text{CO}_3^{\bullet-}$ a été confirmée sans ambiguïté pour l'échantillon d'eau de rivière Arc. L'absorbance de cette eau a été enregistrée entre 300 et 700 nm par pas de 20 nm et chaque signal nous a permis d'obtenir par ajustement (exponentielle d'ordre 1) l'équation associée à sa décroissance. Les absorbances ont été calculées pour un temps donné (60 ns après le pulse), ce qui nous a permis pour l'Arc de tracer un spectre d'absorption UV-visible présenté sur la figure 3-9. Ainsi, il est possible de voir sur ce spectre une bande avec un maximum d'absorbance autour de 600 nm qui pourrait être attribuée au radical anion carbonate $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (Behar et al., 1970). Pour les autres eaux, une démarche identique a été mise en œuvre mais les spectres obtenus ne nous ont pas permis de mettre clairement en évidence la bande d'absorption spécifique au radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$.

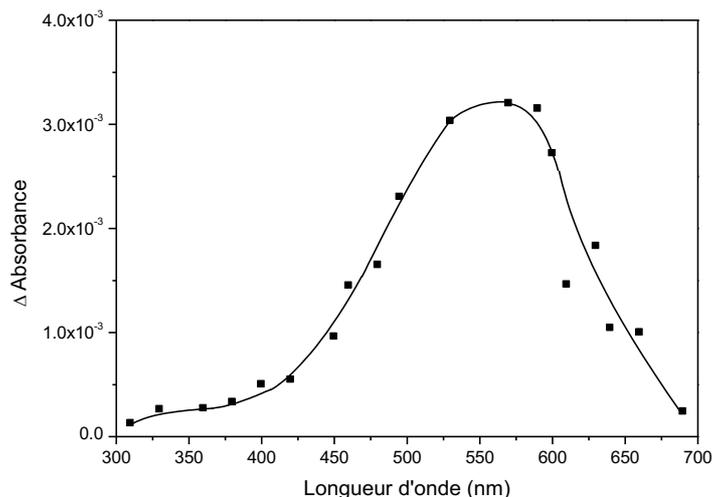


Figure 3-9 : Spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon d'eau de l'Arc enregistré 60 ns après l'impulsion laser. Excitation à 266 nm, énergie laser = 44 mJ.

Cette observation est certainement liée au contenu chimique des différentes eaux et en particulier la concentration en ions hydrogénocarbonate qui est nettement plus importante dans l'eau de l'Arc.

Origine des radicaux carbonates. Pour s'assurer que la formation de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ était principalement due à la réaction avec les radicaux hydroxyles, des expériences complémentaires ont été conduites en utilisant les mêmes pièges chimiques que précédemment (acrylamide et isopropanol). Les évolutions de trace à 600 nm ainsi que les absorbances déterminées 60 ns après le pulse sont présentées dans la figure 3-10 dans diverses conditions expérimentales pour les différentes eaux. On peut voir, pour l'eau de l'Arc, que la présence d'acrylamide affecte faiblement la trace à 600 nm alors que l'ajout d'IPA diminue le signal. Cet effet est confirmé par une diminution d'environ 10 % de l'absorbance en présence d'acrylamide et de presque 50 % en présence d'acrylamide et d'isopropanol. Ce résultat confirme l'implication évidente des radicaux hydroxyles dans la formation de l'anion radical et celle très minoritaire d'états excités triplets.

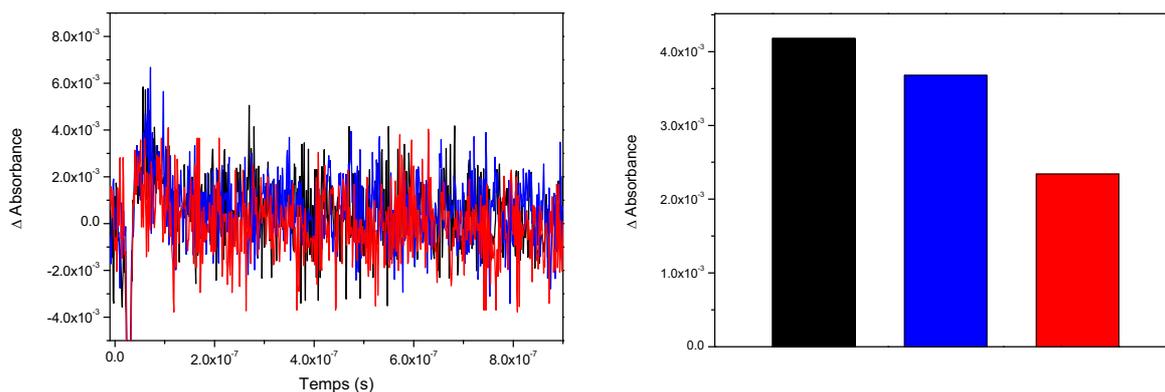


Figure 3-10 : Evolution de l'absorbance à 600 nm de l'eau de l'Arc en fonction du temps (gauche) et absorbance à 60 ns après le pulse (droite) pour l'eau brute (noir), en présence d'acrylamide (bleu), d'acrylamide et d'IPA (rouge).

[acrylamide] = 0,50 mM et [IPA] = 750 mM, Excitation à 266 nm, énergie laser = 44 mJ.

Des expériences similaires ont été effectuées sur l'eau de l'Arc filtrée et aucune différence significative n'a pu être observée par rapport aux résultats obtenus sur l'eau brute. Ceci semble indiquer que la formation des radicaux carbonates impliquent des espèces chimiques présentes exclusivement dans la phase dissoute, les ions hydrogencarbonate bien entendu mais aussi les précurseurs.

Les résultats de ce travail par spectrophotométrie d'absorption résolue dans le temps a permis de mettre en évidence sans ambiguïté des espèces radicalaires autres que les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ dans des eaux naturelles : les radicaux carbonates $\text{CO}_3\cdot^-$ et dans une moindre mesure les radicaux halogénures. Néanmoins, cette approche sur une échelle de temps très courte ne nous a pas permis d'accéder à des données quantitatives du fait des faibles valeurs d'absorbance mesurées (de l'ordre de 10^{-3}) et elle reste aussi éloignée des conditions réelles d'irradiation, notamment du fait de l'utilisation d'une excitation monochromatique dans le domaine de l'ultra-violet.

4. Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce chapitre a mis en évidence la formation d'espèces chimiques réactives dans les eaux naturelles sous excitation lumineuse. Néanmoins, des spécificités apparaissent tant au point de vue de la nature des espèces réactives produites, que de leur concentration ou encore de leur origine.

Ainsi, l'étude par spectrophotométrie résolue en temps a permis de montrer que les radicaux hydroxyles étaient générés dans toutes les eaux naturelles mais que leur formation était issue de constituants appartenant à la phase dissoute et particulaire pour l'eau de Berre et du Rhône et à la phase dissoute pour les eaux de l'Arc et de la mer Méditerranée. Cette première approche qualitative a été confirmée par l'utilisation de l'acide téréphtalique (TPA) comme sonde chimique. En effet, cette seconde approche a permis la quantification des concentrations quasi-stationnaires de radicaux $\bullet\text{OH}$ dans les milieux ainsi que la détermination de leur vitesse initiale de formation. La concentration de ces radicaux, de l'ordre de 2×10^{-17} M, s'est avérée plus importante dans les eaux douces (Arc et Rhône) que dans les eaux salées. De plus, cette étude a confirmé la part importante des constituants dissous dans la production des radicaux $\bullet\text{OH}$ dans l'Arc, probablement attribuable à la présence en concentration importante d'espèces azotées, dont les ions nitrate ($11,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Par ailleurs, elle a aussi fait ressortir l'influence des constituants de la phase particulaire, notamment le fer, sur la quantification des radicaux hydroxyles, soulignant de ce fait, les limites de notre approche avec l'utilisation de TPA.

De plus, d'autres espèces radicalaires ont été mises en évidence dans les eaux naturelles par LFP. D'une part, des radicaux halogénés ($\text{Br}_2\bullet^-$ et/ou $\text{Cl}_2\bullet^-$) ont été détectés dans les eaux salées en accord avec leur forte teneur en ions chlorure ($16,3\text{-}23,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) et en ions bromure ($57,2\text{-}73,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), mais avec des origines variables en fonction des eaux. Dans l'eau de Berre, la formation de ces radicaux est majoritairement attribuable à des états excités triplets ou aux radicaux $\bullet\text{OH}$ générés dans la phase particulaire et dans l'eau de mer à des radicaux $\bullet\text{OH}$ générés dans la phase dissoute.

Enfin, la présence de radicaux carbonates $\text{CO}_3\bullet^-$ a été clairement observée dans l'eau de l'Arc et dans une moindre mesure dans les autres eaux naturelles. La formation importante de $\text{CO}_3\bullet^-$ dans l'eau de l'Arc est attribuable à la très forte teneur en ions carbonate ($297,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) et implique les radicaux hydroxyles produits par des constituants de la phase dissoute.

Chapitre 4 :

Etude du devenir de CBZ, OxCBZ et du produit de transformation 9-CAA dans les compartiments aquatiques

L'objectif de ce chapitre est de présenter l'étude des comportements des composés sélectionnés à savoir CBZ, OxCBZ et 9-CAA (présentés au tableau 2-3 du matériel et méthodes) dans l'environnement notamment sous l'influence de la lumière. L'étude du devenir photochimique d'un composé implique un certain nombre de processus ainsi qu'une série d'expériences pour répondre à plusieurs questions :

- Quelles sont les propriétés photochimiques des composés ?
- La nature et la composition du milieu ont-elles un impact sur la photodégradation des composés, c'est-à-dire est-ce que le temps de demi-vie d'un produit sera différent dans une eau douce ou salée ? Si oui, quelles sont les processus d'atténuation naturelle mis en jeu ? Et quel est l'impact des espèces chimiques réactives formées au cours de l'irradiation sur la dégradation des composés ?
- Quels sont les produits de transformation formés dans les milieux et par quels mécanismes ? Est-ce que des différences sont observées selon les milieux et selon les composés ?

Pour répondre à ces questions, les comportements de CBZ, OxCBZ et 9-CAA ont été évalués dans différentes conditions expérimentales et dans différents types d'eaux.

Dans un premier temps, leurs devenirs dans l'eau ultrapure ont été examinés en absence de lumière, afin d'évaluer leur stabilité puis sous irradiation, afin d'estimer leur aptitude à la photolyse. Dans un second temps, leurs devenirs dans les 4 eaux naturelles ont été étudiés, d'une part, à l'obscurité pour mettre en évidence d'éventuels processus d'atténuation naturelle (biotique et abiotique) et d'autre part sous irradiation pour prédire leur évolution photochimique dans l'environnement. Pour compléter l'approche cinétique, les constantes de réactions entre les espèces chimiques réactives identifiées dans le chapitre 3 avec CBZ, OxCBZ et 9-CAA ont été déterminées. De plus, des méthodes d'analyses sophistiquées ont été mises en œuvre afin d'identifier et de quantifier les produits de transformation (TP) de CBZ, OxCBZ, 9-CAA, formés au cours de l'ensemble des expériences. A partir de ces résultats, des processus et mécanismes de dégradation ont été proposés pour les trois composés, afin de décrire les différentes voies réactionnelles rencontrées dans chaque milieu aquatique.

1. Etude cinétique de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans l'eau ultrapure

1.1 Propriétés d'absorption des composés

Les propriétés spectrales des différents composés ont été déterminées par spectrophotométrie d'absorption UV-Visible. Leurs spectres d'absorption et leurs propriétés

spectrales sont respectivement présentés en figure 4-1 et dans le tableau 4-1.

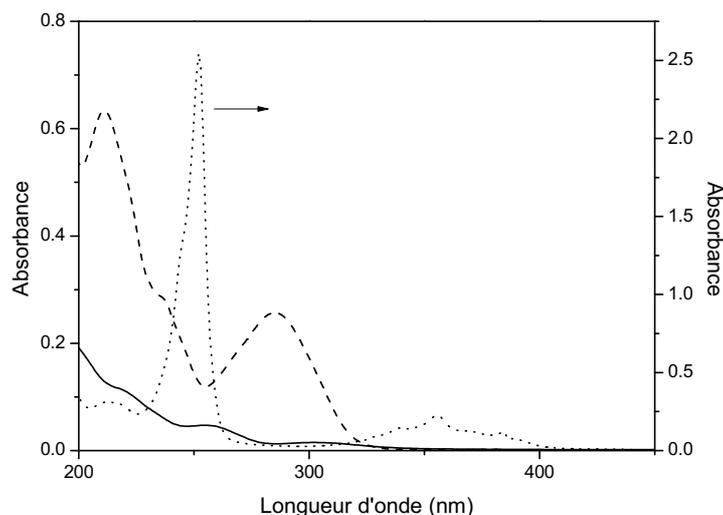


Figure 4-1 : Spectre d'absorption UV-visible dans H₂O de CBZ (5 mg.L⁻¹, tirets), OxCBZ (5 mg.L⁻¹, trait plein) et 9-CAA (5 mg.L⁻¹, pointillés), pH = 5,75

D'après les spectres présentés sur la figure 4-1, les maximums d'absorption ont pu être déterminés (tableau 4-1), ainsi que les coefficients d'absorption molaire associés, qui sont comparables aux valeurs trouvées dans la littérature. Ainsi, deux bandes centrées autour de 211 et 285 nm sont visibles pour CBZ avec des coefficients d'absorption molaire élevés. Ses bandes sont attribuables à des transitions $\pi-\pi^*$ liées à la présence des noyaux aromatiques. Pour les deux autres composés, ces mêmes transitions justifient la présence de bandes autour de 254 et 302 nm pour OxCBZ et 252 et 356 nm pour 9-CAA. La bande à plus grande longueur d'onde pour 9-CAA s'explique par l'augmentation de l'aromaticité de cette molécule par rapport aux autres. Bien que ces spectres aient été enregistrés à un pH proche de 6, compte-tenu des pKa de CBZ (13,9), de OxCBZ (13,7) et de 9-CAA (0,9 et environ 4,1 comparable à celui de l'acridine (Hosmane et Liebman, 2009)), on peut supposer qu'à un pH proche de 8 (qui correspond au pH des eaux naturelles), les spectres d'absorption UV-visible des composés seront comparables. En effet, CBZ et OxCBZ, qui sont des bases, seront majoritairement sous leur forme moléculaire et 9-CAA qui est une base faible, majoritairement sous sa forme non protonnée (fonction amine) pour des pH voisins de la neutralité (entre 6 et 8).

Il est à noter que OxCBZ est majoritairement sous sa forme cétonique dans l'eau ultra-pure mais que l'équilibre céto-énolique (tautomérie) peut être déplacé vers la formation de l'énol notamment en fonction du pH ou encore de la nature du solvant.

Tableau 4-1 : Propriétés d'absorption de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans l'eau ultrapure, pH = 5,75.

Composé	λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$) (cette étude)	$\epsilon_{\lambda_{\max}}$ ($M^{-1} cm^{-1}$)
CBZ	285	12220 ± 600	$\epsilon_{285nm} = 12500$ (Andreozzi et al., 2002)
	211	30400 ± 1500	
OxCBZ	254	8140 ± 400	$\epsilon_{254nm} = 7245$ (Li et al., 2011)
	303	5370 ± 130	
9-CAA	252	110550 ± 5500	Pas de donnée
	356	9560 ± 480	
	384	5370 ± 270	

De plus, on remarque que les trois composés présentent une absorption au-delà de 290 nm avec une absorption qui se poursuit au-delà de 320 nm. Cela signifie qu'il existe un recouvrement non négligeable entre leur spectre d'absorption et celui d'émission de la lumière solaire et à fortiori avec celui du système d'irradiation.

De ce fait, il apparaît important d'évaluer la photolyse potentielle de ces composés. Le suivi de l'évolution de la concentration de ces 3 composés a été réalisé dans l'eau ultrapure, à l'obscurité dans un premier temps puis sous irradiation. L'étude préliminaire à l'obscurité a été menée afin d'évaluer si des phénomènes comme de l'adsorption sur le verre (utilisé comme contenant) ou de l'hydrolyse étaient susceptibles de se produire.

1.2 Suivi cinétique des composés à l'obscurité

Chacun des 3 composés a été étudié à une concentration de 5 mg.L^{-1} dans de l'eau ultrapure, à température ambiante (autour de 25°C) et à un pH proche de 6, dans un premier temps. L'évolution de la concentration a été suivie pendant 65 à 80 h à l'obscurité par chromatographie liquide et les résultats sont présentés dans la figure 4-2.

Il est à noter que les concentrations des composés sont quasiment stables sur l'échelle de temps considérée (c'est-à-dire environ 3 jours) dans nos conditions expérimentales. On remarque néanmoins une légère disparition de OxCBZ sur ce laps de temps d'environ 2-3 %, c'est-à-dire de l'ordre des erreurs expérimentales. Ces résultats démontrent que les trois composés ne subissent pas (ou très peu) d'hydrolyse et ne s'adsorbent pas sur les parois en verre des contenants. Pour CBZ, ceci est en accord avec différentes études antérieures (Andreozzi et al., 2002; Matamoros et al., 2009).

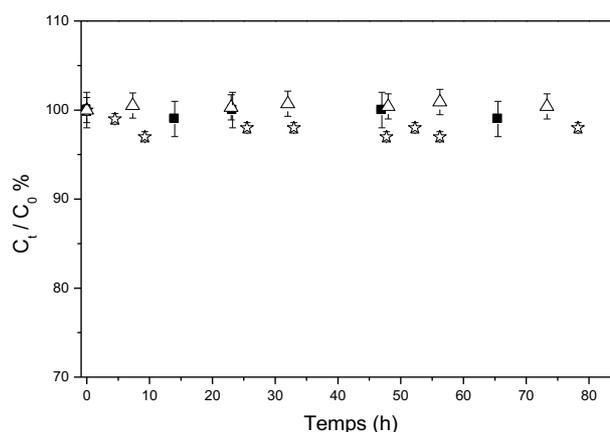


Figure 4-2 : Evolution de la concentration en composé organique, concentration au temps t (C_t) divisée par la concentration initiale C_0 , dans l'eau ultrapure à l'obscurité : (●) CBZ, (☆) OxCBZ, (△) 9-CAA, concentration = 5 mg.L^{-1} , pH = 5,75 et $T = 25^\circ\text{C}$ (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique)

Néanmoins, comme le pH de nos échantillons d'eau collectés est quelque peu différent de celui de l'eau ultrapure, des études complémentaires ont été réalisées à un pH alcalin voisin de 9 (pH = 8,6), en particulier pour OxCBZ. Ainsi, un suivi de la concentration de OxCBZ (concentration initiale égale à 5 mg.L^{-1}) à l'obscurité a été réalisé sur une période de 48 h. Les résultats obtenus ont montré que sa concentration était constante dans nos conditions expérimentales. De ce fait, il est possible d'affirmer qu'aucun phénomène d'hydrolyse ne se produit à un pH proche de la neutralité (6-9) à l'inverse de ce qui a été montré par Pathare et al. (2007) dans des conditions basiques extrêmes (pH = 13,7) avec la formation du dérivé désamidé (perte de la fonction amide sur l'atome d'azote de l'aniline) de OxCBZ.

1.3 Suivi cinétique des composés sous irradiation

Dans un second temps, l'irradiation de solutions aqueuses (30 mL) contenant chacune un des composés à une concentration de 5 mg.L^{-1} a été réalisée sur une durée identique (80 h). Les suivis cinétiques ont été effectués en analysant les composés dans les échantillons d'eau par LC et sont présentées dans la figure 4-3.

Ces courbes ont permis de déterminer des paramètres cinétiques, tels que la constante de vitesse de pseudo-ordre 1 (k) et les vitesses initiales de disparition (v) pour CBZ, OxCBZ et 9-CAA. Ces valeurs sont rassemblées dans le tableau 4-2 avec les pourcentages de disparition de chaque composé

après 3 et 50 h d'irradiation (respectivement %_{3h} et %_{50h}) et les temps de demi-vie ($t_{1/2}$). De plus, les rendements quantiques de transformation initiale (ϕ) ont aussi été déterminés, en utilisant le flux de photons calculés à chaque longueur d'onde ($I_0(\lambda)$), à partir des résultats obtenus avec le *para*-nitroanisole utilisé comme actinomètre chimique, comme cela est décrit dans la partie expérimentale. Les rendements quantiques donnés dans le tableau 4-2 correspondent à la moyenne des rendements obtenus en utilisant les deux facteurs de correction sur le flux de lumière réellement reçu par la solution.

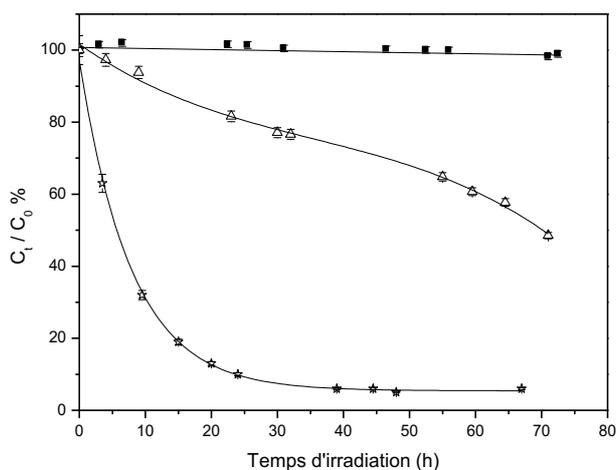


Figure 4-3 : Evolution de la concentration en composé organique, concentration au temps t (C_t) divisée par la concentration initiale C_0 , sous irradiation : (●) CBZ, (☆) OxCBZ, (△) 9-CAA. pH = 5,75, concentration égale à 5 mg.L⁻¹ et lampe Xe 300 W (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique)

Les courbes en figure 4-3 ainsi que les valeurs répertoriées dans le tableau 4-2 montrent clairement que CBZ est très peu dégradé sous irradiation directe dans nos conditions expérimentales avec : une vitesse initiale de dégradation très faible, un pourcentage de disparition après 50 h sous irradiation quasiment nul, et une durée de demi-vie de plus de 13 semaines. En revanche, OxCBZ et 9-CAA dans une moindre mesure, subissent une dégradation assez efficace dans ces conditions expérimentales avec respectivement 95 et 35 % de disparition après 50 h d'exposition et des temps de demi-vie respectifs d'environ 7 h et 3 jours. Cependant, lorsque l'on compare les rendements quantiques de disparition, il est possible de se rendre compte que OxCBZ est le composé le plus photodégradable avec un rendement quantique 100 fois plus élevé que celui de CBZ et 9-CAA.

Tableau 4-2 : Vitesses initiales (v), constantes de vitesse (k), pourcentages de dégradation après 3 et 50h, temps de demi-vie ($t_{1/2}$) et rendements quantiques de disparition (ϕ) pour CBZ, OxCBZ et 9-CAA lors de leur irradiation dans l'eau ultrapure, $[PP]_0 = 5 \text{ mg.L}^{-1}$, Xe 300 W et pH = 5,75.

	v (10^8 M.h^{-1})	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	ϕ	% _{3h}	% _{50h}
CBZ	$0,78 \pm 0,08$	$(3,27 \pm 0,65) \times 10^{-4}$	$2119,7 \pm 417,6$	$(2,2 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	0	1
OxCBZ	$236,1 \pm 46,7$	$(10,1 \pm 0,55) \times 10^{-2}$	$6,8 \pm 0,4$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-2}$	35	95
9-CAA	$12,8 \pm 0,8$	$(0,88 \pm 0,03) \times 10^{-2}$	$78,3 \pm 2,7$	$(2,7 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	2	35

Le rendement quantique relativement faible de CBZ, ϕ_{CBZ} , montre que la photolyse de CBZ n'est pas une voie prédominante dans la dégradation du composé. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus dans d'autres études avec des valeurs comprises entre $1,3-3,1 \times 10^{-4}$ (Carlos et al., 2012; Chiron et al., 2006; Lam et Mabury, 2005) mais 10 fois plus élevé que ceux de Andreozzi et al. (2003, 2002), Calisto et al. (2011b), et Yamamoto et al. (2009).

Un nombre restreint d'études concernant le comportement photochimique de OxCBZ a été réalisée jusqu'alors. Toutefois, la transformation de OxCBZ a été étudiée par Li et al. (2011) sous excitation à 254 nm dans l'eau à pH = 7,6 conduisant à un rendement quantique égale à $8,0 \times 10^{-4}$. Dans notre cas, le rendement quantique de formation est bien plus grand (environ 20 fois plus grand). Enfin le rendement quantique calculé ici pour le 9-CAA est du même ordre de grandeur que celui de CBZ.

1.4 Conclusion

Cette étude cinétique préliminaire montre l'absence d'hydrolyse de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans nos conditions de travail. De plus, l'importance de la photolyse directe a été mise en évidence dans le cas de 9-CAA et surtout dans celui de OxCBZ. Ce phénomène devra être pris en compte lors de l'étude de leur devenir photochimique dans les eaux naturelles. Par ailleurs, elle permet de confirmer, dans nos conditions expérimentales, que CBZ est photostable avec une photodégradation directe négligeable sur notre échelle de temps.

2. Etude cinétique du devenir de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans les eaux naturelles à l'obscurité

2.1 Cinétiques de transformation de CBZ, OxCBZ et 9-CAA

Afin d'étudier les phénomènes d'atténuation naturelle autres que photochimique et de s'assurer que les résultats qui seront obtenus sous irradiation sont bien uniquement liés à des processus impliquant les rayonnements lumineux, un suivi de la concentration de chaque composé dans la phase dissoute été réalisé dans chacune des eaux à l'obscurité. L'évolution des concentrations en composés au cours du temps est présentée sur les figures 4-4 et 4-5 :

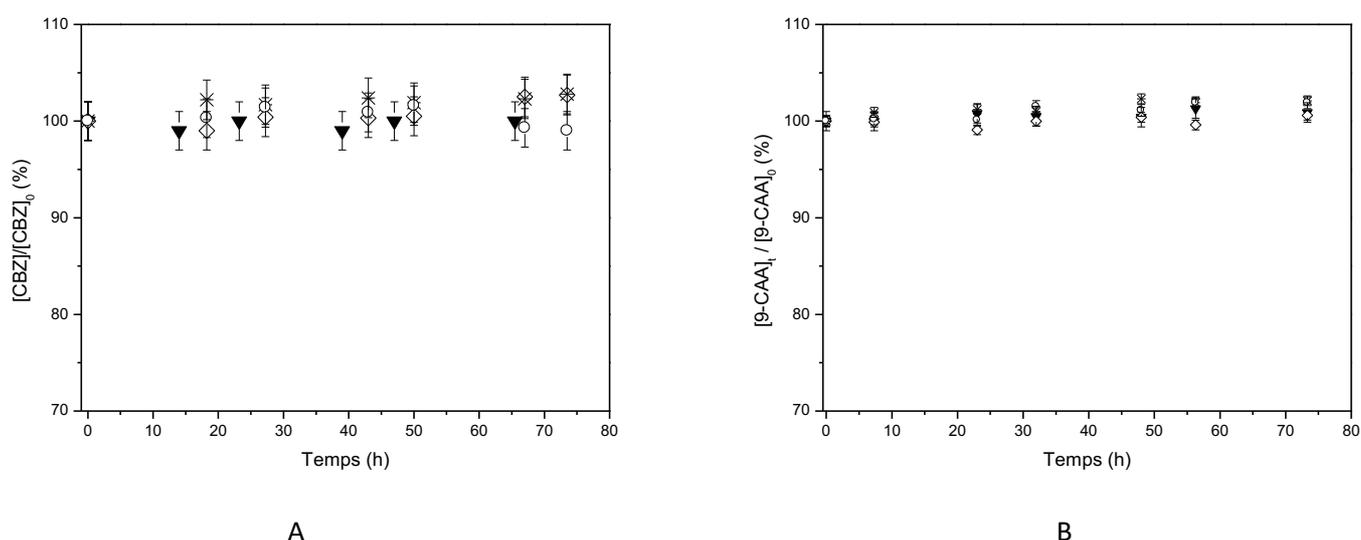


Figure 4-4 : Evolution des concentrations de CBZ (A) et de 9-CAA (B) dans les eaux naturelles à l'obscurité : Arc (▼), Berre (*), Rhône (◇), Mer (○). $[PP]_0 = 5 \text{ mg.L}^{-1}$, $T = 25^\circ\text{C}$ et $\text{pH} \approx 8$ (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique)

On constate qu'à l'obscurité aucune variation significative de la concentration en CBZ et 9-CAA dans la phase dissoute n'a été constatée quel que soit le milieu. Cela signifie qu'aucun phénomène d'atténuation naturelle, tel que l'oxydoréduction, la biodégradation ou encore l'adsorption ne se produit dans nos conditions expérimentales et dans nos milieux. Ces résultats, notamment ceux pour la carbamazépine, sont en accord avec la littérature et en particulier, avec l'étude de Matamoros et al. (2009) qui ont également montré l'absence de dégradation de CBZ à l'obscurité dans une eau de rivière. De plus, compte-tenu des valeurs de $\log K_{ow}$ de CBZ et 9-CAA (respectivement 2,5 et 3,08), il semble logique que l'adsorption de ces composés soit un processus négligeable.

A l'inverse, la figure 4-5 montre clairement que la concentration de OxCBZ diminue significativement dans chacune des eaux naturelles étudiées, voire très efficacement dans l'eau de

l'étang de Berre, avec des taux de disparition compris entre 22 et 100 % environ après 48 h et des temps de demi-vie compris entre 8 et 107 h environ (cf. tableau 4-3).

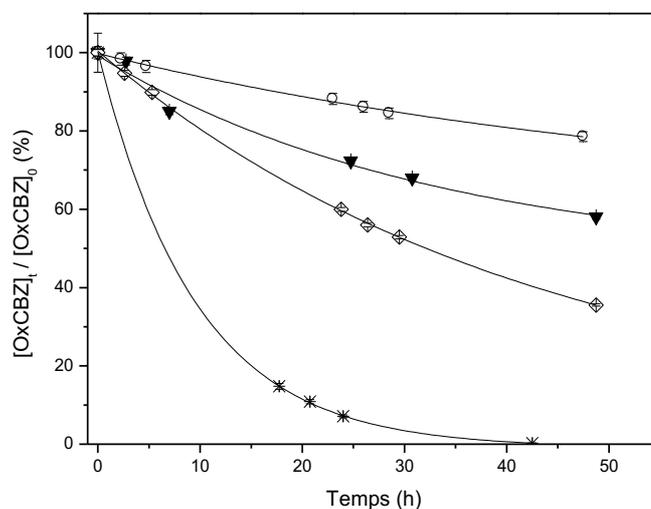


Figure 4-5 : Cinétique à l'obscurité de OxCBZ dans les eaux naturelles : Arc (▼), Berre (*), Rhône (◇), Mer (○). $[OxCBZ]_0 = 5 \text{ mg.L}^{-1}$, $T = 25^\circ\text{C}$ et $\text{pH} \approx 8$ (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique)

Tableau 4-3 : Bilan des dégradations (deg) de OxCBZ à l'obscurité dans l'Arc, le Rhône, Berre et la Méditerranée

	v (10^8 M.h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	% deg 48 h
Arc	$16,8 \pm 2,0$	$87,6 \pm 7,6$	42
Berre	70,5*	$7,5 \pm 0,6$	99,7**
Rhône	$34,8 \pm 1,2$	$32,6 \pm 1,2$	64,4
Méditerranée	$11,4 \pm 0,8$	$106,7 \pm 4,6$	21,4

* incertitude non déterminée, * valeur obtenue après 42h

2.1.1 Origine de la dégradation de OxCBZ dans les eaux naturelles

Une série d'expériences complémentaires a été réalisée en testant quatre conditions opératoires différentes afin d'évaluer la part de chaque phénomène d'atténuation naturelle (hydrolyse, adsorption, biodégradation, et oxydo-réduction) aussi bien dans la phase dissoute que dans la phase particulaire. L'hydrolyse a été négligée dans cette partie car nous avons pu montrer précédemment qu'en milieu aqueux à deux pH (environ 6 et 9), aucune transformation significative de

OxCBZ n'est observée après 48 h à l'obscurité avec une disparition très faible, de l'ordre de quelques pourcents.

Ainsi, la filtration de l'eau permet de s'affranchir de la contribution de la matière en suspension (organique, minérale ou métallique) à la disparition de OxCBZ (mes^D_{OxCBZ}). Dans la phase particulaire, des phénomènes tels que l'adsorption (ads^P_{OxCBZ}), la biodégradation ($biodeg^P_{OxCBZ}$) ou encore des réactions d'oxydo-réduction ($redox^P_{OxCBZ}$) peuvent se produire. Après filtration, la dégradation de OxCBZ à l'obscurité devrait correspondre uniquement aux phénomènes de biodégradation ($biodeg^D_{OxCBZ}$) et d'oxydoréduction ($redox^D_{OxCBZ}$) dans la phase dissoute soit encore :

$$\% \text{disp}_{OxCBZ} (\text{filtré}) = \text{redox}^D_{OxCBZ} + \text{biodeg}^D_{OxCBZ} \quad (1)$$

L'ajout de NaN_3 (10 % v/v), connu pour ses capacités à inhiber toute activité biologique (Rügge et al., 1999; Taylor et Viraraghavan, 1999), dans l'eau brute permet de s'affranchir de tout phénomène de biodégradation en phase dissoute ($biodeg^D_{OxCBZ}$) et particulaire ($biodeg^P_{OxCBZ}$). La dégradation observée est alors attribuable aux réactions d'oxydoréduction dans les deux phases ($redox^D_{OxCBZ}$ et $redox^P_{OxCBZ}$) et à l'adsorption (ads^P_{OxCBZ}) soit :

$$\% \text{disp}_{OxCBZ} (NaN_3) = \text{redox}^D_{OxCBZ} + \text{redox}^P_{OxCBZ} + \text{ads}^P_{OxCBZ} \quad (2)$$

Enfin, la combinaison de ces deux conditions (filtration et ajout d'azoture de sodium) montrera la part des réactions d'oxydo-réduction ($redox^D_{OxCBZ}$) dans la phase dissoute qui est alors le seul phénomène qui devrait être impliqué dans la transformation de OxCBZ, soit :

$$\% \text{disp}_{OxCBZ} (\text{Filtration} + NaN_3) = \text{redox}^D_{OxCBZ} \quad (3)$$

Afin de formaliser cette approche, pour élucider la disparition de OxCBZ ($disp_{OxCBZ}$), l'équation suivante a été utilisée :

$$\% \text{disp}_{OxCBZ} = \% \text{biodeg}^D_{OxCBZ} + \% \text{redox}^D_{OxCBZ} + \% \text{me}_{SOxCBZ} \quad (4)$$

$$\text{avec } \% \text{me}_{SOxCBZ} = \% \text{ads}^P_{OxCBZ} + \% \text{biodeg}^P_{OxCBZ} + \% \text{redox}^P_{OxCBZ} \quad (5)$$

Cette série d'expériences a été faite dans chacune des eaux naturelles et les résultats sont regroupés par type de masses d'eaux (les eaux douces et ensuite les eaux salées).

2.1.2 Cinétique dans l'eau de l'Arc et du Rhône

Les cinétiques de disparition de OxCBZ obtenues en faisant varier les conditions expérimentales sont présentées sur la figure 4-6 et pour plus de précision des pourcentages de disparition (% deg t h) à différents temps (t) sont rassemblés dans le tableau 4-4.

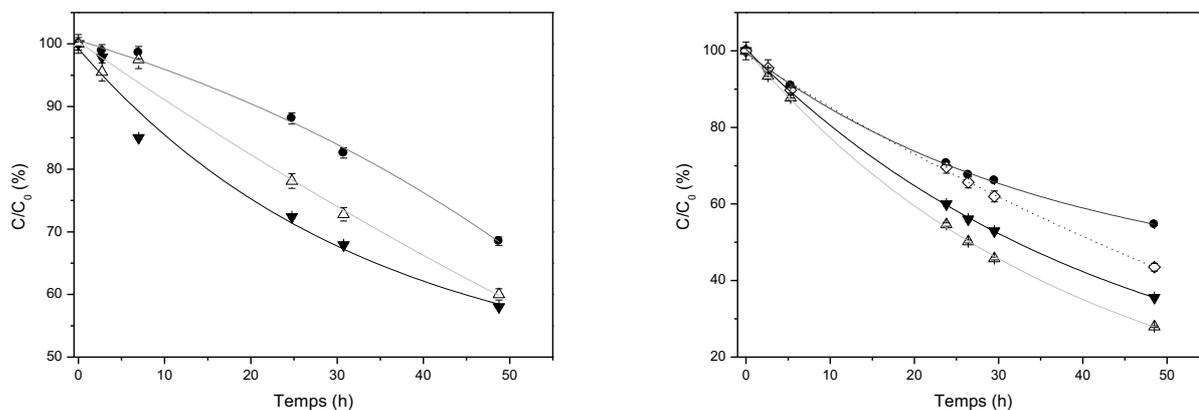


Figure 4-6 : Cinétique à l'obscurité de OxCBZ dans l'eau de l'Arc (gauche) et du Rhône (droite) : brute (▼), filtrée (●), NaN₃ (△), filtrée et NaN₃ (◇). [OxCBZ]₀ = 5 mg.L⁻¹, T = 25°C et pH ≈ 8, (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique)

Il est possible de voir que le changement des conditions opératoires affecte la disparition de OxCBZ par rapport à la cinétique de référence dans l'eau brute. Et cette modification semble dépendre de l'eau considérée.

Tableau 4-4 : Bilan des dégradations de OxCBZ à l'obscurité dans l'Arc et le Rhône

	% deg 3 h		% deg 48 h	
	Arc	Rhône	Arc	Rhône
Brute	10	9	42	64,4
Filtrée	2-3	8	32	45,3
NaN ₃	4	10	40	72,1
Filtrée + NaN ₃	non mesuré	9	31	56,5

En effet, on observe ainsi sur la figure 4-6 que la dégradation de OxCBZ est, dès les premiers instants, plus importante dans l'eau de l'Arc brute que dans l'eau filtrée ou en présence d'azoture de sodium. Ce premier résultat semble indiquer que l'absence de particules en suspension et l'ajout de NaN₃ ralentissent la disparition de OxCBZ témoignant l'importance de cette matière en suspension et de la matière organique. Toutes les conditions ont été testées et les résultats sont rassemblés dans le

tableau 4-4. A partir de ces résultats, il a été possible de calculer la contribution de chaque phénomène en utilisant les formules (1) à (5). Ainsi, il a été possible de montrer que dans l'eau de l'Arc le phénomène majoritaire est la réaction d'oxydo-réduction dans la phase dissoute (73,8 %), puis les interactions avec la phase particulaire (4,8 %) et enfin la biodégradation en phase dissoute (2,4 %). Compte-tenu de la valeur de $\log K_{ow}$ de OxCBZ (égale à 1,44), les interactions avec la phase particulaire ne relèvent certainement pas de phénomène d'hydrophobicité.

Dans l'eau du Rhône, la dégradation de OxCBZ est ralentie lorsque l'eau est filtrée ce qui suggère que la matière en suspension joue un rôle important dans la disparition de OxCBZ (environ 29,6 %). Quoiqu'il en soit, ce phénomène n'est pas le phénomène majeur car plus de 70 % de dégradation de OxCBZ est attribuable à d'autres processus. Les cinétiques obtenues en présence de NaN_3 sont surprenantes car aucune diminution de la disparition de OxCBZ n'est observée et même la disparition augmente. Des manipulations complémentaires notamment avec de l'eau du Rhône filtrée à $0,2 \mu\text{m}$ afin d'éliminer toutes les particules en suspension ainsi que la matière biologique (Bobbitt et Betts, 1992) ont alors été réalisées. Les résultats nous ont permis de montrer que cette filtration supplémentaire n'affecte pas la disparition de OxCBZ suggérant que les phénomènes de biodégradation sont négligeables aussi bien dans la phase dissoute que dans la phase particulaire. De ce fait, dans l'eau du Rhône, nous pouvons affirmer que le phénomène d'oxydo-réduction est prépondérant.

2.1.3 Cinétiques dans Berre et la mer Méditerranée

Les cinétiques de disparition de OxCBZ obtenues en faisant varier les conditions expérimentales dans l'eau de l'étang de Berre et de la mer Méditerranée sont présentées dans la figure 4-7 et pour plus de précision des pourcentages de disparition à différents temps sont rassemblés dans le tableau 4-5.

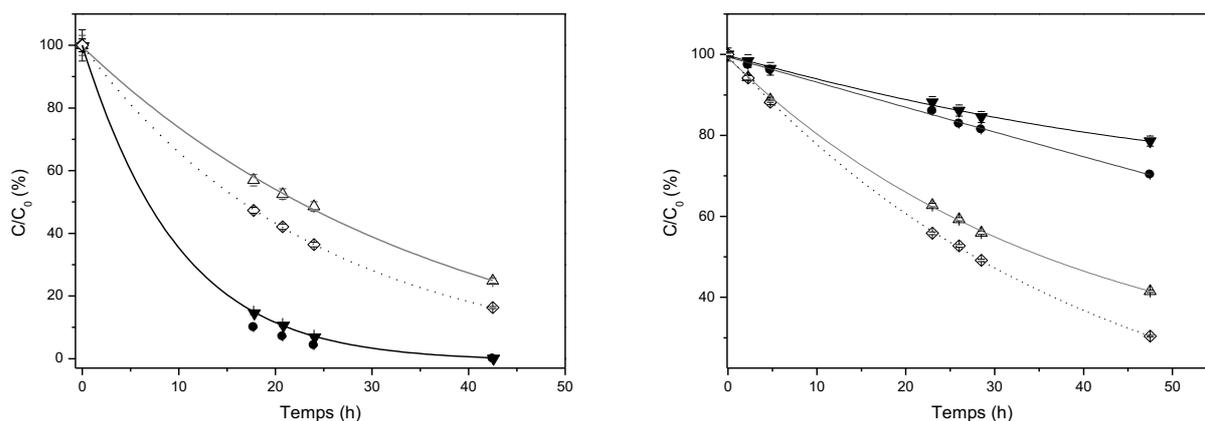


Figure 4-7 : Cinétique à l'obscurité de OxCBZ dans l'eau de l'étang de Berre (gauche) et de la mer Méditerranée (droite): brut (▼), filtrée (●), NaN₃ (△), filtrée et NaN₃ (◇). c = 5 mg.L⁻¹, T = 25°C, pH ≈ 8 (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique)

D'après la figure 4-7 et le tableau 4-5, dans l'eau de Berre, la dégradation de OxCBZ semble identique pour une eau brute ou filtrée. La part d'adsorption semble donc être très faible voire nulle. Egalement, on remarque que OxCBZ se dégrade d'une façon assez comparable en présence d'azote de sodium que ce soit dans l'eau filtrée ou non filtrée mais surtout on peut noter une diminution de la dégradation par rapport à celles mesurées en absence de NaN₃. Cela suggère que la part du phénomène de biodégradation de OxCBZ est certainement non négligeable dans cette eau (environ 20 %). Le dernier phénomène qui pourrait probablement expliquer la disparition importante de OxCBZ dans ce milieu est le phénomène d'oxydo-réduction majoritairement dans la phase dissoute.

Tableau 4-5 : Bilan des dégradations de OxCBZ à l'obscurité dans Berre et dans la mer

	% deg 42 h	% deg 3 h	% deg 48 h
	Berre	Mer	
Brute	99,7	4	21,4
Filtrée	100	10	58,6
NaN ₃	75,1	3	29,7
Filtrée + NaN ₃	83,7	10	69,6

Les résultats obtenus dans l'eau de mer montrent que la dégradation de OxCBZ est plus importante lorsque l'eau est filtrée et assez comparable en présence ou en absence de NaN₃. L'impact assez faible de NaN₃ sur la cinétique de disparition de OxCBZ semble suggérer que la biodégradation est un phénomène peu important dans l'eau de mer. Des manipulations complémentaires notamment avec de l'eau de mer filtrée à 0,2 µm nous ont permis de montrer que la disparition de OxCBZ était

fortement ralentie après la filtration (55 % de disparition contre 97,7 % en 24 h) suggérant que les phénomènes de biodégradation et d'adsorption ne sont pas négligeables dans la phase particulaire. Ce résultat est plutôt en désaccord avec ceux exposés précédemment et de ce fait, dans l'eau de mer, il nous a été difficile de préciser davantage les origines de la disparition de OxCBZ.

2.2 Conclusion

Cette partie a permis de mettre en évidence que dans les eaux naturelles sélectionnées, CBZ et 9-CAA ne subissait aucune transformation en absence de lumière. Par contre, des phénomènes de transformation autre que photochimique entrent en jeu de façon non négligeable pour OxCBZ, en particulier l'oxydo-réduction (principalement dans l'eau de Berre). Ces processus devront être pris en considération dans l'étude de son comportement photochimique dans les eaux naturelles.

3. Etude cinétique du comportement photochimique de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans les eaux naturelles

3.1 Cinétiques de transformation de CBZ, OxCBZ et 9-CAA sous irradiation lumineuse

Les cinétiques de disparition présentées sur la figure 4-8 pour ces trois composés ont été obtenues par irradiation des quatre milieux naturels sélectionnés juste après l'ajout du composé organique, c'est-à-dire sans attendre l'équilibre à l'obscurité comme cela a été observé précédemment (notamment pour OxCBZ). Ces courbes montrent que les trois composés CBZ, OxCBZ et 9-CAA se transforment au cours de leur exposition à la lumière dans les quatre milieux naturels, mais elles soulignent aussi des comportements bien différents en fonction du couple composé organique et milieu naturel. Afin de mieux évaluer au cas par cas, ces comportements singuliers, les vitesses initiales (v), constantes de vitesse (k), pourcentages de dégradation (% après 3 et 50 h, respectivement $\%_{3h}$ et $\%_{50h}$) et temps de demi-vie ($t_{1/2}$) ont été rassemblés dans les tableaux 4-6, 4-7 et 4-8 pour chacun des trois composés.

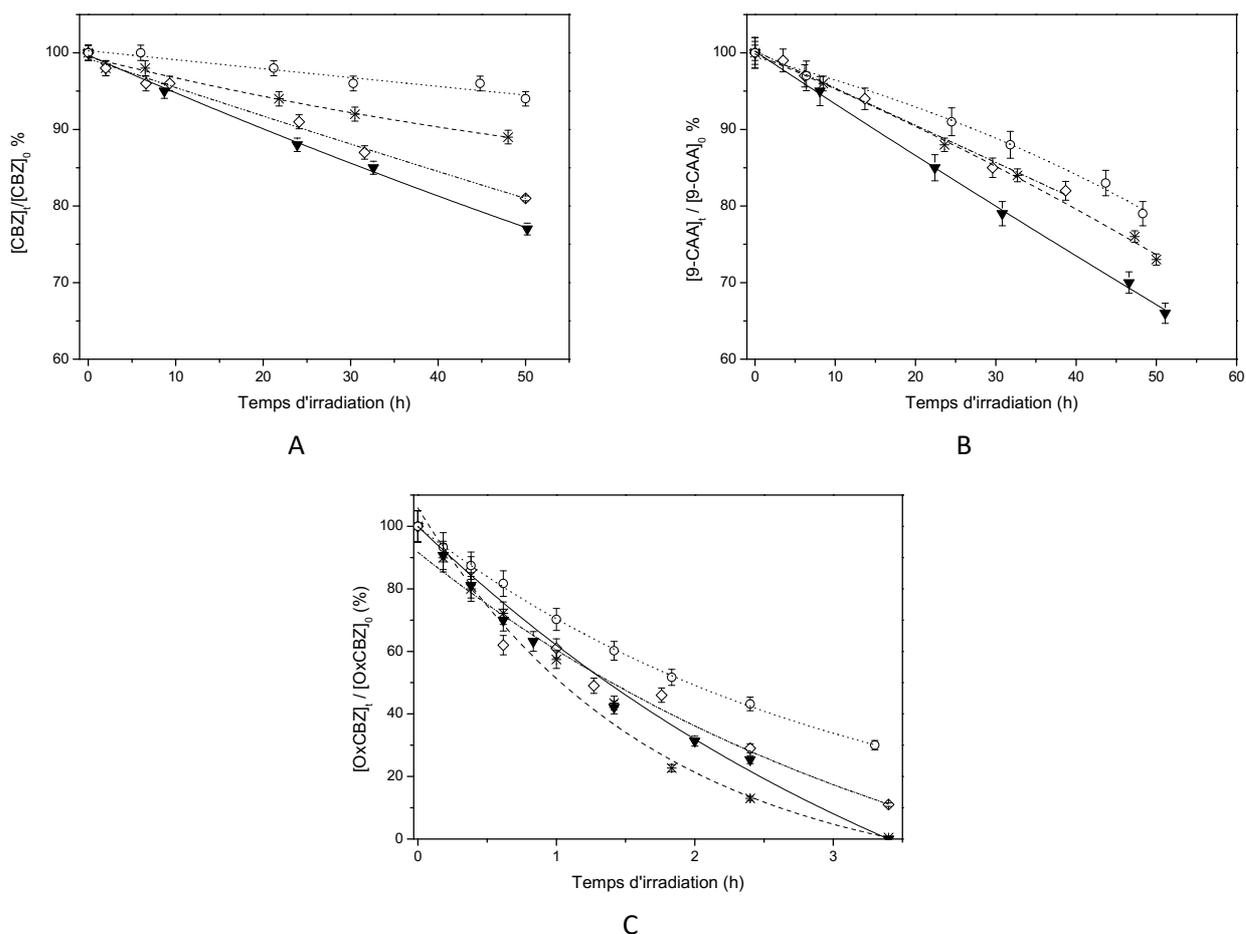


Figure 4-8 : Cinétique sous irradiation de CBZ (A), du 9-CAA (B) et de OxCBZ (C) dans les eaux naturelles : Arc (▼), Berre (*), Rhône (◇), Mer (○), concentration égale à 5 mg.L⁻¹, lampe Xe de 300 W, (pour une expérience, l'erreur reportée correspond à un triplicat d'injection analytique)

3.1.1 Comportement photochimique de la carbamazépine

On peut noter que la carbamazépine se dégrade dans des milieux aquatiques naturels alors qu'aucune disparition n'avait été observée dans de l'eau ultrapure sous irradiation ou encore à l'obscurité dans les eaux naturelles. Le temps de demi-vie de CBZ dans les eaux naturelles est diminué au minimum d'un facteur 4 ($t_{1/2} < 24$ jours, mer) et au maximum d'un facteur 16 ($t_{1/2} < 6$ jours, Arc) par rapport à sa transformation dans l'eau ultra-pure. Ces premières observations montrent clairement que dans les eaux naturelles des réactions de dégradation photoinduites sont responsables de la disparition de CBZ.

Tableau 4-6 : Bilan des cinétiques de dégradation de CBZ ($2,1 \times 10^{-5}$ M) sous irradiation dans les différentes eaux, lampe Xe 300W

	v (10^{-8} M.h $^{-1}$)	k (10^{-4} h $^{-1}$)	$t_{1/2}$ (h)	% _{3h}	% _{50h}
Arc	$9,8 \pm 0,4$	$52,0 \pm 2,0$	$133,4 \pm 5,2$	3	23
Berre	$4,8 \pm 0,3$	$23,3 \pm 1,3$	$297,9 \pm 19,0$	2	11
Rhône	$7,9 \pm 0,3$	$40,5 \pm 1,3$	$171,3 \pm 5,6$	3	19
Mer	$2,5 \pm 0,3$	$12,5 \pm 1,4$	$555,0 \pm 62,6$	0	6

On peut constater dans la littérature, une grande disparité entre les valeurs des constantes cinétiques de photodégradation de CBZ déterminées dans des eaux naturelles. Pour exemple, des temps de demi-vie compris entre 6 h (Lam et Mabury, 2005) et 907 h (Andreozzi et al., 2002) ont été reportés. Cette gamme de valeurs englobe, néanmoins, les valeurs déterminées dans le présent travail. Cette forte disparité s'explique sur un plan photochimique par la nature, la puissance des sources lumineuses et leur domaine de longueur d'onde d'émission. En effet, il est à souligner que les constantes cinétiques les plus faibles ont été déterminées lors de l'utilisation de la lumière solaire (Andreozzi et al., 2002 et Matamoros et al., 2009) et les plus fortes avec des lampes Xe (Lam et Mabury, 2005 et Matamoros et al., 2009) du fait des grandes différences d'énergie d'émission des sources. Sur un plan environnemental également la composition chimique des eaux naturelles et des espèces chimiques réactives probablement générées sous irradiation varient et influent sur les constantes cinétiques, comme le montrent nos résultats, puisque dans notre cas, toutes les conditions photochimiques sont égales par ailleurs.

Cependant, bien que la dégradation de CBZ ait été observée dans tous nos milieux, on remarque que la dégradation peut être classée dans l'ordre décroissant suivant : Arc > Rhône > Berre > mer Méditerranée. Cet ordre semble être corrélé à la salinité des milieux avec une diminution de la transformation de CBZ dans les milieux plus salins. En effet, le temps de demi-vie est multiplié par plus de 4 lorsqu'on passe de l'eau de la rivière Arc, la plus douce, à l'eau de mer. Ce résultat est en partie en accord avec des travaux réalisés par Matamoros et al. (2009) qui ont montré que le temps de demi-vie de CBZ était légèrement augmenté (d'un facteur 1,12 à 1,75) lors de l'étude en eau salée par rapport à l'eau douce. Cependant, les auteurs n'ont avancé aucune hypothèse particulière permettant de justifier ces résultats.

Afin de mieux appréhender le ou les paramètres physico-chimiques (paramètres globaux et contenu chimique) de l'eau qui pourrai(en)t avoir la plus grande influence sur la dégradation de CBZ, des tracés de la vitesse initiale de disparition de CBZ en fonction de ces différents paramètres ont été

réalisés. D'une façon générale, les coefficients de corrélation de ces tracés se sont avérés être inférieurs à 0,80 hormis pour les deux présentés en figure 4-9.

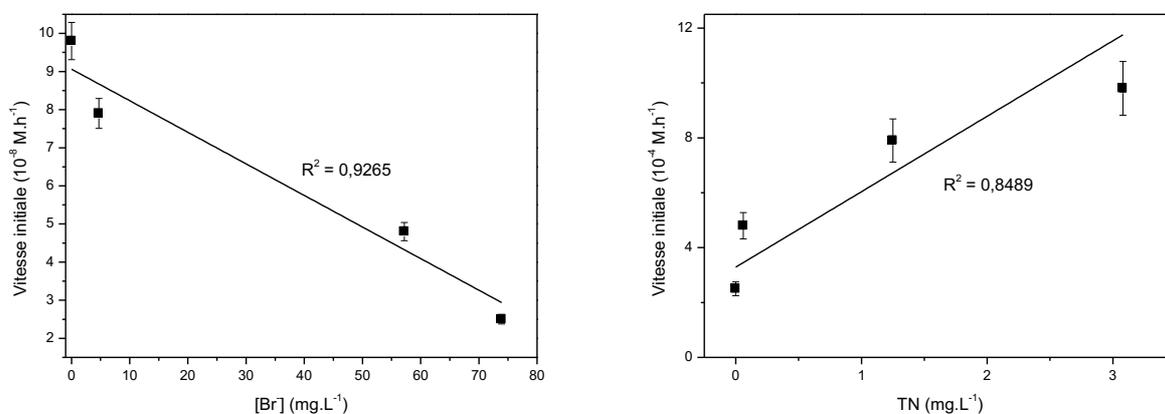


Figure 4-9 : Tracé de la corrélation entre la vitesse initiale de disparition de CBZ et la concentration en ions bromure (gauche) et en azote total (TN, droite). $[\text{CBZ}]_0 = 5 \text{ mg.L}^{-1}$, lampe Xe 300 W

Ces tracés indiquent que la disparition de CBZ est favorisée par une concentration élevée en azote total et défavorisée par une concentration élevée en ion bromure. La concentration plus importante d'azote total dans l'eau de l'Arc justifie donc la meilleure dégradation de CBZ et les quantités plus importantes d'ions bromure dans les eaux salées, sa dégradation moins efficace.

3.1.2 Comportement photochimique de l'acide 9-carboxylique acridine

Concernant le 9-CAA, les valeurs reportées dans le tableau 4-7 indiquent que ce composé est dégradé sous irradiation dans les eaux naturelles, mais d'une façon moins efficace que dans l'eau ultrapure avec des temps de demi-vie jusqu'à deux fois plus grand que dans l'eau ultrapure ($t_{1/2} = 78,3 \text{ h}$).

Tableau 4-7 : Bilan des cinétiques de dégradation de 9-CAA ($2,24 \times 10^{-5} \text{ M}$), sous irradiation dans les différentes eaux, lampe Xe 300W

	v (10^{-8} M.h^{-1})	k (10^{-4} h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	% _{3h}	% _{50h}
Arc	$15,9 \pm 0,2$	$79,8 \pm 1,6$	$86,9 \pm 1,7$	3	33
Berre	$12,3 \pm 0,3$	$60,4 \pm 2,7$	$114,7 \pm 5,0$	1	27
Rhône	$11,1 \pm 0,5$	$52,5 \pm 2,4$	$132,1 \pm 5,9$	1	27
Mer	$9,1 \pm 0,4$	$45,2 \pm 2,9$	$153,5 \pm 1,0$	1	22

Néanmoins, si on considère les vitesses initiales de disparition de 9-CAA, celle obtenue dans l'Arc est plus élevée que celle obtenue dans l'eau ultrapure ($12,8 \times 10^{-8} \text{ M.h}^{-1}$) témoignant de l'implication de processus de dégradation photoinduite. Dans l'eau de l'étang de Berre, la vitesse initiale est comparable à celle obtenue dans l'eau ultrapure et celles-ci sont inférieures dans l'eau du Rhône et l'eau de mer. Ce résultat implique que des réactions d'inhibition, telles que le piégeage d'états excités ou des compétitions d'absorption ou encore un mélange plus complexe de réactions d'inhibition, se produisent et ralentissent la dégradation de 9-CAA.

Afin de vérifier ces différentes hypothèses, les quantités de lumière absorbée par les eaux naturelles ont été considérées et celles-ci montrent que les milieux sont classés dans l'ordre croissant de leur absorption comme suit : Rhône < Mer < Berre < Arc. Or, les vitesses initiales de dégradation de 9-CAA ainsi que les pourcentages de dégradation après 50 h d'irradiation sont en désaccord avec cet effet, car ces valeurs sont classées dans le même ordre. Ceci écarte donc l'hypothèse précédente sur l'implication de compétitions d'absorption dans nos expériences.

Par ailleurs, des essais de corrélation entre la vitesse initiale de dégradation de 9-CAA et les paramètres physico-chimiques des eaux ne nous ont pas permis de faire ressortir un critère influent, certainement du fait de l'implication concomitante du processus de photolyse dans la dégradation du 9-CAA.

Enfin, il est à noter que comme pour CBZ, la dégradation du 9-CAA est plus importante dans les eaux douces (maximum dans l'Arc) que dans les eaux salées (minimum dans l'eau de mer) suggérant une origine identique bien qu'aucune corrélation n'ait pu être établie.

3.1.3 Comportement photochimique de l'oxcarbazépine

Pour OxCBZ, les vitesses initiales de photodégradation dans les eaux naturelles (tableau 4-8) sont environ 3 fois plus élevées que celle mesurée dans l'eau ultrapure ($v = 236 \times 10^{-8} \text{ M.h}^{-1}$) et elles sont 4 à 200 fois plus grandes que celles obtenues à l'obscurité dans les eaux naturelles (comprises entre $4,1$ et $197,2 \times 10^{-8} \text{ M.h}^{-1}$). Il en est de même pour les temps de demi-vie qui sont vraiment très faibles dans les eaux naturelles sous irradiation en comparaison à ceux obtenus dans l'eau ultrapure (sous irradiation (6,8 h) ou à l'obscurité dans les eaux naturelles (entre 7,5 et 106,7 h). Ces résultats soulignent la forte photodégradabilité de OxCBZ dans les eaux de surface à l'inverse de ce qui a été décrit par une autre équipe de recherche (Li et al., 2011).

Tableau 4-8 : Bilan des cinétiques de dégradation de OxCBZ ($2,46 \times 10^{-5}$ M) sous irradiation dans les différentes eaux, lampe Xe 300W

	v (10^{-8} M.h $^{-1}$)	k (10^{-4} h $^{-1}$)	$t_{1/2}$ (h)	% _{3h}	% _{50h}
Arc	807,9 ± 8,0	5784,9 ± 60,3	1,2 ± 0,01	90	100
Berre	791,3 ± 42,2	8269,3 ± 378,2	0,8 ± 0,04	90	100
Rhône	729,6 ± 10,8	5213,2 ± 391	1,3 ± 0,09	85	100
Mer	669,4 ± 11,5	3561,9 ± 62,1	1,9 ± 0,03	65	100

L'ensemble de ces résultats montre clairement que des processus photoinduits augmentent grandement la dégradation de OxCBZ dans les eaux naturelles et qu'ils contribuent même de façon prépondérante à sa transformation, dans des proportions dépendantes du type d'eau. En effet, si on considère que les différents processus peuvent se produire sans modification de leur vitesse initiale, la photolyse participera quel que soit le milieu à 25 % de la disparition de OxCBZ, l'oxydo-réduction à 22 % dans l'eau de Berre (ce phénomène étant négligeable dans les autres milieux) et les réactions photoinduites à environ 50 % dans l'eau de Berre et 70 % dans les autres eaux. L'implication de l'ensemble de ces processus justifie probablement que la plus forte dégradation de OxCBZ ait été observée dans l'eau de l'étang de Berre.

De la même façon que pour les autres composés, des essais de corrélation entre la vitesse initiale de dégradation de OxCBZ et les paramètres physico-chimiques des eaux ont été entrepris mais aucun critère particulier n'a pu être identifié comme influent.

3.1.4 Comparaison entre les comportements de CBZ, OxCBZ et 9-CAA

Dans les eaux naturelles et sous irradiation solaire simulée, la carbamazépine reste le composé le moins dégradé suivi par l'acide 9-carboxylique acridine et par l'oxcarbazépine, qui se dégrade complètement en un peu moins de 4 h. Les processus mis en jeu pour chacun des composés impliquent des réactions de photodégradation induite mais aussi de photolyse pour 9-CAA et OxCBZ et d'oxydo-réduction pour OxCBZ.

Leur dégradation est en général favorisée dans l'eau de l'Arc et défavorisée dans les eaux salées. Ceci pourrait être dû à des concentrations en carbone organique dissous, ou en azote total plus élevées dans l'eau de l'Arc et à une concentration élevée en ions bromure dans l'eau de mer, agissant comme un compétiteur dans les réactions photoinduites. Néanmoins, ce comportement n'a pas été observé pour OxCBZ du fait de sa forte oxydo-réduction dans l'eau de Berre. Compte-tenu de ces résultats et des corrélations mises en évidence, une meilleure compréhension des processus

photoinduits entrant en jeu dans ces dégradations passe par l'étude de la réactivité des trois composés avec les espèces chimiques réactives susceptibles de se former dans nos milieux (cf chap 3).

3.2 Détermination des constantes de réactions

Les constantes de réactions entre les 3 composés étudiés et les espèces réactives identifiées ont été déterminées en mettant en œuvre deux méthodes. La première approche s'est appuyée sur l'utilisation de la spectrophotométrie résolue en temps et la seconde sur l'exposition continue à une irradiation polychromatique en mettant en œuvre des réactions de compétition, comme cela a été décrit dans le chapitre 2 (matériels et méthodes).

3.2.1 Spectrophotométrie résolue en temps

Les expériences par spectrophotométrie résolue en temps ont été réalisées pour établir l'importance des radicaux hydroxyles dans la dégradation des 3 produits pharmaceutiques ainsi que celui des radicaux carbonates dans le cas de OxCBZ.

3.2.1.1 Détermination des constantes de réaction avec les radicaux hydroxyles $\bullet\text{OH}$

Afin de déterminer ces constantes, nous nous sommes attachés à évaluer quantitativement l'effet de l'ajout des ions thiocyanate, à une solution contenant le composé d'intérêt et du peroxyde d'hydrogène, sur la formation des radicaux anions $(\text{SCN}_2)^{\bullet-}$. En effet, dans ce cas, après excitation du peroxyde d'hydrogène, les réactions suivantes vont avoir lieu :

Photolyse de H_2O_2 pour la génération des radicaux hydroxyles : $\text{H}_2\text{O}_2 + h\nu \rightarrow 2 \bullet\text{OH}$

Transformation du composé (P) photoinduite par $\bullet\text{OH}$:



Formation des radicaux anions, entrant en compétition avec la réaction précédente :



La formation de $(\text{SCN}_2)^{\bullet-}$ a été suivie en enregistrant l'absorbance à 500 nm, le radical du dimère du thiocyanate présentant un coefficient d'absorption molaire autour de cette longueur d'onde ($\epsilon_{480\text{nm}} = 7600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Buxton et al., 1988; Milosavljevic et LaVerne, 2005; Neta et al., 1988). Ainsi, il est possible de déterminer la vitesse de formation apparente de $(\text{SCN}_2)^{\bullet-}$, k_{obs} , en fonction de la concentration en SCN^- . Or, cette vitesse de formation est dépendante des réactions entre les radicaux hydroxyles et le composé P et le compétiteur SCN^- , donc la relation suivante est applicable :

$$k_{\text{obs}} = k_1[\text{P}] + k_2[\text{SCN}^-]$$

avec k_2 la constante de vitesse de réaction entre SCN^- et $\bullet\text{OH}$ en absence de P, k_1 est la constante de vitesse de réaction entre $\bullet\text{OH}$ et P, et $[\text{P}]$ et $[\text{SCN}^-]$ respectivement les concentrations en composé et en ions thiocyanate.

Enfin, le tracé de k_{obs} en fonction de $[\text{SCN}^-]$ pour une concentration P connue devrait conduire à l'obtention d'une droite, validant ainsi notre approche et son ordonnée à l'origine devrait nous permettre de déterminer k_1 .

3.2.1.1.1 Détermination de la constante de réaction entre CBZ et $\bullet\text{OH}$

L'étude par photolyse laser flash (nanoseconde) a été réalisée à une concentration constante en CBZ et variable en ions thiocyanate, sous excitation à 266 nm et en milieu aéré.

L'ajout d'ions thiocyanate favorise la formation des radicaux $(\text{SCN}_2)^{\bullet-}$ comme le montre l'augmentation de l'absorbance à 500 nm avec la concentration en thiocyanate (figure 4-10A). Ceci s'explique par une réaction de compétition en faveur de la formation de $(\text{SCN}_2)^{\bullet-}$ (constante de vitesse élevée entre le thiocyanate et $\bullet\text{OH}$) et au détriment de la réaction des radicaux $\bullet\text{OH}$ avec CBZ.

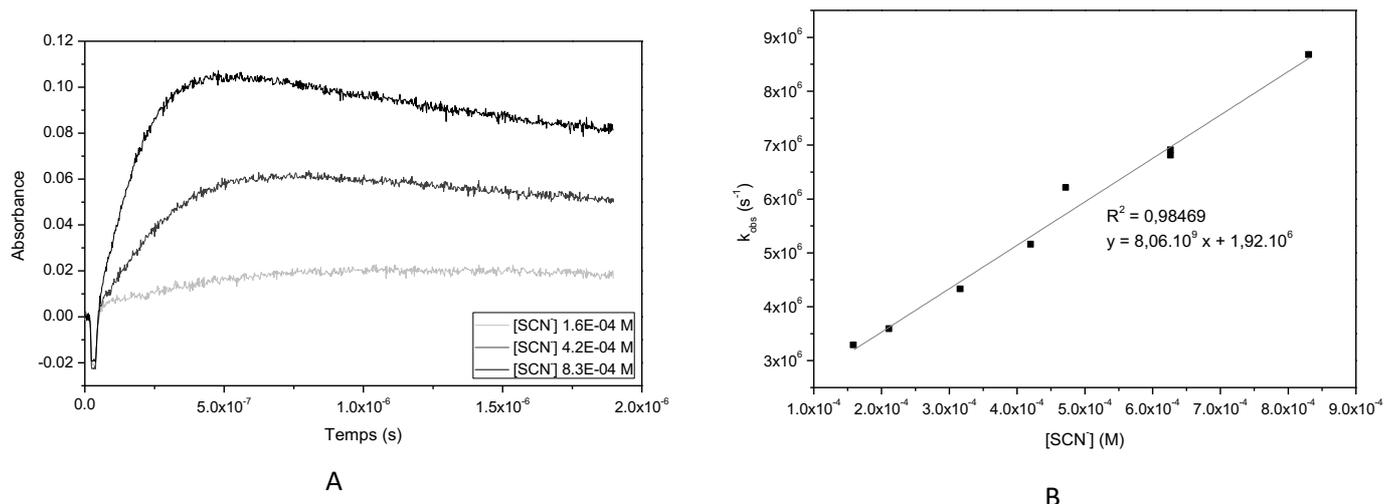


Figure 4-10 : A) Evolution de l'absorbance à 500 nm en fonction du temps et de la concentration de SCN⁻, B) Evolution de la constante de vitesse observée, k_{obs} , en fonction de la concentration de SCN⁻.
 $[CBZ] = 8,46 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[H_2O_2] = 3,75 \times 10^{-2} \text{ M}$ et $\lambda_{exc} = 266 \text{ nm}$.

Le tracé de la constante de vitesse observée k_{obs} en fonction de la concentration initiale de thiocyanate est présenté dans la figure 4-10B. La linéarité de relation reliant ces deux paramètres a bien été vérifiée avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,98, validant notre approche. Ensuite, k_2 a été déterminé comme étant égale à $8,06 \pm 0,38 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui est en accord avec la littérature. En effet, la constante de réaction entre les ions thiocyanate et les radicaux hydroxyles a déjà été évaluée entre 7 et $9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Buxton et al., 1988; Milosavljevic et LaVerne, 2005; Neta et al., 1988).

De plus, la figure 4-10B permet aussi de déterminer $k_1[CBZ]$ à partir de l'ordonnée à l'origine, soit une constante k_1 évaluée à environ $2,27 \pm 0,24 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur est de l'ordre de grandeur de la limite de diffusion ($1 \text{ à } 2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) sachant qu'il a été suggéré que cette limite peut même s'avérer plus grande en s'appuyant sur un mécanisme comparable à celui décrit par Grotthuss (Wols et Hofman-Caris, 2012). Les valeurs calculées dans notre travail sont proches de valeurs déjà publiées comprises entre $(8,02 \pm 1,9) \times 10^9$ et $(1,8 \pm 0,2) \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Vogna et al., 2004 ; Wols et Hofman-Caris, 2012 ; Huber et al., 2003 ; Lam et Mabury, 2005 ; Wols et al., 2013 ; De Laurentiis et al., 2012b) et confirment la réactivité importante des radicaux $\bullet\text{OH}$ vis-à-vis de CBZ.

3.2.1.1.2 Détermination de la constante de réaction entre OxCBZ et $\bullet\text{OH}$

Comme pour CBZ, l'étude a été réalisée par excitation à 266 nm, en milieu aéré et avec une concentration de OxCBZ fixe. La figure 4-11A montre l'augmentation du signal à 500 nm en présence

de SCN^- à différentes concentrations du fait de la réaction des ions SCN^- avec les radicaux $\bullet\text{OH}$.

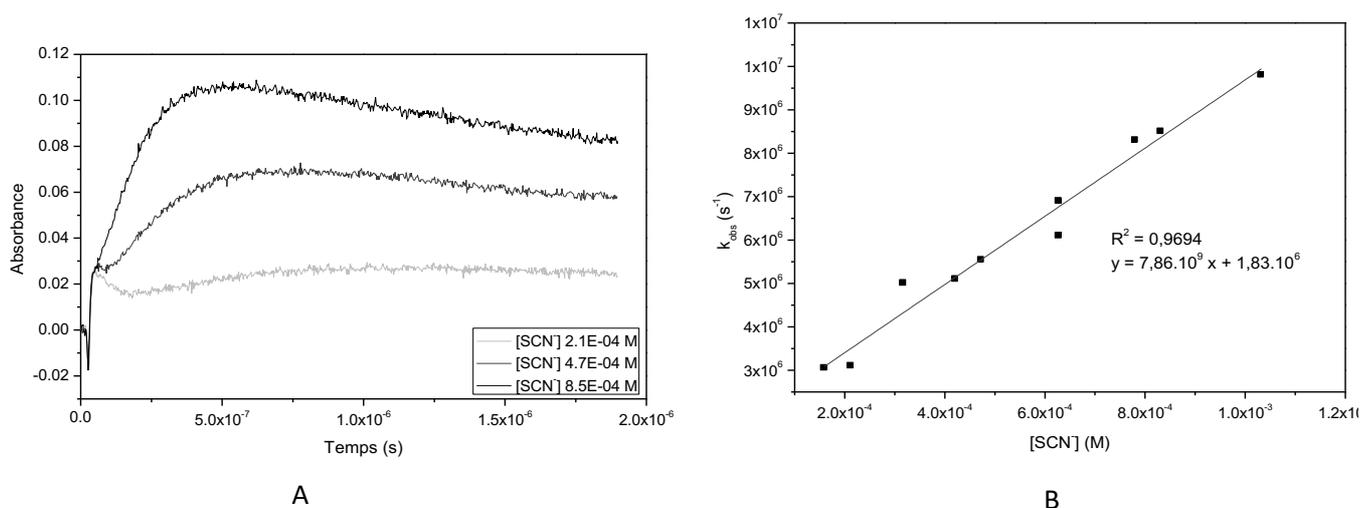


Figure 4-11 : A) Evolution de l'absorbance à 500 nm en fonction du temps et de la concentration de SCN^- , B) Evolution de la constante de vitesse observée, k_{obs} , en fonction de la concentration de SCN^- . $[\text{OxCBZ}] = 8,32 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 3,75 \times 10^{-2} \text{ M}$ et $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$.

De la même façon que précédemment, les constantes de vitesse de premier ordre k_{obs} ont été déterminées en fonction de la concentration initiale de thiocyanate et le tracé linéaire de k_{obs} en fonction de $[\text{SCN}^-]$ est présenté dans la figure 4-11B avec un coefficient de corrélation de 0,97. Ainsi une constante k_2 égale à $7,86 \pm 0,46 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a pu être déterminée et est en accord avec la littérature comme cité précédemment. De plus, à partir de l'ordonnée à l'origine de la droite sur la figure 4-12B, la constante k_1 a été calculée et est égale à environ $2,20 \pm 0,34 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur est environ 10 fois plus élevée que celle trouvée par une autre équipe (Bu et al., 2017) $k_{\bullet\text{OH},\text{OxCBZ}} = 2,43 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et témoigne de la forte réactivité des radicaux $\bullet\text{OH}$ avec OxCBZ.

3.2.1.1.3 Détermination de la constante de réaction entre 9-CAA et $\bullet\text{OH}$

Cet autre essai a été mené dans les mêmes conditions que les expériences précédentes avec une concentration de 9-CAA de $8,06 \times 10^{-5} \text{ M}$. A partir de l'évolution du signal attribué au radical anion $\text{SCN}_2^{\bullet-}$ formé par les radicaux hydroxyyles en présence de 9-CAA à différentes concentrations de SCN^- présenté sur la figure 4-12A, k_{obs} a été tracé en fonction de la concentration initiale en SCN^- (figure 4-12B).

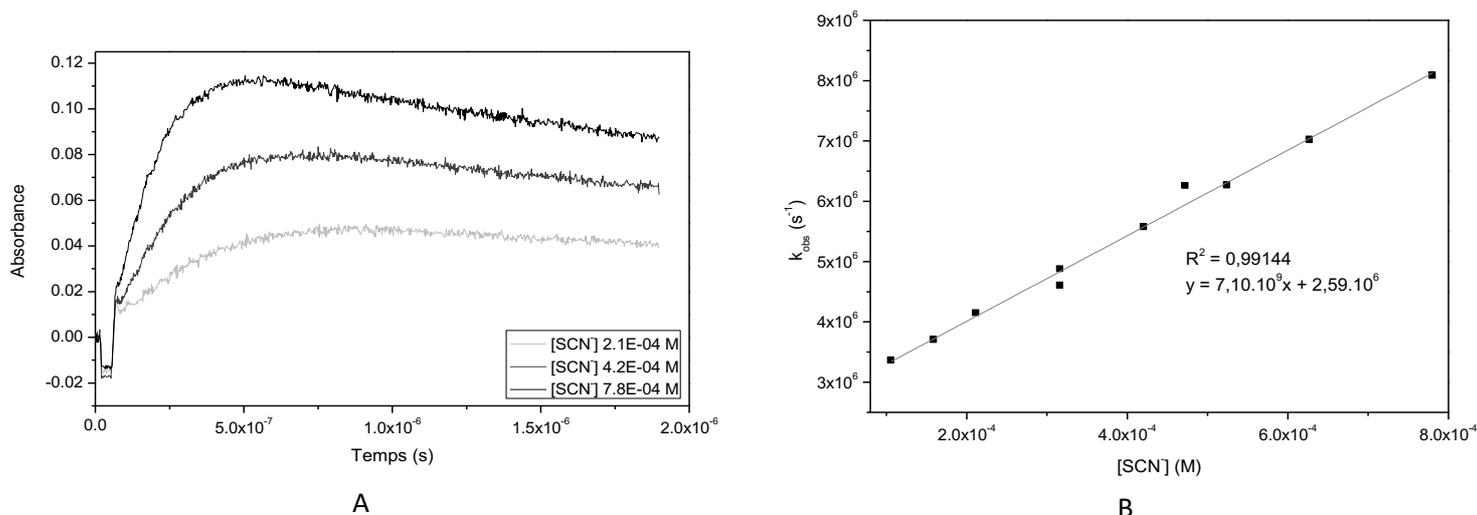
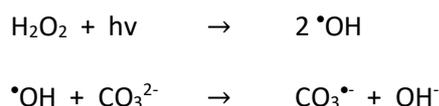


Figure 4-12 : A) Evolution de l'absorbance à 500 nm en fonction du temps et de la concentration de SCN⁻, B) Evolution de la constante de vitesse observée, k_{obs} , en fonction de la concentration de SCN⁻.
 [9-CAA] = $8,06 \times 10^{-5}$ M ; [H₂O₂] = $3,75 \times 10^{-2}$ M et λ_{exc} = 266 nm.

Le tracé de k_{obs} en fonction de la concentration initiale de thiocyanate est linéaire avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,99 (cf. figure 4-12B) et sa pente nous a permis de déterminer k_2 qui est égale à $7,1 \pm 0,22 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, valeur à nouveau cohérente avec la littérature. A partir de l'ordonnée à l'origine de cette droite, k_1 a pu être calculée et est égale à $3,2 \pm 0,12 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur élevée montre aussi la forte réactivité des radicaux $\bullet\text{OH}$ avec 9-CAA.

3.2.1.2 Détermination de la constante de réaction avec CO₃^{•-} par réaction de compétition

Dans cette partie, une démarche similaire à celle présentée pour la détermination des constantes de réaction avec les radicaux $\bullet\text{OH}$ a été mise en œuvre, avec la détection directe des radicaux carbonates par spectrophotométrie résolue en temps du fait de leur forte absorption à 600 nm ($\epsilon = 1860 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Behar et al., 1970). La production des radicaux CO₃^{•-} a été obtenue par l'excitation du peroxyde d'hydrogène en présence d'ions carbonate selon les réactions suivantes :



Cependant, dans nos conditions expérimentales ([CBZ] = $2,9 \times 10^{-4}$ M ; [OxCBZ] = $8,3 \times 10^{-5}$ M, [9-CAA] = $6,3 \times 10^{-5}$ M, [H₂O₂] = $3,75 \times 10^{-2}$ M, [CO₃²⁻] = 0,1 M), bien que la formation des radicaux CO₃^{•-}

ait été validée, aucune évolution de la décroissance de l'absorbance à 600 nm n'a été observée, malgré la diminution de l'absorbance à 600 nm. Un exemple est donné dans la figure 4-13 pour CBZ. Ces résultats, peuvent s'expliquer par une réactivité plus importante des radicaux $\bullet\text{OH}$ avec CBZ ($k_{\text{CBZ},\bullet\text{OH}} = 2,27 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) qu'avec les ions carbonate ($k_{\bullet\text{OH},\text{CO}_3^{\bullet-}} = 2,3 - 8,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (Buxton et Elliot, 1986)), ce qui limite la formation de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ et également la réaction entre CBZ et $\text{CO}_3^{\bullet-}$ mais aussi une compétition d'absorbance entre CBZ et le peroxyde d'hydrogène. Des résultats similaires ont été obtenus pour OxCBZ et 9-CAA.

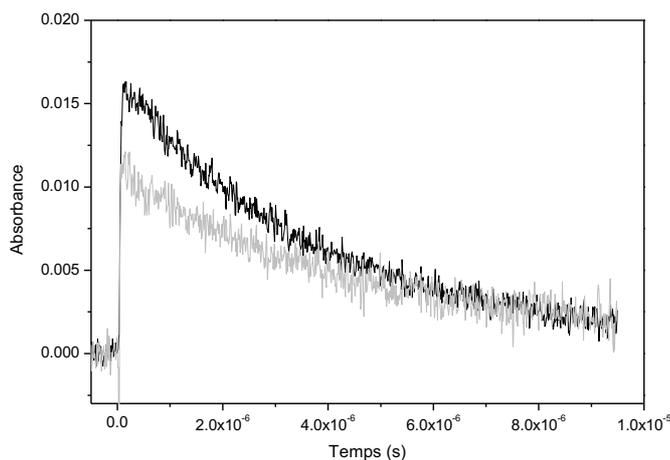


Figure 4-13 : A) Evolution du signal à 600 nm correspondant au radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ en présence (gris clair) et absence (noir) de CBZ, $[\text{CBZ}] = 2,9 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 3,75 \times 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,1 \text{ M}$ et $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$,

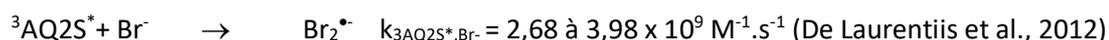
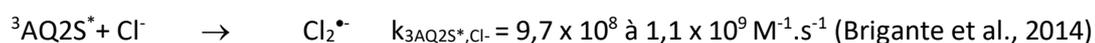
Ainsi, dans nos conditions expérimentales il n'a pas été possible de déterminer les constantes de réaction des radicaux $\text{CO}_3^{\bullet-}$ avec les composés sélectionnés, du fait de leur forte réactivité avec les radicaux $\bullet\text{OH}$, de leur limite de solubilité et aussi d'une concentration en ions carbonate trop faible. Néanmoins, nous supposons que la réactivité de CBZ avec les radicaux $\text{CO}_3^{\bullet-}$ est faible en se basant sur la littérature (De Laurentiis et al., 2012a) avec une constante de l'ordre de $10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et que les constantes de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ avec OxCBZ et 9-CAA sont du même ordre de grandeur.

3.2.2 Détermination des constantes de réactions entre les composés sélectionnés et les radicaux chlorures et bromures

Afin de déterminer des constantes de réactions entre CBZ, OxCBZ et 9CAA avec les radicaux $\text{Cl}_2^{\bullet-}$ et $\text{Br}_2^{\bullet-}$, des réactions de compétition ont été mises en œuvre en présence de l'hydroquinone (HQ) utilisée comme compétiteur.

Tout d'abord, des conditions de travail ont été mises au point, afin de générer sélectivement les radicaux Cl_2^\bullet et Br_2^\bullet en excluant la production de radicaux hydroxyles (trop réactifs vis-à-vis de CBZ, OxCBZ et 9-CAA) et en évitant la photolyse de OxCBZ, 9-CAA et HQ (non négligeable dans l'eau ultrapure). C'est pourquoi l'utilisation du peroxyde d'hydrogène a été écartée et l'anthraquinone-2-sulfonate (AQ2S) a été choisie pour générer les radicaux tout en limitant l'absorption de la lumière par les autres composés.

Ainsi, le sel de sodium de l'anthraquinone-2-sulfonate (AQ2S) a été employé pour former l'état excité triplet $^3\text{AQ2S}^*$ sous irradiation lumineuse. Cette espèce étant très réactive et pouvant oxyder une large gamme de molécules et d'ions dissous dans l'eau (Maddigapu et al., 2010), elle a été utilisée en présence des ions Cl^- ou Br^- pour produire efficacement les radicaux dimères anioniques, Cl_2^\bullet et Br_2^\bullet selon les réactions suivantes :



En parallèle, les conditions opératoires ont été optimisées afin de limiter l'absorption de la lumière par HQ, OxCBZ et 9-CAA, en utilisant AQ2S à une concentration ($2 \times 10^{-4} \text{ M}$) lui permettant d'absorber tout le flux lumineux (cf. figure 4-14).

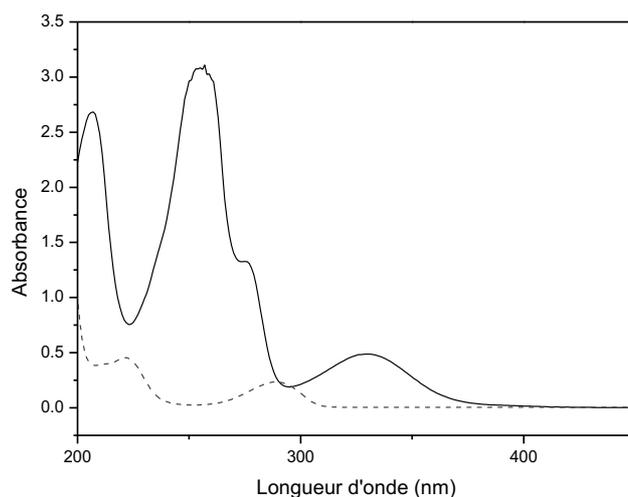


Figure 4-14 : Spectres d'absorption UV-Visible de HQ en pointillés ($9 \times 10^{-5} \text{ M}$) et de AQ2S en noir ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$) dans l'eau ultrapure

De plus, HQ a été choisie comme compétiteur car ces constantes de réaction avec les radicaux Cl_2^{\bullet} et Br_2^{\bullet} sont importantes et connues, et respectivement égales à 1 à $1,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Hasegawa et Neta, 1978; Neta et al., 1988)) et à 7×10^7 à $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Huie et Neta, 1985; Willson, 1970).

Dans cette série d'expériences, les concentrations de CBZ, OxCBZ et 9-CAA ont été maintenues constantes et celle de HQ variable ($9,1 \times 10^{-7}$ et $4,5 \times 10^{-6} \text{ M}$).

Enfin, les constantes de réaction ont été déterminées à partir de la mesure de la vitesse de disparition des composés (CBZ, OxCBZ et 9-CAA) en présence et en absence de HQ, en se basant sur les réactions et équations détaillées dans le chapitre 2 (partie 4.3).

3.2.2.1 Détermination des constantes de réaction avec Cl_2^{\bullet}

Tout d'abord, les constantes de réaction entre les radicaux chlorures et les produits pharmaceutiques ont été déterminées en rajoutant dans le milieu des ions chlorure à une concentration de $4 \times 10^{-2} \text{ M}$ et CBZ à $4,2 \times 10^{-5} \text{ M}$, OxCBZ à $3,9 \times 10^{-5} \text{ M}$ et 9-CAA à $4,5 \times 10^{-5} \text{ M}$.

3.2.2.1.1 Détermination des constantes de réaction de Cl_2^{\bullet} avec CBZ

Dans un premier temps, la cinétique de dégradation de CBZ avec les radicaux chlorures, générés par réaction avec AQ2S a été suivie. Ces cinétiques sont présentés dans la figure 4-15. On observe la dégradation de CBZ en absence de HQ qui démontre bien une réaction entre les radicaux Cl_2^{\bullet} et CBZ, puisqu'en absence des ions chlorure et toutes conditions opératoires étant égales par ailleurs, une dégradation très faible de CBZ (moins de 4 % en 15 min) avait été observée. De plus, on note un ralentissement significatif de la dégradation de CBZ lors de l'ajout de HQ qui valide pleinement l'action de ce compétiteur.

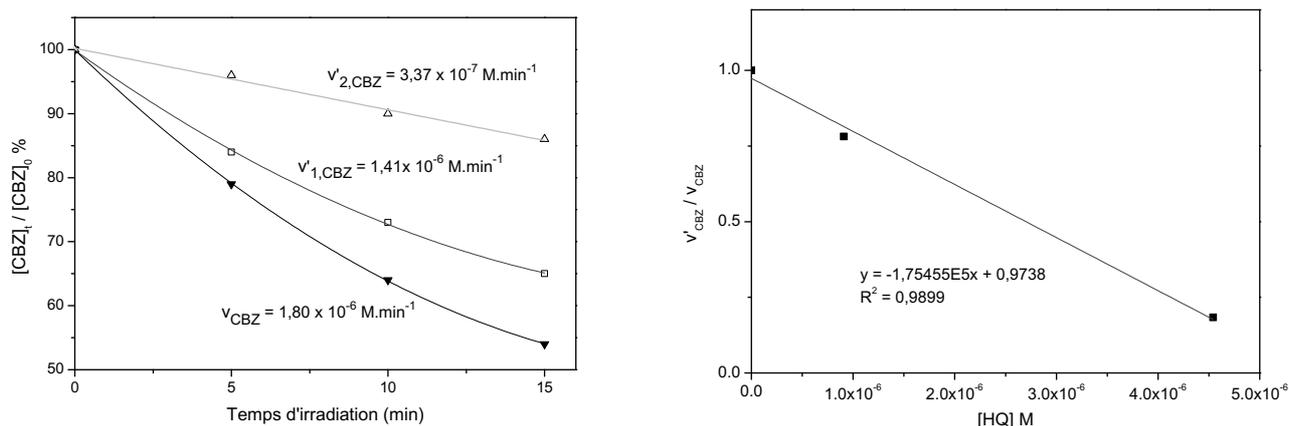


Figure 4-15 : Cinétiques et vitesse de disparition (gauche) de CBZ ($4,2 \times 10^{-5}$ M) en absence (▼) et présence de HQ à $9,1 \times 10^{-7}$ M (□) et $4,5 \times 10^{-6}$ M (△) et avec AQ2S (2×10^{-4} M) et Cl⁻ (4×10^{-2} M) et rapport des vitesses en fonction de la concentration de HQ (droite).

Les vitesses initiales de dégradation de CBZ ont été déterminées graphiquement (pente de la tangente à l'origine).

Sachant que celles-ci sont égales :

à $v_{CBZ} = k_{CBZ}[Cl_2^{\bullet-}][CBZ]$ en absence de HQ

et à $v'_{CBZ} = k_{CBZ}[Cl_2^{\bullet-}][CBZ] - k_{HQ}[Cl_2^{\bullet-}][HQ] = [Cl_2^{\bullet-}](k_{CBZ}[CBZ] - k_{HQ}[HQ])$,

il est alors possible de calculer le rapport $\frac{v'_{CBZ}}{v_{CBZ}}$ et de déterminer graphiquement k_{CBZ} à partir de l'équation suivante :

$$\frac{v'_{CBZ}}{v_{CBZ}} = \frac{k_{CBZ}[CBZ] - k_{HQ}[HQ]}{k_{CBZ}[CBZ]} = 1 - \frac{k_{HQ}}{k_{CBZ}} \frac{[HQ]}{[CBZ]}$$

Les vitesses de disparition sont indiquées sur la figure 4-15 et le tracé de $\frac{v'_{CBZ}}{v_{CBZ}}$ en fonction de la concentration de HQ valide pleinement notre méthodologie avec l'obtention d'une droite ayant un coefficient de corrélation très satisfaisant de 0,9899 et une ordonnée à l'origine de 0,9738 donc proche de l'unité. Ainsi, la constante de réaction des radicaux chlorures avec CBZ, calculée à partir de la pente de cette droite, a été déterminée et est égale à $k_{CBZ,Cl_2^{\bullet-}} = 2,03 \pm 0,15 \times 10^8$ M⁻¹.s⁻¹.

3.2.2.1.2 Détermination des constantes de réaction de Cl_2^{\bullet} avec OxCBZ

Les cinétiques de dégradation de OxCBZ en présence de radicaux chlorures sont présentées sur la figure 4-16. Tout comme pour CBZ, on remarque une dégradation en absence du compétiteur HQ prouvant la réaction entre Cl_2^{\bullet} et le composé. De plus, les cinétiques et vitesses de disparition sont ralenties en présence de HQ et le tracé de $\frac{V'_{\text{OxCBZ}}}{V_{\text{OxCBZ}}}$ en fonction de la concentration de HQ conduit bien à l'obtention d'une droite ($R^2 > 0,99$) avec une ordonnée à l'origine proche de 1. A partir de la pente de cette droite, il nous a été possible de calculer la constante de réaction entre OxCBZ avec les radicaux Cl_2^{\bullet} égale à $4,84 \pm 0,24 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette constante est 2 fois plus élevée qu'avec CBZ.

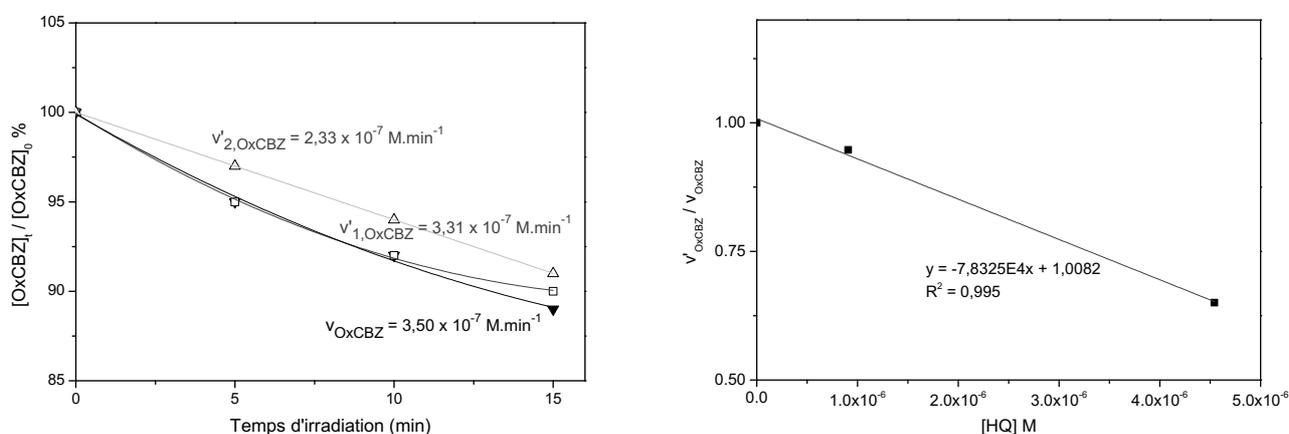


Figure 4-16 : Cinétiques et vitesse de disparition (gauche) de OxCBZ ($4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) en absence (▼) et présence de HQ à $9,1 \times 10^{-7} \text{ M}$ (□) et $4,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ (△) et avec AQ2S ($2 \times 10^{-4} \text{ M}$) et Cl^- ($4 \times 10^{-2} \text{ M}$) et rapport des vitesses en fonction de la concentration de HQ (droite).

3.2.2.1.3 Détermination des constantes de réaction de Cl_2^{\bullet} avec 9-CAA

La figure 4-17 montre également la cinétique de dégradation de 9-CAA en présence de radicaux chlorures sous irradiation et son ralentissement lié à la réaction de compétition avec HQ. Les vitesses de disparition de 9-CAA ont permis le tracé de $\frac{V'_{9-CAA}}{V_{9-CAA}}$ en fonction de la concentration de HQ et à partir de la droite obtenue ($R^2 > 0,999$) d'ordonnée à l'origine proche de 1, la constante de réaction entre Cl_2^{\bullet} et 9-CAA a pu être déduite de la pente et est égale à $2,60 \pm 0,02 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

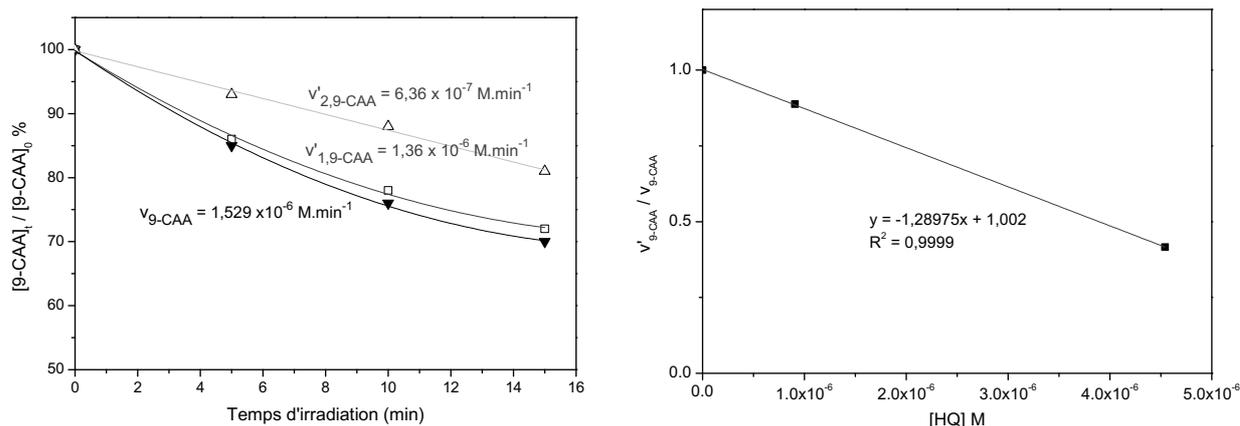


Figure 4-17 : Cinétiques et vitesse de disparition (gauche) de 9-CAA ($4,5 \times 10^{-5}$ M) en absence (▼) et présence de HQ à $9,1 \times 10^{-7}$ M (□) et $4,5 \times 10^{-6}$ M (△) et avec AQ2S (2×10^{-4} M) et Cl^- (4×10^{-2} M) et rapport des vitesses en fonction de la concentration de HQ (droite).

3.2.2.2 Constantes de réaction avec Br_2^{\bullet}

Dans le cas de l'espèce radicalaire Br_2^{\bullet} , les expériences ont été réalisées avec HQ aux mêmes concentrations que précédemment, CBZ, OxCBZ et 9-CAA également et en rajoutant dans le milieu des ions bromure à une concentration 6×10^{-2} M. Les cinétiques de dégradation de CBZ, OxCBZ et 9-CAA ont été suivies en présence de radicaux bromures générés par AQ2S. On a observé que 9-CAA et CBZ ne se dégradent pas ou très peu après 60 min d'irradiation (< 5 %) et que OxCBZ disparaissait à hauteur de 20 %. Par conséquent, les cinétiques de disparition de OxCBZ en absence et présence de HQ ainsi que les vitesses de disparition ont été évaluées et sont présentées dans la figure 4-18.

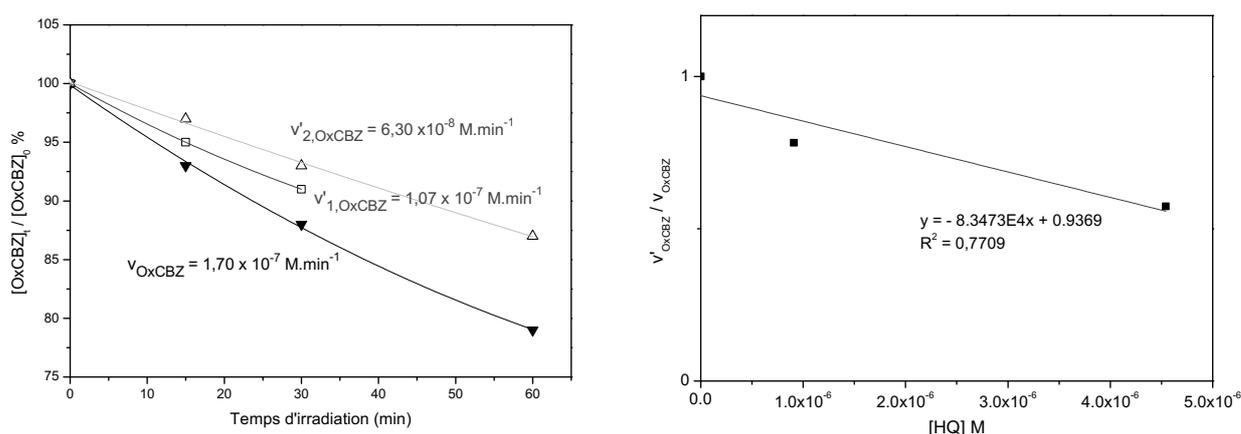


Figure 4-18 : Cinétiques et vitesse de disparition (gauche) de OxCBZ ($4,0 \times 10^{-5}$ M) en absence (▼) et présence de HQ à $9,1 \times 10^{-7}$ M (□) et $4,5 \times 10^{-6}$ M (△) et avec AQ2S (2×10^{-4} M) et Br^- (4×10^{-2} M) et rapport des vitesses en fonction de la concentration de HQ (droite).

Le tracé de $\frac{V_{OxCBZ}}{V_{OxCBZ}}$ en fonction de la concentration de HQ, présenté dans la figure 4-18, a conduit à l'obtention d'une droite avec un coefficient de corrélation tout juste satisfaisant cependant et avec une ordonnée à l'origine assez proche de 1. A partir de la pente de cette droite, il nous a été possible d'évaluer une constante de réaction entre OxCBZ et Br_2^{\bullet} égale à $3,02 \pm 1,09 \times 10^7 M^{-1}.s^{-1}$ mais ceci avec une erreur non négligeable.

Pour CBZ et 9-CAA, comme aucune dégradation n'avait été observée en absence de HQ dans nos conditions expérimentales, il est fort probable que leurs constantes de réactions avec Br_2^{\bullet} sont largement inférieures à celle déterminée pour OxCBZ c'est-à-dire $k \ll 3 \times 10^7 M^{-1}.s^{-1}$.

3.3 Conclusion

Les résultats obtenus sur les constantes de réaction entre les composés pharmaceutiques sélectionnés et les espèces chimiques réactives montrent clairement que les radicaux hydroxyles sont les plus efficaces (au moins d'un facteur 300) dans la photodégradation induite des composés comparativement aux radicaux carbonates et halogénés.

Dans le cas de CBZ, en rassemblant les résultats obtenus et les constantes de réactions déterminées dans la littérature, la réactivité avec CBZ peut être donnée dans l'ordre décroissant suivant (en $M^{-1}.s^{-1}$) : $k_{CBZ, \bullet OH} = 2,27 \pm 0,24 \times 10^{10}$ (notre étude) $> k_{CBZ, SO_2^{\bullet-}} = 1,92 \pm 0,01 \times 10^9$ (Matta et al., 2011) $> k_{CBZ, 3AQ_2S^{\bullet-}} = 7,0 \pm 0,2 \times 10^8$ (De Laurentiis et al., 2012a) $> k_{CBZ, Cl_2^{\bullet-}} = 2,03 \pm 0,15 \times 10^8$ (notre étude) $> k_{CBZ, 1O_2} = (1,9 \pm 0,1) \times 10^5 M^{-1}.s^{-1}$ (De Laurentiis et al., 2012a), les constantes avec les radicaux carbonates et bromures n'ayant pas pu être déterminées. Pour OxCBZ et 9-CAA, la réactivité avec les espèces chimiques réactives a été moins étudiée mais elle peut être classée comme suit d'après nos résultats pour OxCBZ : $k_{OxCBZ, \bullet OH} = 2,20 \pm 0,34 \times 10^{10} > k_{OxCBZ, Cl_2^{\bullet-}} = 4,84 \pm 0,24 \times 10^8 > k_{OxCBZ, Br_2^{\bullet-}} = 3,02 \pm 1,09 \times 10^7 M^{-1}.s^{-1}$ et pour 9-CAA : $k_{9-CAA, \bullet OH} = 3,2 \pm 0,12 \times 10^{10} > k_{9-CAA, Cl_2^{\bullet-}} = 2,60 \pm 0,02 \times 10^8 M^{-1}.s^{-1}$.

Si l'on s'intéresse aux conséquences de ces résultats sur la phototransformation des trois composés dans les eaux naturelles, il faut se rappeler que dans le chapitre 3, il a été clairement démontré par LFP en utilisant les ions thiocyanate que les radicaux hydroxyles se forment dans toutes les eaux naturelles. Néanmoins, la présence de certains constituants dans ces milieux permet de générer de nouvelles espèces de courtes durées de vie telles que les radicaux $CO_3^{\bullet-}$ dans l'eau de l'Arc ou encore Br_2^{\bullet} voire Cl_2^{\bullet} dans les eaux salées (Berre et mer Méditerranée). L'efficacité de ces réactions s'est avérée dépendante du milieu avec des constantes de vitesse de piégeage de $\bullet OH$ plus importantes dans les eaux salées (avec un maximum de $104,3 \times 10^5 s^{-1}$) que dans les eaux douces (avec un minimum de $7,56 \times 10^5 s^{-1}$).

Or, dans ce chapitre, nous avons pu confirmer que les constantes de réaction des radicaux $\cdot\text{OH}$ avec CBZ, OxCBZ et 9-CAA étaient importantes. A partir des concentrations des composés, nous avons pu déterminer dans nos conditions expérimentales des constantes de vitesse de piégeage des radicaux $\cdot\text{OH}$ par CBZ, OxCBZ et 9-CAA respectivement égales à $4,80 \times 10^5$, $5,41 \times 10^5$ et $7,17 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$. Ceci signifie que dans les eaux salées, la formation des espèces réactives de courtes durées de vie ne sera pas affectée par la présence de CBZ, de OxCBZ ou de 9-CAA, alors que dans les eaux douces celle-ci le sera. De ce fait, il est envisageable que les trois composés puissent réagir avec les radicaux hydroxyles générés dans les eaux naturelles et plus particulièrement dans les eaux douces. En effet, ceci permet de justifier notamment, la corrélation entre la quantité totale d'azote et la vitesse initiale de disparition de CBZ, cette quantité étant liée directement aux concentrations en ions nitrate et nitrite, précurseurs connus de radicaux hydroxyles.

Dans les eaux salées, CBZ, OxCBZ et 9-CAA ont peu de probabilité de réagir avec les radicaux $\cdot\text{OH}$. Compte-tenu des faibles constantes de réaction déterminées pour ces composés avec les radicaux $\text{Br}_2\cdot^-$ et $\text{Cl}_2\cdot^-$ (inférieures à $10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), il est normal d'observer des cinétiques de phototransformation de CBZ, OxCBZ et 9-CAA plus lentes dans les eaux contenant de fortes concentrations en ions bromure et chlorure que dans les eaux douces. De plus, cet effet permet d'expliquer la corrélation inverse entre la vitesse initiale de disparition de CBZ et la concentration en ions bromure.

4. Etude analytique de la dégradation de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans les eaux

Au-delà de l'évaluation cinétique du devenir photochimique dans l'environnement de CBZ, OxCBZ et 9-CAA, il nous est apparu important d'élucider les mécanismes de transformation mis en jeu. Pour ce faire, une étude approfondie des produits de transformation formés au cours de l'irradiation dans les eaux naturelles a été menée pour chaque composé. Ce travail d'identification a été réalisé par LC-HRMS et LC/MS/MS (LC-MSQToF). De plus, une comparaison des résultats obtenus dans les différentes eaux, avec ceux issus des études de photolyse (dans l'eau ultra-pure) et à l'obscurité (dans les eaux naturelles), a été faite afin de discerner les produits de transformation et les mécanismes mis en jeu pour chacun des processus (photodégradation induite, photolyse, oxydo-réduction).

4.1 Etude analytique de la dégradation de CBZ dans les eaux

4.1.1 Identification des produits de transformation de CBZ dans les eaux naturelles

Des solutions de CBZ exposées pendant des durées différentes comprises entre 0 et 50 h c'est-à-dire avec un taux de transformation maximal de CBZ égale à 23 % ont été analysées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-MS-QToF). Pour la caractérisation des produits de transformation (TP), aucune préparation préalable des échantillons n'a été effectuée mais pour la quantification de certains d'entre eux, une préconcentration a été nécessaire ainsi que l'ajout d'un étalon interne (OxCBZ). Cette préconcentration d'un facteur 10 a été réalisée par évaporation. Un exemple de chromatogrammes obtenus en mode full scan est donné dans la figure 4-19 suivante après préconcentration de la solution.

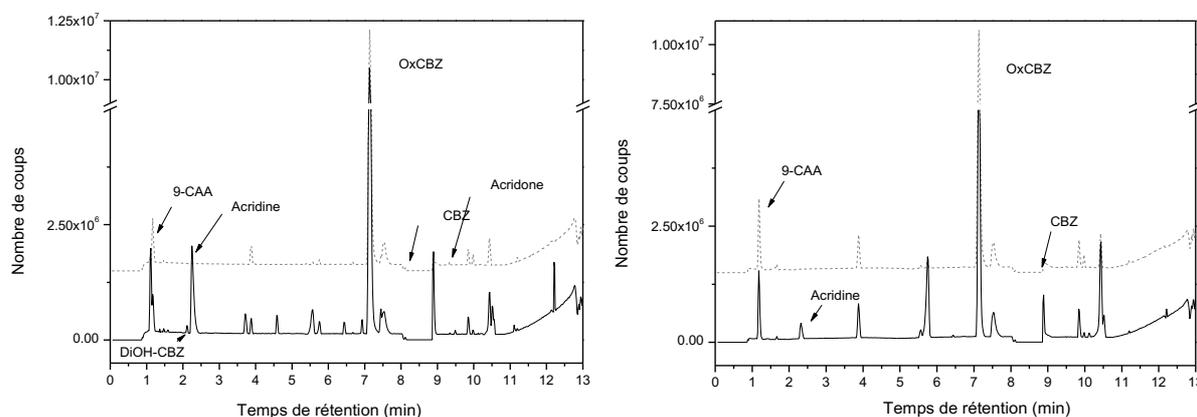


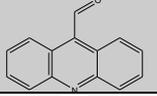
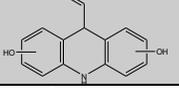
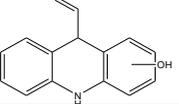
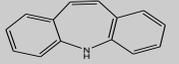
Figure 4-19 : Chromatogrammes de solutions préconcentrées de CBZ avant irradiation (pointillé) et après 24 h d'exposition (ligne pleine) dans l'Arc (gauche) et dans Berre (droite), pH ≈ 8, [CBZ] = 5 mg.L⁻¹ et lampe Xe 300 W

Comme on peut le voir sur le chromatogramme, de nombreux produits de dégradation ont été détectés. Afin de les identifier, plusieurs démarches ont été suivies : (1) détermination de la masse exacte de l'ion moléculaire et proposition d'une formule brute en retenant la formule proposée donnant la plus faible différence de masse (Δm) (entre m/z théorique ou $(m/z)_t$ et la masse réelle $((m/z)_r$ doit être inférieure à 3 mDa), (2) réalisation des spectres de masse des composés par spectrométrie de masse en tandem à différentes énergies de collision (EC) après sélection sur le premier quadripôle des ions moléculaires identifiés, (3) injection des standards quand ils étaient disponibles. En utilisant cette triple approche, les produits de transformation détectés dans les quatre eaux naturelles lors de l'irradiation de CBZ sont présentés ci-dessous, dans le tableau 4-9.

Tableau 4-9 : Temps de rétention, masses exacte théorique (m/z)_t et expérimentale (m/z)_r, erreur sur la masse (Δm), formule brute, structure chimique des produits de transformation, ion parent fragmenté et formules des ions fils obtenus en MS/MS, suite à l'analyse des eaux naturelles dopées en CBZ et irradiées, pH \approx 8, [CBZ] = 5 mg.L⁻¹ et lampe Xe 300 W

T _{ret} (min)	[M+H] ⁺ (m/z) _r	[M+H] ⁺ (m/z) _t	Δm (mDa)	Formule M	Structure chimique	[M+H] ⁺ (m/z) MS ²	Formules des ions fragments	Eaux
8,2 CBZ		237,1028		C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O				
1,2 9CAA	224,0733	224,0706	2,7	C ₁₄ H ₉ NO ₂		196,0762 180,0811 167,0734	C ₁₃ H ₉ NO C ₁₃ H ₉ N C ₁₂ H ₈ N	Arc, Rhône Mer
4,3 10,2	224,0733	224,0706	2,7	C ₁₄ H ₉ NO ₂				Berre Rhône
2,2 4,7 DiOH-CBZ	271,1083	271,1077	0,6	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃		253,0976 236,0609 210,0916 180,0808	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂ C ₁₅ H ₉ NO ₂ C ₁₄ H ₁₁ NO C ₁₃ H ₉ N	Arc, Rhône
2,3 Acridine	180,0819	180,0808	1,1	C ₁₃ H ₉ N		152,0618 128,0507	C ₁₁ H ₆ N ⁺ C ₉ H ₆ N ⁺	Toutes
6,6 6,9	253,0983	253,0972	1,1	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂		236,0707 210,0914 180,0805 167,0727	C ₁₅ H ₉ NO ₂ C ₁₄ H ₁₁ NO C ₁₃ H ₉ N C ₁₂ H ₈ N	Toutes
9,3 Acridone	196,0766	196,0757	0,9	C ₁₃ H ₉ NO		180,0805 167,0732	C ₁₃ H ₉ N C ₁₂ H ₈ N	Toutes
10,1 Br-CBZ	315,0123	315,0121	0,2	C ₁₅ H ₁₁ BrN ₂ O				Berre, Mer

Chapitre 4 : Etude du devenir de CBZ, OxCBZ et du produit de transformation 9-CAA dans les compartiments aquatiques

10,5 ACA	208,0759	208,0757	0,2	C ₁₄ H ₉ NO				Rhône, Berre, Mer
10,4	222,0911	222,0915	0,4	C ₁₅ H ₁₁ NO		182,0962	C ₁₃ H ₁₁ N	Rhône, Berre
11,0 DiOH-ACA	242,0833	242,0814	1,9	C ₁₄ H ₁₁ NO ₃				Arc
11,1 OH-ACA	226,0875	226,0863	1,2	C ₁₄ H ₁₁ NO ₂		208,0759 198,0908 180,0807	C ₁₄ H ₉ NO C ₁₃ H ₁₁ NO C ₁₃ H ₉ N	Toutes
12,1 iminostilbène	194,0991	194,0964	2,7	C ₁₄ H ₁₁ N				Arc

Ainsi, parmi les 14 composés identifiés, l'acide 9-carboxylique acridine ($t_{\text{rét}} = 1,2$ min), 10-hydroxy-10,11-dihydro-carbamazépine (DiOH-CBZ) ($t_{\text{rét}} = 2,2$ et 4,7 min), l'acridine ($t_{\text{rét}} = 2,3$ min) et l'acridone ($t_{\text{rét}} = 9,3$ min) ont pu être identifiés sans ambiguïté en confirmant les temps de rétention et les spectres de masse par l'injection des produits commerciaux.

Pour DiOH-CBZ ($m/z = 271$), sa fragmentation conduit à la formation de 4 ions de rapport m/z égaux à 253, 236, 210 et 180 comme le montre le tableau 4-9 et la figure 4-20. Ce mécanisme de fragmentation met en évidence les processus suivants : la perte de molécule d'eau, la perte de la fonction amine, la perte de la fonction amide et enfin la perte de CH_2O qui conduit à la contraction du cycle à 7 (azépine) comme cela a été décrit dans la littérature (Jelic et al., 2013).

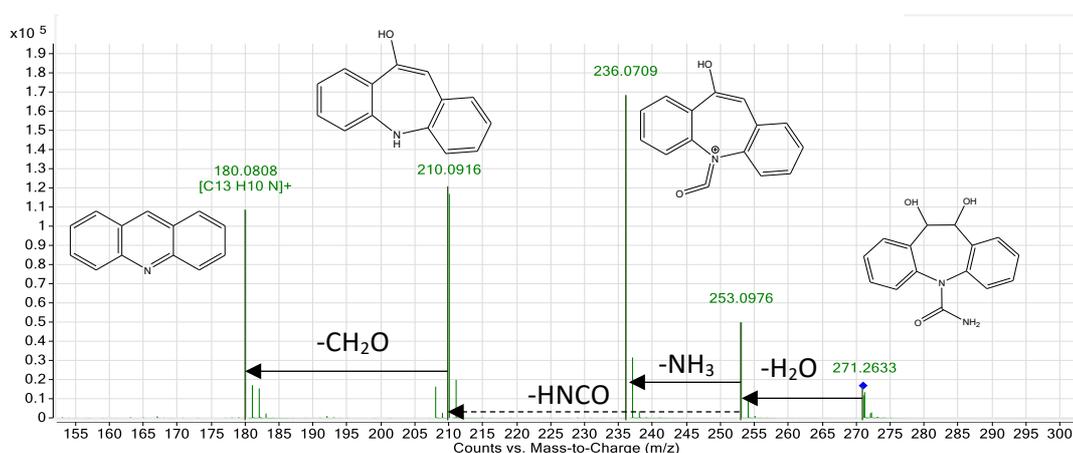


Figure 4-20 : Spectre MS-MS du composé DiOH-CBZ à $m/z = 271$ (EC = 10 eV)

Pour la fragmentation de l'acridone ($m/z = 196$), celle-ci conduit à la formation d'un seul fragment de rapport m/z égal à 167. Ce fragment correspond à une perte d'un groupement CHO de la molécule d'acridone. Ce dernier a déjà été identifié comme le seul fragment de l'acridone (Jelic et al., 2012; Petrovic et Barceló, 2007).

La fragmentation du 9-CAA ($m/z = 224$) conduit à la formation de 3 ions fragments de rapport m/z égaux à 196, 180, 167. Le premier ion fragment correspond à une perte d'un groupement CO (28 Da), c'est l'acridone. Le second à une perte d'un groupement CO et d'un atome d'oxygène (44 Da) c'est l'acridine. Le troisième ion fragment correspond à la perte d'un groupement CHO de la molécule d'acridone, comme indiqué ci-dessus.

La voie de fragmentation de l'acridine ($m/z = 180$) conduit à l'obtention de 2 ions fragments. Le premier ion fragment de m/z égal à 152 correspond à une perte d'un groupement C_2H_4 (28 Da) et le second de m/z égal à 128 (52 Da) correspond à une perte de C_4H_4 . (Jelic et al., 2012).

La fragmentation et les temps de rétention ont ainsi confirmé que le composé 9-CAA ($m/z = 224$), l'acridine ($m/z = 180$) et l'acridone ($m/z = 196$) étaient bien des produits de transformation de CBZ dans l'eau du Rhône.

Pour les composés à $m/z = 253$ ($t_{rét} = 6,6$ et $6,9$ min), plusieurs propositions structurales ont été suggérées dans la littérature (figure 4-21) donnant des ions fragments identiques (Calza et al., 2012; De Laurentiis et al., 2012a; Hübner et al., 2014; Jelic et al., 2012; Kosjek et al., 2009; Leclercq et al., 2009; Mahdi Ahmed et Chiron, 2014; Miao et Metcalfe, 2003; Zhang et al., 2015; Zhu et al., 2015).

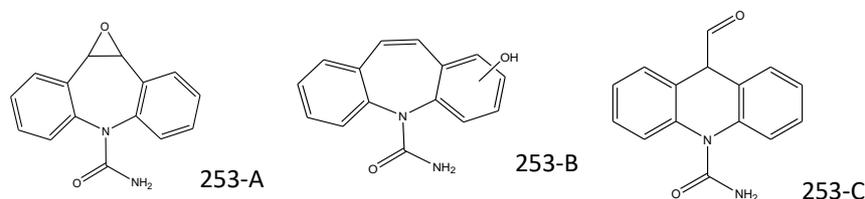


Figure 4-21 : Structures chimiques de composés ayant une masse m/z égales à 253 d'après la littérature

Néanmoins, l'abondance des fragments obtenus pour le composé $m/z = 253$ ($t_{rét} = 6,6$ min) (figure 4-22) nous a permis d'exclure le composé 253-B car l'ion fragment m/z égal à 210 est, dans son cas, le plus abondant (Calza et al., 2012; Jelic et al., 2013; Miao et Metcalfe, 2003). Cependant, les abondances ne permettent pas de différencier le composé 253-A et 253-C qui ont les mêmes fragments (Calza et al., 2012; Jelic et al., 2012; Miao et Metcalfe, 2003). Pour l'autre composé $m/z = 253$ ($t_{rét} = 6,9$ min), aucune des trois structures proposées n'a pu être écartée.

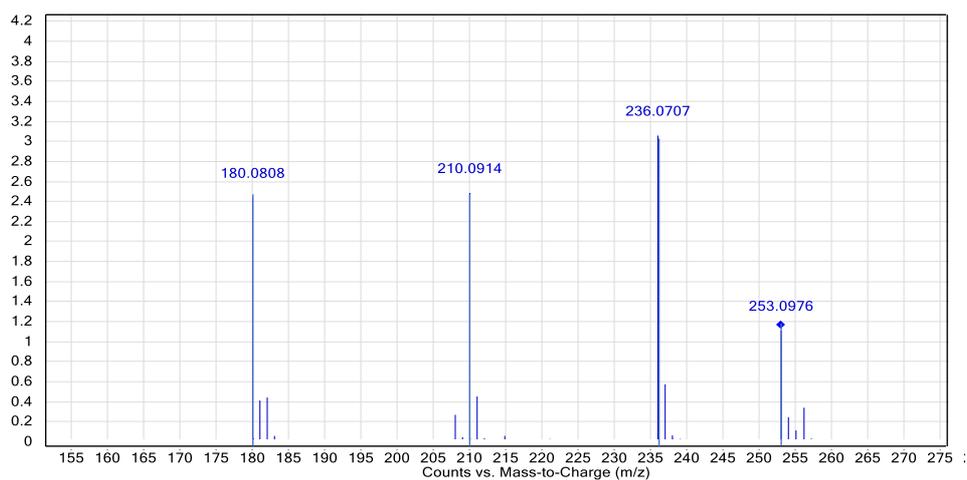


Figure 4-22 : Spectre MS-MS du composé $m/z = 253$ ($t_{\text{rét}} = 6,6$ min) (EC = 10 eV)

La littérature nous a également permis d'associer une structure chimique aux composés de m/z 208 (Calza et al., 2012; Tran et al., 2013; Vogna et al., 2004), 226 (Calisto et al., 2011a; Lekkerkerker-Teunissen et al., 2012; Pan et al., 2017) et 194 (Jelic et al., 2012; Kosjek et al., 2009; Zhu et al., 2015). En revanche, la structure du composé de m/z 242 demeure une hypothèse.

La fragmentation du composé de masse exacte $m/z = 226,0858$ ($t_{\text{rét}} = 11,1$ min) donne lieu à 3 ions fragments de m/z égaux à 208, 198 et 180 (figure 4-23), ce qui permet de valider la proposition structurale d'un dérivé hydroxylé de l'acridine carboxaldéhyde (OH-ACA).

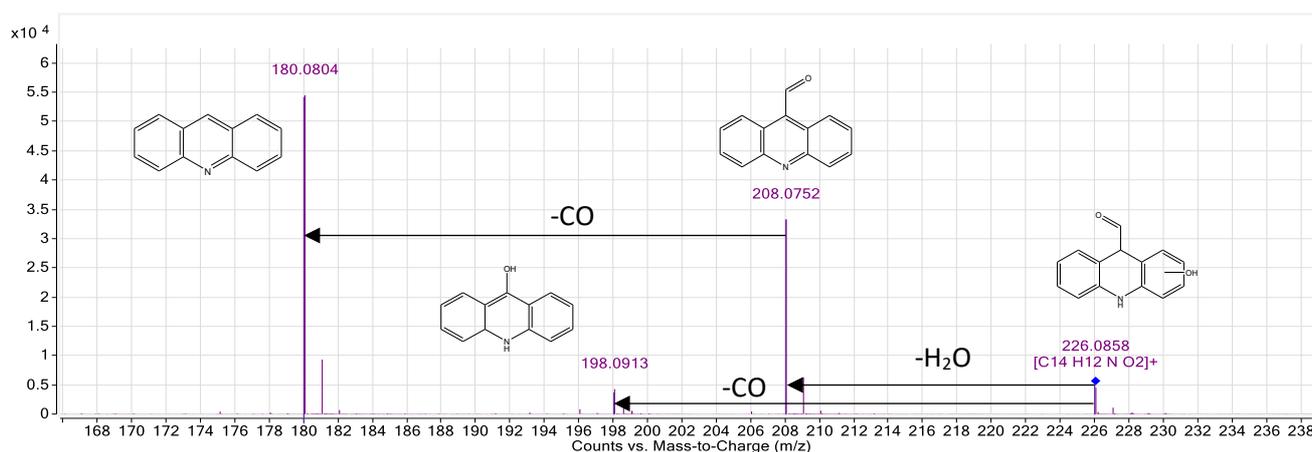


Figure 4-23 : Spectre MS-MS du composé $m/z = 226,0858$ (EC = 20 eV)

4.1.2 Comparaison des sous-produits de CBZ identifiés dans les différents milieux

Les composés listés dans le tableau 4-9 sont ceux détectés dans, au moins, un des quatre milieux naturels et la dernière colonne de ce tableau permet de préciser dans quels milieux ils ont été détectés.

Ainsi, il apparaît que 5 sous-produits sont formés quel que soit le milieu considéré parmi lesquels l'acridine, le dérivé époxyde de CBZ, son dérivé cétonique, l'acridone et OH-ACA.

Certains sous-produits n'ont été détectés que dans certaines eaux : les produits de transformation de $m/z = 242$ et 194 dans l'Arc et ceux de $m/z = 208$ et 222 dans le Rhône et les eaux salées, et m/z égal à 315 uniquement dans les eaux salées.

La formation spécifique de ces composés peut être attribuée aux mécanismes mis en jeu dans la dégradation induite de CBZ, qui dépendent directement des milieux, sa photolyse et les autres réactions d'atténuation naturelle étant négligeables. Une étude cinétique quantitative des produits de transformation de CBZ a été entreprise.

4.1.3 Cinétique de formation et quantification des TP de CBZ

Pour chaque sous-produit identifié lors de l'irradiation de CBZ, l'évolution de leur abondance en fonction de la durée d'exposition a été tracée pour chacune des eaux naturelles. Les abondances ont été déterminées en prenant sur les chromatogrammes reconstruits en extrayant le signal correspondant au rapport m/z exact des ions moléculaires de chacun des composés, l'intensité maximale du pic. Ces cinétiques sont présentées dans la figure 4-24. Lorsque l'on disposait d'étalons commerciaux correspondants aux sous-produits, une quantification précise de ces sous-produits a été faite dans des solutions irradiées pendant 24 h.

On constate dans un premier temps que l'acridine ($m/z = 180$) est un composé qui se forme dès les premiers temps d'irradiation dans tous les milieux. La concentration d'acridine est plus importante et du même ordre de grandeur dans l'Arc et le Rhône (respectivement 18 et $10,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, tableau 4-10) par rapport à celles mesurées dans Berre et la mer Méditerranée (d'un facteur environ 5).

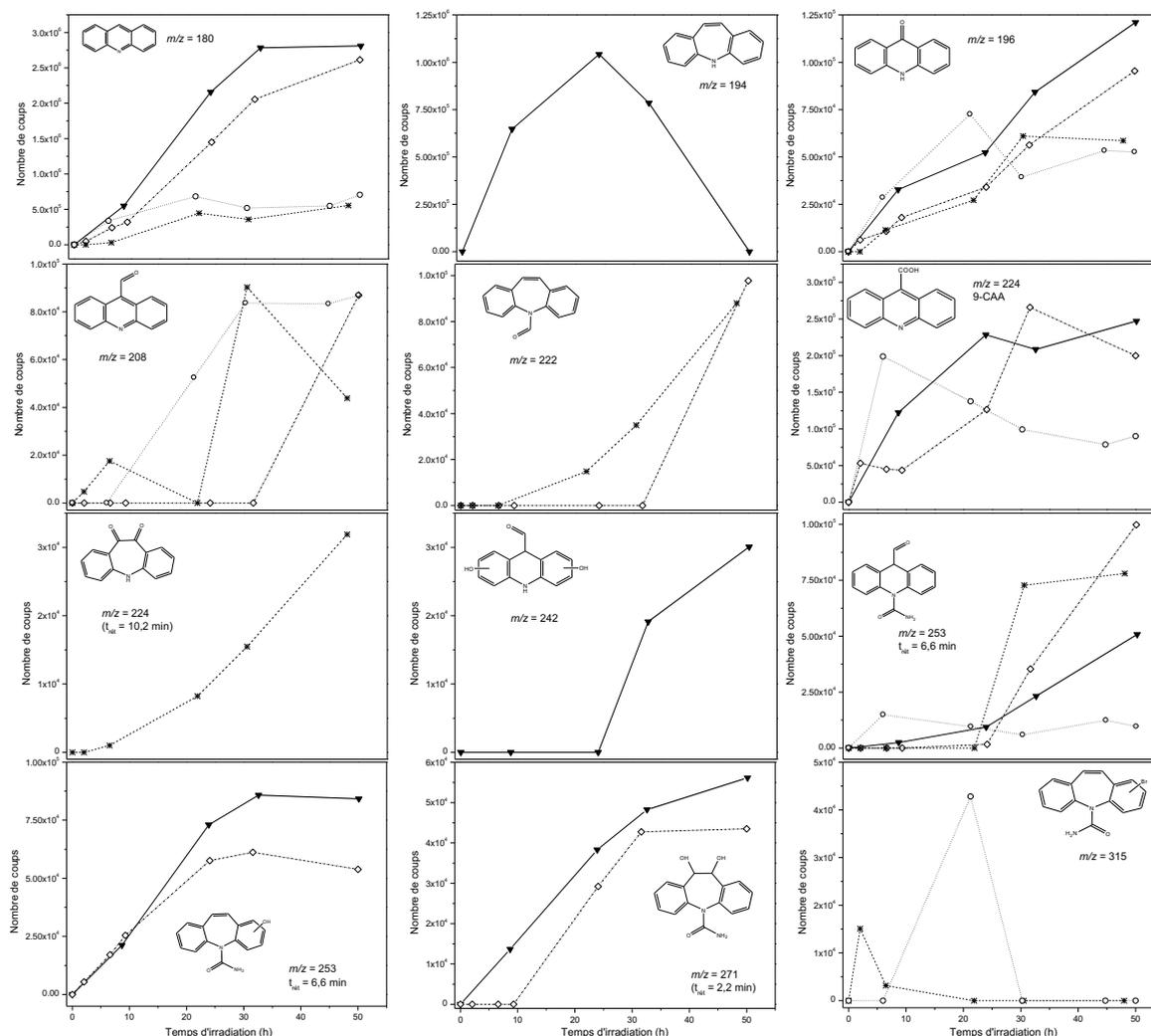


Figure 4-24 : Cinétiques de formation des produits de transformation de CBZ dans les eaux naturelles : (▼) Arc, (◇) Rhône, (○) Méditerranée, (*) Berre, pH ≈ 8, [CBZ] = 5 mg.L⁻¹ et lampe Xe 300 W

Cette différence peut s'expliquer par un taux de dégradation de CBZ moins élevé dans les deux dernières eaux naturelles (d'un facteur 2 à 3) mais reflète tout de même la formation moins favorisée de l'acridine (ou son accumulation) dans ces eaux. L'acridine représente environ 3 à 0,2 % de CBZ transformé respectivement dans l'Arc et dans Berre. Pour le composé $m/z = 226$, les mêmes comportements cinétiques ont été observés.

Le composé de $m/z = 194$, l'iminostilbène, est un sous-produit primaire puisqu'il se forme dès le début de l'irradiation, et se transforme après 24 h d'irradiation pour disparaître totalement de l'eau de l'Arc au bout de 50 h. Ce sous-produit a déjà été identifié comme le résultat de l'hydrolyse de CBZ par les radicaux hydroxyles (Zhu et al., 2015). Ce même type de cinétique a aussi été observé pour le composé bromé de $m/z = 315$ dans les eaux de Berre et de la mer Méditerranée, avec un léger décalage

temporel pour la mer Méditerranée liée peut-être à une transformation de CBZ favorisée dans l'eau de Berre.

L'acridone (m/z 196) est présent dès les premiers temps et sa formation est continue au cours du temps dans les quatre eaux naturelles, avec, cependant, des variations de pente qui semblent traduire une formation et une disparition concomitantes. Les quantités produites (respectivement 2,1 et 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans l'eau de l'Arc et de Berre, tableau 4-10) sont en accord avec le taux de transformation de CBZ. Le phénomène de formation-disparition concomitante est nettement visible également pour 9-CAA (m/z = 224), et dans le cas de l'eau de mer, la réaction de disparition est même prédominante après 8 h d'exposition.

Pour le composé de m/z = 208, non détecté dans l'eau de l'Arc, sa formation semble intervenir au bout de quelques heures d'exposition dans les eaux du Rhône et de la mer Méditerranée. Sa cinétique dans l'eau de Berre semble décrire des cycles de formation-disparition-formation-disparition.

Les cinétiques pour les composés (m/z = 222 et 224) dans l'eau de Berre présentent une allure comparable, qui témoigne de leur formation après quelques heures d'irradiation puis de leur accumulation, faisant d'eux des sous-produits dits secondaires. Dans l'eau du Rhône, le composé m/z = 222 est formé très tardivement et peut même être considéré comme un sous-produit tertiaire. Ceci est aussi le cas pour les composés de m/z = 242 et de m/z = 253 élué à 6,6 min, ce qui tend à montrer qu'il correspond à la structure 253-C (figure 4-21). Ce résultat pour le composé m/z = 253 tend à montrer que celui-ci correspond au 253-C qui se forme après oxydation et contraction de cycle.

Deux composés, détectés uniquement dans l'eau de l'Arc et du Rhône, de m/z = 253 ($t_{\text{rét}} = 6,9$ min) et 271 (DiOH-CBZ)), présentent des évolutions de concentrations assez similaires. Il est à souligner que dans l'Arc, la formation de DiOH-CBZ est très importante (163 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ après 24 h d'irradiation) et elle représente 25,8 % de la dégradation de CBZ (tableau 4-10). Ces deux composés, hormis m/z = 271 dans le Rhône (qui est formé après quelques heures d'irradiation), sont formés dès les premiers temps d'irradiation, s'accumulent et enfin disparaissent du milieu. Ce type de cinétique tend à privilégier la structure 253-B pour le composé m/z = 253 ($t_{\text{rét}} = 6,9$ min) dont la formation résulterait d'un processus (hydroxylation).

Tableau 4-10 : Concentration en acridine, acridone, 9-CAA et DiOH-CBZ après 24 h d'irradiation de CBZ dans les différentes eaux, pH ≈ 8, [CBZ] = 5 mg.L⁻¹ et lampe Xe 300 W

	Acridine		Acridone		9-CAA		DiOH-CBZ	
	Concentration formée (µg.L ⁻¹)	% de transformation de CBZ	Concentration formée (µg.L ⁻¹)	% de transformation de CBZ	Concentration formée (µg.L ⁻¹)	% de transformation de CBZ	Concentration formée (µg.L ⁻¹)	% de transformation de CBZ
Arc	18	2,9	2,1	0,3	36	5,7	163	25,8
Rhône	10,5	2,2	0,4	0,1	3	0,6	3,5	0,7
Berre	0,7	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1	/	/
Mer	4,9	3,5	0,9	0,6	1,8	1,3	/	/

4.2 Processus de dégradation de 9-CAA dans les eaux naturelles

4.2.1 Identification des TP de 9-CAA

Comme pour CBZ, 9-CAA a été irradié dans chacune des 4 eaux naturelles pendant environ 48 h et plusieurs prélèvements ont été réalisés 2 à 3 fois par jour avec un taux de transformation maximal de 9-CAA égal à 33 %. Ces prélèvements ont été analysés par LC-MSQTof avec une préconcentration d'un facteur 10.

Des exemples de chromatogrammes obtenus en mode full scan sont donnés dans la figure 4-25 dans les eaux de l'Arc et de Berre. On peut ainsi voir sur ces chromatogrammes de nombreux pics associés aux TP. Pour les identifier, la même démarche que celle décrite pour CBZ a été mise en œuvre.

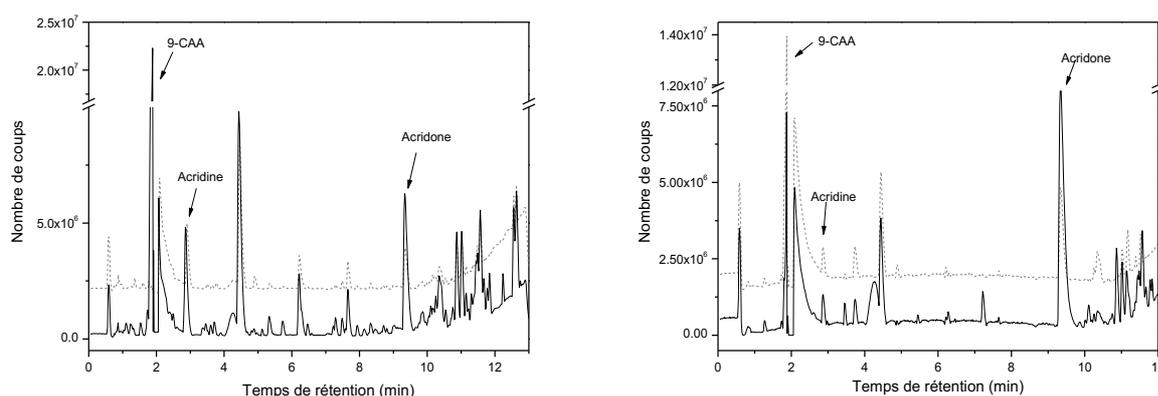


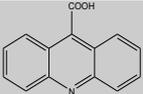
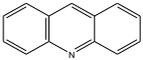
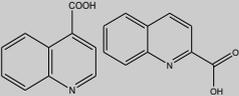
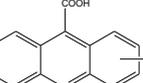
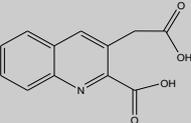
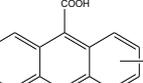
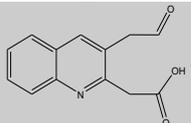
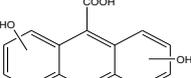
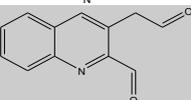
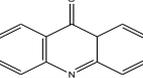
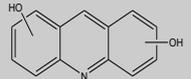
Figure 4-25 : Chromatogrammes de solutions préconcentrées de 9-CAA avant irradiation (pointillé) et après 48 h d'exposition (ligne pleine) dans l'Arc (gauche) et dans Berre (droite), pH ≈ 8, [9-CAA] = 5 mg.L⁻¹ et lampe Xe 300 W.

En utilisant cette approche, les produits de transformation détectés dans les quatre eaux naturelles lors de l'irradiation de 9-CAA sont présentés dans le tableau 4-11.

Chapitre 4 : Etude du devenir de CBZ, OxCBZ et du produit de transformation 9-CAA dans les compartiments aquatiques

Ainsi, parmi les 9 composés identifiés, la présence de l'acide 9-carboxylique acridine ($t_{\text{rét}} = 1,7$ min) et de l'acridone ($t_{\text{rét}} = 9,3$ min) ont pu être identifiés sans ambiguïté en confirmant les temps de rétention et les spectres de masse par l'injection des produits commerciaux. Pour les autres composés, les propositions structurales sont uniquement basées sur leur formule élémentaire.

Tableau 4-11 : Sous-produits formés au cours de l'irradiation de 9-CAA dans les eaux naturelles

Tret (min)	[M+H] ⁺ (m/z obtenu)	[M+H] ⁺ (m/z théorique)	Erreur sur la masse (mDa)	Formule	Structure chimique	Eaux
1,7 9-CAA		224,0706		C₁₄H₉NO₂		
3,4 Acridine	180,0811	180,0808	0,3	C₁₃H₉N		Toutes
3,5 Acide carboxylique quinoléine	174,0552	174,055	0,2	C₁₀H₇NO₂		Toutes
3,8	258,0313	258,0316	0,3	C₁₄H₈NO₂Cl		Mer
4,0	232,0606	232,0604	0,2	C₁₂H₉NO₄		Arc, Berre, Mer
4,3	301,9802	301,9811	0,9	C₁₄H₈NO₂Br		Mer
5,4	230,0807	230,0812	0,5	C₁₃H₁₁NO₃		Toutes
5,3	256,0605	256,0604	0,1	C₁₄H₉NO₄		Toutes
4,05 5,5	200,0706	200,0706	0	C₁₂H₉NO₂		Toutes
9,3 Acridone	196,0761	196,0757	0,4	C₁₃H₉NO		Toutes
10,2 Dihydroxy- acridine	212,0705	212,0706	0,1	C₁₃H₉NO₂		Berre

Ainsi, pour le composé de $m/z = 258$, sa formule élémentaire $C_{14}H_8NO_2Cl$ fait apparaître comme différence par rapport à la formule de 9-CAA ($C_{14}H_9NO_2$), l'ajout d'un atome de chlore remplaçant un atome d'hydrogène, ce qui suggère fortement la chloration de 9-CAA, liée aux espèces réactives chlorées, et rend très plausible cette proposition. Il en est de même pour le composé à 4,3 min

($m/z = 302$, $C_{14}H_8NO_2Br$) avec cette fois-ci le remplacement d'un atome d'hydrogène par un atome de brome, concordant avec la bromation de 9-CAA liée aux espèces réactives bromées. De façon comparable, l'hypothèse structurale du composé à 5,3 min ($m/z = 256$) s'appuie sur sa formule élémentaire ($C_{14}H_9NO_4$), qui se distingue de celle de 9-CAA par la présence de deux atomes d'oxygène supplémentaires. Ceci suggère la présence de deux groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques, soit sur le même noyau comme cela est présenté dans le tableau 4-11, ou encore un seul groupement OH par noyau.

Pour les composés de $m/z = 232$ et 200 et de formule élémentaire respective $C_{12}H_9NO_4$ et $C_{12}H_9NO_2$, leur hypothèse structurale s'est basée sur la perte de deux atomes de carbone par rapport à la formule de 9-CAA, qui ne peut s'expliquer que par la perte de la fonction acide carboxylique de 9-CAA et la perte d'un atome de carbone d'un noyau aromatique par ouverture d'un cycle. Ensuite, la présence de 4 atomes d'oxygène sur le composé de $m/z = 232$ suppose la présence de deux fonctions acides carboxyliques et la présence de 2 atomes d'oxygène sur le composé de $m/z = 200$ suppose deux fonctions aldéhydes, validant ainsi les propositions structurales. De plus, il est à noter qu'entre ces deux composés, la différence de masse de 32 Da concorde également avec nos hypothèses.

Enfin, pour le composé de $m/z = 230$ de formule élémentaire $C_{13}H_{11}NO_3$, la structure chimique proposée se base sur les deux précédentes propositions, avec la présence de trois atomes d'oxygène, qui suggère la présence d'une fonction aldéhyde et d'une fonction acide carboxylique.

4.2.2 Comparaison des sous-produits de 9-CAA identifiés dans les différents milieux

Dans la dernière colonne du tableau 4-11 sont indiqués les eaux dans lesquels les composés listés ont été détectés.

Certains sous-produits sont formés lors de l'irradiation de 9-CAA dans chacune des eaux, c'est le cas de l'acridine, l'acridone et les composés de $m/z = 174$, 230, 256 qui correspondent à des hydroxylations et ouvertures de cycle. Cependant, quelques différences sont observables, notamment l'absence du composé $m/z = 232$ dans le Rhône et la formation des composés bromé ($m/z = 301$) et chloré ($m/z = 258$) exclusivement dans l'eau de la mer Méditerranée.

De plus, le sous-produit de $m/z = 212$ n'est retrouvé que dans l'eau de Berre. Enfin, le composé de $m/z = 200$ n'est pas identifié dans le Rhône alors qu'il est formé dans les 3 autres eaux. Cependant le temps de rétention de ce dernier est différent entre l'Arc, Berre ($t_{rét} = 5,5$) et la mer ($t_{rét} = 4,1$), ceci

peut s'expliquer par l'ouverture de cycle et la position différente des groupements carboxyle et cétone sur la molécule selon la nature de l'eau.

4.2.3 Cinétique de formation et quantification des TP de 9-CAA

Les cinétiques de formation des sous-produits dans chacune des eaux naturelles ont été tracées et sont représentées sur la figure 4-26.

Ce tracé permet de confirmer que l'acridone ($m/z = 196$) se forme dès les premiers temps d'irradiation, c'est un composé primaire. De plus, son abondance atteint ensuite un plateau avant de diminuer. Ce type de cinétique a été aussi observé pour le composé de $m/z = 200$ et 180 (acridine) avec un plateau moins marqué et avec le composé de $m/z = 258$ avec néanmoins une concentration qui se stabilise après sa formation. Les concentrations en acridine mesurées après 24 h d'exposition sont assez faibles et plus élevées pour l'acridone (cf. tableau 4-12) mettant en évidence la part plus importante du processus conduisant à la formation de l'acridone dans la dégradation de 9-CAA.

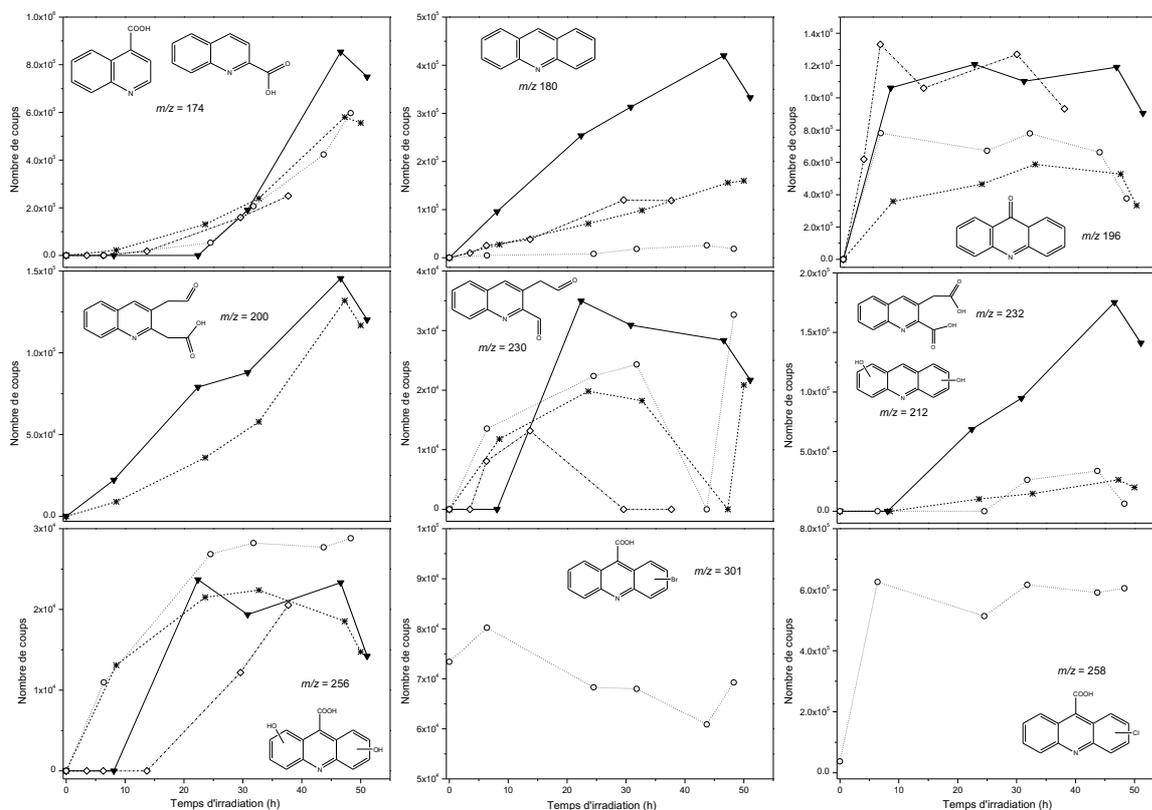


Figure 4-26 : Cinétiques de formation des produits de transformation de 9-CAA dans les eaux naturelles : (▼) Arc, (◇) Rhône, (○) Méditerranée, (*) Berre

La cinétique du composé de $m/z = 174$ permet de définir ce composé comme un composé secondaire puisqu'il se forme après les 4 premières heures d'irradiation de 9-CAA dans Berre, la Mer et le Rhône tandis qu'il se forme après 22 h dans l'Arc. Cette allure de cinétique a aussi été observée pour le composé de $m/z = 232$ et 212.

Deux composés ($m/z = 230$ et 256) ont des comportements assez similaires. Leur formation prend place dès les premiers instants dans l'eau de mer et de Berre et après quelques heures dans les deux autres. Par contre, l'accumulation du composé de $m/z = 230$ est moins importante car le composé disparaît assez rapidement dans le milieu. Ici encore, les nombreux changements de pente soulignent bien leur formation et disparition concomitante.

Tableau 4-12 : Concentration en acridine et acridone après 24 h d'irradiation de 9-CAA dans les différentes eaux, $\text{pH} \approx 8$, $[9\text{-CAA}] = 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et lampe Xe 300 W.

Composés	Acridine					Acridone				
	Arc	Rhône	Berre	Mer	Eau ultrapure	Arc	Rhône	Berre	Mer	Eau ultrapure
Type d'Eau										
Concentration formée ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	2,3	1,4	1	0,2	0,09	44,7	54,3	70,4	65,1	35,6
% de transformation de 9-CAA	0,25	0,26	0,16	0,04	0,01	4,9	10,3	11,2	13,9	4,5

4.2.4 Comparaison avec les résultats obtenus lors de la photolyse de 9-CAA

De la même façon, des solutions de 9-CAA exposées pendant des durées différentes (jusqu'à environ 48 h) c'est-à-dire avec un taux de transformation maximal de 9-CAA d'environ 35 % ont été analysées par LC-MS-QToF sans préparation préalable des échantillons.

Quatre composés ont été identifiés sans ambiguïté parmi lesquels l'acridine ($m/z = 180$) et l'acridone ($m/z = 196$). De plus, deux autres composés, identifiés à partir de leur formule élémentaire, ont été proposés : l'acide carboxylique quinoléine ($m/z = 174$) et le dihydroxy-acridine ($m/z = 212$).

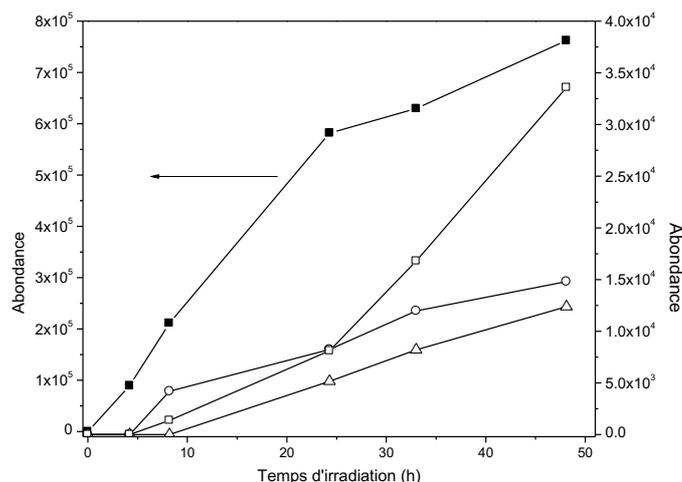


Figure 4-27 : Cinétiques de formation des TP issus de la photodégradation de 9-CAA dans l'eau ultrapure : acridone (■), acridine (○), acide carboxylique quinoléine (△), dihydroxy-acridine (□), pH = 5,75, lampe Xe 300 W, [9-CAA] = 5 mg.L⁻¹.

Le tracé de leur cinétique de formation sur la figure 4-27, montre que l'acridone est présent dès les premiers temps d'exposition et semble s'accumuler avec une concentration après 24,4 h d'irradiation égale à 35 µg.L⁻¹ qui correspond à 8,5 % de la dégradation de CBZ. Cependant, l'acridine et son dérivé dihydroxylé semblent être des composés secondaires qui ont été détectés après quelques heures d'exposition. L'acridine, dont la concentration mesurée est très faible, représente une part infime de la dégradation de 9-CAA (tableau 4-12). Enfin, le dérivé de la quinoléine est plutôt un composé tertiaire avec une présence détectable au-delà de 10 h sous irradiation. Ces trois composés s'accumulent aussi dans le milieu dans nos conditions de travail.

Cette comparaison fait apparaître que les sous-produits de la photolyse de 9-CAA sont aussi détectés lors de son irradiation dans les eaux naturelles. Par ailleurs, les concentrations en acridine et acridone dans les eaux naturelles sont plus importantes que celles mesurées au cours de la photolyse et suggèrent que d'autres processus de photodégradation induite sont à l'origine de leur formation. Ceci est, de plus, confirmé par leurs cinétiques avec des formations plus rapides dès les premiers temps d'exposition.

4.3 Processus de dégradation de OxCBZ dans les eaux naturelles

4.3.1 Identification des TP de OxCBZ

Des solutions de OxCBZ ont été irradiées de façon à obtenir la dégradation presque totale du composé de départ (entre 90 et 100 % de transformation). Ces échantillons ainsi que les solutions laissées à l'obscurité (solutions de référence) ont été analysés par LC-MSQTof. Ces dernières se sont avérées indispensables pour discriminer les produits issus des processus de photodégradation. Des exemples de chromatogrammes obtenus en mode full scan sont donnés sur la figure 4-28.

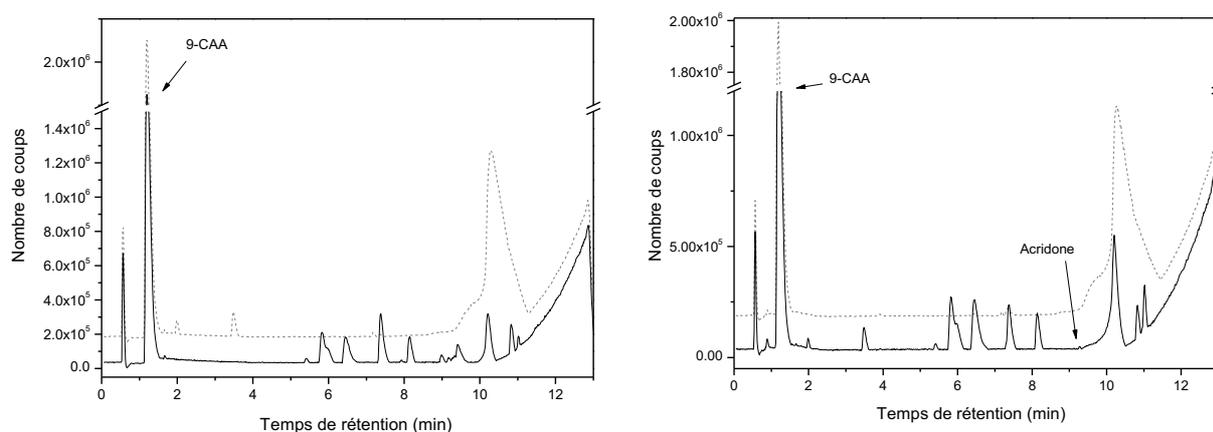


Figure 4-28 : Chromatogrammes de solutions de OxCBZ de référence (pointillé) et après 4 h d'exposition dans Berre (gauche) et dans Rhône (droite), $\text{pH} \approx 8$, $[\text{OxCBZ}] = 5 \text{ mg.L}^{-1}$ et lampe Xe 300 W.

Tous les composés détectés dans les solutions de OxCBZ irradiées sont rassemblés dans le tableau 4-13. Les produits de transformations ont été identifiés soit par comparaison avec les produits commerciaux, soit à partir de la masse exacte des composés et de leur formule élémentaire ou encore en s'appuyant sur la littérature (Bu et al., 2016; Kaiser et al., 2014; Miao et al., 2017).

Ainsi, il est possible de se rendre compte que 3 standards sont détectés : 9-CAA ($t_{\text{rét}} = 1,2 \text{ min}$), l'acridine ($t_{\text{rét}} = 2,4 \text{ min}$) et l'acridone ($t_{\text{rét}} = 9,3 \text{ min}$) comme cela est visible dans le tableau 4-13 mais aussi sur la figure 4-28.

Tableau 4-13: Sous-produits formés lors de l'irradiation de OxCBZ dans les eaux naturelles

T _{ret} (min)	[M+H] ⁺ (m/z obtenu)	[M+H] ⁺ (m/z théorique)	Erreur sur la masse (mDa)	Formule M	Structure chimique	Eaux
1,2 9-CAA	224,0710	224,0706	0,4	C₁₄H₉NO₂		Toutes
2,4 acridine	180,0802	180,0808	0,6	C₁₃H₉N		Berre, mer
7,2 OxCBZ	253,0976	253,0972	0,4	C₁₅H₁₂N₂O₂		
5,1 6,4 OH-ACA	224,0706	224,0706	0	C₁₄H₉NO₂		Arc, Berre, mer
5,2 7,3	267,0768	267,0764	0,4	C₁₅H₁₀N₂O₃		Rhône, Berre Arc, Berre, mer
9,3 Acridone	196,0766	196,0757	0,9	C₁₃H₉NO		Arc, Rhône, mer
10,3 11,5 OH-9- CAA	240,0652	240,0655	0,3	C₁₄H₉NO₃		Arc, mer
8,3 10,8	210,091	210,0913	0,3	C₁₄H₁₁NO		Rhône, Berre, mer Tous
11,1 DiOH- ACA	242,0814	242,0812	0,2	C₁₄H₁₁NO₃		Tous

Parmi les 5 autres composés détectés, on retrouve deux composés déjà identifiés comme TP de CBZ, il s'agit du produit élué à 11,1 min ($m/z = 242$ et de formule $C_{14}H_{11}NO_3$), qui correspond au dérivé dihydroxylé de l'acridine carboxaldéhyde (DiOH-ACA) et du produit de $m/z = 224$ qui correspond à OH-ACA.

Pour le composé de $m/z = 210$ et de formule élémentaire $C_{14}H_{11}NO$, la perte d'un groupement $-CONH$ par rapport à la formule de OxCBZ ($C_{15}H_{12}N_2O_2$) suppose la perte de la fonction latérale amide et valide la proposition structurale. La structure chimique du composé de $m/z = 240$ et de formule élémentaire $C_{14}H_9NO_3$, qui présente un rapport m/z supérieur de 16 Da (c'est-à-dire un atome d'oxygène) par rapport à celui de 9-CAA ($m/z = 224$ et formule $C_{14}H_9NO_2$) conforte l'hypothèse de la présence d'un groupement hydroxyle sur un noyau aromatique. Sa position n'étant pas définie, aussi bien sur le noyau aromatique que sur le carbone porteur de cette fonction, une proposition a été faite sans certitude absolue. Il est à noter que la détection de deux composés présentant un rapport m/z identique soutient cette structure chimique qui correspond au dérivé hydroxylé de 9-CAA (OH-9-CAA).

Enfin, pour les composés de $m/z = 267$, correspondant à 1-(2-benzaldéhyde)-(1H,3H)-quinazoline-2,4-dione (BQD) et/ou à 1-(2-acide benzoïque)-(1H,3H)-quinazoline-2-one (BaQM), leur attribution structurale s'est basée sur leur masse exacte mais aussi sur les travaux de (Bu et al., 2016).

4.3.2 Comparaison des TP de OxCBZ identifiés dans les différents milieux

D'une façon générale, la présence des TP formés lors de l'irradiation de OxCBZ dans les eaux naturelles ne semble pas dépendre du milieu lui-même sauf pour quelques composés qui sont détectés dans un ou deux milieux : l'acridine dans l'eau de Berre et de la mer Méditerranée et le dérivé désamidé de OxCBZ dans l'eau du Rhône et de Berre. A l'opposé, trois sous-produits se forment dans toutes les eaux : il s'agit de l'acridone, de 9-CAA et de DiOH-ACA. Enfin, un composé n'a pas été détecté dans l'eau du Rhône, le OH-ACA.

4.3.3 Comparaison avec les résultats obtenus à l'obscurité et lors la photolyse de OxCBZ

Les résultats analytiques sur les TP issus de la dégradation de OxCBZ à l'obscurité et par photolyse ont été obtenus par LC-MS-QToF après différents temps de réaction.

Ainsi, 5 composés ont été identifiés à l'obscurité dans les eaux naturelles et 10 lors de l'exposition à la lumière dans l'eau ultrapure. Les composés formés à l'obscurité sont communs aux autres conditions expérimentales (photolyse et photodégradation induite) avec la détection de : 9-CAA, OH-ACA, BaQM et BQD. Les 5 autres composés mis en évidence lors de la photolyse de OxCBZ ont aussi été identifiés lors des études photochimiques dans les eaux naturelles : acridine, acridone, dérivé désamidé de OxCBZ, OH-9-CAA et DiOH-ACA.

Pour les composés quantifiables (9-CAA, acridine et acridone), leur concentration a été mesurée dans les différentes conditions expérimentales et les valeurs sont rassemblées dans le tableau 4-14 ci-après.

Tableau 4-14 : Concentrations en 9-CAA, acridine et acridone à partir de OxCBZ dans les différentes eaux et dans les différentes conditions expérimentales, pH ≈ 8, [OxCBZ] = 5 mg.L⁻¹ et lampe Xe 300 W.

Composés	Conditions	Arc	Berre	Rhône	Mer	
9-CAA	Obscurité*	mg.L ⁻¹	0,28	0,35	0,34	0,25
		% de OxCBZ	5,6	7,1	7,0	5,2
	Irradiation	mg.L ⁻¹	0,09	0,31	0,29	0,07
		% de OxCBZ	1,8	6,1	5,9	1,3
Acridone	Irradiation	mg.L ⁻¹	0,0064	0,0047	0,0033	0,0050
		% de OxCBZ	0,13	0,09	0,07	0,005
Acridine	Irradiation	mg.L ⁻¹		8,6×10 ⁻⁵		8,6×10 ⁻⁵
		% de OxCBZ		0,0017		0,01

* après 48h à l'obscurité

D'après le tableau 4-14, la formation photochimique d'acridone et d'acridine est très faible et correspond à moins de 0,2 % de la dégradation de OxCBZ. 9-CAA est formé en quantité plus importante et donc contribue plus significativement au bilan massique de la dégradation de OxCBZ, jusqu'à environ 6 %. Par ailleurs, ces valeurs soulignent aussi le fait que 9-CAA est formé en quantités comparables dans les eaux de Berre et du Rhône à l'obscurité et sous irradiation mais en quantités plus faibles sous irradiation dans les eaux de l'Arc et de mer qu'à l'obscurité. Cette différence dans l'Arc est probablement liée à la photodégradation induite très efficace de 9-CAA (cf. tableau 4-7).

D'après ces résultats, il apparaît que lors de la photodégradation induite de OxCBZ dans les eaux naturelles, les processus d'atténuation naturelle ainsi que la photolyse de OxCBZ peuvent avoir lieu sans que l'on ait pu néanmoins leur attribuer une pondération.

4.4 Conclusion

Ces études analytiques ont permis de mettre en évidence la formation de nombreux composés au cours de la photodégradation de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans les eaux naturelles avec la détection très fréquente de l'acridine et de l'acridone. Deux autres composés ont été souvent mis en évidence lors de la phototransformation de OxCBZ et CBZ, il s'agit de OH-ACA et de 9-CAA.

De nombreux autres composés détectés se sont avérés spécifiques du composé de départ : pour 9-CAA, des dérivés quinoléiques ; pour CBZ, l'imino stilbène et le dérivé désaminé de CBZ ; pour OxCBZ, BaQM, BQD, et le dérivé désamidé de OxCBZ.

Enfin, certains produits de transformation n'ont été identifiés que dans des milieux spécifiques. C'est notamment, le cas des composés halogénés dont la présence a pu être validée lors de la phototransformation de 9-CAA et CBZ dans les eaux salées.

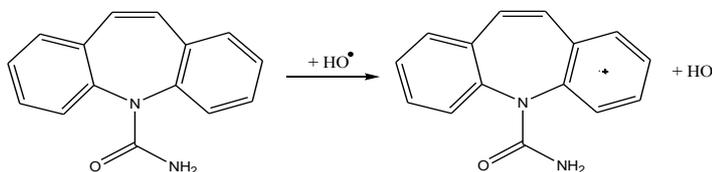
5. Mécanismes de dégradation de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans les eaux naturelles

5.1 Mécanisme de dégradation de CBZ dans les eaux naturelles

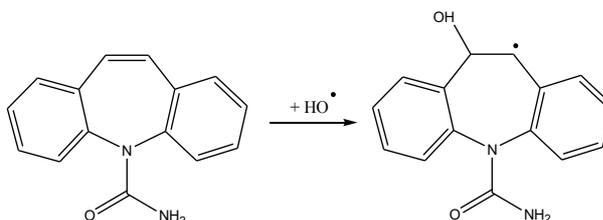
A partir des résultats sur l'étude des milieux naturels (composition chimique, espèces réactives), sur la détermination des constantes de réaction et sur la transformation de CBZ (études cinétiques et analytiques) dans les eaux naturelles et dans l'eau ultrapure, il est possible d'affirmer que la dégradation de CBZ dans le milieu aquatique est essentiellement due aux processus de phototransformation induite. La nature des espèces réactives impliquées dans la transformation primaire de CBZ est dépendante des milieux tout comme les mécanismes réactionnels. Aussi, pour plus de clarté, un premier point sera fait sur les mécanismes primaires et dans un second temps sur les voies réactionnelles en indiquant les particularités de chacune des eaux naturelles.

Dans ce chapitre, il a été clairement démontré que dans les eaux douces, les radicaux hydroxyles sont majoritairement responsables de la dégradation induite de CBZ. Or, ces radicaux sont connus pour oxyder les composés organiques d'une façon non sélective et peuvent réagir par transfert d'électron, par addition sur une double liaison ou encore par arrachement d'un atome d'hydrogène (Neta et Fessenden, 1974). Compte-tenu de la structure de CBZ, les deux premières réactions ont été envisagées, soit par exemple :

Le transfert d'électron avec la formation du radical cation de CBZ (CBZ^{•+}) :

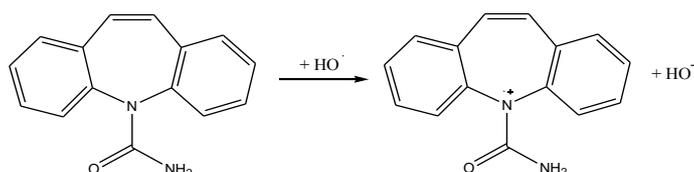


Et l'addition sur une double liaison pour donner l'adduit hydroxylé de CBZ (OH-CBZ[•]) :

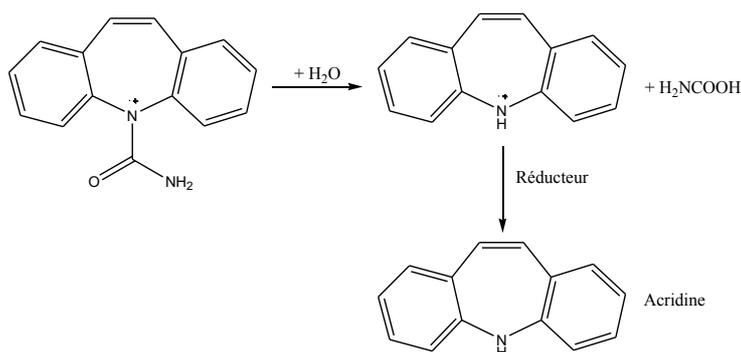


Par contre, dans les eaux salées, la formation majoritaire de radicaux halogénés (radicaux Br_2^{\bullet} voire Cl_2^{\bullet}) pourrait permettre la dégradation de CBZ suivant un processus primaire impliquant aussi le transfert d'électron avec la formation de $\text{CBZ}^{*\bullet}$ et une possible recombinaison radicalaire avec Br^{\bullet} .

Plusieurs voies de transformation de CBZ permettent de justifier les nombreux produits de transformation détectés, notamment des coupures de liaisons, des hydroxylations, des ouvertures de cycles, des halogénations et des oxydations. Ainsi, les coupures de liaisons peuvent s'expliquer par l'obtention d'un radical cation sur l'un des atomes d'azote (la réactivité des radicaux $\bullet\text{OH}$ n'étant pas sélective) :

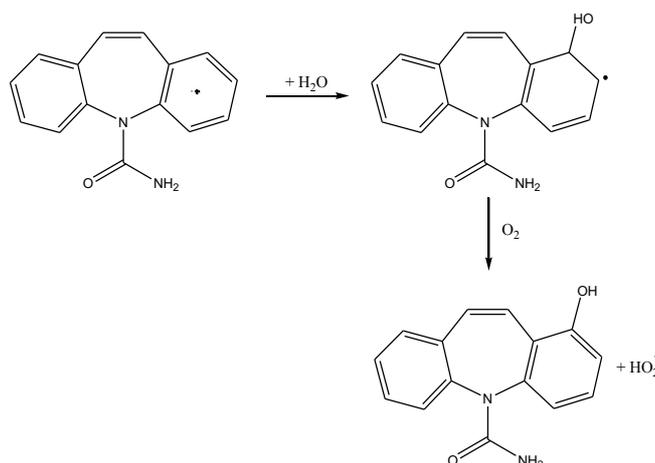


La présence d'un réducteur dans le milieu (par exemple, le radical superoxyde) conduit à la formation de l'acridine ($m/z = 180$) ce qui explique sa présence dès les premiers instants d'irradiation :



La formation du radical cation sur l'atome d'azote de la fonction amide permet la formation du composé $m/z = 222$ (avec la rupture de la liaison C-N entre la fonction carbonyle et amine). Cette réaction semble plus lente et moins favorisée car ce composé est formé après quelques heures sous irradiation et en assez faible quantité en comparaison avec l'acridine.

L'hydroxylation de CBZ ou des produits de transformation implique la formation initiale d'un adduit radicalaire (exemple de OH-CBZ^{\bullet}) ou d'un radical cation (exemple de $\text{CBZ}^{*\bullet}$) qui peuvent évoluer en présence d'eau et d'oxygène pour conduire à la formation des dérivés hydroxylés :



L'obtention de DiOH-CBZ (figure 4-29, voie C) implique la formation d'un intermédiaire non détecté dans nos conditions de travail, l'époxyde de CBZ comme cela a été décrit dans la littérature (Bahlmann et al., 2014; De Laurentiis et al., 2012a; Tran et al., 2013; Vogna et al., 2004; Zhu et al., 2015). DiOH-CBZ évolue ensuite par oxydation vers les composés de $m/z = 224$. En parallèle, à partir de l'époxyde, la contraction du cycle azépine permet la formation du composé de $m/z = 253$ (voie D) puis de l'acridine carboxaldéhyde (figure 4-29, voie E) qui peut évoluer pour donner l'acridine (par décarbonylation, figure 4-29, voie E1), 9-CAA (par hydroxylation, figure 4-29, voie E2) et l'acridone (figure 4-29, voies F et G) (De Laurentiis et al., 2012a; Mahdi Ahmed et Chiron, 2014; Tran et al., 2013; Vogna et al., 2004; Zhu et al., 2015) mais aussi ces dérivés hydroxylés (OH-ACA et DiOH-ACA) (figure 4-29, voie H et H1) (Zhu et al., 2015). Dans nos conditions de travail, les voies C1, E1, E2 semblent favorisées cinétiquement par rapport à la voie H car les composés issus de DiOH-CBZ et ACA sont présents dès les premiers temps d'irradiation. L'irradiation de CBZ peut également conduire à une hydroxylation pour former OH-CBZ (figure 4-29, voie I).

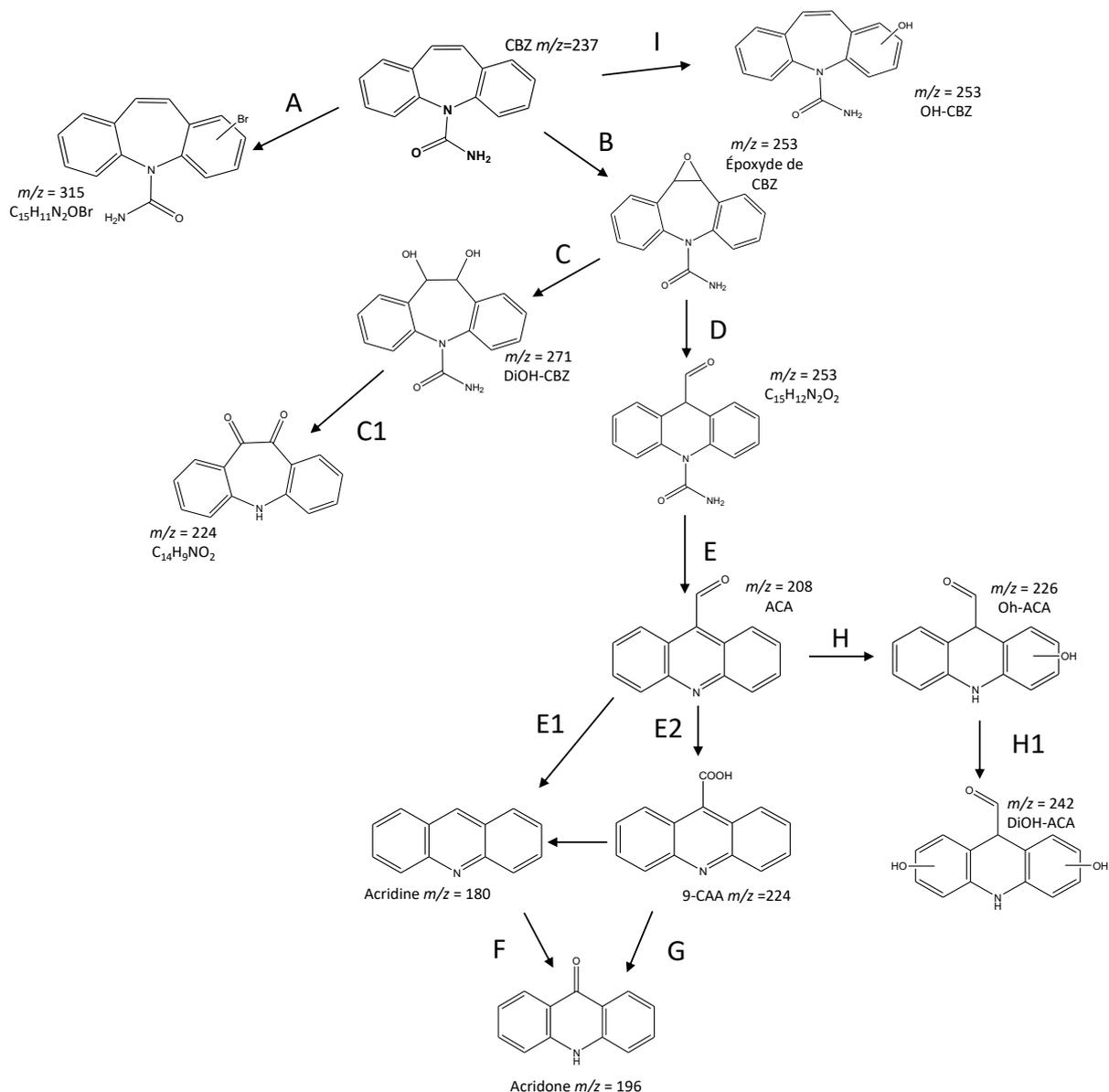


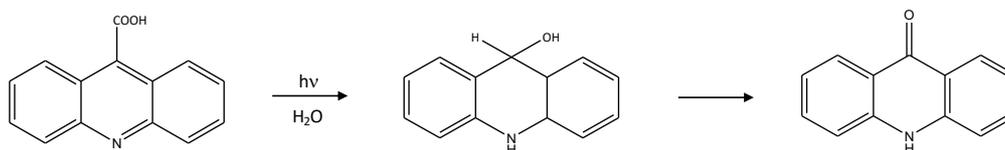
Figure 4-29 : Mécanismes de phototransformation de CBZ dans les eaux naturelles d'après la littérature et les résultats obtenus au cours de la thèse

Parmi les voies de transformation présentées dans la figure 4-29, la voie A, identifiée uniquement dans ce travail correspond à l'obtention par halogénéation du composé bromé uniquement détecté dans les eaux salées. Cette réaction se produit probablement à partir de CBZ^{•+} qui en présence de Br[•] pourrait conduire au composé bromé par recombinaison radicalaire et réduction.

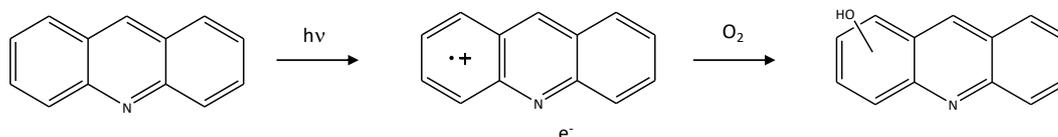
5.2 Mécanisme de dégradation de 9-CAA dans les eaux naturelles

En considérant l'ensemble des résultats obtenus, il est possible d'affirmer que la dégradation de 9-CAA dans les compartiments aquatiques environnementaux est due aux processus de phototransformation directe (photolyse) et aussi induite. Néanmoins, la nature des espèces réactives impliquées dans la transformation primaire de 9-CAA ainsi que les mécanismes réactionnels semblent dépendre des milieux, comme c'est le cas pour les processus de phototransformation induite.

Dans ce chapitre, il a été clairement démontré que la photolyse de 9-CAA se produisait avec l'obtention très rapide de l'acridine et ensuite de l'acridone, de l'acide carboxylique quinoléine et du dihydroxy-acridine. La dégradation directe de 9-CAA peut s'expliquer par le processus de photodécarbonylation (perte de CO). Celui-ci permet de justifier la formation directe de l'acridone comme cela a été décrit pour le dérivé de l'anthracène (Budac et Wan, 1992; Negrón-Encarnación et Arce, 2007) :



Par ailleurs, la formation de dérivés hydroxylés de l'acridine à partir de 9-CAA peut s'expliquer par le processus de décarboxylation (perte de CO_2) de 9-CAA qui conduit à la formation de l'acridine puis à celui de photoionisation (Da Silva et al., 2013; De Laurentiis et al., 2012a; Horio et al., 2012; Kalachandra et Farhataziz, 1980; Wong-Wah-Chung et al., 2007). Ce dernier implique la formation d'un radical cation par photoéjection d'un électron qui en présence d'oxygène conduit à la formation de l'hydroxy-acridine comme cela est représenté ci-après :



L'hydroxylation supplémentaire de ce composé ainsi que son oxydation conduit ensuite à l'ouverture du cycle aromatique (Vialaton et al., 1999) et à l'obtention indirecte du dérivé de la quinoléine.

Cependant, la formation de l'acridine et de l'acridone semble aussi se produire par photodégradation induite tout comme celle des autres composés non détectés par photolyse (produits d'ouverture de cycle, produits hydroxylés et produits halogénés).

Le mécanisme de formation des sous-produits proposé dans ce travail est présenté sur la figure 4-30. Ainsi dans les eaux naturelles, l'implication des radicaux hydroxyles, bromures voire chlorures dans la transformation de 9-CAA est à considérer (voies A et B, figure 4-30). Cela implique donc la formation probable du radical cation de 9-CAA par transfert d'électron pour donner son radical cation 9-CAA^{•+} ou encore celui de l'adduit HO-9-CAA[•] comme cela a été décrit pour CBZ. A partir de ces composés, l'hydroxylation voire la double hydroxylation de 9-CAA (voie B, figure 4-30) est envisageable et justifie la formation secondaire de DiOH-9-CAA. A partir de l'acridine, les mêmes processus ont lieu et génèrent les dérivés hydroxylés et dihydroxylés de l'acridine (voies C1 et C2, figure 4-30). Ensuite, l'hydroxylation supplémentaire de ce composé ainsi que son oxydation conduit à l'ouverture du cycle aromatique (Vialaton et al., 1999) et à l'obtention indirecte des dérivés de la quinoléine (voies E, F et G, figure 4-30).

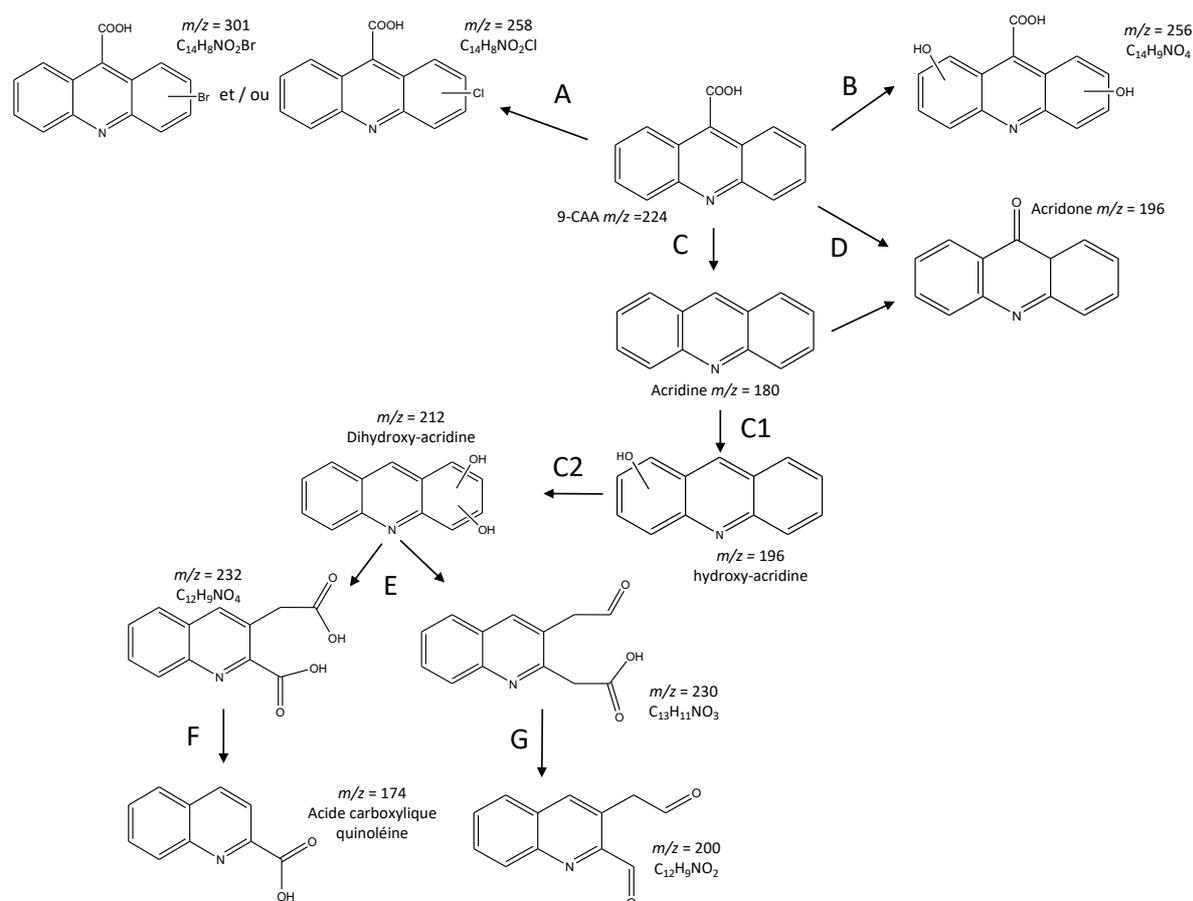


Figure 4-30 : Hypothèses mécanistiques de photodégradation du sous-produit 9-CAA dans les eaux naturelles : (▼) Arc, (◇) Rhône, (○) Méditerranée, (*) Berre d'après les résultats obtenus dans la thèse

Pour les produits halogénés, leur formation dans les eaux salées se justifie par la production de $\text{Br}_2^{\bullet-}$ et $\text{Cl}_2^{\bullet-}$ soit donc la formation préalable de Br^{\bullet} et Cl^{\bullet} qui conduit à la formation des dérivés chloré et bromé de 9-CAA comme cela a été supposé pour CBZ (voie A, figure 4-30).

5.3 Mécanisme de dégradation de OxCBZ dans les eaux naturelles

Concernant la transformation de OxCBZ (études cinétiques et analytiques) dans les eaux naturelles, elle est complexe et fait intervenir : des processus d'atténuation naturelle, de phototransformation directe (photolyse) mais aussi de phototransformation induite. La nature des espèces réactives impliquées dans la transformation primaire de OxCBZ ainsi que les mécanismes réactionnels semblent dépendre des milieux.

Les résultats obtenus dans ce chapitre ont clairement montré que OxCBZ était transformé par absorption directe de la lumière. Les processus de dégradation directe de OxCBZ supposent qu'à l'état excité, OxCBZ (comme de nombreux composés organiques aromatiques (Da Silva et al., 2013; De Laurentiis et al., 2012a; Horio et al., 2012; Kalachandra et Farhataziz, 1980; Wong-Wah-Chung et al., 2007)) puisse subir un processus de photoéjection d'électron, afin de donner plusieurs radicaux cations (localisé sur l'azote de l'azépine, sur le noyau aromatique ou encore sur un atome de carbone de l'azépine). Ces radicaux cations peuvent ensuite évoluer pour produire par coupure de la liaison C-N des dérivés désamidés, ou encore pour générer le dérivé hydroxylé OH-OxCBZ en présence d'oxygène.

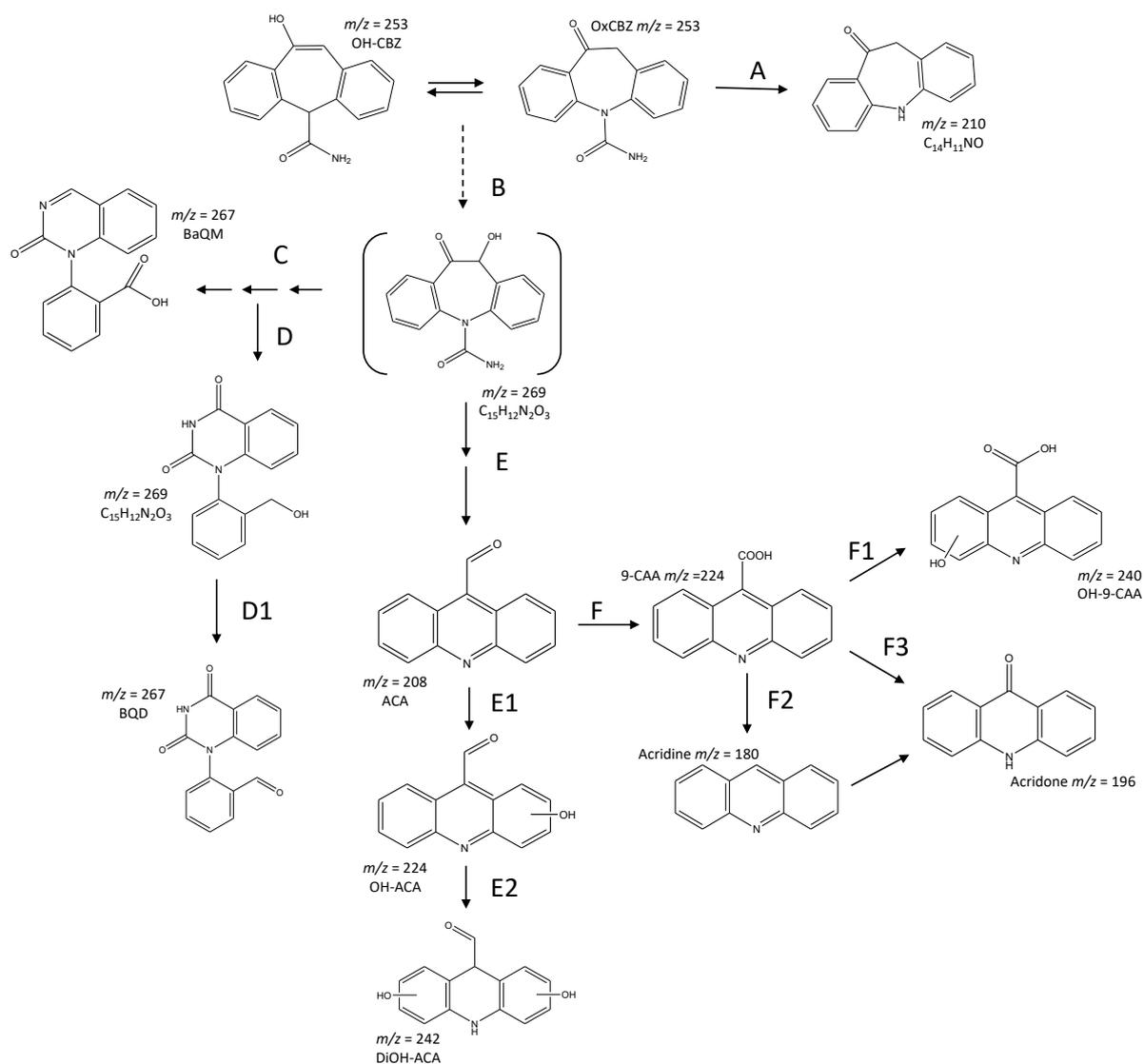


Figure 4-31 : Mécanismes de phototransformation de OxCBZ dans les eaux naturelles d'après la littérature et les résultats obtenus dans la thèse

Ainsi, dans les eaux naturelles (figure 4-31), une désamination de OxCBZ est envisageable et entraîne la formation du composé ayant un m/z égal à 210 (figure 4-31, voie A). De plus, il est vraisemblable qu'un processus d'oxydation ou hydroxylation localisé sur l'azépine de OxCBZ ou OH-CBZ, puisse générer l'intermédiaire ($m/z = 269$), non identifié dans notre cas, mais nécessaire pour justifier la formation de certains des TP. A partir de cet intermédiaire, plusieurs voies réactionnelles peuvent s'enchaîner, notamment une coupure de liaison, une oxydation et une fermeture cycle (Kaiser et al., 2014) donnant BaQM (figure 4-31, voie C) ainsi que le produit de transformation de $m/z = 269$ qui peut être oxydé en BQD (figure 4-31, voies D et D1). Egalement, l'intermédiaire ($m/z = 269$) peut subir une désamidation, un réarrangement α -cétonique, une contraction de cycle puis une perte d'un groupement hydroxyle pour former ACA (figure 4-31, voie E). A partir de ACA, les processus qui ont

lieu, génèrent les dérivés hydroxylés et dihydroxylés de ACA (OH-ACA et DiOH-ACA) identifiés dans ce travail (figure 4-31, voies E1 et E2). Enfin, ACA peut également, par oxydation, former 9-CAA (figure 4-31, voie F), qui comme montré précédemment, peut s'hydroxyler (OH-9-CAA) (figure 4-31, voie F1) mais aussi se transformer en acridine et acridone (figure 4-31, voies F2 et F3). Toutefois, il convient rappeler qu'aucun produit de transformation de OxCBZ chloré ou bromé n'a été identifié dans les eaux salées.

Le processus de transformation de OxCBZ à l'obscurité qui conduit à la formation de 9-CAA et de BaQD ou BaQM peut être, en partie, attribué à une réaction chimique d'oxydo-réduction de OxCBZ avec le fer présent dans les milieux comme cela a été démontré par (Hu et al., 2009) pour CBZ et envisagé pour OxCBZ par (Kaiser et al., 2014). La présence des dérivés hydroxylés de l'acridine carboxaldéhyde (HO-ACA) pourrait s'expliquer par un mécanisme plus complexe qui impliquerait une première étape d'hydroxylation, probablement par voie biologique, comme cela a été suggéré pour les eaux de l'Arc et du Rhône, puis une contraction de cycle et enfin une hydroxylation supplémentaire comme cela a été partiellement décrit dans la littérature (Kaiser et al., 2014).

5.4 Conclusion

Ces études mécanistiques ont permis de mettre en évidence des voies de transformation communes ou différentes selon les composés mais également les milieux. Dans un premier temps, la contraction du cycle azépine présent uniquement sur les molécules de CBZ et OxCBZ a été observée à partir d'intermédiaires réactionnels, tels que l'époxyde de CBZ ou encore le OH-OxCBZ. Dans un second temps, l'ouverture du cycle aromatique a été mise en évidence dans le cas de 9-CAA pour former des dérivés de la quinoléine.

Egalement l'hydroxylation de deux des produits de départ (CBZ et 9-CAA) a été remarquée (OH-CBZ et OH-9-CAA), mais aussi l'hydroxylation ou la dihydroxylation de sous-produits comme ACA ou l'acridine dans les différentes eaux. De plus, des processus d'oxydation ont été mis en évidence dans chacun des milieux pour chaque composé.

L'étude sur des types d'eaux différents a permis de montrer que dans les eaux salées, les mécanismes réactionnels menaient à la formation de produits de transformation halogénés dans le cas de CBZ et 9-CAA.

6. Conclusion générale

L'étude des cinétiques de disparition de CBZ, OxCBZ et 9-CAA sous irradiation dans l'eau ultrapure a permis de mettre en évidence la part très importante du processus de photolyse pour OxCBZ et 9-CAA avec des temps de demi-vie de 7 h et 3 jours respectivement, contre 35 jours pour CBZ qui semble être un composé photostable. Le rendement quantique de disparition plutôt élevé de OxCBZ vient confirmer cette observation ($\phi = 1,8 \times 10^{-2}$), mais cette valeur est largement supérieure aux résultats obtenus par une autre équipe (Li et al. (2011)). Dans le cas de 9-CAA et CBZ, les rendements quantiques de disparition sont du même ordre de grandeur (respectivement $\phi = 2,7 \times 10^{-4}$ et $2,2 \times 10^{-4}$). Le faible rendement quantique de CBZ ainsi que son temps de demi-vie élevé tendent à prouver que sa transformation par absorption directe de la lumière n'est pas une voie prédominante dans sa dégradation, ce qui est en accord avec des études antérieures ($\phi = 1,3$ à $3,1 \times 10^{-4}$) (Carlos et al., 2012; Chiron et al., 2006; Lam et Mabury, 2005).

L'étude des cinétiques de disparition des composés dans les 4 eaux naturelles à l'obscurité a montré que seul OxCBZ subissait des phénomènes d'atténuation naturelle, potentiellement des réactions d'oxydo-réduction ($t_{1/2}$ compris entre 8 et 107 h). Sous irradiation, les suivis cinétiques ont montré que la photodégradation était dépendante des composés et de la nature des milieux. CBZ est le composé le moins dégradé, suivi par 9-CAA et OxCBZ qui disparaît totalement en un peu moins de 4 h. Les processus mis en jeu pour chacun des composés impliquent des réactions de photodégradation induite mais aussi de la photodégradation directe pour 9-CAA et OxCBZ et probablement des réactions d'oxydo-réduction pour OxCBZ. Leur disparition est en général favorisée dans l'eau de l'Arc et défavorisée dans les eaux salées (temps de demi-vie 2 à 4 fois plus grand) pour 9-CAA et CBZ. Ceci est en parfait accord avec les travaux de Matamoros et al. (2009) montrant un temps de demi-vie légèrement plus élevé en eau salée qu'en eau douce (facteur 2). Néanmoins, ce comportement n'a pas été observé pour OxCBZ peut-être du fait de l'importance des phénomènes d'atténuation naturelle constatés à l'obscurité dans l'eau de Berre.

Afin de mieux comprendre les différences observées entre les composés, mais également dans chacun des milieux, les constantes de réaction entre CBZ, OxCBZ, 9-CAA d'une part et les espèces chimiques réactives générées dans les eaux d'autres part, ont été déterminées. Ces résultats ont clairement montré que les radicaux hydroxyles étaient très efficaces dans la photodégradation induite des composés avec des constantes de l'ordre de $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Les données pour CBZ et OxCBZ sont proches des résultats issus de la littérature avec des valeurs comprises entre $2,43 \times 10^9$ à $1,8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Bu et al., 2017; De Laurentiis et al., 2012; Huber et al., 2003; Lam et Mabury, 2005; Vogna et al., 2004; Wols et al., 2013; Wols et Hofman-Caris, 2012). Les constantes de réaction entre les composés et les radicaux halogénés ont été déterminées pour la première fois dans le cadre de notre travail et

sont comprises entre 10^6 à 10^8 $M^{-1}.s^{-1}$. Ces résultats ont permis de mieux comprendre les différences de dégradation des 3 composés dans chaque type d'eau. En effet, bien que les radicaux hydroxyles soient jusqu'à 300 fois plus efficaces que les autres radicaux, ils sont piégés de manière importante par différents constituants présents en grande quantité dans les eaux (CO_3^{2-} , Cl^- , Br^- par exemple), les rendant moins disponibles pour réagir avec les composés. Ceci soutient la plus faible dégradation de CBZ et 9-CAA dans les eaux salées, compte tenu d'une quantité plus importante en ions chlorure et bromure agissant comme des compétiteurs.

Les différentes espèces chimiques réactives générées au cours de l'irradiation dans chaque eau entraînent globalement une dégradation plus ou moins efficace de nos composés. Une étude analytique a alors été menée afin d'identifier les différents produits de transformation communs ou spécifiques. Ces analyses ont montré la formation très fréquente de l'acridine et de l'acridone, régulièrement identifiés dans la littérature (Calisto et al., 2011; Mahdi Ahmed et Chiron, 2014; Matta et al., 2011; Miao et al., 2017; Zhang et al., 2015; Zhu et al., 2015) ainsi que OH-ACA et 9-CAA issus de la phototransformation de OxCBZ et CBZ (Calisto et al., 2011; Kaiser et al., 2014; Kosjek et al., 2009). De nombreux autres composés identifiés se sont avérés spécifiques du composé de départ: pour 9-CAA des dérivés quinoléiniques; pour CBZ, l'imino-stilbène et le dérivé désaminé de CBZ; pour OxCBZ, BaQM, BQD, et le dérivé désamidé de OxCBZ (Brezina et al., 2017; Bu et al., 2016; Hübner et al., 2014; Li et al., 2011; Miao et al., 2017; Zhu et al., 2015). Enfin, certains produits de transformation n'ont été identifiés que dans des milieux spécifiques. C'est notamment, le cas des composés halogénés formés lors de la phototransformation de 9-CAA et CBZ dans les eaux salées, qui n'ont jusqu'alors jamais été mentionnés dans la littérature.

Pour finir, les études mécanistiques ont permis de mettre en évidence des voies de transformation communes ou différentes selon les composés mais également les milieux. Les principales voies sont :

- la contraction du cycle azépine présent sur les molécules de CBZ et OxCBZ (Leclercq et al., 2009; Zhu et al., 2015) (Kaiser et al., 2014; Miao et al., 2017)
- l'ouverture de cycle aromatique dans le cas de 9-CAA pour former des dérivés de la quinoléine
- l'hydroxylation de 9-CAA en OH-9-CAA (Kaiser et al., 2014) mais aussi celle de CBZ.
- l'hydroxylation ou la dihydroxylation de sous-produits comme ACA ou l'acridine dans les différentes eaux (Kaiser et al., 2014)
- l'oxydation de chacun des composés dans tous les milieux.

L'ensemble de ces résultats met en exergue que la transformation de ces substances organiques dans les masses d'eaux se produit selon différents processus et avec une efficacité variable, tous dépendants de la nature de l'eau mais aussi de celle du composé. Dans tous les cas, leur transformation conduit à la production de nouveaux composés qui, pour certains d'entre eux, s'accumulent dans le milieu.

En conséquence, il apparaît important de pouvoir évaluer l'impact sur l'écosystème aquatique des composés pharmaceutiques parents, continuellement déversés dans les milieux aquatiques, mais aussi de leurs nombreux sous-produits potentiellement présents eux-aussi dans les eaux naturelles. Les effets de ces cocktails de substances est une problématique très actuelle.

Chapitre 5 :

*Évaluation de l'écotoxicité de la carbamazépine et de
sous-produits : mise au point pour aborder les effets à
faibles doses et en mélange*

L'objectif de ce chapitre est de répondre à plusieurs questions d'intérêt majeur ayant émergées dans la synthèse bibliographique :

- Peut-on trouver des organismes assez sensibles pour appréhender l'impact de faibles doses de composés pharmaceutiques ? Quelles sont les biomarqueurs les plus sensibles chez ces organismes?
- Quels sont les effets écotoxicologiques pour des durées d'exposition à court ou long terme à des produits pharmaceutiques seuls mais aussi en mélange ? Peut-on observer un effet cocktail ?

Pour ce faire, trois organismes modèles ont été choisis, à savoir *Vibrio fischeri*, *Lemna minor* et *Hydra circumcincta*. Le test normalisé sur *Vibrio fischeri* a été sélectionné dans le but d'obtenir une référence d'écotoxicité aiguë en suivant un protocole décrit dans une norme (ISO 11348-3 :2007). De plus, l'intérêt de l'espèce cible, *V. fischeri*, réside dans le fait qu'elle soit halophile, permettant ainsi d'évaluer l'écotoxicité au cours de l'irradiation de CBZ dans des eaux douces mais également marines.

Le test sur l'espèce *Lemna minor* (lentilles d'eau) existe en tant que test normalisé (OECD 221, 2006) d'exposition chronique (7 jours) où la croissance est suivie. Dans le cadre de cette thèse, une approche différente a été développée dans le but d'obtenir une réponse plus précoce et potentiellement plus sensible en se basant sur un suivi de phytométabolites primaires et secondaires.

Enfin, l'hydre d'eau douce, *Hydra circumcincta* Schulze, 1914 a montré une sensibilité à divers polluants comme les métaux (Arkhipchuk et al., 2000), les perturbateurs endocriniens (Pascoe et al., 2002), les hydrocarbures (Mitchell et Holdway, 2000) et grâce aux divers paramètres morphologiques et moléculaires auxquels on peut accéder, ce modèle se révèle prometteur en écotoxicologie et justifie notre intérêt.

Ce chapitre regroupe l'ensemble des résultats des bioessais obtenus sur les 3 organismes modèles sélectionnés, à savoir *Vibrio fischeri*, *Lemna minor* et *Hydra circumcincta*, suite à une exposition à la carbamazépine, l'oxcarbazépine et l'acide 9-carboxylique acridine pris séparément et en mélange à des concentrations au plus proches de celles mesurées dans l'environnement. Rappelons que jusqu'alors, seule la carbamazépine a fait l'objet d'évaluations écotoxicologiques poussées par d'autres équipes de recherche, contrairement à OxCBZ et 9-CAA, dont les effets n'ont que très peu voire jamais été explorés.

1. Évaluation de l'écotoxicité lors d'une exposition aiguë

La bactérie *V. fischeri* est sélectionnée, afin de mesurer l'écotoxicité lors d'exposition aiguë à nos composés pharmaceutiques. De plus, ce test étant normalisé et très employé, les résultats pourront être comparés à d'autres essais publiés, notamment sur CBZ.

1.1 Bioluminescence chez *V. fischeri*

Dans un premier temps, l'inhibition de luminescence de la bactérie est étudiée après une mise en contact avec les produits pharmaceutiques pris séparément, afin de déterminer de manière classique les EC_{50} pour chacune des molécules. Puis, dans un deuxième temps, le même bioessai est utilisé pour tester un mélange des 3 composés à faibles concentrations.

1.1.1 Détermination des EC_{50} sur les substances isolées

Pour chaque composé, la norme ISO 11348-3 :2007 est appliquée. Dans le cadre de cette norme, les EC_{50} après 15 et 30 min d'exposition sont mesurés. Les courbes dose-effet sont représentées sur la figure 5-1. Pour la carbamazépine, les EC_{50} obtenus sont respectivement de 58,5 et 64,4 $mg.L^{-1}$.

Dans le cas de l'oxcarbazépine, l' EC_{50} ne peut pas être déterminée en raison de la solubilité trop faible du composé dans l'eau. En effet, sa solubilité maximale étant de 30 $mg.L^{-1}$, la plus haute concentration testée sur *Vibrio fischeri* est de 24 $mg.L^{-1}$ (80 % de 30 $mg.L^{-1}$). Dans la figure 5-1, il est possible de distinguer une relation dose-effet de faible intensité qui confirme que lorsque la concentration augmente, la bioluminescence est inhibée. En extrapolant les résultats, l' EC_{50} après 30 min d'exposition correspondrait à 151,8 % de la concentration maximale testée soit 45,5 $mg.L^{-1}$. Ceci impliquerait que l'oxcarbazépine ait une écotoxicité légèrement supérieure à celle de la carbamazépine.

Pour 9-CAA, la solubilité du composé dans l'eau ultrapure est beaucoup trop faible pour observer une inhibition. Les résultats présentés dans la figure 5-1 montrent qu'aucune relation dose-effet n'est observée et, dans ces conditions, aucun EC_{50} ne peut être extrapolé. Il n'est donc pas possible de conclure quant à l'écotoxicité de ce composé en utilisant ce bioessai.

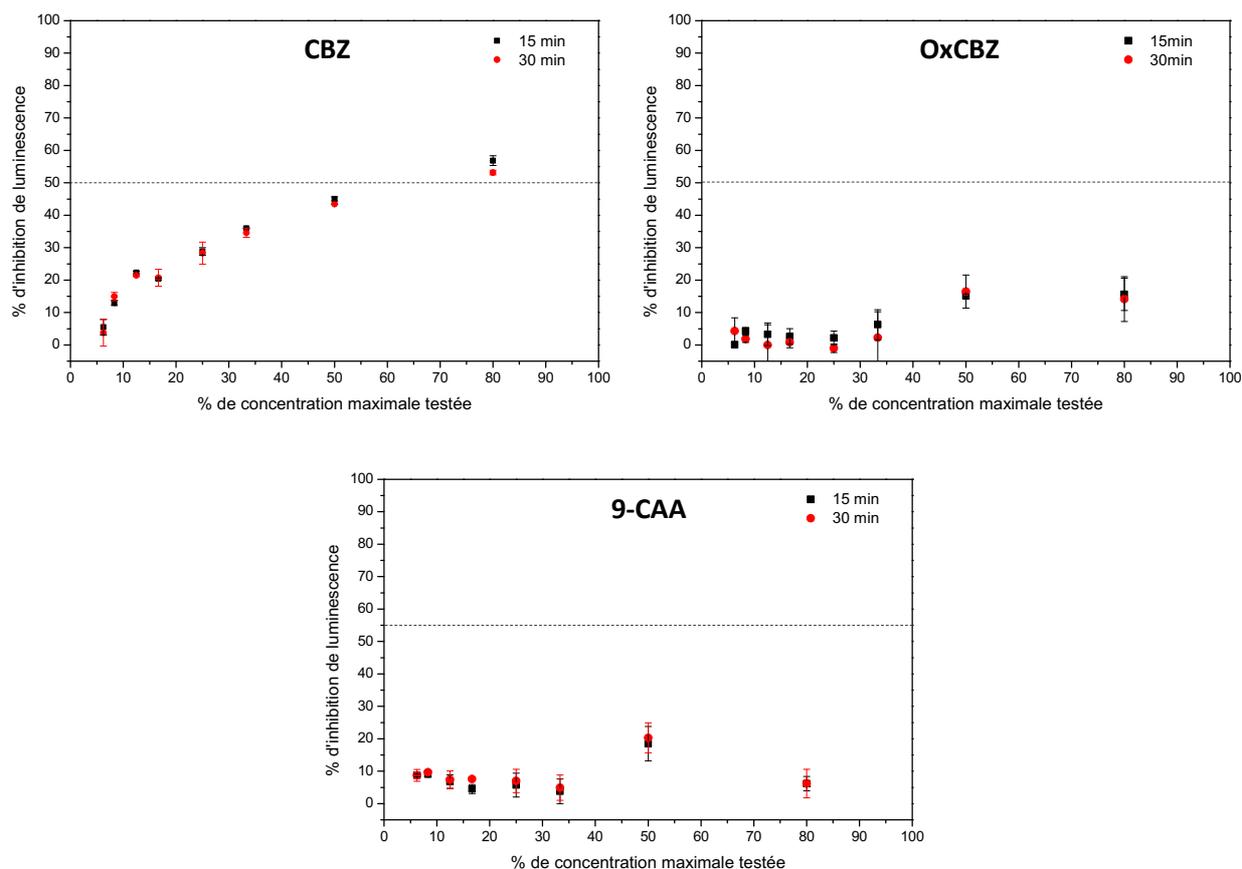


Figure 5-1 : Courbe dose-effet représentant le pourcentage d'inhibition de bioluminescence de *Vibrio fischeri* en fonction du pourcentage de concentration maximale testée pour CBZ, OxCBZ et 9-CAA

1.1.2 Détermination de l' EC_{50} de mélanges à faible dose

Pour rappel, le mélange de polluants a été réalisé sur la base des concentrations reportées dans l'article de Kaiser et al. (2014), afin de tester des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental. Ainsi pour OxCBZ, la concentration en sortie de STEU est de 29 $ng.L^{-1}$ et pour 9-CAA de 920 $ng.L^{-1}$. Pour CBZ, la concentration médiane a été évaluée à 500 $ng.L^{-1}$.

La réponse au mélange des trois composés aux concentrations environnementales montre qu'aucun effet cocktail sur la bactérie marine n'a pu être démontré aux concentrations testées. Il n'est pas possible d'estimer une EC_{50} pour ce mélange, probablement à cause d'une exposition trop courte aux polluants (figure 5-2). Soulignons que les concentrations testées en mélange sont inférieures d'environ 5 unités de Log_{10} à celles testées pour les composés considérés isolément. Un effet cocktail aurait peut-être été observé en se plaçant en mélange à des concentrations de la dizaine de $mg.L^{-1}$ mais, ce n'était pas l'objectif de cette étude.

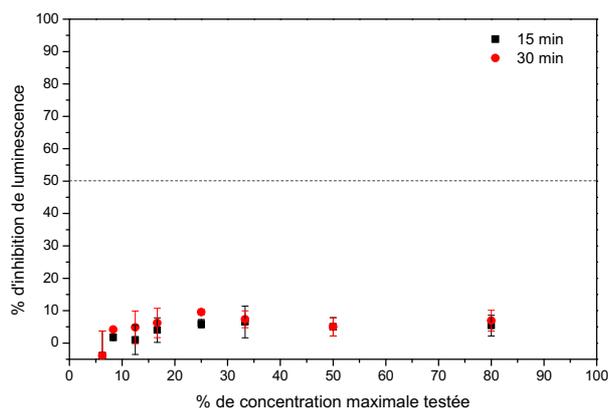


Figure 5-2 : Courbe dose-effet représentant le pourcentage d'inhibition de bioluminescence de *Vibrio fischeri* en fonction du pourcentage de concentration testée pour le mélange

1.2 Évaluation des potentielles modifications d'écotoxicité avant et après irradiation

Dans le cas d'un composé, l'écotoxicité a été étudiée avant et après 24 h d'irradiation dans une eau naturelle pour mettre en évidence une potentielle modification d'écotoxicité liés aux produits de transformations formés et décrits dans le chapitre 4.

1.2.1 Évaluation par utilisation du Screening test 81,9 %

Le screening test est réalisé sur deux types d'eau, une eau saumâtre (provenant de l'étang de Berre) et une eau douce (provenant de la rivière Arc). Supposant une faible toxicité des échantillons, le screening test à 81,9 % est choisi puisqu'il permet de tester la plus faible dilution de l'échantillon (soit 81,9 %).

Dans un premier temps, l'écotoxicité des eaux de l'Arc et de Berre a été mesurée sur les échantillons d'eaux non dopées avant et après 25 h d'irradiation et également concentré 10 fois, afin de mieux distinguer les effets s'ils existent. Dans le cas de l'Arc, les résultats ne montrent aucun effet sur *V. fischeri* indiquant que l'eau seule même irradiée et concentrée ne présente pas une écotoxicité pour cette espèce. Les mêmes expériences sont réalisées en ajoutant 5 mg.L⁻¹ de CBZ à l'eau de l'Arc. Après cela, l'écotoxicité est mesurée avant et après 25 h d'irradiation, sans et après concentration d'un facteur 10. L'EC₅₀ de CBZ ayant été évaluée ca. 60 mg.L⁻¹, prise isolément, le facteur de concentration par 10 devait permettre de mettre en évidence un effet dans les échantillons concentrés. Les résultats obtenus montrent effectivement une inhibition de la bioluminescence pour les échantillons concentrés avec 23,4 % d'effet pour l'eau de l'Arc dopée avec CBZ non irradiée et concentrée et 28,7 % d'effet pour l'eau de l'Arc dopée avec CBZ irradiée 25 h et concentrée. Cette différence assez faible

entre les valeurs ne permet pas d'affirmer qu'il existe une différence significative des effets provoqués par l'un ou l'autre des échantillons (irradié, non irradié).

Les mêmes expériences sont réalisées sur l'eau de l'étang de Berre avant et après 25 h d'irradiation ainsi que sur chaque échantillon concentré 10 fois. Pour l'eau de l'étang de Berre non concentrée, aucun effet d'inhibition de la bioluminescence n'est constaté que l'eau soit irradiée ou non. Cependant, l'eau de l'étang de Berre concentrée d'un facteur 10 provoque une réponse de *V. fischeri* en inhibant à 100 % la bioluminescence. En effet, en concentrant l'eau par évaporation, les sels sont également concentrés et ont un effet létal sur les bactéries. Les mêmes constatations sont faites avec ajout de CBZ. Les eaux non concentrées sont trop peu chargées en CBZ pour provoquer un effet, et les eaux reconcentrées sont trop chargées en sels ne permettant pas de conclure sur un effet écotoxique de la CBZ dans ce type d'eau.

Le screening test montre donc une réponse de *V. fischeri* lorsque les bactéries sont en contact avec les échantillons de CBZ dans l'Arc concentrés par un facteur 10 avant et après irradiation. Pour affiner nos résultats, le basic test 81,9 % a été réalisé.

1.2.2 Évaluation par utilisation du Basic test 81,9 %

Le basic test 81,9 % contenant une série de 8 dilutions est réalisé afin de distinguer les différences potentiellement liées à la disparition de CBZ et à la formation de produits de transformation dans les eaux de l'Arc.

La figure 5-3 montre la relation dose-effet du mélange Arc + CBZ à 5 mg.L⁻¹ concentré par 10 à t0 et après 25 h d'irradiation. Compte tenu d'un nombre de réplicas égal à 2 ou 3 selon l'expérience, aucun test statistique n'a pu être entrepris. Toutefois, on peut noter une tendance montrant une inhibition de bioluminescence plus élevée après irradiation (34,5 % d'effet contre 25,2 % avant irradiation). CBZ se dégradant seulement à hauteur de 5 % en 25 h, ceci laisse suspecter que cette augmentation d'écotoxicité peut être liée à la formation de produits de transformation, qui seraient, en ce cas, bien plus toxiques que CBZ.

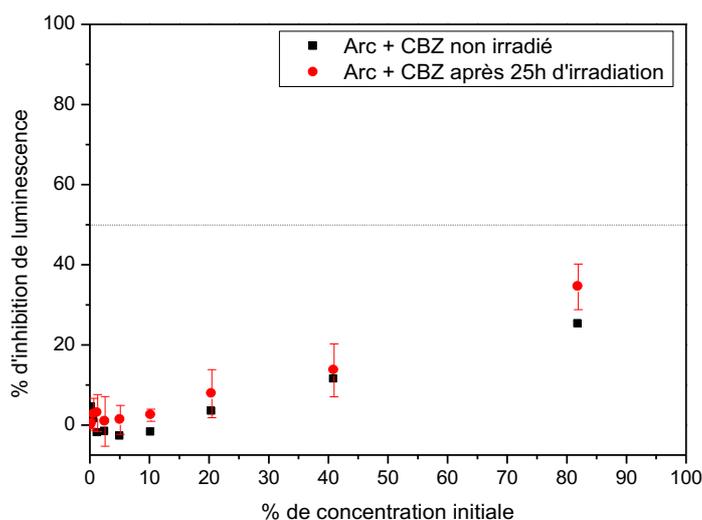


Figure 5-3 : Courbe dose-effet représentant le pourcentage d'inhibition de bioluminescence de *Vibrio fischeri* en fonction du pourcentage de concentration initiale testée pour l'eau de l'Arc dopée à 5 mg.L⁻¹ (concentrée par 10) et pour l'eau de l'Arc dopée à 5 mg.L⁻¹ après 25 h d'irradiation (concentrée par 10)

1.3 Discussion sur les résultats obtenus avec le bioessai sur *V. fischeri*

Dans le cadre de notre étude, la valeur de l'EC₅₀ obtenue pour CBZ est proche des concentrations trouvées dans la littérature en utilisant le même bioessai. Ainsi, Kim et al. (2007) ont mesuré une EC₅₀ de 52,5 et 52,2 mg.L⁻¹, après 5 et 15 min d'exposition respectivement, en suivant la méthode «Basic test 81,9 %». La solution mère de CBZ était préparée dans du DMSO mais seulement 0,5 % (v/v) était présent lors des expositions. Bien que les concentrations soient proches de celle que l'on a obtenues, ce résultat soulève tout de même un questionnement sur la réalité environnementale de résultats obtenus avec l'utilisation de solvants pour solubiliser les composés. Le recours à un tiers solvant permet une solubilisation plus grande des polluants, mais dans ce cas les concentrations testées ne représentent en aucun cas des concentrations environnementales. De plus, même si un faible pourcentage de DMSO est présent à la fois dans le témoin de comparaison et dans les échantillons, ces solvants ne sont pas retrouvés dans l'environnement et pourraient créer des effets synergiques avec les composés testés. De plus, Harada et al. (2008) ont suivi le protocole du « Microtox® Acute Toxicity Test » (le même que celui utilisé dans notre étude) sur une durée de 15 min et ont estimé une EC₅₀ de 28,3 mg.L⁻¹ pour CBZ. Ferrari et al. (2003) ont suivi la norme AFNOR T90-320-3 (1999) en exposant les bactéries pendant 30 min à CBZ. La gamme de concentrations testées pour CBZ a été préparée dans de l'eau ultrapure sans ajout de solvant. L'EC₅₀ obtenue était supérieure à 81 mg.L⁻¹ (concentration supérieure à la plus haute concentration testée). Les EC₅₀ mesurées sur CBZ

dans notre étude (58,5 et 64,4 mg.L⁻¹ après 15 et 30 min, respectivement) sont donc du même ordre de grandeur que celles répertoriées dans la littérature pour les mêmes conditions.

Dans l'étude de Kaiser et al. (2014), la toxicité de CBZ, de OxCBZ et de 9-CAA a été étudiée sur *V. fischeri* mais en suivant une méthode semi-quantitative non normalisée. La méthode consistait en un dépôt des composés en différentes quantités sur des plaques de chromatographie sur couche mince et d'immerger cette plaque dans un bain de bactéries bioluminescentes afin d'observer, avec un lecteur de plaque, la luminescence pour chaque concentration testée. Les résultats ont montré une LOEC (concentration minimale avec effet observé) pour CBZ de 100 ng.L⁻¹, et pour OxCBZ et 9-CAA, de 50 ng.L⁻¹. Cette méthode est moins précise (semi-quantitative) mais elle présente l'avantage de rendre possible la mesure d'un effet à bien plus faible concentration et vient confirmer, comme dans notre cas (EC₅₀ = 64,4 mg.L⁻¹ pour CBZ contre 45,5 mg.L⁻¹ pour OxCBZ), une écotoxicité plus grande de OxCBZ par rapport à CBZ.

Dans notre étude, le mélange des trois composés aux concentrations environnementales n'a pas provoqué d'effet écotoxicologique mesurable sur la bactérie marine. L'hypothèse d'un effet cocktail n'a pu être confirmée. Ceci peut être dû à une exposition trop courte et également à un manque de sensibilité de l'espèce cible dans nos conditions et à ce type de composés, puisque les concentrations testées en mélange étaient notablement inférieures aux EC₅₀ déterminées pour les composés seuls.

De plus, les courbes doses réponses obtenues avant et après irradiation sur *Vibrio fischeri*, ont tendance à montrer une toxicité plus grande après irradiation, potentiellement liée à des produits de transformation qui pourraient être bien plus toxiques (34,5 % d'effet après 30 min d'exposition contre 25,2 % avant irradiation). Pour rappel, dans le chapitre 4, les principaux produits de transformations de CBZ identifiés, étaient l'acridine et l'acridone à des concentrations respectives de 47 et 2,1 µg.L⁻¹. Certaines études se sont d'ailleurs intéressées à la toxicité de ces polluants et ont montré un effet cancérigène ainsi qu'une réponse plus toxique que celle de CBZ (Parkhurst et al., 1981; Wiegman et al., 2002) expliquant potentiellement nos résultats après irradiation.

2. Évaluation de l'écotoxicité pour une durée d'exposition chronique

Deux espèces (végétale et animale) ont été sélectionnées afin de mettre au point des protocoles pour évaluer l'écotoxicité sur une durée d'exposition chronique des 3 composés avec l'objectif de pouvoir évaluer l'effet de faibles concentrations.

2.1 Mise au point de biomarqueurs précoces pour l'évaluation d'une écotoxicité chez *Lemna minor* L.

Chez la lentille d'eau, *Lemna minor*, trois indices ont été suivis : celui des chlorophylles, métabolites primaires, celui des composés phénoliques, métabolites secondaires et enfin un rapport azote sur carbone, représentatif de la disponibilité des ressources dans la plante. Chaque indice est suivi pendant 17 jours d'exposition de l'espèce *Lemna minor* aux polluants seuls : CBZ, OxCBZ, 9-CAA et au mélange. Pour chaque composé pris individuellement, 3 niveaux de concentrations différents ont été testés : ng.L^{-1} , $\mu\text{g.L}^{-1}$ et mg.L^{-1} tandis que le mélange des 3 composés a été considéré à la plus faible concentration, c'est-à-dire de l'ordre du ng.L^{-1} pour évaluer un potentiel effet cocktail aux doses environnementales. Les concentrations exactes sont données dans le tableau 2-7 du chapitre 2.

2.1.1 Indice de chlorophylles

La figure 5-4 représente l'indice des chlorophylles pour chaque composé testé individuellement à chaque concentration ainsi que pour le mélange des 3 à la plus faible concentration.

Aucun effet n'est observé au cours du temps sur la teneur en chlorophylles chez *L. minor* exposée aux différentes concentrations de CBZ.

Cependant, des différences sont visibles pour les autres composés. Lorsque les lentilles d'eau sont en contact avec OxCBZ, on peut noter que celles exposées à la plus faible concentration (ng.L^{-1}) ont une teneur en chlorophylle constamment supérieure au témoin au long de l'expérience, ce qui peut laisser penser à un effet stimulateur. Aux concentrations de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$ et mg.L^{-1} , les teneurs en chlorophylles sont également significativement supérieures au témoin mais sur des durées d'exposition plus courtes (à J2, J3 et J11 pour le $\mu\text{g.L}^{-1}$, et à J1 et J14 pour le mg.L^{-1}). De manière générale, chaque concentration testée provoque un effet, mais la plus faible (ng.L^{-1}) donne un indice de chlorophylles plus important qu'aux deux autres concentrations ($\mu\text{g.L}^{-1}$ et mg.L^{-1}) de manière récurrente. De plus, les mesures effectuées sur les lentilles exposées au $\mu\text{g.L}^{-1}$ sont très fluctuantes d'un jour à l'autre.

Pour les expositions des lentilles d'eau au 9-CAA, aucune différence significative entre les 3 concentrations testées et le témoin ne sont observées, excepté à J7 et J17 où l'indice de chlorophylles est significativement inférieur en présence de $\mu\text{g.L}^{-1}$ de 9-CAA par rapport au témoin. Par contre, de façon récurrente à J1, J2, J4, J5, J6, J7, J9 et J14, l'apport de 9-CAA au $\mu\text{g.L}^{-1}$ réduit significativement l'indice de chlorophylles comparé à ceux obtenus au mg.L^{-1} alors qu'à J3 et J11, il n'y a pas de différence significative entre les trois concentrations testées.

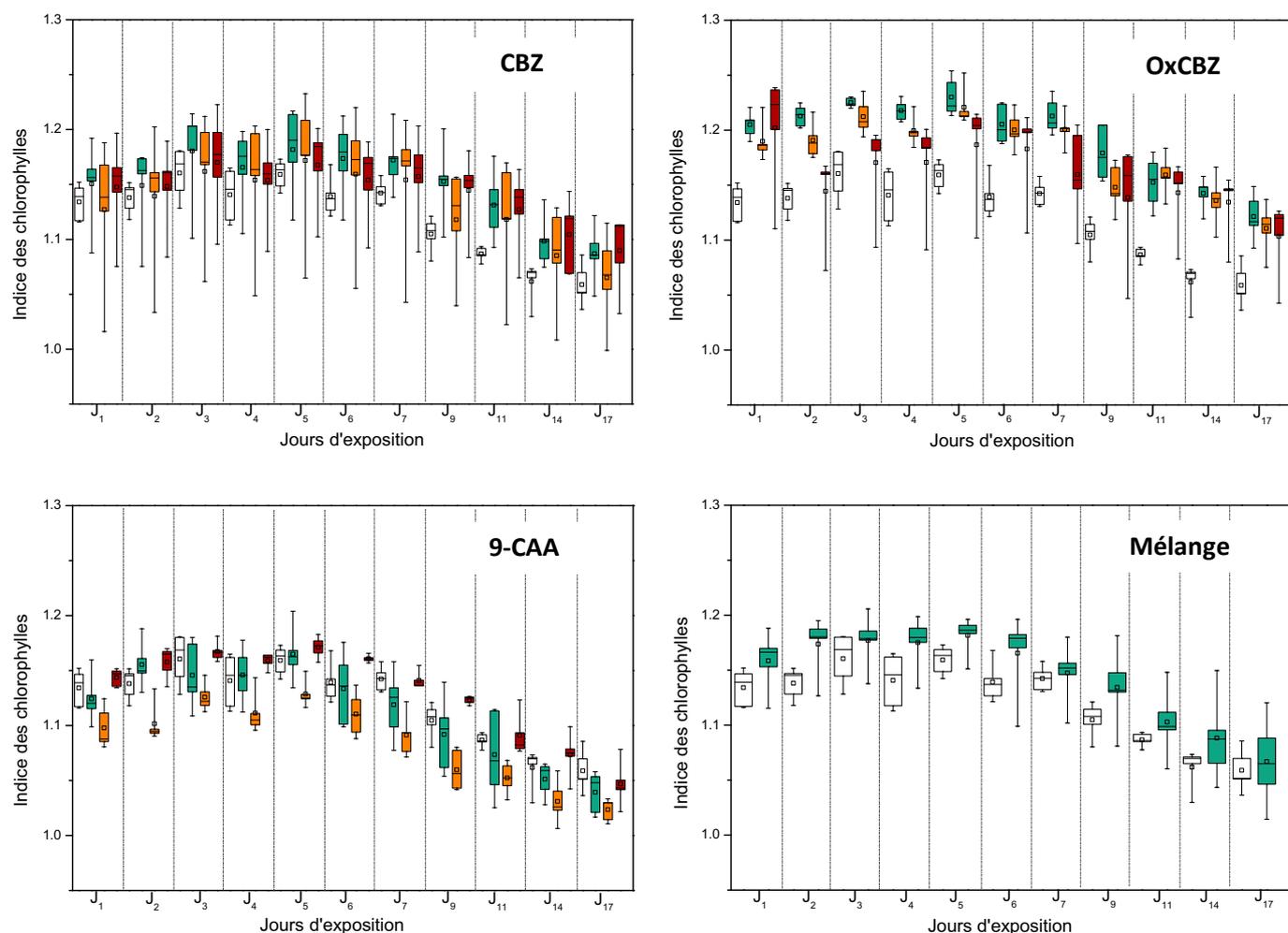


Figure 5-4 : Boîtes à moustaches représentant l'indice de chlorophylle mesuré au Multiplex[®] pendant 17 jours chez les lentilles d'eau *Lemna minor* après contact avec le témoin (en blanc), CBZ, OxCBZ, 9-CAA au ng.L⁻¹ (vert), µg.L⁻¹ (orange) et mg.L⁻¹ (rouge) et le mélange à faible dose (ng.L⁻¹).

Enfin, le mélange des 3 composés au ng.L⁻¹ ne semble pas impacter durablement l'indice de chlorophylles chez les lentilles d'eau. On note cependant une augmentation de cet indice à J4 et J5 en présence du mélange.

2.1.2 Indice des composés phénoliques

La figure 5-5 représente l'indice des composés phénoliques pour chaque composé pharmaceutique testé individuellement à chaque concentration ainsi que pour le mélange des 3 à la plus faible concentration.

Aucune différence significative n'est observée entre chaque concentration de CBZ par rapport au témoin hormis à J6 où la concentration en CBZ au µg.L⁻¹ induit une valeur de l'indice de composés

phénoliques plus faible que celle du témoin. De plus, le 1^{er} jour d'exposition, une augmentation significative de l'indice des composés phénoliques est observée entre CBZ au $\mu\text{g.L}^{-1}$ et mg.L^{-1} par rapport au ng.L^{-1} mais, cette tendance n'est pas confirmée les autres jours en raison de grosses fluctuations dans les valeurs obtenues, comme le montre les valeurs minimales et maximales des boîtes à moustache.

Lors de l'exposition des lentilles d'eau aux différentes concentrations en OxCBZ, aucune différence n'est observée par rapport au témoin à J1, J2, J3, J5, J6, J11, J14 et J17. On note toutefois une diminution de l'indice des composés phénoliques pour les lentilles d'eau en contact avec OxCBZ au mg.L^{-1} par rapport au témoin à J4 mais une augmentation de cet indice chez les lentilles d'eau exposées au mg.L^{-1} à J7 et J9 par rapport au témoin. De plus, les expositions au mg.L^{-1} entraînent également une augmentation de l'indice des composés phénoliques par rapport au ng.L^{-1} à J2, J4, J6, J11 et J14 et par rapport au $\mu\text{g.L}^{-1}$ à J17.

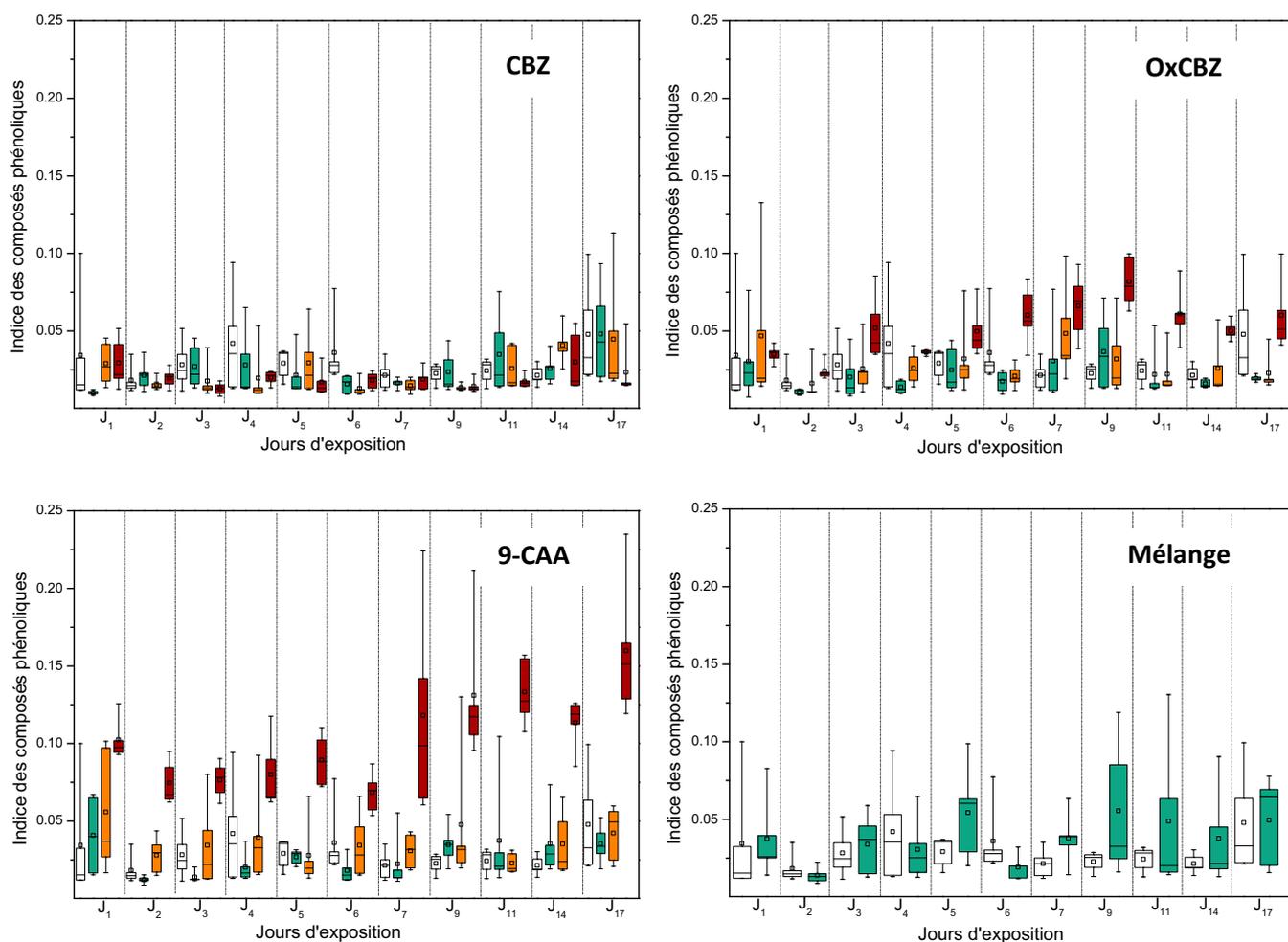


Figure 5-5 : Boîtes à moustaches représentant l'indice phénolique mesuré au multiplex pendant 17 jours chez les lentilles d'eau *Lemna minor* après contact avec le témoin (en blanc), CBZ, OxCBZ, 9-CAA au ng.L^{-1} (vert), $\mu\text{g.L}^{-1}$ (orange) et mg.L^{-1} (rouge) et le mélange à faible dose (ng.L^{-1}).

Pour 9-CAA, aucune différence significative n'est observée entre les plus faibles concentrations au ng.L^{-1} et $\mu\text{g.L}^{-1}$ par rapport au témoin. À l'inverse la plus forte concentration entraîne un indice des composés phénoliques plus élevé par rapport au témoin tous les jours sauf à J3, J4, J5 et J6. Des différences sont également observées entre les concentrations puisque l'exposition au mg.L^{-1} augmente l'indice des composés phénoliques par rapport au ng.L^{-1} à J2, J3, J4, J6 et J7 et par rapport au $\mu\text{g.L}^{-1}$ à J5 et J11.

Le mélange des 3 composés au ng.L^{-1} ne semble pas avoir d'effet significatif sur les composés phénoliques, écartant toute possibilité d'effet additif, mais il en est de même pour les composés seuls au ng.L^{-1} .

2.1.3 Rapport azote/carbone (N/C)

La figure 5-6 représente le rapport N/C (c'est-à-dire le rapport des métabolites azotés sur ceux carbonés) pour chaque composé testé individuellement à chaque concentration ainsi que pour le mélange des 3 à la plus faible concentration.

Aucun effet n'est observé au cours du temps sur l'espèce *L. minor* exposée aux différentes concentrations de CBZ hormis à J14 où le rapport N/C à la plus forte concentration testée (60 mg.L^{-1}) est significativement plus élevé par rapport au témoin.

Lorsque les lentilles d'eau sont en contact avec quelques ng.L^{-1} de OxCBZ, on peut noter que le rapport N/C est plus élevé par rapport au témoin tout au long de l'exposition sauf en fin d'expérience c'est-à-dire à J11 et J17. À l'inverse, le rapport N/C des lentilles en contact avec une concentration au $\mu\text{g.L}^{-1}$ de OxCBZ est plus élevé au début de l'exposition par rapport au témoin (J4, J5, J6, J7). Enfin, la plus forte concentration testée (mg.L^{-1}) entraîne une augmentation du rapport N/C à J9, J11, J14 et J17 par rapport au témoin. Ces résultats montrent une augmentation du pool de composés azotés par rapport au pool de composés carbonés lorsque *L. minor* est en contact avec OxCBZ. Également, entre chaque concentration testée des différences sont constatées, avec une élévation du rapport N/C au ng.L^{-1} par rapport au mg.L^{-1} à J2, J3 et J4 et au $\mu\text{g.L}^{-1}$ par rapport au mg.L^{-1} à J4.

Pour les expositions des lentilles d'eau à 9-CAA, aucune différence significative entre les 3 concentrations testées et le témoin n'est observée, excepté à J3. Cependant, des différences significatives sont à noter puisque les effets liés à l'exposition de 9-CAA semblent augmenter au cours du temps. Le rapport N/C est significativement plus élevé au ng.L^{-1} par rapport au témoin à J2, J5, J9, J11, J14 et J17. Ce rapport est également plus élevé lors d'une exposition au mg.L^{-1} par rapport au témoin à J4, J5, J6, J9, J11, J14 et J17 tandis qu'aucune différence n'est observée entre le $\mu\text{g.L}^{-1}$ et le témoin. On constate également des différences entre les concentrations testées, avec une

augmentation du rapport N/C pour la concentration au mg.L^{-1} par rapport au $\mu\text{g.L}^{-1}$ à J1 et J7 et entre le ng.L^{-1} et le $\mu\text{g.L}^{-1}$ à J2. L'effet du mg.L^{-1} semble plus important.

Le rapport N/C du mélange des 3 composés au ng.L^{-1} , est toujours significativement supérieur à celui du témoin dès le premier jour d'exposition. L'écotoxicité est donc plus élevée lorsque les 3 composés sont combinés, indiquant un effet cocktail. En comparant les effets obtenus entre le mélange et chaque substance seule à la même concentration que dans le mélange, il s'avère que les effets remarquables ne sont ni synergiques, ni additifs. En effet, les effets du mélange sur le rapport azote sur carbone chez les lentilles d'eau sont plus faibles que la somme des effets de chaque composé. Il s'agirait donc d'un effet infra-additif ou antagoniste.

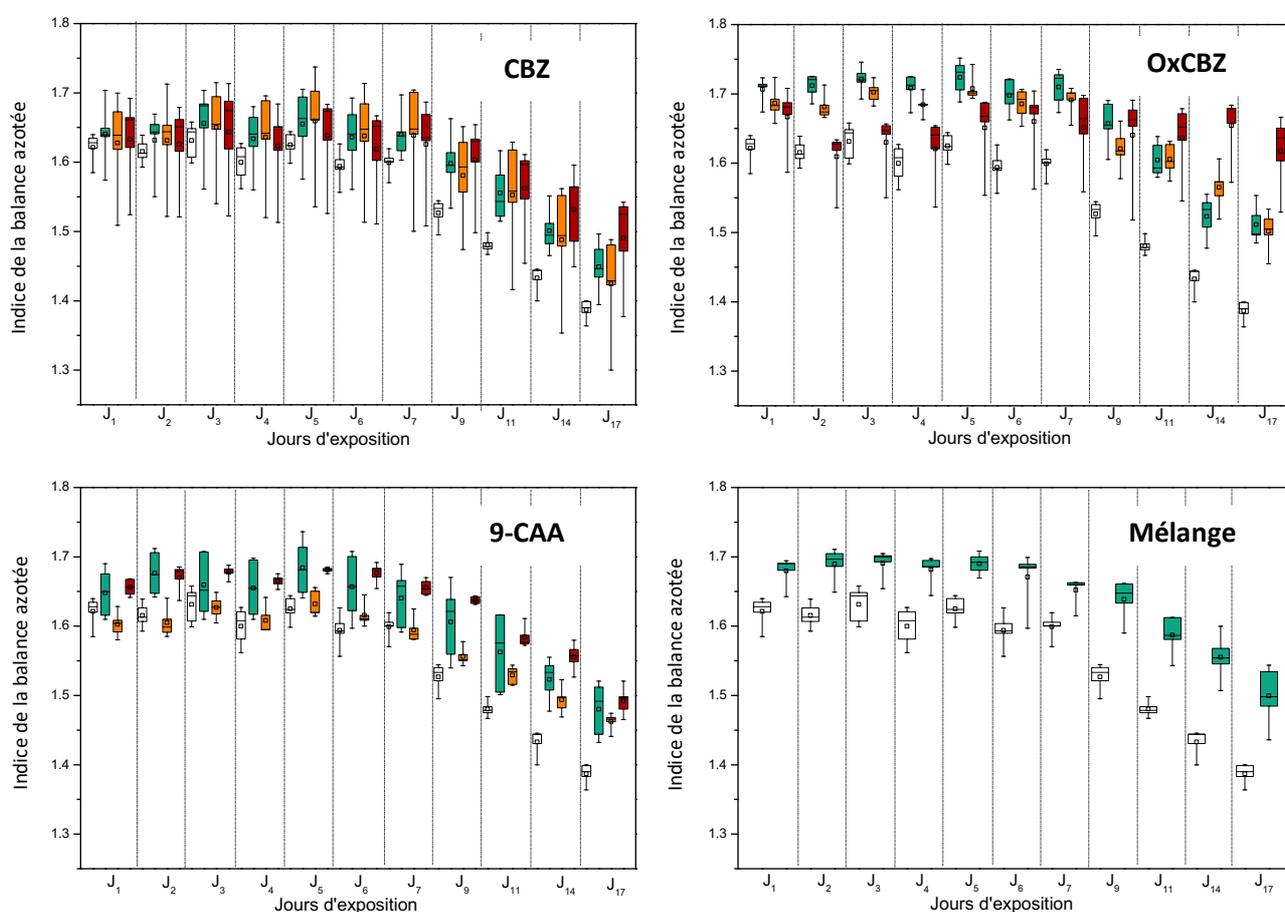


Figure 5-6 : Boîtes à moustaches représentant la balance azotée mesurée au multiplex pendant 17 jours chez les lentilles d'eau *Lemna minor* après contact avec le témoin (en blanc), CBZ, OxCBZ, 9-CAA au ng.L^{-1} (vert), $\mu\text{g.L}^{-1}$ (orange) et mg.L^{-1} (rouge) et le mélange à faible dose (ng.L^{-1}).

2.1.4 Discussion sur les résultats obtenus chez *L. minor*

Une des rares études qui a pu être recensée sur l'écotoxicité de CBZ sur *L. minor* est celle de Cleuvers en 2003. Dans cette étude, la croissance de la population de *L. minor* était suivie et une EC₅₀ a été déterminée à 25,5 mg.L⁻¹ pour CBZ.

En 2015, Fekete-Kertész et al. (2015) ont eu l'idée de suivre la concentration en chlorophylles chez *L. minor* exposée à différents composés chimiques de synthèse dont certains produits pharmaceutiques. Leur approche était destructive car ils ont récolté les lentilles d'eau après 7 jours d'exposition et ont réalisé des dosages par spectrophotométrie à partir d'extraits. Ils ont montré que la réponse des lentilles d'eau varie en fonction des composés chimiques testés avec une plus grande sensibilité pour les pesticides et une moindre sensibilité pour les produits pharmaceutiques (diclofénac). Dans notre cas, l'utilisation d'un appareil de mesure non destructif de la fluorescence émise par les phytométabolites a permis de mettre en avant des effets précoces sur le métabolisme de *L. minor* dès les plus faibles concentrations. Cependant, la grande variabilité des réponses entre réplicas et au cours du temps ne permet pas de faire ressortir un effet tranché.

Pour mieux comprendre les effets de ces composés sur cette espèce végétale, la littérature sur la phytoépuration, dans laquelle l'espèce *L. minor* est largement utilisée, peut apporter des précisions. En effet, des études ont utilisé les lentilles d'eau pour traiter divers effluents. Ainsi, Farrell (2012) montre que CBZ n'est pas éliminé, ni absorbé par les lentilles d'eau tandis que d'autres produits comme l'acétaminophène, la progestérone ou la fluoxétine sont éliminés à plus de 90 % donc métabolisés. Une autre étude a montré à l'inverse que CBZ pouvait s'accumuler dans cette plante à hauteur de $23,8 \pm 7,37$ ng.g⁻¹ de matière fraîche (Woodard, 2013). Cependant, des recherches plus poussées paraissent nécessaires vu le nombre restreint d'études sur les effets de CBZ sur cette espèce végétale et leurs résultats discordants.

Des études en laboratoire sur *L. minor* ont montré des abattements en ibuprofène conséquents de 40 à 99 % après des durées d'incubation de 15 à 40 jours (Matamoros et al., 2012; Reinhold et al., 2010). Matamoros et al. (2012) fait l'hypothèse que la différence de résultats entre les 2 études pourraient être due d'une part à des concentrations initiales en ibuprofène différentes (300 et 10 µg.L⁻¹) mais également à une différence de densité de la biomasse végétale (20 et 2 g de masse de matière fraîche.L⁻¹). Ainsi la densité de culture pourrait modifier la réponse à une exposition à un composé dans le milieu. Dans nos expériences, nous avons pris la précaution de peser une masse de matière fraîche de lentilles d'eau identique pour tous les réplicas de toutes les conditions de façon à

couvrir à confluence la surface en eau de la verrerie utilisée et avoir la meilleure reproductibilité possible entre réplicas.

Une autre réflexion peut être faite sur la réponse elle-même des lentilles d'eau au cours du cycle jour/nuit imposé par les conditions de culture. En effet, des travaux sur une autre espèce de lentilles d'eau ont mis en évidence un photopériodisme chez cette espèce dépendant de son horloge circadienne (Hillman, 1970). Certains xénobiotiques peuvent également engendrer un décalage de phase du rythme circadien comme démontré chez *Lemna gibba* qui par conséquent modifie les flux de potassium (Kondo, 1989). Il est admis que la synthèse de composés phénoliques chez les plantes est contrôlée par le rythme circadien par notamment son effet sur la régulation de l'expression de certains gènes (Lattanzio, 2013) ce qui a pour conséquence un effet régulateur des voies de biosynthèse via les enzymes clefs de ces voies. Selon Cheynier et al. (2013), les composés phénoliques jouent un rôle prépondérant dans la réponse aux stress des plantes. La variabilité des réponses obtenues chez *L. minor* dans nos travaux peut correspondre à des réponses multiples au niveau de la voie des phénylpropanoïdes aboutissant à l'absence d'un signal clair en lien avec l'apport de CBZ, de sous-produits ou de leur mélange car les indices regroupent un ensemble de composés phénoliques dont des flavonols et des anthocyanes. Ainsi ces groupes de métabolites ne peuvent pas être utilisés comme biomarqueurs précoces des effets de ces produits pharmaceutiques. Il serait alors peut-être plus pertinent de se focaliser sur un métabolite en particulier pour éviter des réponses antagonistes. La proline, par exemple, a été identifiée comme un bon indicateur chez *L. gibba* (Megateli et al., 2009) et *L. minor* (Bassi et Sharma, 1993) lors d'exposition à des métaux lourds. Cependant, il apparaît que l'exposition aux composés pharmaceutiques ne génère pas de réaction d'oxydation ou de stress osmotique et donc n'implique pas de réponse coordonnée impliquant la proline. Il est donc nécessaire de rechercher plus finement chez *L. minor* la présence d'une altération métabolique corrélée à l'exposition à des composés pharmaceutiques.

2.2 Mise au point de bioessais multi-réponses chez *Hydra circumcincta*

Pour pouvoir mettre au point des outils d'indication en utilisant l'hydre d'eau douce, *H. circumcincta*, nous avons sélectionné un panel de réponses biologiques multi-échelles : modifications morphologiques, impact sur la reproduction asexuée, comportement alimentaire, variations de deux paramètres de la balance oxydative et distribution de deux neuromodulateurs. Seules les concentrations de l'ordre du ng.L^{-1} ont été testées dans cette partie pour chacun des composé étudié mais aussi pour le mélange. Ces concentrations sont données dans le tableau 2-8 du chapitre 2.

2.2.1 Analyse morphologique

Les différents stades morphologiques de *H. circumcincta* au cours des expositions aux polluants et à leur mélange ont été étudiés à deux températures : 19,5°C et 23°C. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 5-7A et 5-7B. La nomenclature utilisée pour les différents stades morphologiques est explicitée dans le chapitre 2 (section 6.2.2.3), pour mémoire les hydres ne présentant aucun signe d'intoxication sont au stade *a* et les autres stades *b*, *c*, *d*, *e* et *f* traduisent une intoxication progressive.

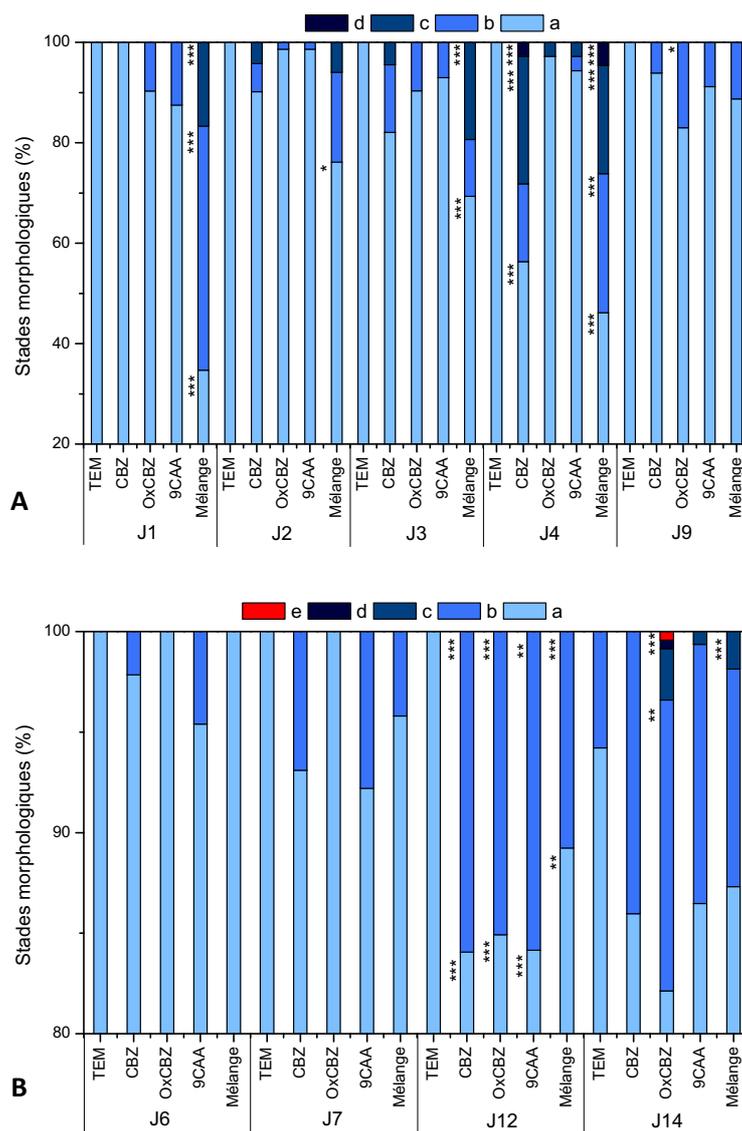


Figure 5-7 : Histogrammes cumulés des stades morphologiques (*a* : pas d'intoxication et *b*, *c*, *d*, *e* : signes d'une intoxication croissante) observés chez *Hydra circumcincta* en conditions contrôles (TEM) et exposées à CBZ, OxCBZ, 9-CAA et leur mélange à **A)** 19,5°C et **B)** 23°C.

(* : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$ significativement différent du témoin au jour correspondant par type de stade indiqué par le code couleur). Afin de permettre une meilleure lisibilité du graphique, les écarts-types et les jours ne présentant pas de différence significative par rapport au témoin n'ont pas été représentés.

Pour chaque température, aucun signe d'intoxication n'est observé chez les hydres témoins puisque seuls des stades *a* sont recensés hormis quelques stades *b* chez les hydres maintenues 14 jours à 23°C. Cependant, les résultats semblent montrer qu'une augmentation de la température de 3,5°C n'a pas d'effet significatif sur la morphologie des hydres témoins sur la période étudiée.

A 19,5°C, température optimale de croissance des hydres, des changements morphologiques significatifs apparaissent dès le premier jour d'exposition au mélange. En effet, seuls 34,7 % des polypes exposés présentent une morphologie normale (stade *a*), tandis que les stades *b* et *c* représentent respectivement 48,6 et 16,7 % (figure 5-7A). Ces changements morphologiques significatifs sont encore observables à J2, J3 et J4 chez les polypes exposés au mélange. A J4, des stades *d* sont également observés dans la population exposée au mélange (4,6 %) et à CBZ (2,8 %), tandis que les stades *a* représentent respectivement 46,2 et 56,3 %. Du jour 5 au jour 8, tous les polypes présentent une morphologie normale. Puis, au jour 9, certains polypes exposés à CBZ, OxCBZ, 9-CAA et au mélange présentent des stades *b*. Cependant à J9, seuls les polypes en contact avec OxCBZ montrent un nombre significativement plus important de stade *b* (17,6 %). Enfin, du jour 10 jusqu'à la fin des deux semaines d'exposition, un retour à la normale est observé : aucun des polypes exposés ne présente de signes d'altération morphologique.

A 23°C, température supra-optimale de croissance des hydres, l'étude des stades morphologiques montre un schéma de distribution très différent de celui observé à 19,5°C. En effet, jusqu'au 12^{ème} jour d'exposition, aucune différence significative par rapport au témoin n'est observée. Cependant à J12, le nombre de stades *b* est significativement plus élevé pour toutes les conditions d'exposition par rapport au témoin et représente entre 10,8 et 15,9 % de la population exposée (Figure 5-7B). À la fin des deux semaines d'exposition, les stades *b* sont encore présents dans les mêmes proportions, mais des stades *b* sont aussi observés chez les hydres témoins. De plus, à J14, des stades *c* apparaissent chez les polypes exposés à OxCBZ et au mélange, avec des différences significatives par rapport au témoin pour les deux dernières conditions.

2.2.2 Taux de reproduction, taux de bourgeonnement et comportement alimentaire

Les figures 5-8 et 5-9 présentent l'évolution des taux de reproduction et de bourgeonnement au cours du temps chez *H. circumcincta* à 19,5 et 23°C, pour les différentes expositions aux contaminants.

À 19,5°C, une diminution significative du taux de reproduction (RHR) est observée chez les polypes exposés à CBZ à partir du 9^{ème} jour (figure 5-8A). De plus, une diminution significative est également observée chez les polypes exposés au mélange à partir de J12 (figure 5-8A).

A 23°C, le même type de diminution significative du RHR est observée à partir de J12 chez les polypes exposés au mélange mais aussi chez ceux exposés à CBZ et OxCBZ (figure 5-8B).

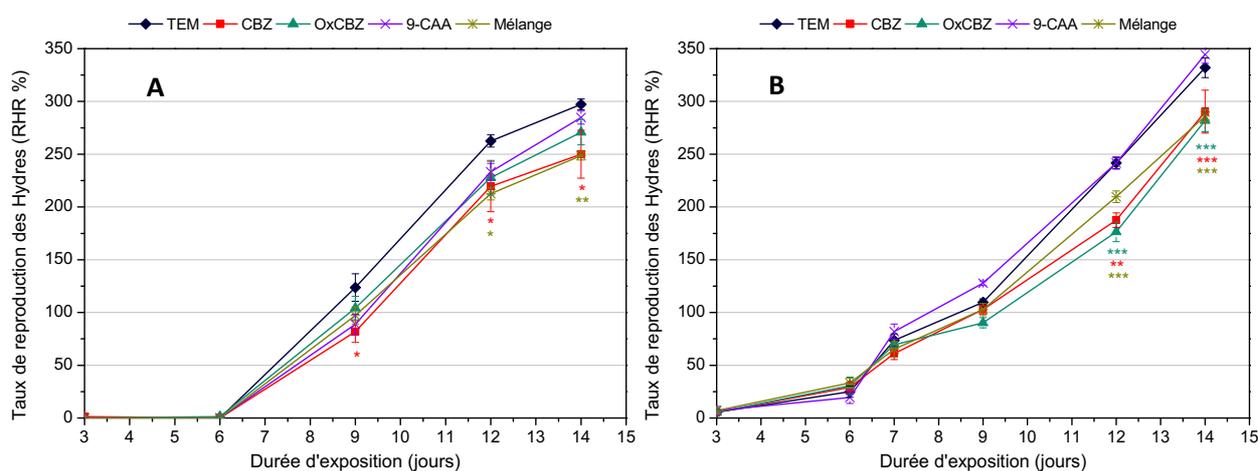


Figure 5-8 : Taux de reproduction (RHR) chez *Hydra circumcincta* en exposées au témoin (TEM) et exposées à CBZ, OxCBZ, 9-CAA et leur mélange pendant 14 jours à **A)** 19,5°C et **B)** 23°C.

(* : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$ significativement différent du témoin au jour correspondant).

Concernant les taux de bourgeonnement (Ktot), une diminution significative est observée à 19,5°C chez les polypes exposés à CBZ à J6 et au mélange à J6 et à J9 (figure 5-9A). A 23°C, le Ktot est significativement plus bas à partir du 9^{ème} jour d'exposition à CBZ et OxCBZ ainsi qu'à J7, J12 et J14 pour les polypes exposés au mélange (Figure 5-9B). De plus, un effet significatif de la température sur Ktot est observé à J3 ($F_{9,59} = 9,839$, $P < 0,0001$) : les valeurs Ktot de chaque groupe de polypes exposés à 23°C sont significativement supérieures à celles obtenues à 19,5°C (la moyenne de Ktot est de 0,006 à 19,5°C et de 0,066 à 23°C) (figures 5-9A et B). A la fin de l'exposition, à J14, un effet significatif de la température est observé sur le taux de bourgeonnement : les valeurs Ktot obtenues à 23°C sont inférieures à celles obtenues à 19,5°C ($F_{1,1} = 77,002$, $P < 0,0001$), et aussi un effet significatif des produits pharmaceutiques ($F_{1,4} = 9,415$, $P < 0,0001$).

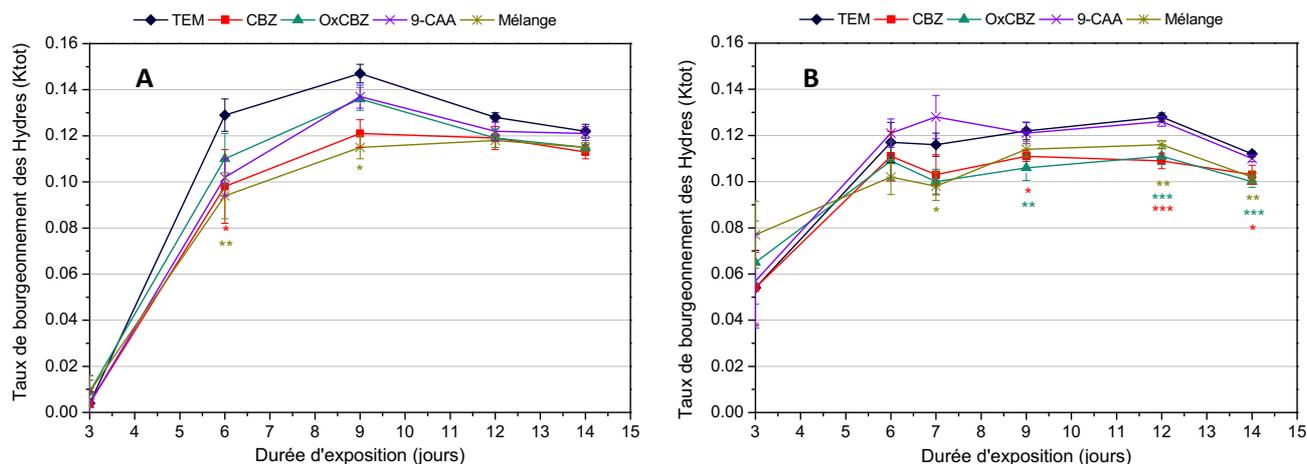


Figure 5-9 : Taux de bourgeonnement (Ktot) chez *Hydra circumcincta* exposées au témoin (TEM), à CBZ, OxCBZ, 9-CAA et leur mélange pendant 14 jours à **A)** 19,5°C et **B)** 23°C.

(* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$ significativement différent du témoin au jour correspondant).

Enfin, les polypes exposés aux polluants à 19,5°C ou 23°C n'ont pas modifié leur comportement alimentaire pendant l'exposition de 2 semaines, car tous les polypes, quel que soit leur stade morphologique, étaient encore capables de capturer et d'ingérer leurs proies.

2.2.3 Mesure du stress oxydant

À 19,5°C et après 2 semaines d'exposition, l'ANOVA bidimensionnelle montre une différence significative globale pour la capacité antioxydante totale (AOC). En effet, cette exposition induit une augmentation significative (d'un facteur 2,4 au maximum) de l'AOC par rapport aux témoins (figure 5-10A). Concernant la peroxydation lipidique (LPO), l'ANOVA bidimensionnelle montre une différence significative globale à 19,5°C entre les différentes conditions (figure 5-10B). En effet, la LPO est significativement plus élevée chez les polypes exposés à CBZ et au 9-CAA que chez les témoins et à l'inverse, plus faible chez ceux exposés au mélange. Aucune différence significative n'est observée chez les polypes exposés à OxCBZ.

À 23°C, aucune différence significative dans les valeurs de AOC n'est observée entre le groupe témoin et les polypes exposés aux différents polluants (figure 5-10A). Cependant, on constate une augmentation significative du taux de LPO (figure 5-10B) à 23°C chez les polypes exposés à CBZ et au 9-CAA et, à l'inverse, une diminution significative chez les polypes exposés à OxCBZ par rapport au groupe témoin.

De plus, les données obtenues montrent un effet significatif de la température puisque des différences sont également observées chez les hydres témoins ($F_{1,4} = 540,55$, $P < 0,0001$ pour AOC et $F_{1,4} = 124,55$, $P < 0,0001$ pour LPO). En effet, les taux mesurés sont significativement plus faibles pour

la capacité antioxydante des hydres témoins à 23°C par rapport à 19,5°C, alors que le taux de peroxydation lipidique est significativement plus important à 23°C qu'à 19,5°C. Ces variations significatives sont également constatées chez les polypes exposés aux produits pharmaceutiques puisqu'à 23°C les valeurs de AOC sont plus basses que celles à 19,5°C et, à l'inverse, concernant LPO, les polypes exposés à 23°C ont des valeurs de LPO plus élevées (figure 5-10), à l'exception de ceux exposés à OxCBZ.

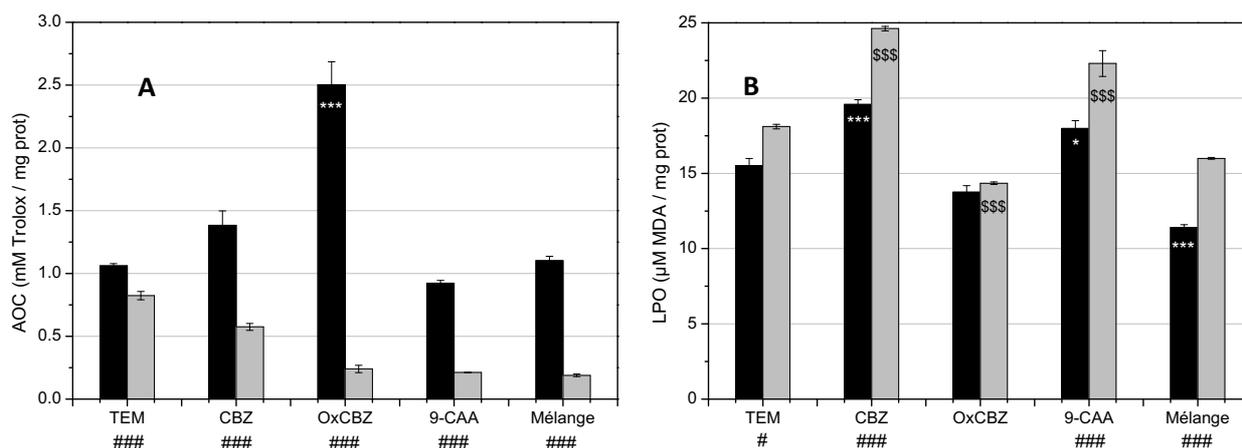


Figure 5-10 : Capacité antioxydante totale (AOC exprimée en mM de Trolox par mg de protéines) **(A)** et peroxydation lipidique (LPO exprimée en µM MDA/mg de protéines) **(B)** chez *Hydra circumcincta* en conditions contrôles (TEM) et après exposition à CBZ, OxCBZ, 9-CAA et leur mélange pendant 14 jours à 19,5°C (noir) et 23°C (gris).

(* : $P < 0.05$; *** : $P < 0.001$ significativement différent du témoin à 19,5°C ; \$\$\$: $P < 0.001$ significativement différent du témoin à 23°C ; # : $P < 0,05$; ### : $P < 0,001$ significativement différent entre 19,5°C et 23°C).

2.2.4 Distribution des neuromodulateurs

À la fin de l'exposition de 14 jours à de faibles doses de produits pharmaceutiques, certains changements dans la distribution de la localisation de la dopamine (DA) et de la sérotonine (5-HT) chez *H. circumcincta* sont observés. Tous les résultats sont résumés dans le tableau 5-1 et une partie des clichés ayant permis sa réalisation est présentée en annexes 4 et 5.

Tableau 5-1 : Estimation de l'intensité de l'immunomarquage de la dopamine et de la sérotonine chez *Hydra circumcincta* après 14 jours d'exposition aux produits à 19,5°C et 23°C.

Condition	Région du corps	Dopamine (DA)		Sérotonine (5-HT)	
		19,5°C	23°C	19,5°C	23°C
Témoin	Tentacule	++++	+	+++	++
	Hypostome	+++	++	+++	++
	Région gastrique	+++	++	++++	++
CBZ (605 ng.L ⁻¹)	Tentacule	++++	+	+++	+
	Hypostome	ND	+++	+++	+++
	Région gastrique	++	++	++++	++
OxCBZ (27 ng.L ⁻¹)	Tentacule	ND	+/-	+++	+
	Hypostome	++	++	+++	++
	Région gastrique	++	++	++	+++
9-CAA (900 ng.L ⁻¹)	Tentacule	++	+/-	+++	++
	Hypostome	+++	+/-	ND	++
	Région gastrique	++++	+/-	+++	++
Mélange	Tentacule	+++	+/-	+++	++
	Hypostome	+	++	+++	+++
	Région gastrique	+++	++	++++	++

++++ : marquage très intense ; +++ marquage intense ; ++ marquage modéré ; + marquage faible ; +/- marquage très faible ; ND non déterminé

À 19,5°C, DA et 5-HT sont bien réparties dans toutes les régions du corps des hydres témoins : les tentacules, l'hypostome et la zone de la cavité gastrique (la nomenclature utilisée pour désigner les régions du corps est celle de Fujisawa (2003) ; (figure 2-10 du chapitre 2). Quel que soit le neuromodulateur, l'immunomarquage est intense à très intense. En ce qui concerne l'expression tissulaire de 5-HT, l'intensité de l'immunomarquage est similaire dans presque tous les polypes exposés et chez les témoins, à l'exception des polypes exposés à OxCBZ, où elle est plus faible dans la région de la cavité gastrique que chez les témoins (figure 5-11).

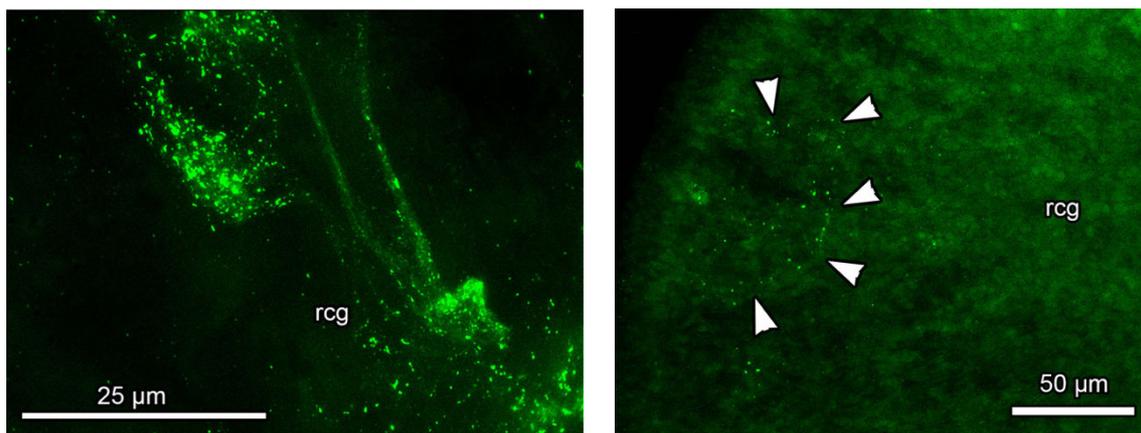


Figure 5-11 : Immuno-localisation de la 5-HT dans la région de la cavité gastrique de l'hydre d'eau douce témoin (gauche) et après 14 jours d'exposition à OxCBZ (droite) à 19,5°C.

rcg : région de la cavité gastrique ; les flèches indiquent quelques immunomarquages.

Concernant l'expression de DA, l'immunomarquage est globalement plus faible dans toutes les régions des polypes exposés à OxCBZ. A l'inverse, chez les polypes exposés aux autres produits pharmaceutiques, l'intensité de l'expression de DA dépend de la région du corps (figure 5-12). En effet, parfois l'intensité de l'immunomarquage est plus importante (dans la région de la cavité gastrique des polypes exposés à 9-CAA) et parfois plus faible (dans la région de la cavité gastrique des polypes exposés à CBZ et OxCBZ, dans l'hypostome des polypes exposés à OxCBZ et au mélange).

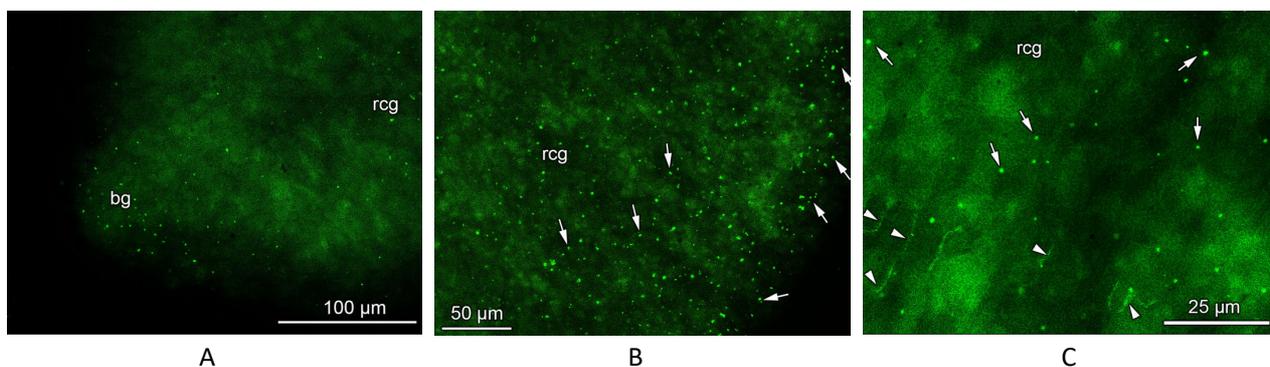


Figure 5-12 : Immuno-localisation de la DA dans la région de la cavité gastrique de l'hydre d'eau douce témoin (A) et après 14 jours d'exposition au 9-CAA (B) et à CBZ (C) à 19,5°C.

bg : bourgeon ; rcg : région de la cavité gastrique ; les flèches indiquent quelques immunomarquages.

À 23°C, DA et 5-HT sont uniformément réparties dans toutes les régions du corps chez les polypes témoins, mais l'intensité de l'immunomarquage est nettement plus faible qu'à 19,5°C. Cette diminution est plus prononcée pour DA que pour 5-HT et les tentacules sont la région du corps la plus touchée (figure 5-13).

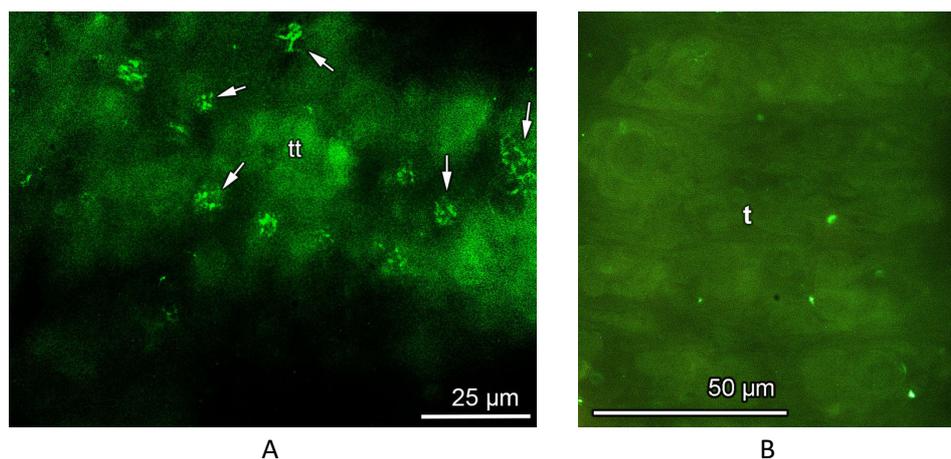


Figure 5-13 : Comparaison de l'immunomarquage dopaminergique aux deux températures testées **A)** 19,5°C et **B)** 23°C dans les tentacules des hydres témoins. Les flèches indiquent quelques immunomarquages très intenses.

A 23°C, la diminution de l'immunomarquage de 5-HT est très importante dans les tentacules des polypes exposés à CBZ et à OxCBZ et légèrement réduite chez les polypes exposés à 9-CAA et au mélange par rapport à ceux exposés aux mêmes produits à 19,5°C.

Concernant DA, l'exposition de 14 jours à 9-CAA a fortement réduit l'expression du neuromodulateur dans toutes les régions du corps à 23°C par rapport à 19,5°C. Cependant, concernant l'exposition au mélange, l'effet de la température sur la distribution de A n'est pas aussi évidente : à 23°C, une diminution de l'intensité de l'immunomarquage a été observé dans les tentacules et la cavité gastrique alors qu'un immunomarquage plus intense a été observé dans l'hypostome.

2.2.5 Discussion sur les résultats obtenus chez *Hydra circumcincta*

Chez *Hydra* sp., lorsque les conditions environnementales sont favorables (température appropriée et alimentation régulière), le bourgeonnement se fait par reproduction asexuée plutôt que sexuée (Otto et Campbell, 1977). Selon Maruyama et Sugiyama (1979), deux facteurs déterminent le taux de croissance d'une population d'hydres : la fréquence à laquelle les polypes matures produisent des bourgeons et la rapidité avec laquelle les bourgeons nouvellement formés mûrissent et commencent à produire leurs propres bourgeons. Les bourgeons apparaissent, puis se développent progressivement et des tentacules apparaissent. En quelques jours, le bourgeon atteint une taille appropriée et est prêt à se détacher du polype parent. Le temps de bourgeonnement pour former une nouvelle hydre dépend à la fois du taux d'alimentation et de la température (Stiven, 1962). Dans notre étude, la fréquence d'alimentation est de trois jours, les polypes sont équitablement nourris (*ad libitum*) et, quelles que soient les conditions d'exposition ici, tous les polypes sont encore capables de

capturer et d'ingérer leurs proies. Par conséquent, les différences significatives observées dans les taux de bourgeonnement entre le groupe témoin et ceux exposés aux produits pharmaceutiques peuvent être attribuées uniquement aux conditions d'exposition. De plus, la vitesse précoce (trois jours) de formation de nouveaux bourgeons à 23°C, par rapport à 19,5°C, est probablement liée à l'augmentation de la température qui conduit à un métabolisme plus élevé. A 19,5°C, un taux de bourgeonnement plus faible observé au jour 6 chez les polypes exposés à CBZ et, aux jours 6 et 9, chez les polypes exposés au mélange, pourrait expliquer en partie les taux de reproduction (RHR) plus faibles observés les jours suivants. Cependant, au-delà du 9^{ème} jour d'exposition, comme plus aucune différence dans le taux de bourgeonnement n'est observée, on pourrait supposer que la diminution du RHR puisse aussi s'expliquer par l'action de CBZ et du mélange sur les voies de signalisation moléculaires hautement conservées impliquées dans le développement. Par exemple, des approches pharmacologiques ont démontré l'importance de la voie de signalisation FGFR (« *fibroblast growth factor receptor* », c'est à dire le récepteur du facteur de croissance des fibroblastes) / Notch (récepteur membranaire) dans le développement embryonnaire. En effet, lorsque les voies FGFR ou Notch sont inhibées, la morphogénèse du bourgeon est normale, les bourgeons se forment mais ne se détachent jamais du parent (Böttger et Hassel, 2012; Galliot, 2012; Münder et al., 2010). Par conséquent, si CBZ et le mélange de produits pharmaceutiques agissent sur de telles voies, ils pourraient retarder le détachement des bourgeons (c'est-à-dire un RHR plus faible observé aux jours 12 et 14) mais pas nécessairement ralentir le bourgeonnement (Ktot). À 23°C et à partir du 7^{ème} jour, des différences significatives dans les taux de bourgeonnement des polypes exposés sont plus fréquemment observées qu'à 19,5°C. En effet, les polypes exposés à CBZ, OxCBZ et au mélange ont des taux de bourgeonnement (Ktot) plus faibles. Ce dernier résultat est en accord avec un RHR plus faible à partir du 12^{ème} jour à cette même température. Ainsi, il semble que l'augmentation de la température affecte la sensibilité des organismes exposés à CBZ, OxCBZ et au mélange, ce qui conduit à des diminutions de Ktot et RHR à la fin de l'exposition. De plus, il est raisonnable de penser que la diminution significative des taux de reproduction (RHR) aux deux températures et après une longue période d'exposition aux produits pharmaceutiques, notamment au mélange, puisse entraîner un effet préjudiciable sur le succès reproducteur et la pérennité des populations sauvages exposées de manière chronique.

À 19,5°C, du 1^{er} au 4^{ème} jour de l'exposition au mélange, les changements morphologiques révèlent des effets pouvant être classés comme « modérément toxiques » (entre 21 et 40 % d'effets) à « hautement toxiques » (de 61 à 80 % d'effets) selon l'échelle de toxicité définie par Arkhipchuk et al. (2006) et Wang, (1990). Puis, à partir du 5^{ème} et jusqu'au 14^{ème} jour, on observe un retour à une morphologie normale. Ces observations suggèrent une efficacité dans la mise en place précoce de mécanismes de défense.

À 23°C, il semble que l'augmentation de l'activité métabolique, suggérée par un K_{tot} élevé au 3^{ème} jour, puisse protéger d'une intoxication au début de l'exposition. De manière intéressante, à 23°C, des signes morphologiques d'intoxication sont apparus au 12^{ème} jour et ont persisté au 14^{ème} jour, chez les polypes exposés à OxCBZ et au mélange. On pourrait ainsi supposer que l'allocation énergétique nécessaire pour se défendre contre un stress thermique puisse protéger les polypes de l'intoxication aux produits pharmaceutiques sur une courte période. Cependant, les mécanismes de défense mis en place ne pourraient pas être maintenus à long terme pour préserver l'homéostasie. Cette hypothèse est étayée par l'apparition, au 14^{ème} jour, de stades *b* chez les témoins et une sensibilité plus importante des polypes exposés à OxCBZ et au mélange.

À la fin des 14 jours d'exposition, les altérations morphologiques ne permettent pas de définir les effets observés comme étant toxiques puisque, selon l'échelle de toxicité définie par Arkhipchuk et al. (2006), moins de 20 % de la population exposée présente des signes d'intoxication. De manière intéressante, à la fin des 14 jours d'exposition à 23°C, les altérations morphologiques sont néanmoins supérieures à 10 % chez les polypes exposés aux faibles concentrations pharmaceutiques utilisées dans cette étude. Ainsi, nos résultats montrent que *H. circumcincta* est une espèce suffisamment sensible pour être utilisée dans des bioessais d'écotoxicité pour la recherche de signaux précoces d'intoxication pouvant être utilisés dans les procédures réglementaires (NOEC, LOEC, CMA (concentration maximale acceptable) = $(NOEC \cdot LOEC)^{1/2}$) et en particulier EC_{10} , un paramètre préconisé par certains auteurs pour remplacer les trois cités précédemment (Warne et van Dam, 2008). D'une manière similaire, en exposant le cnidaire, *H. circumcincta*, à un mélange de 11 produits pharmaceutiques, (Quinn et al., 2009) ont montré un effet significatif sur la morphologie après 96 h d'exposition à des concentrations 10 fois moins élevées que celles trouvées dans des effluents municipaux, ce qui est également en faveur de la sensibilité de cette espèce.

Concernant les effets de l'exposition chronique aux produits pharmaceutiques sur les paramètres de la balance oxydative, il a été précédemment montré que, chez *H. circumcincta*, après 48 h d'exposition à CBZ à 20°C, les concentrations maximales inductibles pour l'activité de l'hème oxydase et de la glutathion S-transférase, deux enzymes impliqués dans l'équilibre oxydatif, étaient respectivement de 0,03 et 0,2 μM (soit 7 et 47 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (Quinn et al., 2004). Cependant, ces concentrations sont beaucoup plus élevées que les concentrations environnementales testées dans notre étude, seules et dans le mélange puisqu'elles sont de l'ordre du $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$. Nos résultats indiquent qu'à 19,5°C, l'exposition à des concentrations environnementales de CBZ et de 9-CAA n'a pas induit les mécanismes de défense antioxydants et a donc conduit à une peroxydation des lipides membranaires. En revanche, comme les mécanismes de défense antioxydants ont été induits chez les polypes exposés à OxCBZ, aucune peroxydation lipidique n'a été mise en évidence. Cela peut s'expliquer par le fait que

de faibles doses de CBZ et de 9-CAA induisent une peroxydation lipidique membranaire non compensée par les systèmes antioxydants. L'exposition au mélange semble n'avoir aucun impact sur les paramètres de la balance oxydative (pas de mécanismes de défense oxydative induits et faible peroxydation lipidique). Ce résultat est déroutant et suppose un effet encore inconnu (agoniste / antagoniste / synergique) de la combinaison des trois molécules sur l'équilibre oxydatif. L'ensemble de ces résultats indique que l'hydre est un modèle sensible pour détecter les effets des faibles concentrations de produits pharmaceutiques sur la peroxydation lipidique de la membrane cellulaire. À des concentrations plus élevées, il a été rapporté que l'hydre pourrait réduire l'effet toxique du mélange pharmaceutique en métabolisant les substances toxiques (Quinn et al., 2009). En effet, le genre *Hydra* posséderait une activité glutathion S-transférase (Stenersen et al., 1987), qui est une enzyme jouant un rôle important dans la biotransformation de phase II pour détoxifier et métaboliser des composés endogènes (Hoarau et al., 2004). Le fait que l'augmentation de la température entraîne une élévation significative de la capacité antioxydante dans tous les groupes de *H. circumcincta* est cohérent avec les observations de (Dash et Phillips, 2012), qui ont démontré qu'une autre espèce, *H. vulgaris*, répond au stress thermique en régulant la transcription de l'ARNm de la catalase, une autre enzyme impliquée dans la régulation de la balance oxydative. Dans leur travail, ces auteurs ont étudié les effets d'élévations brusques et importantes de la température (chocs thermiques aigus) sur les niveaux d'ARNm de la HvCatalase. Ils ont observé une diminution du taux d'ARNm de la HvCatalase chez les hydres exposés à 30 ou à 37°C pendant 6 h par rapport aux témoins maintenus à 18°C. Notre condition d'exposition thermique (+ 3,5°C pendant 14 jours) conduit à un résultat similaire, car nous avons observé un niveau plus faible d'AOC chez les témoins et les groupes exposés aux produits pharmaceutiques. Ainsi, on pourrait émettre l'hypothèse que les hydres sont capables de réguler les niveaux d'ARNm des enzymes antioxydants en fonction de la température ambiante. Comme proposé par (Dash et Phillips, 2012), il se pourrait que l'exposition à des températures plus élevées pendant une longue durée altère la machinerie transcriptionnelle de la cellule, affectant ainsi négativement la transcription des ARNm des enzymes antioxydants, diminuant ainsi la capacité antioxydante totale. Cette diminution de l'AOC pourrait, à son tour, conduire à une augmentation de la peroxydation lipidique de la membrane cellulaire.

Dans ce travail, les variations de la distribution tissulaire de deux neuromodulateurs (dopamine et sérotonine) en fonction des conditions d'exposition aux substances pharmaceutiques ont été étudiées. Tout d'abord, il est à noter qu'il n'a pas été possible de trouver dans la littérature des points de comparaison permettant d'évaluer les effets d'une exposition à des produits pharmaceutiques sur ces systèmes neuronaux que ce soit chez une espèce proche de *H. circumcincta* ou sur un autre invertébré. En effet, la seule étude disponible à ce jour est celle sur laquelle nous nous

sommes appuyés pour sélectionner cette réponse biologique dans nos tests d'écotoxicité, et qui a montré notamment des diminutions de l'expression tissulaire de la sérotonine suite à des expositions à un colorant azoïque, le « Disperse Red 1 » (de Jong et al., 2016). Nous avons donc élargi la recherche bibliographique au groupe des mammifères pour discuter de ces résultats. Dans notre étude, une exposition de 14 jours à des concentrations environnementales en produits pharmaceutiques à une température d'élevage normale (19,5°C) ne semble pas avoir d'incidence nette sur la distribution de la dopamine (DA) ou de la sérotonine (5-HT) chez *H. circumcincta*. En effet, le résultat le plus marqué était une diminution de l'expression de DA dans les régions de l'hypostome et de la cavité gastrique chez les polypes exposés à OxCBZ ou au mélange. Cependant, les effets sont faibles et dépendent de la région du corps. Bien que cela ait été réalisé chez les mammifères, il a été montré, dans de précédentes études, que les effets de CBZ sur le système dopaminergique sont hétérogènes. En effet, chez les rongeurs, CBZ peut affecter la transmission dopaminergique et peut réduire la libération de DA dans le cortex préfrontal (Elphick, 1989) ; CBZ peut augmenter les niveaux de DA dans une autre région du cerveau, le striatum (Barros et al., 1986) ; CBZ peut induire une augmentation ou une diminution du renouvellement de la DA (Okada et al., 1997). Néanmoins, nos résultats ont montré que le système dopaminergique peut être impacté par des produits pharmaceutiques, leurs métabolites ou leur mélange.

En ce qui concerne la localisation de 5-HT, les résultats obtenus ont montré que seule une exposition de 14 jours à OxCBZ affecte l'intensité de l'immunomarquage chez *H. circumcincta* dans la région de la cavité gastrique. Ce résultat est en accord avec les données antérieures obtenues chez la souris, où il a été montré que OxCBZ peut modifier les taux de 5-HT dans la région corticale du cerveau et peut également modifier le comportement de l'animal (Arora et al., 2013). Ces résultats laissent penser que l'exposition à long terme aux produits pharmaceutiques dans les systèmes aquatiques, même à de faibles concentrations, peut induire des altérations de l'expression des neuromodulateurs et peut affecter les taux de reproduction (RHR) plus faibles après deux semaines d'exposition. Cependant, les mécanismes biologiques qui sous-tendent ces variations méritent d'être clarifiés.

Lorsque la température d'élevage a été augmentée de 3,5°C, une diminution de l'expression de 5-HT et de DA a été observée dans presque toutes les régions du corps et, lorsqu'elle était associée à une exposition pharmaceutique, la diminution de l'expression était souvent plus importante. Bien qu'elles aient été obtenues chez des rats de laboratoire, des données antérieures ont montré qu'une augmentation de la température d'élevage entraînait une chute des teneurs en 5-HT dans une région cérébrale en particulier, l'hypothalamus (Chauhan et al., 2017). Des travaux précédents ont montré que les neuromodulateurs DA et 5-HT sont impliqués dans le comportement alimentaire (de Jong et al., 2016; Hanai et Kitajima, 1984; Sher et Zlotkin, 2009). Dans un travail récent (de Jong et al., 2016), il a été montré que les polypes présentant un immunomarquage sérotoninergique intense dans les

tentacules, l'hypostome et la région de la cavité gastrique avaient un comportement alimentaire normal. Cependant, lorsque les polypes avaient été exposés à des concentrations croissantes en un colorant azoïque (Disperse Red 1), ils étaient incapables d'ingérer leurs proies capturées et l'immunomarquage sérotoninergique n'était plus présent dans la région de la cavité gastrique et l'hypostome. Dans notre cas, l'immunomarquage était toujours présent et les polypes ont pu attraper et ingérer leurs proies. Cependant, les expressions du neuromodulateur étaient plus faibles dans la région de la cavité gastrique, par exemple, chez les polypes exposés à OxCBZ (tableau 5-1) et, par conséquent, on peut supposer que l'efficacité du processus digestif puisse être affectée sur le long terme (au-delà des 14 jours de nos expériences) comme démontré chez *H. circumcincta* exposé au Disperse Red 1. En outre, lorsque la température d'élevage est augmentée de 3,5°C, l'intensité de l'immunomarquage est nettement diminuée dans presque toutes les régions du corps. Ces observations pourraient donc être liées à l'altération des paramètres morphologiques, de ceux de la reproduction ainsi que ceux de la balance oxydative qui a été constatée à la fin de l'exposition de 14 jours à 23°C.

En résumé, à la fin des deux semaines d'exposition aux produits pharmaceutiques, aucun critère biologique ne permet de classer les effets selon une échelle de toxicité (Arkhipchuk et al., 2006; Wang, 1990). Cependant, les variations significatives des paramètres biologiques étudiés conduisent aux mêmes conclusions: (1) l'exposition à long terme à des produits pharmaceutiques à de faibles concentrations et en mélange a des effets délétères sur *H. circumcincta*, et les taux de reproduction indiqueraient un possible effet néfaste sur la *fitness* des populations sauvages exposées de manière chronique; (2) la hausse des températures semble également avoir des effets nocifs sur les paramètres biologiques étudiés. Lorsque la hausse des températures est associée à l'exposition à de très faibles doses de produits pharmaceutiques en mélange, les effets semblent être plus prononcés sur certains paramètres biologiques. Ainsi, dans un contexte de réchauffement global, il est possible que leurs effets toxiques sur les organismes aquatiques non cibles se révèlent plus importants.

3. Discussion et Conclusion

Bien qu'utile dans le cadre de la réglementation des substances chimiques, le test Microtox montre ici des limites. En effet, même si le bioessai utilisant l'espèce *V. fischeri* a permis de mesurer des EC₅₀, les conditions intrinsèques de ce test d'écotoxicité aiguë (courte période d'exposition) conduisent à obtenir des valeurs d'effet pour des concentrations de l'ordre du mg.L⁻¹ donc bien plus élevées que celles observées dans l'environnement (de l'ordre du ng.L⁻¹). Ainsi, pour CBZ, les EC₅₀ obtenus sont respectivement de 58,5 et 64,4 mg.L⁻¹ après 15 et 30 min d'exposition. De plus, compte

tenu des propriétés physico-chimiques des deux autres substances testées (OxCBZ et 9-CAA) et notamment de leur faible solubilité dans l'eau, la détermination des EC_{50} n'a pas pu aboutir car elle aurait nécessité une solution mère beaucoup plus concentrée et l'utilisation de solvants organiques, ce qui ne permet pas d'obtenir un résultat adapté à l'information sur un risque environnemental. De plus, nos résultats montrent que le test sur *V. fischeri* n'informe pas sur d'éventuels effets toxiques potentiels de ces trois produits pharmaceutiques en mélange à des concentrations environnementales.

Le suivi des phytométabolites chez les lentilles d'eau n'a également pas permis de mettre en évidence de biomarqueurs précoces de la toxicité des composés pharmaceutiques. En effet, malgré cette nouvelle approche consistant à mesurer des phytométabolites plutôt que des effets sur la croissance, qui est une résultante d'un ensemble de processus métaboliques, les résultats obtenus montrent des effets mitigés des 3 composés pharmaceutiques et du mélange sur certains indices. On peut ainsi noter que l'indice des chlorophylles, l'indice du rapport azote sur carbone et l'indice des composés phénoliques ont été impactés par les composés pharmaceutiques. Ainsi, on peut noter que CBZ n'impacte que très rarement les lentilles d'eau quel que soit l'indice et la concentration étudiés, tandis que OxCBZ et 9-CAA induisent des effets dès les plus faibles concentrations. Le mélange, quant à lui, affecte parfois la plante montrant de potentiels effets à faibles concentrations.

Le suivi de différents paramètres chez *H. circumcincta* s'est montré la méthode la plus sensible des trois testées dans ce travail. L'originalité de l'approche étudiant à la fois les paramètres démographiques, comportementaux, morphologiques et moléculaires ont permis de détecter des effets des composés à de faibles concentrations. Cette espèce a permis de montrer une toxicité de CBZ sur de multiples indicateurs que sont la morphologie, la reproduction, les lipides membranaires mais également la distribution tissulaire des neuromodulateurs (dopamine en particulier). Les deux autres composés ont également provoqué des effets. OxCBZ semble également impacter la morphologie et la reproduction ainsi que la distribution tissulaire des neuromodulateurs (dopamine et sérotonine) mais, à l'inverse de CBZ, ce composé modifie la capacité antioxydante de l'hydre. 9-CAA à faible concentration n'a pas d'effet sur la reproduction, ni sur la distribution de la sérotonine mais affecte tous les autres paramètres suivis. Le mélange des 3 produits affecte la plupart des paramètres étudiés, il ralentit significativement le taux de reproduction, altère la morphologie des hydres ainsi que la distribution de la dopamine mais n'a pas d'effet sur celle de la sérotonine.

La sensibilité des 3 espèces étudiées dans le cadre de cette thèse peut être comparée à celle d'autres espèces appartenant aussi à différents niveaux trophiques. En effet, le nombre de travaux recensés en écotoxicologie montre que CBZ est un composé pharmaceutique d'intérêt (tableau 5-2). Cependant, les données recueillies montrent une toxicité assez faible sur les espèces utilisées, en particulier sur la base de tests d'écotoxicité aigüe (bactéries, crustacés, diptères et poissons) où les EC_{50} et LC_{50} sont comprises entre $9,5 \text{ mg.L}^{-1}$ sur l'espèce *Chironomus tentans* et 111 mg.L^{-1} sur l'espèce *Daphnia magna*. Les valeurs de toxicité chronique montrent une toxicité plus importante de CBZ avec une NOEC mesurée de $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$ sur *Ceriodaphnia dubia*. OxCBZ et 9-CAA ont été nettement moins étudiés mais des travaux mentionnent que OxCBZ ne présente pas de toxicité sur *Daphnia magna* dans la gamme de concentrations testées ($2,5$ à 10 mg.L^{-1}) (Li et al., 2011). Globalement, les valeurs de toxicité examinées sont bien plus élevées que celles testées dans nos conditions montrant ainsi que les hydres d'eau douce, particulièrement, représentent un bon modèle pour évaluer l'écotoxicité à faible dose de polluants seuls et en mélange.

Les prédictions de différents critères de toxicité à l'aide d'un système expert DSSTox ont montré que plusieurs produits de transformation de CBZ, en particulier 9-CAA, pouvaient présenter une génotoxicité accrue par rapport au composé parent (CBZ), contrairement à OxCBZ qui est moins génotoxique (Brezina et al., 2017). Également, la neurotoxicité de OxCBZ a été étudiée sur des rats et s'est avérée plus grande que celle de CBZ (Araújo et al., 2004).

Ces résultats de la littérature ainsi que ceux obtenus dans notre étude montrent qu'il est important de considérer et d'étudier les produits de transformation puisque ces derniers peuvent être potentiellement plus dangereux. Cependant, malgré une prise de conscience, il existe toujours un grand manque de données concernant les produits de transformation comme le signale Evgenidou et al. (2015). Il faut également souligner l'importance des tests de génotoxicité qui pourraient compléter les résultats écotoxicologiques et apporter des informations à des niveaux organisationnels complémentaires.

Tableau 5-2 : Données écotoxicologiques obtenues dans la littérature pour la carbamazépine à partir de tests normalisés

Niveau trophique	Espèces	Durée d'exposition	Paramètre étudié	Données écotoxicologiques	Références
Bactérie	<i>Vibrio fischeri</i>	30 min 15 min 15 min	Bioluminescence	LC ₅₀ = > 81 mg.L ⁻¹ LC ₅₀ : 52,2 mg.L ⁻¹ LC ₅₀ = 28,3 mg.L ⁻¹ estimé	(Ferrari et al., 2004, 2003) (Kim et al., 2007) (Harada et al., 2008)
Algue	<i>Pseudokirchnerella subcapitata</i>	4 j	Croissance	LC ₅₀ / NOEC / LOEC = > 100 mg.L ⁻¹ LC ₅₀ = 48,9 mg.L ⁻¹ estimé NOEC = 0,5 mg.L ⁻¹	(Ferrari et al., 2004, 2003) (Harada et al., 2008)
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	3 j	Croissance	EC ₅₀ = 74 mg.L ⁻¹	(Clevers, 2003)
Lentille d'eau	<i>Lemna minor</i>	7 j	Croissance	EC ₅₀ = 25,5 mg.L ⁻¹	(Clevers, 2003)
Rotifère	<i>Brachionus calyciflorus</i>	48 h	Croissance	NOEC = 0,377 mg.L ⁻¹ LOEC = 0,754 mg.L ⁻¹	(Ferrari et al., 2004, 2003)
Crustacé	<i>Daphnia magna</i>	48 h	Mobilité	EC ₅₀ ou LC ₅₀ = > 13,8 mg.L ⁻¹ EC ₅₀ = > 100 mg.L ⁻¹ pas d'effet mesuré à 10 mg.L ⁻¹	(Ferrari et al., 2004, 2003) (Clevers, 2003; Kim et al., 2007) (Harada et al., 2008)
			Mortalité	LC ₅₀ = 111 mg.L ⁻¹	(Han et al., 2006)
	<i>Ceriodaphnia magna</i>	48 h	Mobilité	EC ₅₀ ou LC ₅₀ = 77,7 mg.L ⁻¹	(Ferrari et al., 2004, 2003)
		7 j	Croissance	NOEC = 0,025 mg.L ⁻¹ LOEC = 0,1 mg.L ⁻¹	(Ferrari et al., 2004, 2003)
	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	24 h	Mortalité	LC ₅₀ = >100 mg.L ⁻¹	(Kim et al., 2009)
<i>Hyalella azteca</i>	10 j	Croissance	LC ₅₀ = 9,9 mg.L ⁻¹ LC ₅₀ = 15,0 mg.L ⁻¹	(Dussault et al., 2008)	
Diptère	<i>Chironomus tentans</i>	10 j	Croissance	LC ₅₀ = 47,3 mg.L ⁻¹ EC ₅₀ = 9,5 mg.L ⁻¹	(Dussault et al., 2008)
Poisson	<i>Danio rerio</i>	10 j	Mortalité embryons	NOEC = 25 mg.L ⁻¹ LOEC = 50 mg.L ⁻¹	(Ferrari et al., 2004, 2003)
	<i>Oryzias latipes</i>	96 h	Mortalité	LC ₅₀ = 45,9 mg.L ⁻¹ LC ₅₀ = 35,4 mg.L ⁻¹	(Kim et al., 2009)

Conclusion générale et perspectives

Dans le cadre de ces travaux de thèse, la synthèse bibliographique a permis de réaliser un état de l'art à propos de la contamination en produits pharmaceutiques du bassin méditerranéen, présentant d'abord leurs concentrations dans les différents compartiments aquatiques et leurs impacts sur des organismes aquatiques ciblés.

Cette étude approfondie a montré, dans un premier temps, une contamination en sortie des stations de traitement des eaux usées avec des concentrations de PP allant jusqu'à la centaine de $\mu\text{g.L}^{-1}$ puis un effet de dilution après leur rejet dans l'environnement et probablement l'implication de phénomènes d'atténuation naturelle. De ce fait les concentrations retrouvées en rivières et dans la mer étaient plutôt de l'ordre du ng.L^{-1} au $\mu\text{g.L}^{-1}$. Ces mesures ont permis de calculer des quotients de danger et des indices de priorisation pour les 43 produits pharmaceutiques ciblés faisant ressortir treize PP dangereux pour les compartiments aquatiques méditerranéens. Certains de ces PP sont déjà sur les listes et programmes de surveillance (17α -éthinyloestradiol, érythromycine, azithromycine, clarithromycine) mais cette étude a révélé aussi d'autres composés à savoir : amoxicilline, ciprofloxacine, ofloxacine, triméthoprime, sulfaméthoxazole, métoprolol, acétaminophène, naproxène et ibuprofène.

Cette synthèse a également mis en avant la grande variété de tests écotoxicologiques normalisés. On constate aujourd'hui que la majorité des tests appliqués pour les PP sont des tests évaluant principalement une écotoxicité aiguë (*Daphnia magna* (28 %), *Pseudokirchneriella subcapitata* (13 %) et *Vibrio fischeri* (12 %)). Dans le cas des hormones, ce sont principalement les tests sur les poissons qui sont utilisés (*Danio rerio* (29 %)).

Au cours de cette étude, de nombreux facteurs limitant sont apparus notamment : (1) le niveau de sensibilité des méthodes analytiques, qui, selon les laboratoires et les pays sont différents et peuvent conduire à des composés non détectés, (2) le manque de données sur la présence des PP dans les pays au Sud de la Méditerranée, (3) l'application de tests écotoxicologiques normalisés avec des adaptations ou des réactualisations qui conduit à des valeurs disparates difficilement comparables entre elles pour un même test, (4) le manque d'études d'écotoxicologie menées à faibles doses et sur des mélanges de composés.

Cet état de l'art a amené à cibler le travail expérimental sur la carbamazépine et ses sous-produits. Ainsi, dans un second temps, les travaux réalisés en laboratoire se sont intéressés au devenir

de CBZ, OxCBZ et 9-CAA dans des eaux de surface naturelles de différentes natures (rivière Arc, fleuve Rhône, étang de Berre et mer Méditerranée).

Le suivi des cinétiques de CBZ, OxCBZ et 9-CAA sous irradiation dans l'eau ultrapure a permis de mettre en évidence la part très importante du processus de photolyse de 9-CAA et OxCBZ, confirmée par les rendements quantiques de disparition assez élevés (compris entre 10^{-4} et 10^{-2}) et les temps de demi-vie assez faibles (compris entre 7 heures et 3 jours) à l'inverse de CBZ qui est plutôt photostable avec un temps de demi-vie de plusieurs mois. Dans les eaux naturelles, l'étude de la disparition de CBZ et 9-CAA a révélé leur stabilité à l'obscurité à l'inverse de OxCBZ qui subit des phénomènes d'atténuation naturelle (temps de demi-vie allant de 8 à 107 h).

En présence d'une source lumineuse, les comportements des 3 composés se sont avérés bien différents en fonction des eaux. En effet, seuls des processus chimiques photoinduits expliquent la dégradation de CBZ, alors que dans le cas de 9-CAA, ces processus et celui de photolyse sont impliqués et dans celui de OxCBZ, ces deux processus et des phénomènes d'atténuation naturelle sont responsables de sa dégradation.

De plus, la dégradation de CBZ et 9-CAA était plus importante dans les eaux douces avec des temps de demi-vie 2 à 3 fois plus élevés que dans les eaux salées. Cette forte réactivité s'explique par des constantes de réaction avec les radicaux $\bullet\text{OH}$ élevées (de l'ordre de $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et la détection et quantification de ces mêmes radicaux respectivement par spectrophotométrie résolue en temps et par l'utilisation d'une sonde chimique (TPA) sous irradiation continue dans ces eaux. Ainsi, des concentrations quasi-stationnaires plus élevées dans les eaux douces (10^{-17} M) contre 10^{-19} M dans les eaux salées ont été mesurées. De plus, une corrélation a pu être établie entre la teneur en composés azotés, source potentielle de $\bullet\text{OH}$, et l'efficacité de la transformation de CBZ. A l'inverse, dans les eaux salées, un ralentissement dans les cinétiques de dégradation de CBZ et 9-CAA a été observé du fait des concentrations plus faibles en radicaux $\bullet\text{OH}$ mais aussi du fait de la production d'espèces chimiques réactives halogénés (radicaux bromures $\text{Br}_2\bullet$ et chlorures $\text{Cl}_2\bullet$) générées en partie par les radicaux hydroxyles dans les eaux salées. Les constantes de réactions entre les radicaux halogénés et les composés se sont avérées plus faibles (de l'ordre de 10^7 à $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) que celles mesurées avec les radicaux $\bullet\text{OH}$. Ces résultats justifient la dégradation plus lente des composés dans les eaux salées en particulier le piégeage majoritaire des radicaux hydroxyles par les ions bromure.

Les études par LFP ont également mis en exergue la formation de radicaux carbonates dans les eaux naturelles mais les constantes de réactions n'ont pas permis de montrer la part de cette espèce chimique réactive dans les processus de dégradation induits.

Des études analytiques ont été menées pour identifier les produits de transformation communs ou spécifiques selon les eaux. L'acridine et l'acridone ont ainsi été mis en évidence dans chacune des eaux et pour tous les composés. De plus, dans le cas de CBZ et 9-CAA, la formation de composés bromé et chloré dans les eaux salées est à souligner. Les études mécanistiques ont montré plusieurs voies de transformation, notamment la contraction de cycle azépine pour OxCBZ et CBZ, une ouverture de cycle aromatique pour 9-CAA mais aussi des réactions d'hydroxylation et d'oxydation des composés de départ mais aussi de leurs sous-produits.

Afin d'évaluer les risques environnementaux liés à la présence de ces PP, des approches novatrices basées sur l'utilisation de *L. minor* et de *H. circumcincta* ont été développées pour évaluer les effets d'une exposition chronique aux PP à faibles concentrations (seuls et en mélange) pendant au moins 2 semaines. En parallèle, leur écotoxicité a été testée sur *V. fischeri* utilisé comme bioessai de référence.

Les résultats ont montré qu'avec l'espèce *V. fischeri*, seule la toxicité de CBZ a pu être démontrée avec une EC_{50} de 66 mg.L^{-1} après 30 min d'exposition puisque la solubilité de OxCBZ et 9-CAA dans l'eau n'était pas assez importante. L'étude de l'eau de l'Arc dopée avec CBZ a montré un effet plus important après irradiation qui peut s'expliquer par la formation d'acridine et d'acridone connus pour être toxiques (Parkhurst et al., 1981; Wiegman et al., 2002).

Chez les lentilles d'eau (*L. minor*), au lieu de suivre la croissance qui regroupe des étapes morphogénétiques qui peuvent être altérées à plus ou moins long terme suite à l'exposition à des PP, l'objectif a été de mettre au point une approche précoce par le suivi des phytométabolites. Un protocole non destructif a été établi pour mesurer 2 indices sur les parties aériennes des lentilles d'eau, représentatifs l'un de la teneur en chlorophylles et l'autre, en composés phénoliques. Un 3ème indice plus intégrateur a été utilisé, représentant le rapport azote sur carbone. Il a été possible de mettre en évidence des effets sur *L. minor* dès les plus faibles concentrations pour OxCBZ et 9-CAA (indice de chlorophylles et de la balance azote/carbone) contrairement à CBZ. De plus, il a été montré que le mélange affectait l'indice azote/carbone et celui de chlorophylles chez la plante lorsque les trois composés étaient ajoutés au ng.L^{-1} . Cependant, la grande plasticité des réponses obtenues rend difficile l'obtention de tendances claires et ne permet pas, à l'heure actuelle, de développer un nouvel outil d'évaluation écotoxicologique sur la base de ces résultats.

L'originalité de l'approche chez *H. circumcincta* a été de permettre d'étudier de nombreux paramètres allant de la reproduction à la réponse tissulaire pour obtenir une vision plus intégrative des altérations liées à l'exposition aux PP en identifiant des effets spécifiques à chacune des molécules

étudiées et également des effets cocktails. En effet, cet organisme aquatique se prête bien à l'ensemble de ces suivis. Ainsi ont pu être mis en évidence des effets de CBZ à faibles concentrations sur la morphologie, la reproduction, les lipides membranaires mais également la distribution tissulaire des neuromodulateurs (dopamine en particulier). Dans le cas de OxCBZ, la capacité antioxydante de l'hydre a également été impactée alors que pour 9-CAA, l'exposition n'a pas eu d'effet sur la reproduction, ni la distribution de la sérotonine mais sur tous les autres paramètres suivis. Le mélange des 3 produits a également ralenti le taux de reproduction, altéré la morphologie des hydres ainsi que la distribution de la dopamine mais n'a pas eu d'effet sur celle de la sérotonine. Ainsi les résultats obtenus permettent de valider ce modèle et de proposer un panel de test permettant de mieux identifier les effets de ces PP à faibles doses.

L'approche a été menée à la température optimale de croissance des hydres, soit 19°C mais également à 23°C dans le cadre d'une simulation de réchauffement climatique. Il a ainsi pu être montré que les hydres exposées, à une température de 23°C, ont des effets plus marqués en particulier sur la capacité antioxydante ainsi que l'intensité de l'immunomarquage dans presque toutes les régions du corps des polypes, qu'à température normale. Cette étude apporte une réflexion sur l'adaptation des tests aux modifications environnementales notamment le changement climatique qui est susceptible d'amplifier ou tout du moins de moduler les réponses des organismes aux polluants.

Dans le cadre de cette thèse, la mise en évidence de certaines espèces chimiques réactives formées dans les eaux naturelles a été explorée mais, la présence de certaines espèces ou encore leur réactivité aurait mérité plus d'attention. C'est le cas par exemple des radicaux carbonates dont la formation a été prouvée sans pour autant parvenir à mesurer leur réactivité avec les composés sélectionnés. En effet, durant ce travail les constantes cinétiques n'ont pas pu être déterminées avec les radicaux carbonates à cause d'une concentration en composés (CBZ, OxCBZ et 9-CAA) limitée par leur solubilité maximale dans l'eau ultrapure. Néanmoins, l'approche que nous avons proposée pourrait permettre de déterminer ces constantes en augmentant la quantité d'ions carbonate pour favoriser la formation de radicaux carbonates. Une autre possibilité serait d'utiliser la méthodologie employée pour déterminer les constantes de réaction des radicaux halogénés avec les composés, à l'aide de AQ25. Bien entendu, le prérequis serait de vérifier par LFP la formation des radicaux $\text{CO}_3^{\bullet-}$. Enfin, cette méthode, qui a montré des limites dans le cas de la détermination des constantes de réaction avec les radicaux bromures, pourrait être optimisée en choisissant un compétiteur avec une

constante de réaction avec les radicaux bromures plus faible ($10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), tel que l'ion linoléate, la phenylalanine, MnEDTA^{2-} (Neta et al., 1988).

De plus, bien que non observés par LFP, les radicaux sulfates sont d'intérêt car leur forte réactivité avec certains produits pharmaceutiques a déjà été démontrée ($k = 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Matta et al., 2011; Mahdi Ahmed et al., 2012).

Par ailleurs, aucune certitude n'a pu être donnée quant à la formation de radicaux chlorures ou bromures dans les eaux salées puisque les deux espèces réactives absorbent dans le même domaine de longueur d'onde. Une approche intéressante à développer serait l'utilisation de la technique de résonance paramagnétique électronique afin de pouvoir les discriminer (Rehorek et al., 1991). De plus, pour compléter les résultats obtenus en LFP, il aurait été intéressant de confirmer l'abondance des radicaux hydroxyles, par une méthode semi-quantitative à l'aide des ions thiocyanate.

Egalement, la présence et le rôle de la matière organique dissoute a été révélée dans les différentes eaux mais sa caractérisation n'a pas été réalisée. Cet aspect pourrait apporter une réponse sur les différences de réactivité observées dans des eaux de même nature car le contenu en acides fulviques ou humiques est susceptible de générer préférentiellement des espèces réactives différentes. Une piste serait de fractionner la MOD par chromatographie d'exclusion stérique voire de travailler sur la fraction non soluble (POC), afin de pouvoir les caractériser par spectroscopie de fluorescence et de mesurer leur capacité à produire des espèces réactives en utilisant des sondes spécifiques (alcool furfurylique, TPA...).

Au-delà des différents produits de transformation détectés dans la phase aqueuse, il aurait été intéressant de regarder ceux susceptibles de s'adsorber sur les particules en suspension, en particulier les polluants aza-aromatiques comme l'acridine et l'acridone, ce qui peut justifier les faibles concentrations formées dans les eaux naturelles (Negrón-Encarnación et Arce, 2007).

Dans le cadre de l'étude sur l'impact des produits pharmaceutiques sur les organismes, l'écotoxicité des eaux salées après irradiation n'a pas pu être étudiée, en raison d'une salinité trop importante pour les espèces ciblées dont *V. fischeri*, pourtant espèce bactérienne marine. Les composés halogénés sont connus pour être toxiques, et leur étude aurait pu révéler une écotoxicité bien plus importante dans les eaux salées. D'autres modèles adaptés à des salinités élevées peuvent être alors envisagés comme *Dunaliella salina*, une Chlorophycée ou *Brachionus plicatilis*, un rotifère.

De nouvelles approches peuvent donc être suggérées en comparant des formes de vies proches, certaines adaptées aux eaux douces et d'autres aux eaux salées comme *Chlorella vulgaris* / *Dunaliella salina* ou *Brachionus calyciflorus* / *Brachionus plicatilis*.

De plus, bien que le modèle sur les hydres se soit révélé le plus sensible, ce test est difficilement applicable pour des eaux naturelles. L'utilisation d'une démarche EDA (effect directed analysis ou analyse chimique orientée) pourrait palier à ce problème ainsi qu'aux problèmes de salinité et permettre de fractionner les différents constituants d'un mélange pour les extraire et les concentrer, afin d'étudier leur toxicité. Par ailleurs, même s'il permet d'augmenter la solubilisation des PP, le DMSO n'a pas été retenu dans nos essais, car les résultats correspondants s'écarteraient des conditions environnementales réelles.

La démarche développée au cours de ce travail pour étudier le devenir des produits pharmaceutiques et leur potentielle écotoxicité pourrait également être appliquée à d'autres cibles moléculaires, telles que par exemple les treize composés mis en évidence dans la synthèse bibliographique, afin de répondre à des inquiétudes environnementales.

Enfin, dans une autre mesure, une question se pose quant à la représentativité des eaux sélectionnées dans ces travaux par rapport à tous les milieux aquatiques existants. Les espèces chimiques formées dans ces eaux sont-elles propres à chaque milieu où peuvent-elles être les mêmes dans toutes les masses d'eaux ? A notre échelle, les résultats ont montré que les eaux douces avaient tendance à former le même genre d'espèces chimiques réactives, tout comme les eaux salées. Néanmoins il serait intéressant de regarder s'il en est de même dans les eaux de montagnes, les lacs ou les zones de rejet végétalisées. Par ailleurs, toutes les eaux de surface étudiées ont été prélevées proches des côtes méditerranéennes et à une profondeur inférieure à 15 cm. Or, il est admis que la composition des eaux et par conséquent, les espèces chimiques réactives formées varient selon la profondeur des eaux. Il serait intéressant de travailler à l'interface entre la phase gazeuse et la phase aqueuse (micro-couche de surface, 10-100 μm), connu pour être un mélange complexe composé notamment de polysaccharides et protéines (Cunliffe et al., 2013). Les réactions photochimiques et les cinétiques de dégradation pourraient donc être complètement bouleversées à cette interface et pourraient éventuellement entraîner un transfert vers la phase gazeuse de composés volatils de faible masse moléculaire

Références

- Agüera, A., Pérez Estrada, L.A., Ferrer, I., Thurman, E.M., Malato, S., Fernández-Alba, A.R., 2005. Application of time-of-flight mass spectrometry to the analysis of phototransformation products of diclofenac in water under natural sunlight. *J. Mass Spectrom.* 40, 908–915. <https://doi.org/10.1002/jms.867>
- Al Aukidy, M., Verlicchi, P., Jelic, A., Petrovic, M., Barcelò, D., 2012. Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Sci. Total Environ.* 438, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.061>
- Ali, M., Wang, J.J., DeLaune, R.D., Seo, D.C., Dodla, S.K., Hernandez, A.B., 2013. Effect of redox potential and pH status on degradation and adsorption behavior of tylosin in dairy lagoon sediment suspension. *Chemosphere* 91, 1583–1589. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.050>
- Alygizakis, N.A., Gago-Ferrero, P., Borova, V.L., Pavlidou, A., Hatzianestis, I., Thomaidis, N.S., 2016. Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. *Sci. Total Environ.* 541, 1097–1105. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.145>
- Andreozzi, R., Caprio, V., Ciniglia, C., de Champdoré, M., Lo Giudice, R., Marotta, R., Zuccato, E., 2004. Antibiotics in the Environment: Occurrence in Italian STPs, Fate, and Preliminary Assessment on Algal Toxicity of Amoxicillin. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6832–6838. <https://doi.org/10.1021/es049509a>
- Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G., Pollio, A., 2002. Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Res.* 36, 2869–2877. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00500-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00500-0)
- Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50, 1319–1330.
- Anipsitakis, G.P., Dionysiou, D.D., Gonzalez, M.A., 2006. Cobalt-Mediated Activation of Peroxymonosulfate and Sulfate Radical Attack on Phenolic Compounds. Implications of Chloride Ions. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1000–1007. <https://doi.org/10.1021/es050634b>
- Araújo, I.M., Ambrósio, A.F., Leal, E.C., Verdasca, M.J., Malva, J.O., Soares-da-Silva, P., Carvalho, A.P., Carvalho, C.M., 2004. Neurotoxicity Induced by Antiepileptic Drugs in Cultured Hippocampal Neurons: A Comparative Study between Carbamazepine, Oxcarbazepine, and Two New Putative Antiepileptic Drugs, BIA 2-024 and BIA 2-093. *Epilepsia* 45, 1498–1505. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.14104.x>
- Arditsoglou, A., Voutsas, D., 2008. Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers. *Environ. Pollut.* 156, 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.02.007>
- Arkhipchuk, V.V., Blaise, C., Malinovskaya, M.V., 2006. Use of hydra for chronic toxicity assessment of waters intended for human consumption. *Environ. Pollut.* 142, 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.10.012>
- Arkhipchuk, V.V., Malinovskaya, M.V., Garanko, N.N., 2000. Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, and *Hydra attenuata* cells. *Environ. Toxicol.* 15, 338–344. [https://doi.org/10.1002/1522-7278\(2000\)15:4<338::AID-TOX10>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1522-7278(2000)15:4<338::AID-TOX10>3.0.CO;2-R)

- Arora, T., Bhowmik, M., Khanam, R., Vohora, D., 2013. Oxcarbazepine and fluoxetine protect against mouse models of obsessive compulsive disorder through modulation of cortical serotonin and creb pathway. *Behav. Brain Res.* 247, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.038>
- Ashfaq, M., Nawaz Khan, K., Saif Ur Rehman, M., Mustafa, G., Faizan Nazar, M., Sun, Q., Iqbal, J., Mulla, S.I., Yu, C.-P., 2017. Ecological risk assessment of pharmaceuticals in the receiving environment of pharmaceutical wastewater in Pakistan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 136, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.029>
- Asmus, K.D., Moeckel, H., Henglein, A., 1973. Pulse radiolytic study of the site of hydroxyl radical attack on aliphatic alcohols in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* 77, 1218–1221. <https://doi.org/10.1021/j100629a007>
- Atkins, P.J., Herbert, T.O., Jones, N.B., 1986. Kinetic studies on the decomposition of erythromycin A in aqueous acidic and neutral buffers. *Int. J. Pharm.* 30, 199–207. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(86\)90079-7](https://doi.org/10.1016/0378-5173(86)90079-7)
- Aydin, E., Talinli, I., 2013. Analysis, occurrence and fate of commonly used pharmaceuticals and hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey. *Chemosphere* 90, 2004–2012. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.074>
- Azzouz, A., Souhail, B., Ballesteros, E., 2010. Continuous solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry determination of pharmaceuticals and hormones in water samples. *J. Chromatogr. A* 1217, 2956–2963. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.069>
- Backhaus, T., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquat. Toxicol.* 49, 49–61.
- Baena-Nogueras, R.M., González-Mazo, E., Lara-Martín, P.A., 2017. Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters: photolysis vs biodegradation. *Sci. Total Environ.* 590–591, 643–654. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.015>
- Bahlmann, A., Brack, W., Schneider, R.J., Krauss, M., 2014. Carbamazepine and its metabolites in wastewater: Analytical pitfalls and occurrence in Germany and Portugal. *Water Res.* 57, 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.022>
- Balakrishna, K., Rath, A., Praveenkumarreddy, Y., Guruge, K.S., Subedi, B., 2017. A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 137, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.014>
- Banjac, Z., Ginebreda, A., Kuzmanovic, M., Marcé, R., Nadal, M., Riera, J.M., Barceló, D., 2015. Emission factor estimation of ca. 160 emerging organic microcontaminants by inverse modeling in a Mediterranean river basin (Llobregat, NE Spain). *Sci. Total Environ.* 520, 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.055>
- Baronti, C., Curini, R., D’Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R., 2000. Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water. *Environ. Sci. Technol.* 34, 5059–5066. <https://doi.org/10.1021/es001359q>
- Barros, H.M.T., Braz, S., Leite, J.R., 1986. Effect of Carbamazepine on Dopamine Release and Reuptake in Rat Striatal Slices. *Epilepsia* 27, 534–537. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1986.tb03579.x>
- Bassi, R., Sharma, S.S., 1993. Changes in Proline Content Accompanying the Uptake of Zinc and Copper by *Lemna minor*. *Ann. Bot.* 72, 151–154. <https://doi.org/10.1006/anbo.1993.1093>
- Bastos, S., Figueiredo, S., Matos-Delerue, C., Santos, L.H.M.L.M., 2017. Impact of venlafaxine in the growth of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*.
- Baxendale, J.H., Bevan, P.L.T., Stott, D.A., 1968. Pulse radiolysis of aqueous thiocyanate and iodide solutions. *Trans. Faraday Soc.* 64, 2389. <https://doi.org/10.1039/tf9686402389>

- Baxendale, J.H., Fielden, E.M., Capellos, C., Francis, J.M., Davies, J.V., Ebert, M., Gilbert, C.W., Keene, J.P., Land, E.J., Swallow, A.J., Nosworthy, J.M., 1964. Pulse Radiolysis. *Nature* 201, 468–470. <https://doi.org/10.1038/201468a0>
- Behar, D., Bevan, P.L.T., Scholes, G., 1972. Pulse Radiolysis of Aqueous Thiocyanate Solutions. *Nature of the Intermediate Transient Species. J. Phys. Chem.* 76, 1537–1542.
- Behar, D., Czapski, G., Duchovny, I., 1970. Carbonate radical in flash photolysis and pulse radiolysis of aqueous carbonate solutions. *J. Phys. Chem.* 74, 2206–2210.
- Białk-Bielińska, A., Stolte, S., Matzke, M., Fabiańska, A., Maszkowska, J., Kołodziejska, M., Liberek, B., Stepnowski, P., Kumirska, J., 2012. Hydrolysis of sulphonamides in aqueous solutions. *J. Hazard. Mater.* 221, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.044>
- Biel-Maeso, M., Baena-Nogueras, R.M., Corada-Fernández, C., Lara-Martín, P.A., 2018. Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). *Sci. Total Environ.* 612, 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.279>
- Bjerselius, R., Lundstedt-Enkel, K., Dimberg, K., 2001. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 β -estradiol. *Aquat. Toxicol.* 14.
- Bobbitt, J.A., Betts, R.P., 1992. The removal of bacteria from solutions by membrane filtration. *J. Microbiol. Methods* 16, 215–220. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(92\)90006-P](https://doi.org/10.1016/0167-7012(92)90006-P)
- Boix, C., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Rambla, J., Aranda, J.L., Ballester, S., Hernández, F., 2015. Fast determination of 40 drugs in water using large volume direct injection liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 131, 719–727. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.005>
- Boreen, A.L., Arnold, W.A., McNeill, K., 2004. Photochemical Fate of Sulfa Drugs in the Aquatic Environment: Sulfa Drugs Containing Five-Membered Heterocyclic Groups. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3933–3940. <https://doi.org/10.1021/es0353053>
- Böttger, A., Hassel, M., 2012. Hydra, a model system to trace the emergence of boundaries in developing eumetazoans. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 583–591. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113454ab>
- Bouchaala, L., Charchar, N., Gherib, A.E., 2017. Ressources hydriques: traitement et réutilisation des eaux usées en Algérie. *Algerian J. Arid Environ.* 7, 84–95.
- Boyle, E.S., Guerriero, N., Thiallet, A., Vecchio, R.D., Blough, N.V., 2009. Optical Properties of Humic Substances and CDOM: Relation to Structure. *Environ. Sci. Technol.* 43, 2262–2268. <https://doi.org/10.1021/es803264g>
- Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Hanson, M.L., Sanderson, H., Lam, M.W., Young, C., Mabury, S.A., Sibley, P.K., Solomon, K.R., 2004a. Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquat. Toxicol.* 70, 23–40. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.06.011>
- Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Sanderson, H., Sibley, P.K., Solomon, K.R., 2004b. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 371–382. <https://doi.org/10.1897/02-576>
- Brain, R.A., Reitsma, T.S., Lissemore, L.I., Bestari, K. (Jim), Sibley, P.K., Solomon, K.R., 2006. Herbicidal Effects of Statin Pharmaceuticals in *Lemna gibba*. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5116–5123. <https://doi.org/10.1021/es0600274>
- Brennan, S.J., Brougham, C.A., Roche, J.J., Fogarty, A.M., 2006. Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 64, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.046>
- Brezina, E., Prasse, C., Meyer, J., Mückter, H., Ternes, T.A., 2017. Investigation and risk evaluation of

- the occurrence of carbamazepine, oxcarbazepine, their human metabolites and transformation products in the urban water cycle. *Environ. Pollut.* 225, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.106>
- Brezonik, P.L., Fulkerson-Brekken, J., 1998. Nitrate-Induced Photolysis in Natural Waters: Controls on Concentrations of Hydroxyl Radical Photo-Intermediates by Natural Scavenging Agents. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3004–3010. <https://doi.org/10.1021/es9802908>
- Brigante, M., Minella, M., Mailhot, G., Maurino, V., Minero, C., Vione, D., 2014. Formation and reactivity of the dichloride radical (Cl₂⁻) in surface waters: A modelling approach. *Chemosphere* 95, 464–469. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.098>
- Brinkmann, T., Sartorius, D., Frimmel, F.H., 2003. Photobleaching of humic rich dissolved organic matter. *Aquat. Sci. - Res. Boundaries* 65, 415–424. <https://doi.org/10.1007/s00027-003-0670-9>
- Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M., La Point, T.W., 2003. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol. Lett.* 142, 169–183. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00066-3)
- Brumovský, M., Bečanová, J., Kohoutek, J., Borghini, M., Nizzetto, L., 2017. Contaminants of emerging concern in the open sea waters of the Western Mediterranean. *Environ. Pollut.* 229, 976–983. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.082>
- Bu, L., Zhou, S., Shi, Z., Bi, C., Zhu, S., Gao, N., 2017. Iron electrode as efficient persulfate activator for oxcarbazepine degradation: Performance, mechanism, and kinetic modeling. *Sep. Purif. Technol.* 178, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.007>
- Bu, L., Zhou, S., Shi, Z., Deng, L., Li, G., Yi, Q., Gao, N., 2016. Degradation of oxcarbazepine by UV-activated persulfate oxidation: kinetics, mechanisms, and pathways. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 2848–2855. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5524-1>
- Bu, Q., Wang, B., Huang, J., Deng, S., Yu, G., 2013. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review. *J. Hazard. Mater.* 262, 189–211. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.040>
- Budac, D., Wan, P., 1992. Photodecarboxylation: mechanism and synthetic utility. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 67, 135–166.
- Buxton, G.V., Elliot, A.J., 1986. Rate constant for reaction of hydroxyl radicals with bicarbonate ions. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part C Radiat. Phys. Chem.* 27, 241–243. [https://doi.org/10.1016/1359-0197\(86\)90059-7](https://doi.org/10.1016/1359-0197(86)90059-7)
- Buxton, G.V., Greenstock, C.L., Helman, W.P., Ross, A.B., 1988. Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\text{O}^-$ in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 17, 513–886. <https://doi.org/10.1063/1.555805>
- Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., 2003. Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1241–1248. <https://doi.org/10.1021/es020158e>
- Calderón-Preciado, D., Matamoros, V., Bayona, J.M., 2011. Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network. *Sci. Total Environ.* 412–413, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.057>
- Calisto, V., Domingues, M.R.M., Erny, G.L., Esteves, V.I., 2011a. Direct photodegradation of carbamazepine followed by micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry. *Water Res.* 45, 1095–1104. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.037>

- Calisto, V., Domingues, M.R.M., Esteves, V.I., 2011b. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments – Kinetics and photodegradation products. *Water Res.* 45, 6097–6106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.008>
- Calleja, M.C., Persoone, G., Geladi, P., 1994. Comparative acute toxicity of the first 50 multicentre evaluation of in vitro cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 69–78.
- Calza, P., Medana, C., Padovano, E., Giancotti, V., Baiocchi, C., 2012. Identification of the unknown transformation products derived from clarithromycin and carbamazepine using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26, 1687–1704. <https://doi.org/10.1002/rcm.6279>
- Calza, P., Vione, D., Royal Society of Chemistry (Great Britain) (Eds.), 2016. Surface water photochemistry, *Comprehensive series in photochemistry and photobiology*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Canfield, D.E., Erik Kristensen, Bo Thamdrup, 2005. The Sulfur Cycle, in: Canfield, D.E., Kristensen, E., Thamdrup, B. (Eds.), *Advances in Marine Biology, Aquatic Geomicrobiology*. Academic Press, pp. 313–381. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(05\)48009-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(05)48009-8)
- Canonica, S., Kohn, T., Mac, M., Real, F.J., Wirz, J., von Gunten, U., 2005. Photosensitizer Method to Determine Rate Constants for the Reaction of Carbonate Radical with Organic Compounds. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9182–9188. <https://doi.org/10.1021/es051236b>
- Carlos, L., Mártire, D.O., Gonzalez, M.C., Gomis, J., Bernabeu, A., Amat, A.M., Arques, A., 2012. Photochemical fate of a mixture of emerging pollutants in the presence of humic substances. *Water Res.* 46, 4732–4740. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.022>
- Carlson, J.C., Stefan, M.I., Parnis, J.M., Metcalfe, C.D., 2015. Direct UV photolysis of selected pharmaceuticals, personal care products and endocrine disruptors in aqueous solution. *Water Res.* 84, 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.04.013>
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R., Zuccato, E., 2005. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J. Chromatogr. A* 1092, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.012>
- Celano, R., Piccinelli, A.L., Campone, L., Rastrelli, L., 2014. Ultra-preconcentration and determination of selected pharmaceutical and personal care products in different water matrices by solid-phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction prior to ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A* 1355, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.009>
- Charbouillot, T., Brigante, M., Mailhot, G., Maddigapu, P.R., Minero, C., Vione, D., 2011. Performance and selectivity of the terephthalic acid probe for OH as a function of temperature, pH and composition of atmospherically relevant aqueous media. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 222, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.05.003>
- Chauhan, N.R., Kapoor, M., Prabha Singh, L., Gupta, R.K., Chand Meena, R., Tulsawani, R., Nanda, S., Bala Singh, S., 2017. Heat stress-induced neuroinflammation and aberration in monoamine levels in hypothalamus are associated with temperature dysregulation. *Neuroscience* 358, 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.06.023>
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V., Martens, S., 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem., Plant Phenolics: biosynthesis, genetics, and ecophysiology* 72, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>
- Chin, Y.-P., Miller, P.L., Zeng, L., Cawley, K., Weavers, L.K., 2004. Photosensitized Degradation of

- Bisphenol A by Dissolved Organic Matter †. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5888–5894. <https://doi.org/10.1021/es0496569>
- Chiron, S., Minero, C., Vione, D., 2006. Photodegradation Processes of the Antiepileptic Drug Carbamazepine, Relevant To Estuarine Waters. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5977–5983. <https://doi.org/10.1021/es060502y>
- Choubert, J.M., Penru, Y., Mathon, B., Guillon, A., Esperanza, M., Crétollier, C., Dherret, L., Daval, A., Masson, M., Lagarrigue, C., Miège, C., Coquery, M., 2017. Elimination de substances prioritaires et émergentes des eaux résiduaires urbaines par ozonation : évaluations technique, énergétique, environnementale. Rapport final du projet MICROPOLIS-PROCEDES 167.
- Christensen, A.M., Ingerslev, F., Baun, A., 2006. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2208–2215.
- Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142, 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00068-7)
- Cleuvers, M., 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 309–315. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00141-6)
- Cleuvers, M., 2005. Initial risk assessment for three β -blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* 59, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.090>
- Collado, N., Rodriguez-Mozaz, S., Gros, M., Rubirola, A., Barceló, D., Comas, J., Rodriguez-Roda, I., Buttiglieri, G., 2014. Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system. *Environ. Pollut.* 185, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.040>
- Colman, J.R., Baldwin, D., Johnson, L.L., Scholz, N.L., 2009. Effects of the synthetic estrogen, 17 α -ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 91, 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.12.001>
- Comoretto, L., Chiron, S., 2005. Comparing pharmaceutical and pesticide loads into a small Mediterranean river. *Sci. Total Environ.* 349, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.01.036>
- Cottrell, B.A., Timko, S.A., Devera, L., Robinson, A.K., Gonsior, M., Vizenor, A.E., Simpson, A.J., Cooper, W.J., 2013. Photochemistry of excited-state species in natural waters: A role for particulate organic matter. *Water Res.* 47, 5189–5199. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.059>
- Czech, B., Joško, I., Oleszczuk, P., 2014. Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* before and after photooxidation process. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.024>
- Da Silva, E.S., Wong-Wah-Chung, P., Sarakha, M., Burrows, H.D., 2013. Photophysical characterization of the plant growth regulator 2-(1-naphthyl) acetamide. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 265, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2013.05.009>
- Dalla Bona, M., Zounková, R., Merlanti, R., Blaha, L., De Liguoro, M., 2015. Effects of enrofloxacin, ciprofloxacin, and trimethoprim on two generations of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.018>
- Dasenaki, M.E., Thomaidis, N.S., 2015. Multianalyte method for the determination of pharmaceuticals in wastewater samples using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 4229–4245. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8654-x>
- Dash, B., Phillips, T.D., 2012. Molecular characterization of a catalase from *Hydra vulgaris*. *Gene* 501, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.015>

- Daumalin, X., Laffont-Schwob, I., 2016. Les Calanques industrielles de Marseille et leurs pollutions: une histoire au présent = Pollution of Marseille's industrial Calanques : the impact of the past on the present. REF. 2C, Aix-en-Provence.
- Dave, G., Herger, G., 2012. Determination of detoxification to *Daphnia magna* of four pharmaceuticals and seven surfactants by activated sludge. *Chemosphere* 88, 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.070>
- de Jong, L., Pech, N., de Aragão Umbuzeiro, G., Moreau, X., 2016. Multi-scale biomarker evaluation of the toxicity of a commercial azo dye (Disperse Red 1) in an animal model, the freshwater cnidarian *Hydra attenuata*. *Water Res.* 96, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.043>
- De Laurentiis, E., Chiron, S., Kouras-Hadef, S., Richard, C., Minella, M., Maurino, V., Minero, C., Vione, D., 2012a. Photochemical Fate of Carbamazepine in Surface Freshwaters: Laboratory Measures and Modeling. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8164–8173. <https://doi.org/10.1021/es3015887>
- De Laurentiis, E., Minella, M., Maurino, V., Minero, C., Mailhot, G., Sarakha, M., Brigante, M., Vione, D., 2012. Assessing the occurrence of the dibromide radical (Br₂⁻) in natural waters: Measures of triplet-sensitised formation, reactivity, and modelling. *Sci. Total Environ.* 439, 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.037>
- De Liguoro, M., Di Leva, V., Dalla Bona, M., Merlanti, R., Caporale, G., Radaelli, G., 2012. Sublethal effects of trimethoprim on four freshwater organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 82, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.05.016>
- De Liguoro, M., Fioretto, B., Poltronieri, C., Gallina, G., 2009. The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimethoprim. *Chemosphere* 75, 1519–1524. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.002>
- de Oliveira, L.L.D., Antunes, S.C., Gonçalves, F., Rocha, O., Nunes, B., 2016. Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna*. *Drug Chem. Toxicol.* 39, 13–21. <https://doi.org/10.3109/01480545.2015.1029048>
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., 2011. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>
- Donner, E., Kosjek, T., Qualmann, S., Kusk, K.O., Heath, E., Revitt, D.M., Ledin, A., Andersen, H.R., 2013. Ecotoxicity of carbamazepine and its UV photolysis transformation products. *Sci. Total Environ.* 443, 870–876. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.059>
- Dorfman, L.M., Adams, G.E., 1973. Reactivity of the hydroxyl radical in aqueous solutions (No. NBS NSRDS 46). National Bureau of Standards, Gaithersburg, MD. <https://doi.org/10.6028/NBS.NSRDS.46>
- Dotan, P., Godinger, T., Odeh, W., Groisman, L., Al-Khateeb, N., Rabbo, A.A., Tal, A., Arnon, S., 2016. Occurrence and fate of endocrine disrupting compounds in wastewater treatment plants in Israel and the Palestinian West Bank. *Chemosphere* 155, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.027>
- Du, J., Mei, C.-F., Ying, G.-G., Xu, M.-Y., 2016. Toxicity Thresholds for Diclofenac, Acetaminophen and Ibuprofen in the Water Flea *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 84–90. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1806-7>
- Du, L., Xu, Y., Musson, D.G., 2003. Simultaneous determination of clofibrate and its active metabolite clofibrac acid in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. B* 794, 343–351. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00500-2](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00500-2)

- Dulin, D., Mill, T., 1982. Development and evaluation of sunlight actinometers. *Environ. Sci. Technol.* 16, 815–820. <https://doi.org/10.1021/es00105a017>
- Dussault, È.B., Balakrishnan, V.K., Sverko, E., Solomon, K.R., Sibley, P.K., 2008. Toxicity of human pharmaceuticals and personal care products to benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 425–432. <https://doi.org/10.1897/07-354R.1>
- Dzialowski, E.M., Turner, P.K., Brooks, B.W., 2006. Physiological and Reproductive Effects of Beta Adrenergic Receptor Antagonists in *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 503–510. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0121-9>
- Ebert, I., Bachmann, J., Kühnen, U., Küster, A., Kussatz, C., Maletzki, D., Schlüter, C., 2011. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2786–2792. <https://doi.org/10.1002/etc.678>
- Eguchi, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y.S., Goto, K., Hirata, K., Miyamoto, K., Yoshimura, H., 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere* 57, 1733–1738. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.07.017>
- El-Serehy, H.A., Aboulela, H., Al-Misned, F., Kaiser, M., Al-Rasheid, K., El-Din, H.E., 2012. Heavy metals contamination of a Mediterranean coastal ecosystem, Eastern Nile Delta, Egypt. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 12.
- Elphick, M., 1989. Effects of carbamazepine on dopamine function in rodents. *Psychopharmacology (Berl.)* 99, 532–536. <https://doi.org/10.1007/BF00589904>
- Escher, B.I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., McArdell, C.S., 2011. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res.* 45, 75–92. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.019>
- Esteban, S., Gorga, M., Petrovic, M., González-Alonso, S., Barceló, D., Valcárcel, Y., 2014. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. *Sci. Total Environ.* 466–467, 939–951. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.101>
- EU, 2015. Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (notified under document C(2015) 1756) Text with EEA relevance.
- European Commission, 2011. Technical guidance for deriving environmental quality standards No 27. No 27. Publications Office, Luxembourg.
- Eurostat, 2017. International trade in medicinal and pharmaceutical products - Statistics Explained [WWW Document]. URL http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/International_trade_in_medicinal_and_pharmaceutical_products#Further_Eurostat_information (accessed 1.20.18).
- Evgenidou, E.N., Konstantinou, I.K., Lambropoulou, D.A., 2015. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review. *Sci. Total Environ.* 505, 905–926. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.021>
- Farré, M., Ferrer, I., Ginebreda, A., Figueras, M., Olivella, L., Tirapu, L., Vilanova, M., Barceló, D., 2001. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J. Chromatogr. A*, 10th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography 938, 187–197. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01154-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01154-2)

- Farrell, J., 2012. Duckweed Uptake of Phosphorus and Five Pharmaceuticals: Microcosm and Wastewater Lagoon Studies. Grad. Theses Diss.
- Faust, B.C., 1999. Aquatic Photochemical Reactions in Atmospheric, Surface, and Marine Waters: Influences on Oxidant Formation and Pollutant Degradation, in: Boule, P. (Ed.), *Environmental Photochemistry*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 101–122. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69044-3_4
- Faust, B.C., Hoigné, J., 1990. Photolysis of Fe (III)-hydroxy complexes as sources of OH radicals in clouds, fog and rain. *Atmospheric Environ. Part Gen. Top.* 24, 79–89.
- Faust, B.C., Zepp, R.G., 1993. Photochemistry of aqueous iron(III)-polycarboxylate complexes: roles in the chemistry of atmospheric and surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2517–2522. <https://doi.org/10.1021/es00048a032>
- Feitosa-Felizzola, J., Chiron, S., 2009. Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France). *J. Hydrol.* 364, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.10.006>
- Fekete-Kertész, I., Kunglné-Nagy, Z., Gruiz, K., Magyar, Á., Farkas, É., Molnár, M., 2015. Assessing toxicity of organic aquatic micropollutants based on the total chlorophyll content of *Lemna minor* as a sensitive endpoint. *Period. Polytech. Chem. Eng.* 59, 262–271. <https://doi.org/10.3311/PPch.8077>
- Fenet, H., Arpin-Pont, L., Vanhoutte-Brunier, A., Munaron, D., Fiandrino, A., Martínez Bueno, M.-J., Boillot, C., Casellas, C., Mathieu, O., Gomez, E., 2014. Reducing PEC uncertainty in coastal zones: A case study on carbamazepine, oxcarbazepine and their metabolites. *Environ. Int.* 68, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.025>
- Fenet, H., Mathieu, O., Mahjoub, O., Li, Z., Hillaire-Buys, D., Casellas, C., Gomez, E., 2012. Carbamazepine, carbamazepine epoxide and dihydroxycarbamazepine sorption to soil and occurrence in a wastewater reuse site in Tunisia. *Chemosphere* 88, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.050>
- Feng, W., Nansheng, D., 2000. Photochemistry of hydrolytic iron (III) species and photoinduced degradation of organic compounds. A minireview. *Chemosphere* 41, 1137–1147. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00024-2)
- Fent, K, Weston, A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2014. Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: From hospital effluents through urban wastewater to natural environment. *Environ. Pollut.* 193, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.07.002>
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéaus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garric, J., 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1344–1354.
- Ferrari, B., Paxeus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garric, J., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 359–370.
- Ferrer, I., Zweigenbaum, J.A., Thurman, E.M., 2010. Analysis of 70 Environmental Protection Agency priority pharmaceuticals in water by EPA Method 1694. *J. Chromatogr. A* 1217, 5674–5686. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.002>
- Foran, C.M., Weston, J., Slattery, M., Brooks, B.W., Huggett, D.B., 2004. Reproductive Assessment of

- Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Following a Four-Week Fluoxetine (SSRI) Exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-3042-5>
- Fraysse, B., Garric, J., 2005. Prediction and experimental validation of acute toxicity of β -blockers in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2470–2476. <https://doi.org/10.1897/04-541R.1>
- Fu, L., Huang, T., Wang, S., Wang, X., Su, L., Li, C., Zhao, Y., 2017. Toxicity of 13 different antibiotics towards freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and their modes of action. *Chemosphere* 168, 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.043>
- Fujisawa, T., 2003. Hydra regeneration and epitheliopeptides. *Dev. Dyn.* 226, 182–189. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10221>
- Galliot, B., 2012. Hydra, a fruitful model system for 270 years. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 411–423. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120086bg>
- Gangwang, Liu, G., Liu, H., Zhang, N., Wang, Y., 2012. Photodegradation of salicylic acid in aquatic environment: Effect of different forms of nitrogen. *Sci. Total Environ.* 435, 573–577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.068>
- García-Galán, M.J., Anfruns, A., Gonzalez-Olmos, R., Rodríguez-Mozaz, S., Comas, J., 2016. UV/H₂O₂ degradation of the antidepressants venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine: Elucidation of their transformation pathway and environmental fate. *J. Hazard. Mater.* 311, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.02.070>
- García-Galán, M.J., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2010. Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPE-LC–MS/MS). *Talanta* 81, 355–366. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.12.009>
- García-Galán, M.J., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2011. Occurrence of sulfonamide residues along the Ebro river basin Removal in wastewater treatment plants and environmental impact assessment. *Environ. Int.* 37, 462–473. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.11.011>
- Geddes, C.D., 2001. Optical halide sensing using fluorescence quenching: theory, simulations and applications - a review. *Meas. Sci. Technol.* 12, R53. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/12/9/201>
- Ghiron, C., Bazin, M., Santus, R., 1988. Determination of the acrylamide quenching constant for protein and model indole triplets. *Photochem. Photobiol.* 48, 539–543. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1988.tb02858.x>
- Godoy, A.A., Kummrow, F., Pamplin, P.A.Z., 2015a. Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment - A review. *Chemosphere* 138, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.024>
- Godoy, A.A., Kummrow, F., Pamplin, P.A.Z., 2015b. Ecotoxicological evaluation of propranolol hydrochloride and losartan potassium to *Lemna minor* L. (1753) individually and in binary mixtures. *Ecotoxicology* 24, 1112–1123. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1455-3>
- Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V.K., Tushara Chaminda, G.G., An, A.K., Kumar, M., 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundw. Sustain. Dev.* 6, 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>
- Gómez, M.J., Martínez Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A.R., Agüera, A., 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* 66, 993–1002. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.051>
- Gordon, S., Hart, E.J., Matheson, M.S., Rabani, J., Thomas, J.K., 1963. Reaction constants of the hydrated electron. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 1375–1377.

- Graafland, T., Wagenaar, A., Kirby, A.J., Engberts, J.B.F.N., 1979. Structure and reactivity in intramolecular catalysis. Catalysis of sulfonamide hydrolysis by the neighboring carboxyl group. *J. Am. Chem. Soc.* 101, 6981–6991. <https://doi.org/10.1021/ja00517a034>
- Gracia-Lor, E., Sancho, J.V., Serrano, R., Hernández, F., 2012. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere* 87, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.025>
- Grebel, J.E., Pignatello, J.J., Mitch, W.A., 2012. Impact of Halide Ions on Natural Organic Matter-Sensitized Photolysis of 17 β -Estradiol in Saline Waters. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7128–7134. <https://doi.org/10.1021/es3013613>
- Greskowiak, J., Prommer, H., Massmann, G., Nützmann, G., 2006. Modeling Seasonal Redox Dynamics and the Corresponding Fate of the Pharmaceutical Residue Phenazone During Artificial Recharge of Groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6615–6621. <https://doi.org/10.1021/es052506t>
- 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>
- Gros, M., Petrović, M., Barceló, D., 2007. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (Northeast Spain). *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1553–1562. <https://doi.org/10.1897/06-495R.1>
- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2012. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1248, 104–121. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.084>
- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2013. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1292, 173–188. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.072>
- Guigue, C., Tedetti, M., Giorgi, S., Goutx, M., 2011. Occurrence and distribution of hydrocarbons in the surface microlayer and subsurface water from the urban coastal marine area off Marseilles, Northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2741–2752. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.013>
- Gürlük, S., 2009. Economic growth, industrial pollution and human development in the Mediterranean Region. *Ecol. Econ.* 68, 2327–2335. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2009.03.001>
- Haag, W.R., Hoigné, J., 1985. Photo-sensitized oxidation in natural water via .OH radicals. *Chemosphere* 14, 1659–1671. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(85\)90107-9](https://doi.org/10.1016/0045-6535(85)90107-9)
- Halling-Sorensen, B., 2000. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 53–58. https://doi.org/10.1093/jac/46.suppl_1.53
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H.C., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere* 36, 357–393. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00354-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00354-8)
- Han, G.H., Hur, H.G., Kim, S.D., 2006. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 265–271.

- Han, S., Choi, Kyungho, Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., Yun, J., Choi, Kyunghee, Khim, J.S., Zhang, X., 2010. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat. Toxicol.* 98, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.013>
- Hanai, K., Kitajima, M., 1984. Two types of surface amine receptors modulating the feeding response in *Hydra japonica* : the depressing action of dopamine and related amines. *Chem. Senses* 9, 355–367. <https://doi.org/10.1093/chemse/9.4.355>
- Harada, A., Komori, K., Nakada, N., Kitamura, K., Suzuki, Y., 2008. Biological effects of PPCPs on aquatic lives and evaluation of river waters affected by different wastewater treatment levels. *Water Sci. Technol.* 58, 1541. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.742>
- Hasegawa, K., Neta, P., 1978. Rate constants and mechanisms of reaction of chloride (Cl⁻) radicals. *J. Phys. Chem.* 82, 854–857. <https://doi.org/10.1021/j100497a003>
- Heckmann, L., Callaghan, A., Hooper, H., Connon, R., Hutchinson, T., Maund, S., Sibly, R., 2007. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicol. Lett.* 172, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.06.001>
- Heckmann, L., Connon, R., Hooper, H., Maund, S., Hutchinson, T., Sibly, R., Callaghan, A., 2005. Molecular and population stress responses of *Daphnia magna* exposed to ibuprofen.
- Henschel, K.-P., Wenzel, A., Diedrich, M., Fliedner, A., 1997. Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 25, 220–225.
- Hernando, M.D., Petrovic, M., Fernández-Alba, A.R., Barceló, D., 2004. Analysis by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for β -blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples. *J. Chromatogr. A* 1046, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.102>
- Hillman, W.S., 1970. Carbon dioxide output as an index of circadian timing in *Lemna photoperiodism*. *Plant Physiol.* 45, 273–279.
- Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Girard, J.-P., 2004. Effect of three xenobiotic compounds on Glutathione S-Transferase in the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Toxicol.* 68, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.001>
- Holm, J.V., Ruegge, K., Bjerg, P.L., Christensen, T.H., 1995. Occurrence and Distribution of Pharmaceutical Organic Compounds in the Groundwater Downgradient of a Landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Sci. Technol.* 29, 1415–1420. <https://doi.org/10.1021/es00005a039>
- Horio, T., Shen, H., Adachi, S., Suzuki, T., 2012. Photoelectron spectra of solvated electrons in bulk water, methanol, and ethanol. *Chem. Phys. Lett.* 535, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2012.03.051>
- Hosmane, R.S., Liebman, J.F., 2009. Paradoxes and paradigms: why is quinoline less basic than pyridine or isoquinoline? A classical organic chemical perspective. *Struct. Chem.* 20, 693–697. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9464-6>
- Housari, F. al, Vione, D., Chiron, S., Barbati, S., 2010. Reactive photoinduced species in estuarine waters. Characterization of hydroxyl radical, singlet oxygen and dissolved organic matter triplet state in natural oxidation processes. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 78–86. <https://doi.org/10.1039/B9PP00030E>
- Hu, L., Martin, H.M., Arce-Bulted, O., Sugihara, M.N., Keating, K.A., Strathmann, T.J., 2009. Oxidation of Carbamazepine by Mn(VII) and Fe(VI): Reaction Kinetics and Mechanism. *Environ. Sci. Technol.* 43, 509–515. <https://doi.org/10.1021/es8023513>
- Huang, J., Mabury, S.A., 2000a. Steady-state concentrations of carbonate radicals in field waters.

- Environ. Toxicol. Chem. 19, 2181–2188.
- Huang, J., Mabury, S.A., 2000b. The role of carbonate radical in limiting the persistence of sulfur-containing chemicals in sunlit natural waters. *Chemosphere* 41, 1775–1782. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00042-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00042-4)
- Huber, M.M., Canonica, S., Park, G.-Y., von Gunten, U., 2003. Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation and Advanced Oxidation Processes. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1016–1024. <https://doi.org/10.1021/es025896h>
- Hübner, U., Seiwert, B., Reemtsma, T., Jekel, M., 2014. Ozonation products of carbamazepine and their removal from secondary effluents by soil aquifer treatment – Indications from column experiments. *Water Res.* 49, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.11.016>
- Huertas, E., Folch, M., Salgot, M., Gonzalvo, I., Passarell, C., 2006. Constructed wetlands effluent for streamflow augmentation in the Besòs River (Spain). *Desalination, Integrated Concepts in Water Recycling* 188, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.04.111>
- Hug, G.L., 1981. Optical spectra of nonmetallic inorganic transient species in aqueous solution 172.
- Huggett, D.B., Brooks, B.W., Peterson, B., Foran, C.M., Schlenk, D., 2002. Toxicity of Select Beta Adrenergic Receptor-Blocking Pharmaceuticals (B-Blockers) on Aquatic Organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 229–235. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1182-7>
- Huie, R.E., Clifton, C.L., Neta, P., 1991. Electron transfer reaction rates and equilibria of the carbonate and sulfate radical anions. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part C Radiat. Phys. Chem.* 38, 477–481. [https://doi.org/10.1016/1359-0197\(91\)90065-A](https://doi.org/10.1016/1359-0197(91)90065-A)
- Huie, R.E., Neta, P., 1985. One-electron redox reactions in aqueous solutions of sulfite with hydroquinone and other hydroxyphenols. *J. Phys. Chem.* 89, 3918–3921. <https://doi.org/10.1021/j100264a032>
- Hurley, J.K., Linschitz, H., Treinin, A., 1988. Interaction of halide and pseudohalide ions with triplet benzophenone-4-carboxylate: kinetics and radical yields. *J. Phys. Chem.* 92, 5151–5159. <https://doi.org/10.1021/j100329a019>
- Hutt, A.J., Caldwell, J., Smith, R.L., 1986. The metabolism of aspirin in man: a population study. *Xenobiotica* 16, 239–249. <https://doi.org/10.3109/00498258609043527>
- Iatrou, E.I., Gatidou, G., Damalas, D., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., 2017. Fate of antimicrobials in duckweed Lemna minor wastewater treatment systems. *J. Hazard. Mater.* 330, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.005>
- Ioelle, G., De Luca, M., Ragno, G., 2016. Acute Toxicity of Antibiotics in Surface Waters by Bioluminescence Test. *Curr. Pharm. Anal.* 12, 220–226. <https://doi.org/10.2174/1573412912666151110204041>
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtiera, L., Rubino, M., 2005a. Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Sci. Total Environ.* 348, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.068>
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A., 2005b. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci. Total Environ.* 346, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.11.017>
- Isidori, M., Nardelli, A., Parrella, A., Pascarella, L., Previtiera, L., 2006. A multispecies study to assess the toxic and genotoxic effect of pharmaceuticals: Furosemide and its photoproduct. *Chemosphere* 63, 785–793. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.078>
- Isidori, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Rubino, M., Parrella, A., 2007. Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms. *Environ. Int.* 33, 635–641.

- <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.01.006>
- Isidori, M., Parrella, A., Pistillo, P., Temussi, F., 2009. Effects of ranitidine and its photoderivatives in the aquatic environment. *Environ. Int.* 35, 821–825. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.12.002>
- Jammoul, A., Dumas, S., D'anna, B., George, C., 2009. Photoinduced oxidation of sea salt halides by aromatic ketones: a source of halogenated radicals. *Atmospheric Chem. Phys.* 9, 4229–4237.
- Jasper, J.T., Sedlak, D.L., 2013. Phototransformation of wastewater-derived trace organic contaminants in open-water unit process treatment wetlands. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10781–10790. <https://doi.org/10.1021/es304334w>
- Jayson, G.G., Parsons, B.J., Swallow, A.J., 1973. Some simple, highly reactive, inorganic chlorine derivatives in aqueous solution. Their formation using pulses of radiation and their role in the mechanism of the Fricke dosimeter. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* 69, 1597–1607. <https://doi.org/10.1039/F19736901597>
- Jelic, A., Cruz-Morató, C., Marco-Urrea, E., Sarrà, M., Perez, S., Vicent, T., Petrović, M., Barcelo, D., 2012. Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates. *Water Res.* 46, 955–964. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.063>
- Jelic, A., Michael, I., Achilleos, A., Hapeshi, E., Lambropoulou, D., Perez, S., Petrovic, M., Fatta-Kassinos, D., Barcelo, D., 2013. Transformation products and reaction pathways of carbamazepine during photocatalytic and sonophotocatalytic treatment. *J. Hazard. Mater.* 263, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.068>
- Ji, J.-Y., Xing, Y.-J., Ma, Z.-T., Zhang, M., Zheng, P., 2013. Acute toxicity of pharmaceutical wastewaters containing antibiotics to anaerobic digestion treatment. *Chemosphere* 91, 1094–1098. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.009>
- Jiang, M., Wang, L., Ji, R., 2010. Biotic and abiotic degradation of four cephalosporin antibiotics in a lake surface water and sediment. *Chemosphere* 80, 1399–1405. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.048>
- Jukosky, J.A., Watzin, M.C., Leiter, J.C., 2008. Elevated Concentrations of Ethinylestradiol, 17 β -Estradiol, and Medroxyprogesterone have Little Effect on Reproduction and Survival of *Ceriodaphnia dubia*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81, 230–235. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9462-1>
- Jung, J., Kim, Y., Kim, J., Jeong, D.-H., Choi, K., 2008. Environmental levels of ultraviolet light potentiate the toxicity of sulfonamide antibiotics in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 17, 37–45. <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0174-9>
- Kaiser, E., Prasse, C., Wagner, M., Bröder, K., Ternes, T.A., 2014. Transformation of Oxcarbazepine and Human Metabolites of Carbamazepine and Oxcarbazepine in Wastewater Treatment and Sand Filters. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10208–10216. <https://doi.org/10.1021/es5024493>
- Kalachandra, S., Farhataziz, 1980. Reaction parameters of the solvated electron in diffusion controlled reactions in polar solvents. *Chem. Phys. Lett.* 73, 465–468. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(80\)80696-8](https://doi.org/10.1016/0009-2614(80)80696-8)
- Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H., Honjo, T., 2002. Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 47, 71–80.
- Kashian, D.R., Dodson, S.I., 2004. Effects of vertebrate hormones on development and sex determination in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1282–1288.
- Kaza, M., Nalecz-Jawecki, G., Sawicki, J., 2007. The toxicity of selected pharmaceuticals to the aquatic

- plant *Lemna minor*. *Fresenius Environ. Bull.* 16, 524–531.
- Kermia, A.E.B., Fouial-Djebbar, D., Trari, M., 2016. Occurrence, fate and removal efficiencies of pharmaceuticals in wastewater treatment plants (WWTPs) discharging in the coastal environment of Algiers. *Comptes Rendus Chim.* 19, 963–970. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.05.005>
- Kim, J.-W., Ishibashi, H., Yamauchi, R., Ichikawa, N., Takao, Y., Hirano, M., Koga, M., Arizono, K., 2009. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *J. Toxicol. Sci.* 34, 227–232.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P.-G., Park, J., 2007. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environ. Int.* 33, 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.017>
- Kolz, A.C., Moorman, T.B., Ong, S.K., Scoggin, K.D., Douglass, E.A., 2005. Degradation and Metabolite Production of Tylosin in Anaerobic and Aerobic Swine-Manure Lagoons. *Water Environ. Res.* 77, 49–56. <https://doi.org/10.2175/106143005X41618>
- Kondo, T., 1989. Comparison of Phase Shifts of the Circadian Rhythm of K⁺ Uptake in *Lemna gibba* G3 by Various Amino Acid Analogs. *Plant Physiol.* 90, 1600–1608. <https://doi.org/10.1104/pp.90.4.1600>
- Kookana, R.S., Williams, M., Boxall, A.B.A., Larsson, D.G.J., Gaw, S., Choi, K., Yamamoto, H., Thatikonda, S., Zhu, Y.-G., Carriquiriborde, P., 2014. Potential ecological footprints of active pharmaceutical ingredients: an examination of risk factors in low-, middle- and high-income countries. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130586–20130586. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0586>
- Kosjek, T., Andersen, H.R., Kompare, B., Ledin, A., Heath, E., 2009. Fate of Carbamazepine during Water Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6256–6261. <https://doi.org/10.1021/es900070h>
- Kosma, C.I., Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2010. Occurrence and removal of PPCPs in municipal and hospital wastewaters in Greece. *J. Hazard. Mater.* 179, 804–817. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.075>
- Koumaki, E., Mamais, D., Noutsopoulos, C., Nika, M.-C., Bletsou, A.A., Thomaidis, N.S., Eftaxias, A., Stratogianni, G., 2015. Degradation of emerging contaminants from water under natural sunlight: The effect of season, pH, humic acids and nitrate and identification of photodegradation by-products. *Chemosphere* 138, 675–681. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.033>
- Koutsouba, V., Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D., Hiskia, A., 2003. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography–mass spectrometry. *Chemosphere* 51, 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00819-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00819-6)
- Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V., 2000. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40, 701–710.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., Barceló, D., 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *J. Hydrol.* 358, 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.05.030>
- Labatut, M., Lacan, F., Pradoux, C., Chmeleff, J., Radic, A., Murray, J.W., Poitrasson, F., Johansen, A.M., Thil, F., 2014. Iron sources and dissolved-particulate interactions in the seawater of the Western Equatorial Pacific, iron isotope perspectives. *Glob. Biogeochem. Cycles* 28, 1044–1065. <https://doi.org/10.1002/2014GB004928>

- Lacey, C., McMahon, G., Bones, J., Barron, L., Morrissey, A., Tobin, J.M., 2008. An LC–MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Talanta* 75, 1089–1097. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.011>
- Lam, M.W., Mabury, S.A., 2005. Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquat. Sci.* 67, 177–188. <https://doi.org/10.1007/s00027-004-0768-8>
- Lamichhane, K., Garcia, S.N., Huggett, D.B., DeAngelis, D.L., La Point, T.W., 2013. Chronic Effects of Carbamazepine on Life-History Strategies of *Ceriodaphnia dubia* in Three Successive Generations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 427–438. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9845-5>
- Láng, J., Kőhidai, L., 2012. Effects of the aquatic contaminant human pharmaceuticals and their mixtures on the proliferation and migratory responses of the bioindicator freshwater ciliate *Tetrahymena*. *Chemosphere* 89, 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.058>
- Lanzky, P.F., Halting-Sørensen, B., 1997. The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. *Chemosphere* 35, 2553–2561. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00324-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00324-X)
- Larson, R.A., Zepp, R.G., 1988. Reactivity of the carbonate radical with aniline derivatives. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 265–274.
- Laszakovits, J.R., Berg, S.M., Anderson, B.G., O'Brien, J.E., Wammer, K.H., Sharpless, C.M., 2017. p-Nitroanisole/Pyridine and p-Nitroacetophenone/Pyridine Actinometers Revisited: Quantum Yield in Comparison to Ferrioxalate. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 4, 11–14. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.6b00422>
- Lattanzio, V., 2013. Phenolic Compounds: Introduction, in: Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M. (Eds.), *Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1543–1580. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_57
- Leclercq, M., Mathieu, O., Gomez, E., Casellas, C., Fenet, H., Hillaire-Buys, D., 2009. Presence and Fate of Carbamazepine, Oxcarbazepine, and Seven of Their Metabolites at Wastewater Treatment Plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 408. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9202-x>
- Leenheer, J.A., Croué, J.-P., 2003. Peer Reviewed: Characterizing Aquatic Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 37, 18A-26A. <https://doi.org/10.1021/es032333c>
- Lekkerkerker-Teunissen, K., Benotti, M.J., Snyder, S.A., van Dijk, H.C., 2012. Transformation of atrazine, carbamazepine, diclofenac and sulfamethoxazole by low and medium pressure UV and UV/H₂O₂ treatment. *Sep. Purif. Technol.* 96, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.04.018>
- Li, M., Wei, D., Du, Y., 2014. Acute toxicity evaluation for quinolone antibiotics and their chlorination disinfection processes. *J. Environ. Sci.* 26, 1837–1842. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.06.023>
- Li, W.C., 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ. Pollut.* 187, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.015>
- Li, Y., Qiao, X., Zhang, Y., Zhou, C., Xie, H., Chen, J., 2016a. Effects of halide ions on photodegradation of sulfonamide antibiotics: Formation of halogenated intermediates. *Water Res.* 102, 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.054>
- Li, Y., Qiao, X., Zhou, C., Zhang, Y., Fu, Z., Chen, J., 2016b. Photochemical transformation of sunscreen agent benzophenone-3 and its metabolite in surface freshwater and seawater. *Chemosphere* 153, 494–499. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.080>
- Li, Z., Fenet, H., Gomez, E., Chiron, S., 2011. Transformation of the antiepileptic drug oxcarbazepine upon different water disinfection processes. *Water Res.* 45, 1587–1596. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.038>
- Lilius, H., Hästbacka, T., Isomaa, B., 1995. A comparison of the toxicity of 30 reference chemicals to

- Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 2085–2088.
- Lilius, H., Isomaa, B., Holmström, T., 1994. A comparison of the toxicity of 50 reference chemicals to freshly isolated rainbow trout hepatocytes and *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 30, 47–60.
- Liu, H.-Q., Lam, J.C.W., Li, W.-W., Yu, H.-Q., Lam, P.K.S., 2017. Spatial distribution and removal performance of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment plants in China. *Sci. Total Environ.* 586, 1162–1169. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.107>
- Liu, J.-L., Wong, M.-H., 2013. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. *Environ. Int.* 59, 208–224. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.012>
- Loeff, I., Rabani, J., Treinin, A., Linschitz, H., 1993. Charge transfer and reactivity of n. pi.* and pi.. pi.* organic triplets, including anthraquinonesulfonates, in interactions with inorganic anions: a comparative study based on classical Marcus theory. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 8933–8942.
- Lolić, A., Paíga, P., Santos, L.H.M.L.M., Ramos, S., Correia, M., Delerue-Matos, C., 2015. Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: Occurrence and environmental risk. *Sci. Total Environ.* 508, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.097>
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G., 2009. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* 157, 561–568. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.09.020>
- Loos, R., Tavazzi, S., Paracchini, B., Canuti, E., Weissteiner, C., 2013. Analysis of polar organic contaminants in surface water of the northern Adriatic Sea by solid-phase extraction followed by ultrahigh-pressure liquid chromatography–QTRAP® MS using a hybrid triple-quadrupole linear ion trap instrument. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 5875–5885. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6944-8>
- Lopes-Rocha, M., Langone, L., Miserocchi, S., Giordano, P., Guerra, R., 2017. Detecting long-term temporal trends in sediment-bound metals in the western Adriatic (Mediterranean Sea). *Mar. Pollut. Bull.* 124, 270–285. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.026>
- López-Roldán, R., de Alda, M.L., Gros, M., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., Barceló, D., 2010. Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography–triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography–time of flight-mass spectrometry. *Chemosphere* 80, 1337–1344. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.042>
- López-Serna, R., Petrović, M., Barceló, D., 2012. Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). *Sci. Total Environ.* 440, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.027>
- Lutze, H.V., Bakkour, R., Kerlin, N., von Sonntag, C., Schmidt, T.C., 2014. Formation of bromate in sulfate radical based oxidation: Mechanistic aspects and suppression by dissolved organic matter. *Water Res.* 53, 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.001>
- Lützhøft, H.-C.H., Halling-Sørensen, B., Jørgensen, S.E., 1999. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 1–6.
- Maddigapu, P.R., Bedini, A., Minero, C., Maurino, V., Vione, D., Brigante, M., Mailhot, G., Sarakha, M., 2010. The pH-dependent photochemistry of anthraquinone-2-sulfonate. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 323. <https://doi.org/10.1039/b9pp00103d>
- Madikizela, L.M., Tavengwa, N.T., Chimuka, L., 2017. Status of pharmaceuticals in African water bodies: Occurrence, removal and analytical methods. *J. Environ. Manage.* 193, 211–220.

- <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.02.022>
- Mahdi Ahmed, M., Barbati, S., Doumenq, P., Chiron, S., 2012. Sulfate radical anion oxidation of diclofenac and sulfamethoxazole for water decontamination. *Chem. Eng. J.* 197, 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.040>
- Mahdi Ahmed, M., Chiron, S., 2014. Solar photo-Fenton like using persulphate for carbamazepine removal from domestic wastewater. *Water Res.* 48, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.033>
- Marchisio, A., Minella, M., Maurino, V., Minero, C., Vione, D., 2015. Photogeneration of reactive transient species upon irradiation of natural water samples: Formation quantum yields in different spectral intervals, and implications for the photochemistry of surface waters. *Water Res.* 73, 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.016>
- Mark, G., Tauber, A., Laupert, R., Schuchmann, H.-P., Schulz, D., Mues, A., von Sonntag, C., 1998. OH-radical formation by ultrasound in aqueous solution – Part II: Terephthalate and Fricke dosimetry and the influence of various conditions on the sonolytic yield. *Ultrason. Sonochem.* 5, 41–52. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(98\)00012-1](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(98)00012-1)
- Marques, C.R., Abrantes, N., Gonçalves, F., 2004. Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans: II. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid metabolites: Acute and Chronic Effects of Acetylsalicylic Acid Metabolites. *Environ. Toxicol.* 19, 527–540. <https://doi.org/10.1002/tox.20060>
- Martínez Bueno, M.J., Herrera, S., Munaron, D., Boillot, C., Fenet, H., Chiron, S., Gómez, E., 2016. POCIS passive samplers as a monitoring tool for pharmaceutical residues and their transformation products in marine environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 5019–5029. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3796-5>
- Martínez, D.E., 1998. Mortality Patterns Suggest Lack of Senescence in Hydra. *Exp. Gerontol.* 33, 217–225. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(97\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(97)00113-7)
- Maruyama, T., Sugiyama, T., 1979. A mathematical model for hydra multiplication by asexual budding appendix to “genetic analysis of developmental mechanisms in hydra vii. Statistical analyses of developmental-morphological characters and cellular compositions.” *Dev. Growth Differ.* 21, 377–381. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1979.00377.x>
- Massicotte, P., Asmala, E., Stedmon, C., Markager, S., 2017. Global distribution of dissolved organic matter along the aquatic continuum: Across rivers, lakes and oceans. *Sci. Total Environ.* 609, 180–191. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.076>
- Masteling, R.P., Castro, B.B., Antunes, S.C., Nunes, B., 2016. Whole-organism and biomarker endpoints in *Daphnia magna* show uncoupling of oxidative stress and endocrine disruption in phenolic derivatives. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 134, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.012>
- Matamoros, V., Duhec, A., Albaigés, J., Bayona, J.M., 2009. Photodegradation of Carbamazepine, Ibuprofen, Ketoprofen and 17 α -Ethinylestradiol in Fresh and Seawater. *Water. Air. Soil Pollut.* 196, 161. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9765-1>
- Matamoros, V., Nguyen, L.X., Arias, C.A., Salvadó, V., Brix, H., 2012. Evaluation of aquatic plants for removing polar microcontaminants: A microcosm experiment. *Chemosphere* 88, 1257–1264. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.004>
- Mathon, B., Choubert, J.-M., Miege, C., Coquery, M., 2016. A review of the photodegradability and transformation products of 13 pharmaceuticals and pesticides relevant to sewage polishing treatment. *Sci. Total Environ.* 551, 712–724. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.009>
- Matta, R., Tlili, S., Chiron, S., Barbati, S., 2011. Removal of carbamazepine from urban wastewater by

- sulfate radical oxidation. *Environ. Chem. Lett.* 9, 347–353. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0285-z>
- Maurice, M., 1996. L'écotoxicologie appliquée au milieu marin (No. R.INT.DEU96. 11/NANTES). IFREMER.
- Mazellier, P., Bolte, M., 2000. Heterogeneous light-induced transformation of 2,6-dimethylphenol in aqueous suspensions containing goethite. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 132, 129–135. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(00\)00198-2](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(00)00198-2)
- Mazellier, P., Méité, L., Laat, J.D., 2008. Photodegradation of the steroid hormones 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethinylestradiol (EE2) in dilute aqueous solution. *Chemosphere* 73, 1216–1223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.046>
- McNeill, K., Canonica, S., 2016. Triplet state dissolved organic matter in aquatic photochemistry: reaction mechanisms, substrate scope, and photophysical properties. *Environ. Sci. Process. Impacts* 18, 1381–1399. <https://doi.org/10.1039/C6EM00408C>
- Megateli, S., Semsari, S., Couderchet, M., 2009. Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper, and zinc) by *Lemna gibba*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1774–1780. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.05.004>
- Meite, L., Szabo, R., Mazellier, P., De Laat, J., 2010. Cinétique de phototransformation de polluants organiques émergents en solution aqueuse diluée. *Rev. Sci. Eau* 23, 31. <https://doi.org/10.7202/038923ar>
- Miao, H.F., Han, H.H., Ji, X.P., Lu, M.F., Huang, Z.X., Ruan, W.Q., 2017. Oxidative transformation of oxcarbazepine by Cl₂, ClO₂ and O₃: characteristics and pathways. *Water Sci. Technol. Water Supply* 17, 84–94. <https://doi.org/10.2166/ws.2016.113>
- Miao, X.-S., Metcalfe, C.D., 2003. Determination of Carbamazepine and Its Metabolites in Aqueous Samples Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 75, 3731–3738. <https://doi.org/10.1021/ac030082k>
- Miège, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., Coquery, M., 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. *Environ. Pollut.* 157, 1721–1726. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.045>
- Mill, T., 1980. Chemical and Photo Oxidation, in: *Reactions and Processes, The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 77–105. https://doi.org/10.1007/978-3-540-38519-6_6
- Mille, G., Asia, L., Guiliano, M., Malleret, L., Doumenq, P., 2007. Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean sea (Gulf of Fos area, France). *Mar. Pollut. Bull.* 54, 566–575. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.12.009>
- Milosavljevic, B.H., LaVerne, J.A., 2005. Pulse Radiolysis of Aqueous Thiocyanate Solution. *J. Phys. Chem. A* 109, 165–168. <https://doi.org/10.1021/jp046088a>
- Minella, M., De Laurentiis, E., Buhvestova, O., Haldna, M., Kangur, K., Maurino, V., Minero, C., Vione, D., 2013. Modelling lake-water photochemistry: Three-decade assessment of the steady-state concentration of photoreactive transients (OH, CO₃⁻ and 3CDOM*) in the surface water of polymictic Lake Peipsi (Estonia/Russia). *Chemosphere* 90, 2589–2596. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.103>
- Minero, C., Chiron, S., Falletti, G., Maurino, V., Pelizzetti, E., Ajassa, R., Carlotti, M.E., Vione, D., 2007. Photochemical processes involving nitrite in surface water samples. *Aquat. Sci.* 69, 71–85. <https://doi.org/10.1007/s00027-007-0881-6>
- Minguez, L., Di Poi, C., Farcy, E., Ballandonne, C., Benchouala, A., Bojic, C., Cossu-Leguille, C., Costil, K.,

- Serpentini, A., Lebel, J.-M., Halm-Lemeille, M.-P., 2014a. Comparison of the sensitivity of seven marine and freshwater bioassays as regards antidepressant toxicity assessment. *Ecotoxicology* 23, 1744–1754. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1339-y>
- Minguez, L., Farcy, E., Ballandonne, C., Lepailleur, A., Serpentine, A., Lebel, J.-M., Bureau, R., Halm-Lemeille, M.-P., 2014b. Acute toxicity of 8 antidepressants: What are their modes of action? *Chemosphere* 108, 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.057>
- Minguez, L., Pedelucq, J., Farcy, E., Ballandonne, C., Budzinski, H., Halm-Lemeille, M.-P., 2016. Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4992–5001. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3662-5>
- Mitchell, F.M., Holdway, D.A., 2000. The acute and chronic toxicity of the dispersants Corexit 9527 and 9500, water accommodated fraction (WAF) of crude oil, and dispersant enhanced WAF (DEWAF) to *Hydra viridissima* (green hydra). *Water Res.* 34, 343–348. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00144-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00144-X)
- Mokh, S., El Khatib, M., Koubar, M., Daher, Z., Al Iskandarani, M., 2017. Innovative SPE-LC-MS/MS technique for the assessment of 63 pharmaceuticals and the detection of antibiotic-resistant-bacteria: A case study natural water sources in Lebanon. *Sci. Total Environ.* 609, 830–841. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.230>
- Mopper, K., Zhou, X., 1990. Hydroxyl radical photoproduction in the sea and its potential impact on marine processes. *Science* 250, 661–664. <https://doi.org/10.1126/science.250.4981.661>
- Moreno-González, R., Campillo, J.A., León, V.M., 2013. Influence of an intensive agricultural drainage basin on the seasonal distribution of organic pollutants in seawater from a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain). *Mar. Pollut. Bull.* 77, 400–411. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.09.040>
- Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Gros, M., Barceló, D., León, V.M., 2015. Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a mediterranean coastal lagoon (SE Spain). *Environ. Res.* 138, 326–344. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.02.016>
- Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Gros, M., Pérez-Cánovas, E., Barceló, D., León, V.M., 2014. Input of pharmaceuticals through coastal surface watercourses into a Mediterranean lagoon (Mar Menor, SE Spain): Sources and seasonal variations. *Sci. Total Environ.* 490, 59–72. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.097>
- Muller, M., Rabenoelina, F., Balaguer, P., Patureau, D., Lemenach, K., Budzinski, H., Barceló, D., de Alda, M.L., Kuster, M., Delgenès, J.-P., Hernandez-Raquet, G., 2008. Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1649. <https://doi.org/10.1897/07-519.1>
- Müller, W.A., 1995. Competition for Factors and Cellular Resources as a Principle of Pattern Formation in *Hydra*: II. Assistance of Foot Formation by Heads and Buds and a New Model of Pattern Control. *Dev. Biol.* 167, 175–189. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1015>
- Munaron, D., Tapie, N., Budzinski, H., Andral, B., Gonzalez, J.-L., 2012. Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 114, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.09.009>
- Münder, S., Käsbauer, T., Prexl, A., Aufschneider, R., Zhang, X., Towb, P., Böttger, A., 2010. Notch signalling defines critical boundary during budding in *Hydra*. *Dev. Biol.* 344, 331–345. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.05.517>
- Muñoz, I., López-Doval, J.C., Ricart, M., Villagrasa, M., Brix, R., Geiszinger, A., Ginebreda, A., Guasch, H., Alda, M.J.L. de, Romani, A.M., Sabater, S., Barceló, D., 2009. Bridging levels of pharmaceuticals

- in river water with biological community structure in the llobregat river basin (northeast Spain). *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2706–2714. <https://doi.org/10.1897/08-486.1>
- Mutiyar, P.K., Gupta, S.K., Mittal, A.K., 2018. Fate of pharmaceutical active compounds (PhACs) from River Yamuna, India: An ecotoxicological risk assessment approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 150, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.041>
- Nakatani, N., Hashimoto, N., Shindo, H., Yamamoto, M., Kikkawa, M., Sakugawa, H., 2007. Determination of photoformation rates and scavenging rate constants of hydroxyl radicals in natural waters using an automatic light irradiation and injection system. *Anal. Chim. Acta* 581, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.08.021>
- Nalecz-Jawecki, G., Persoone, G., 2006. Toxicity of Selected Pharmaceuticals to the Anostracan Crustacean *Thamnocephalus platyurus* - Comparison of Sublethal and Lethal Effect Levels with the 1h Rapidtoxkit and the 24h Thamnotoxkit Microbiotests. *Environ. Sci. Pollut. Res. - Int.* 13, 22–27. <https://doi.org/10.1065/espr2006.01.005>
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish. *Environ. Health Perspect.* 112, 1725–1733. <https://doi.org/10.1289/ehp.7209>
- Nassar, R., Trivella, A., Mokh, S., Al-Iskandarani, M., Budzinski, H., Mazellier, P., 2017. Photodegradation of sulfamethazine, sulfamethoxypyridazine, amitriptyline, and clomipramine drugs in aqueous media. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 336, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.12.008>
- Nebbioso, A., Piccolo, A., 2013. Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 109–124. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6363-2>
- Negrón-Encarnación, I., Arce, R., 2007. Light-induced transformations of aza-aromatic pollutants adsorbed on models of atmospheric particulate matter: Acridine and 9 (10-H) acridone. *Atmos. Environ.* 41, 6771–6783.
- Nessim, R.B., Tadros, H.R.Z., Abou Taleb, A.E.A., Moawad, M.N., 2015. Chemistry of the Egyptian Mediterranean coastal waters. *Egypt. J. Aquat. Res.* 41, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.01.004>
- Neta, P., Fessenden, R.W., 1974. Hydroxyl radical reactions with phenols and anilines as studied by electron spin resonance. *J. Phys. Chem.* 78, 523–529. <https://doi.org/10.1021/j100598a013>
- Neta, P., Huie, R.E., Ross, A.B., 1988. Rate Constants for Reactions of Inorganic Radicals in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 17, 1027. <https://doi.org/10.1063/1.555808>
- Nica, V.D., Villa, S., Finizio, A., 2017. Toxicity of individual pharmaceuticals and their mixtures to *Aliivibrio fischeri*: Experimental results for single compounds and considerations of their mechanisms of action and potential acute effects on aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 807–814. <https://doi.org/10.1002/etc.3568>
- Nödler, K., Tsakiri, M., Aloupi, M., Gatidou, G., Stasinakis, A.S., Licha, T., 2016. Evaluation of polar organic micropollutants as indicators for wastewater-related coastal water quality impairment. *Environ. Pollut.* 211, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.014>
- Nödler, K., Voutsas, D., Licha, T., 2014. Polar organic micropollutants in the coastal environment of different marine systems. *Mar. Pollut. Bull.* 85, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.024>
- Nunes, B., Antunes, S.C., Santos, J., Martins, L., Castro, B.B., 2014. Toxic potential of paracetamol to freshwater organisms: A headache to environmental regulators? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 107, 178–

185. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.027>
- OECD, 2016. OECD Health Statistics 2016. Pharmaceutical Market : Pharmaceutical consumption [WWW Document]. OECD.Stat. URL http://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=HEALTH_PHMC (accessed 12.6.17).
- Okada, M., Hirano, T., Mizuno, K., Chiba, T., Kawata, Y., Kiryu, K., Wada, K., Tasaki, H., Kaneko, S., 1997. Biphasic effects of carbamazepine on the dopaminergic system in rat striatum and hippocampus. *Epilepsy Res.* 28, 143–153. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(97\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(97)00042-9)
- Olasehinde, E.F., Ogunsuyi, H.O., Sakugawa, H., 2012. Determination of Hydroxyl Radical in Seto Inland Sea and its Potential to Degrade Irgarol. *IOSR J. Appl. Chem.* 1, 07–14. <https://doi.org/10.9790/5736-0150714>
- Orias, F., Perrodin, Y., 2013. Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: A review. *Sci. Total Environ.* 454, 250–276. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.064>
- Örn, S., Holbech, H., Madsen, T.H., Norrgren, L., Petersen, G.I., 2003. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquat. Toxicol.* 65, 397–411. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00177-2](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00177-2)
- Osorio, V., Larrañaga, A., Aceña, J., Pérez, S., Barceló, D., 2016. Concentration and risk of pharmaceuticals in freshwater systems are related to the population density and the livestock units in Iberian Rivers. *Sci. Total Environ.* 540, 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.143>
- Osorio, V., Marcé, R., Pérez, S., Ginebreda, A., Cortina, J.L., Barceló, D., 2012. Occurrence and modeling of pharmaceuticals on a sewage-impacted Mediterranean river and their dynamics under different hydrological conditions. *Sci. Total Environ.* 440, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.040>
- Otto, J.J., Campbell, R.D., 1977. Tissue economics of hydra: regulation of cell cycle, animal size and development by controlled feeding rates. *J. Cell Sci.* 28, 117–132.
- Pachura-Bouchet, S., Blaise, C., Vasseur, P., 2006. Toxicity of nonylphenol on the cnidarian *Hydra attenuata* and environmental risk assessment. *Environ. Toxicol.* 21, 388–394. <https://doi.org/10.1002/tox.20201>
- Pachura, S., Cambon, J.-P., Blaise, C., Vasseur, P., 2005. 4-nonylphenol-induced toxicity and apoptosis in *Hydra attenuata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 3085–3091. <https://doi.org/10.1897/04-669R.1>
- Packer, J.L., Werner, J.J., Latch, D.E., McNeill, K., Arnold, W.A., 2003. Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibrac acid, and ibuprofen. *Aquat. Sci.* 65, 342–351. <https://doi.org/10.1007/s00027-003-0671-8>
- Page, S.E., Arnold, W.A., McNeill, K., 2010. Terephthalate as a probe for photochemically generated hydroxyl radical. *J. Environ. Monit.* 12, 1658–1665. <https://doi.org/10.1039/C0EM00160K>
- Page, S.E., Arnold, W.A., McNeill, K., 2011. Assessing the Contribution of Free Hydroxyl Radical in Organic Matter-Sensitized Photohydroxylation Reactions. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2818–2825. <https://doi.org/10.1021/es2000694>
- Pal, A., Gin, K.Y.-H., Lin, A.Y.-C., Reinhard, M., 2010. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci. Total Environ.* 408, 6062–6069. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.026>
- Pan, Y., Cheng, S., Yang, X., Ren, J., Fang, J., Shang, C., Song, W., Lian, L., Zhang, X., 2017. UV/chlorine treatment of carbamazepine: Transformation products and their formation kinetics. *Water Res.* 116, 254–265. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.033>
- Panias, D., Taxiarchou, M., Paspaliaris, I., Kontopoulos, A., 1996. Mechanisms of dissolution of iron

- oxides in aqueous oxalic acid solutions. *Hydrometallurgy* 42, 257–265.
- Papageorgiou, M., Kosma, C., Lambropoulou, D., 2016. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Sci. Total Environ.* 543, 547–569. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.047>
- Papp, R., 2010. *Les Propriétés Environnementales des Substances*.
- Park, S., Choi, K., 2008. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology* 17, 526–538. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0209-x>
- Parker, K.M., Mitch, W.A., 2016. Halogen radicals contribute to photooxidation in coastal and estuarine waters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 5868–5873. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602595113>
- Parkhurst, B.R., Bradshaw, A.S., Forte, J.L., Wright, G.P., 1981. The chronic toxicity to *Daphnia magna* of acridine, a representative azaarene present in synthetic fossil fuel products and wastewaters. *Environ. Pollut. Ser. Ecol. Biol.* 24, 21–30. [https://doi.org/10.1016/0143-1471\(81\)90119-7](https://doi.org/10.1016/0143-1471(81)90119-7)
- Pascoe, D., Carroll, K., Karntanut, W., Watts, M.M., 2002. Toxicity of 17 α -Ethinylestradiol and Bisphenol A to the Freshwater Cnidarian *Hydra vulgaris*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 56–63. <https://doi.org/10.1007/s00244-001-0016-3>
- Pathare, D.B., Jadhav, A.S., Shingare, M.S., 2007. A validated stability indicating LC method for oxcarbazepine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, 1825–1830. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.12.002>
- Paul, A., Hackbarth, S., Vogt, R.D., Röder, B., Burnison, B.K., Steinberg, C.E.W., 2004. Photogeneration of singlet oxygen by humic substances: comparison of humic substances of aquatic and terrestrial origin. *Photochem Photobiol Sci* 3, 273–280. <https://doi.org/10.1039/B312146A>
- Pedrouzo, M., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., 2009. Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 78, 1327–1331. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.02.005>
- Pereira, C.D.S., Maranhão, L.A., Cortez, F.S., Pusceddu, F.H., Santos, A.R., Ribeiro, D.A., Cesar, A., Guimarães, L.L., 2016. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Sci. Total Environ.* 548–549, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.051>
- Péry, A.R.R., Gust, M., Vollat, B., Mons, R., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T., Garric, J., 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere* 73, 300–304. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.029>
- Petrovic, M., Barceló, D., 2007. LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* 26, 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.02.010>
- Plan bleu pour la Méditerranée (Ed.), 2009. *Etat de l’environnement et du développement en Méditerranée*. PNUE/PAM, Athènes.
- Poiger, T., Buser, H.-R., Müller, M.D., 2001. Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: pathway, field measurements, and mathematical modeling. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 256–263.
- Pomati, F., Netting, A.G., Calamari, D., Neilan, B.A., 2004. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquat. Toxicol.* 67, 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.02.001>
- Qian, J., Mopper, K., Kieber, D.J., 2001. Photochemical production of the hydroxyl radical in Antarctic waters. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* 48, 741–759. [https://doi.org/10.1016/S0967-0637\(00\)00068-6](https://doi.org/10.1016/S0967-0637(00)00068-6)

- Quinn, B., Gagne, F., Blaise, C., 2004. Oxidative metabolism activity in *Hydra attenuata* exposed to carbamazepine. *Fresenius Environ. Bull.* 13, 783–788.
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C., 2008. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Sci. Total Environ.* 389, 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.08.038>
- Quinn, B., Gagne, F., Blaise, C., 2009. Evaluation of the acute, chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Sci. Total Environ.* 407, 1072–1079. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.022>
- Quintana, J.B., Weiss, S., Reemtsma, T., 2005. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Res.* 39, 2654–2664. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.068>
- Rabiet, M., Togola, A., Brissaud, F., Seidel, J.-L., Budzinski, H., Elbaz-Poulichet, F., 2006. Consequences of Treated Water Recycling as Regards Pharmaceuticals and Drugs in Surface and Ground Waters of a Medium-sized Mediterranean Catchment. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5282–5288. <https://doi.org/10.1021/es060528p>
- Radix, P., Severin, G., Schramm, K.-W., Kettrup, A., 2002. Reproduction disturbances of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) for the screening of environmental endocrine disrupters. *Chemosphere* 47, 1097–1101.
- Rafi, A., Sutton, H.C., 1965. Radiolysis of aerated solutions of potassium bromide. *Trans. Faraday Soc.* 61, 877–890. <https://doi.org/10.1039/TF9656100877>
- Ramade, F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie : Fondements et applications. Lavoisier.
- Rasburn, E.J., Michaels, H.B., 1977. On the reaction of hydrated electrons with oxygen. *Radiat. Phys. Chem.* 1977 10, 289–290. [https://doi.org/10.1016/0146-5724\(77\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0146-5724(77)90031-0)
- Redpath, J.L., Willson, R.L., 1975. Chain reactions and radiosensitization: model enzyme studies. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 27, 389–398.
- Reinhold, D., Vishwanathan, S., Park, J.J., Oh, D., Michael Saunders, F., 2010. Assessment of plant-driven removal of emerging organic pollutants by duckweed. *Chemosphere* 80, 687–692. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.045>
- Rivera-Jaimes, J.A., Postigo, C., Melgoza-Alemán, R.M., Aceña, J., Barceló, D., López de Alda, M., 2018. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 613–614, 1263–1274. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.134>
- Rivetti, C., Campos, B., Barata, C., 2016. Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 170, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.019>
- Robert-Peillard, F., Syakti, A.D., Coulomb, B., Doumenq, P., Malleret, L., Asia, L., Boudenne, J.-L., 2015. Occurrence and fate of selected surfactants in seawater at the outfall of the Marseille urban sewerage system. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 12, 1527–1538. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0577-0>
- Robinson, A.A., Belden, J.B., Lydy, M.J., 2005. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 423–430. <https://doi.org/10.1897/04-210R.1>
- Rodil, R., Quintana, J.B., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., 2009. Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 2958–2969. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.041>

- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C.M., Barceló, D., Balcázar, J.L., 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Res.* 69, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- Rodriguez-Mozaz, S., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2004. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1045, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.040>
- Rodríguez-Navas, C., Björklund, E., Bak, S.A., Hansen, M., Krogh, K.A., Maya, F., Forteza, R., Cerdà, V., 2013. Pollution Pathways of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment on the Island of Mallorca, Spain. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 56–66. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9880-x>
- Rosario-Ortiz, F.L., Canonica, S., 2016. Probe Compounds to Assess the Photochemical Activity of Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 50, 12532–12547. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02776>
- Rügge, K., Bjerg, P.L., Mosbæk, H., Christensen, T.H., 1999. Fate of MCPP and atrazine in an anaerobic landfill leachate plume (Grindsted, Denmark). *Water Res.* 33, 2455–2458. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00444-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00444-8)
- Ruhí, A., Acuña, V., Barceló, D., Huerta, B., Mor, J.-R., Rodríguez-Mozaz, S., Sabater, S., 2016. Bioaccumulation and trophic magnification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in a Mediterranean river food web. *Sci. Total Environ.* 540, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.009>
- Russi, H., Kotzias, D., Korte, F., 1982. Photoinduzierte hydroxylierungsreaktionen organischer chemikalien in natürlichen Gewässern - Nitrate als potentielle OH-radikalquellen -. *Chemosphere* 11, 1041–1048. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(82\)90078-9](https://doi.org/10.1016/0045-6535(82)90078-9)
- Ryan, C.C., Tan, D.T., Arnold, W.A., 2011. Direct and indirect photolysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in wastewater treatment plant effluent. *Water Res.* 45, 1280–1286. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.005>
- Salama, Y., Chennaoui, M., Sylla, A., Mountadar, M., Rihani, M., Assobhei, O., 2014. Review of Wastewater Treatment and Reuse in the Morocco: Aspects and Perspectives. *Int J Env. Pollut Res* 2, 9–25.
- Salierno, J.D., Kane, A.S., 2009. 17 α -Ethinylestradiol alters reproductive behaviors, circulating hormones, and sexual morphology in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 953–961. <https://doi.org/10.1897/08-111.1>
- Samaras, V.G., Stasinakis, A.S., Mamais, D., Thomaidis, N.S., Lekkas, T.D., 2013. Fate of selected pharmaceuticals and synthetic endocrine disrupting compounds during wastewater treatment and sludge anaerobic digestion. *J. Hazard. Mater.* 244–245, 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.11.039>
- Sánchez-Avila, J., Tauler, R., Lacorte, S., 2012. Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: Sources distribution and potential risk. *Environ. Int.* 46, 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.04.013>
- Santoke, H., Cooper, W.J., 2017. Environmental photochemical fate of selected pharmaceutical compounds in natural and reconstituted Suwannee River water: Role of reactive species in indirect photolysis. *Sci. Total Environ.* 580, 626–631. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.008>
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic

- environment. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>
- Sari, S., Ozdemir, G., Yangin-Gomec, C., Zengin, G.E., Topuz, E., Aydin, E., Pehlivanoglu-Mantas, E., Okutman Tas, D., 2014. Seasonal variation of diclofenac concentration and its relation with wastewater characteristics at two municipal wastewater treatment plants in Turkey. *J. Hazard. Mater.* 272, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.015>
- Sárria, M.P., Soares, J., Vieira, M.N., Filipe C. Castro, L., Santos, M.M., Monteiro, N.M., 2011. Rapid-behaviour responses as a reliable indicator of estrogenic chemical toxicity in zebrafish juveniles. *Chemosphere* 85, 1543–1547. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.048>
- Sato, T., Qadir, M., Yamamoto, S., Endo, T., Zahoor, A., 2013. Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment, and use. *Agric. Water Manag.* 130, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.08.007>
- Schoenfuss, H.L., Levitt, J.T., Van Der Kraak, G., Sorensen, P.W., 2002. Ten-week exposure to treated sewage discharge has relatively minor, variable effects on reproductive behavior and sperm production in goldfish. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2185–2190. <https://doi.org/10.1002/etc.5620211023>
- Scholz, S., Gutzeit, H.O., 2000. 17- α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 50, 363–373.
- Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenberg, G.F., Watts, M., Wenzel, A., 2003a. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302–314.
- Segner, H., Navas, J.M., Schäfers, C., Wenzel, A., 2003b. Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 315–322.
- Segura, P.A., MacLeod, S.L., Lemoine, P., Sauv e, S., Gagnon, C., 2011. Quantification of carbamazepine and atrazine and screening of suspect organic contaminants in surface and drinking waters. *Chemosphere* 84, 1085–1094. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.056>
- Segura, P.A., Takada, H., Correa, J.A., El Saadi, K., Koike, T., Onwona-Agyeman, S., Ofosu-Anim, J., Sabi, E.B., Wasonga, O.V., Mghalu, J.M., dos Santos, A.M., Newman, B., Weerts, S., Yargeau, V., 2015. Global occurrence of anti-infectives in contaminated surface waters: Impact of income inequality between countries. *Environ. Int.* 80, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.04.001>
- Senta, I., Terzic, S., Ahel, M., 2013. Occurrence and fate of dissolved and particulate antimicrobials in municipal wastewater treatment. *Water Res.* 47, 705–714. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.041>
- Sher, D., Zlotkin, E., 2009. A hydra with many heads: Protein and polypeptide toxins from hydra and their biological roles. *Toxicon, Cnidarian Toxins and Venoms* 54, 1148–1161. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.036>
- Soares, J., Coimbra, A.M., Reis-Henriques, M.A., Monteiro, N.M., Vieira, M.N., Oliveira, J.M.A., Guedes-Dias, P., Fonta nas-Fernandes, A., Parra, S.S., Carvalho, A.P., 2009. Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development after full life-cycle parental exposure to low levels of ethinylestradiol. *Aquat. Toxicol.* 95, 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.021>
- Stenersen, J., Kobro, S., Bjerke, M., Arend, U., 1987. Glutathione transferases in aquatic and terrestrial animals from nine phyla. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 86, 73–82. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(87\)90147-2](https://doi.org/10.1016/0742-8413(87)90147-2)
- Stiven, A.E., 1962. The Effect of Temperature and Feeding on the Intrinsic Rate of Increase of Three Species of Hydra. *Ecology* 43, 325–328. <https://doi.org/10.2307/1931991>
- Sun, B., Sato, M., Clements, J.S., 1997. Optical study of active species produced by a pulsed streamer

- corona discharge in water. *J. Electrostat.* 39, 189–202.
- Syakti, A.D., Asia, L., Kanzari, F., Umasangadji, H., Malleret, L., Ternois, Y., Mille, G., Doumenq, P., 2012. Distribution of organochlorine pesticides (OCs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in marine sediments directly exposed to wastewater from Cortiou, Marseille. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 1524–1535. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0640-z>
- Takeda, K., Takedoi, H., Yamaji, S., Ohta, K., Sakugawa, H., 2004. Determination of Hydroxyl Radical Photoproduction Rates in Natural Waters. *Anal. Sci.* 20, 153–158. <https://doi.org/10.2116/analsci.20.153>
- Tapie, N., Munaron, D., Gonzalez, J.-L., Budzinski, H., n.d. Application of POCIS for the monitoring of pesticides, pharmaceuticals and alkylphenols in marine water.
- Taylor, C., Viraraghavan, T., 1999. A bench-scale investigation of land treatment of soil contaminated with diesel fuel. *Chemosphere* 39, 1583–1593. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00056-9)
- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers1Dedicated to Professor Dr. Klaus Haberer on the occasion of his 70th birthday.1. *Water Res.* 32, 3245–3260. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00099-2)
- Ternes, T.A., 2001. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* 20, 419–434.
- Ternes, T.A., Herrmann, N., Bonerz, M., Knacker, T., Siegrist, H., Joss, A., 2004a. A rapid method to measure the solid–water distribution coefficient (Kd) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Res.* 38, 4075–4084. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.07.015>
- Ternes, T.A., Joss, A., Siegrist, H., 2004b. Peer Reviewed: Scrutinizing Pharmaceuticals and Personal Care Products in Wastewater Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 392A–399A. <https://doi.org/10.1021/es040639t>
- TGD, 2003. TGD, Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment of new notified chemicals and Commission Regulation (EC) No.1488/94 on risk assessment of existing chemicals (1996).
- Thomas, J.K., Gordon, S., Hart, E.J., 1964. The Rates of Reaction of the Hydrated Electron in Aqueous Inorganic Solutions ¹. *J. Phys. Chem.* 68, 1524–1527. <https://doi.org/10.1021/j100788a043>
- Tissier, C., Morvan, C., Bocquené, G., Grossel, H., James, A., Marchand, M., 2005. Les Substances Prioritaires de la Directive Cadre sur l’Eau (DCE) - Fiches de synthèse.
- Togola, A., 2006. Présence et devenir des substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques. Bordeaux.
- Togola, A., Budzinski, H., 2008. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 1177, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.105>
- Tolls, J., 2001. Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3397–3406. <https://doi.org/10.1021/es0003021>
- Tran, N., Drogui, P., Zaviska, F., Brar, S.K., 2013. Sonochemical degradation of the persistent pharmaceutical carbamazepine. *J. Environ. Manage.* 131, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.09.027>
- Tran, N.H., Reinhard, M., Gin, K.Y.-H., 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Res.* 133, 182–207. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.029>
- Treinin, A., Hayon, E., 1975. Charge transfer spectra of halogen atoms in water. Correlation of the electronic transition energies of iodine, bromine, chlorine, hydroxyl, and hydrogen radicals with

- their electron affinities. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 1716–1721.
- Trottier, S., Blaise, C., Kusui, T., Johnson, E.M., 1998. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12, 265–271. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2256\(1997\)12:3<265::AID-TOX10>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2256(1997)12:3<265::AID-TOX10>3.0.CO;2-9)
- Tsuji, K., Goetz, J.F., 1978. High-performance liquid chromatographic determination of erythromycin. *J. Chromatogr.* 147, 359–367.
- U.S. EPA, 2009. Risk Assessment Guidance for Superfund Volume I: Human Health Evaluation Manual (Part F, Supplemental Guidance for Inhalation Risk Assessment). Office of Superfund Remediation and Technology Innovation Environmental Protection Agency Washington, D.C.
- Van Doorslaer, X., Dewulf, J., Van Langenhove, H., Demeestere, K., 2014. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. *Sci. Total Environ.* 500, 250–269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.075>
- Vancampenhout, K., Wouters, K., De Vos, B., Buurman, P., Swennen, R., Deckers, J., 2009. Differences in chemical composition of soil organic matter in natural ecosystems from different climatic regions – A pyrolysis–GC/MS study. *Soil Biol. Biochem.* 41, 568–579. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.12.023>
- Vandenbergh, G.F., Adriaens, D., Verslycke, T., Janssen, C.R., 2003. Effects of 17 α -ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 216–222.
- Varano, V., Fabbri, E., Pasteris, A., 2017. Assessing the environmental hazard of individual and combined pharmaceuticals: acute and chronic toxicity of fluoxetine and propranolol in the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 26, 711–728. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1803-6>
- Vazquez-Roig, P., Andreu, V., Blasco, C., Picó, Y., 2012. Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments, soils and waters of the Pego–Oliva Marshlands (Valencia, eastern Spain). *Sci. Total Environ.* 440, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.036>
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D., 2012a. Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 430, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.055>
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Jelic, A., Petrović, M., Barceló, D., 2014. Comparison of measured and predicted concentrations of selected pharmaceuticals in wastewater and surface water: A case study of a catchment area in the Po Valley (Italy). *Sci. Total Environ.* 470–471, 844–854. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.026>
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Zambello, E., 2012b. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Sci. Total Environ.* 429, 123–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>
- Vialaton, D., Richard, C., Baglio, D., Paya-Perez, A.-B., 1999. Mechanism of the photochemical transformation of naphthalene in water. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 123, 15–19. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(99\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(99)00044-1)
- Vidal-Dorsch, D.E., Bay, S.M., Maruya, K., Snyder, S.A., Trenholm, R.A., Vanderford, B.J., 2012. Contaminants of emerging concern in municipal wastewater effluents and marine receiving water. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2674–2682. <https://doi.org/10.1002/etc.2004>
- Vieno, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L., 2007. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Res.* 41, 1001–1012. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.017>
- Vione, D., 2016. Photochemical Reactions in Sunlit Surface Waters, in: Bergamini, G., Silvi, S. (Eds.), *Applied Photochemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 343–376.

- https://doi.org/10.1007/978-3-319-31671-0_7
- Vione, D., Falletti, G., Maurino, V., Minero, C., Pelizzetti, E., Malandrino, M., Ajassa, R., Olariu, R.-I., Arsene, C., 2006. Sources and Sinks of Hydroxyl Radicals upon Irradiation of Natural Water Samples. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3775–3781. <https://doi.org/10.1021/es052206b>
- Vione, D., Ponzo, M., Bagnus, D., Maurino, V., Minero, C., Carlotti, M.E., 2010. Comparison of different probe molecules for the quantification of hydroxyl radicals in aqueous solution. *Environ. Chem. Lett.* 8, 95–100. <https://doi.org/10.1007/s10311-008-0197-3>
- Vogna, D., Marotta, R., Andreatti, R., Napolitano, A., d'Ischia, M., 2004. Kinetic and chemical assessment of the UV/H₂O₂ treatment of antiepileptic drug carbamazepine. *Chemosphere* 54, 497–505. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00757-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00757-4)
- 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., Wiest, L., Baudot, R., Grenier-Loustalot, M.-F., 2008. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1210, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.034>
- Wammer, K.H., Korte, A.R., Lundeen, R.A., Sundberg, J.E., McNeill, K., Arnold, W.A., 2013. Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials: Norfloxacin, ofloxacin, and enrofloxacin. *Water Res.* 47, 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.025>
- Wan, L.K., Peng, J., Lin, M.Z., Muroya, Y., Katsumura, Y., Fu, H.Y., 2012. Hydroxyl radical, sulfate radical and nitrate radical reactivity towards crown ethers in aqueous solutions. *Radiat. Phys. Chem.* 81, 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.01.025>
- Wang, L., Xu, H., Cooper, W.J., Song, W., 2012. Photochemical fate of beta-blockers in NOM enriched waters. *Sci. Total Environ.* 426, 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.031>
- Wang, W., 1990. Toxicity Assessment of Pretreated Industrial Wastewaters Using Higher Plants. *Res. J. Water Pollut. Control Fed.* 62.
- Wang, W., Zafiriou, O.C., Chan, I.-Y., Zepp, R.G., Blough, N.V., 2007. Production of Hydrated Electrons from Photoionization of Dissolved Organic Matter in Natural Waters. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1601–1607. <https://doi.org/10.1021/es061069v>
- Wang, Y., Roddick, F.A., Fan, L., 2017. Direct and indirect photolysis of seven micropollutants in secondary effluent from a wastewater lagoon. *Chemosphere* 185, 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.122>
- Wang, Z., Du, Y., Yang, C., Liu, X., Zhang, J., Li, E., Zhang, Q., Wang, X., 2017. Occurrence and ecological hazard assessment of selected antibiotics in the surface waters in and around Lake Honghu, China. *Sci. Total Environ.* 609, 1423–1432. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.009>
- Warne, M.S.J., van Dam, R., 2008. NOEC and LOEC data should no longer be generated or used. *Australas. J. Ecotoxicol.* 14, 1.
- Watanabe, H., Tamura, I., Abe, R., Takanobu, H., Nakamura, A., Suzuki, T., Hirose, A., Nishimura, T., Tatarazako, N., 2016. Chronic toxicity of an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals to three aquatic organisms (alga, daphnid, and fish): Pharmaceutical mixture toxicity to 3 aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 996–1006. <https://doi.org/10.1002/etc.3285>
- Waterman, K.C., Adami, R.C., Alsante, K.M., Antipas, A.S., Arenson, D.R., Carrier, R., Hong, J., Landis, M.S., Lombardo, F., Shah, J.C., Shalaev, E., Smith, S.W., Wang, H., 2002. Hydrolysis in Pharmaceutical Formulations. *Pharm. Dev. Technol.* 7, 113–146. <https://doi.org/10.1081/PDT-120003494>

- Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., Hühnerfuss, H., 2004. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere* 56, 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.015>
- Westerhoff, P., Mezyk, S.P., Cooper, W.J., Minakata, D., 2007. Electron pulse radiolysis determination of hydroxyl radical rate constants with Suwannee river fulvic acid and other dissolved organic matter isolates. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4640–4646. <https://doi.org/10.1021/es062529n>
- Westerhoff, P., Song, R., Amy, G., Minear, R., 1998. Numerical kinetic models for bromide oxidation to bromine and bromate. *Water Res.* 32, 1687–1699. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00287-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00287-X)
- WHO. Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, 2012. Guidelines for ATC classification and DDD assignment, 2013.
- Wiegman, S., Termeer, J.A.G., Verheul, T., Kraak, M.H.S., de Voogt, P., Laane, R.W.P.M., Admiraal, W., 2002. UV Absorbance Dependent Toxicity of Acridine to the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Environ. Sci. Technol.* 36, 908–913. <https://doi.org/10.1021/es010149q>
- Wilkinson, J., Hooda, P.S., Barker, J., Barton, S., Swinden, J., 2017. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environ. Pollut.* 231, 954–970. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.032>
- Wille, K., Noppe, H., Verheyden, K., Vanden Bussche, J., De Wulf, E., Van Caeter, P., Janssen, C.R., De Brabander, H.F., Vanhaecke, L., 2010. Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 1797–1808. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3702-z>
- Willson, R.L., 1970. Pulse radiolysis studies of electron transfer reactions in aerobic solution. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 0, 1005–1005. <https://doi.org/10.1039/C29700001005>
- Winter, M.J., Lillicrap, A.D., Caunter, J.E., Schaffner, C., Alder, A.C., Ramil, M., Ternes, T.A., Giltrow, E., Sumpter, J.P., Hutchinson, T.H., 2008. Defining the chronic impacts of atenolol on embryo-larval development and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 86, 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.11.017>
- Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B., Kusk, K.O., 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 40, 723–730. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00443-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00443-9)
- Wols, B.A., Hofman-Caris, C.H.M., 2012. Review of photochemical reaction constants of organic micropollutants required for UV advanced oxidation processes in water. *Water Res.* 46, 2815–2827. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.036>
- Wols, B.A., Hofman-Caris, C.H.M., Harmsen, D.J.H., Beerendonk, E.F., 2013. Degradation of 40 selected pharmaceuticals by UV/H₂O₂. *Water Res.* 47, 5876–5888. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.008>
- Wong-Wah-Chung, P., Rafqah, S., Voyard, G., Sarakha, M., 2007. Photochemical behaviour of triclosan in aqueous solutions: Kinetic and analytical studies. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 191, 201–208.
- Woodard, J.K., 2013. Comparative phyto-uptake across distribution coefficients of pharmaceutical compounds and aquatic macrophytes: carbamazepine and amiodarone uptake in *Lemna* spp.
- World bank list of economies [WWW Document], 2017. URL databank.worldbank.org/data/download/site-content/CLASS.xls
- World Health Organization, 2004. World medicines situation. [WWW Document]. URL <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s6160e/s6160e.pdf> (accessed 4.4.18).

- Worsfold, P.J., Lohan, M.C., Ussher, S.J., Bowie, A.R., 2014. Determination of dissolved iron in seawater: A historical review. *Mar. Chem.* 166, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2014.08.009>
- Wu, C., Huang, X., Witter, J.D., Spongberg, A.L., Wang, K., Wang, D., Liu, J., 2014. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products and associated environmental risks in the central and lower Yangtze river, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.029>
- Xu, H., Guo, L., 2017. Molecular size-dependent abundance and composition of dissolved organic matter in river, lake and sea waters. *Water Res.* 117, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.006>
- Xu, T., Bao, S., Geng, P., Luo, J., Yu, L., Pan, P., Chen, Y., Hu, G., 2013. Determination of metoprolol and its two metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and its application in pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B* 937, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.017>
- Yamamoto, H., Nakamura, Yudai, Moriguchi, S., Nakamura, Yuki, Honda, Y., Tamura, I., Hirata, Y., Hayashi, A., Sekizawa, J., 2009. Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water Res.* 43, 351–362. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.039>
- Yamashita, N., Yasojima, M., Nakada, N., Miyajima, K., Komori, K., Suzuki, Y., Tanaka, H., 2006. Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. *Water Sci. Technol.* 53, 65. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.338>
- Yang, L.-H., Ying, G.-G., Su, H.-C., Stauber, J.L., Adams, M.S., Binet, M.T., 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1201–1208.
- Yang, Y., Ok, Y.S., Kim, K.-H., Kwon, E.E., Tsang, Y.F., 2017. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Sci. Total Environ.* 596, 303–320. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102>
- Yang, Y., Pignatello, J.J., Ma, J., Mitch, W.A., 2014. Comparison of Halide Impacts on the Efficiency of Contaminant Degradation by Sulfate and Hydroxyl Radical-Based Advanced Oxidation Processes (AOPs). *Environ. Sci. Technol.* 48, 2344–2351. <https://doi.org/10.1021/es404118q>
- Zafiriou, O.C., 1974. Sources and reactions of OH and daughter radicals in seawater. *J. Geophys. Res.* 79, 4491–4497. <https://doi.org/10.1029/JC079i030p04491>
- Zafiriou, O.C., 1990. Chemistry of superoxide ion-radical (O₂⁻) in seawater. I. pK_{asw}* (HOO) and uncatalyzed dismutation kinetics studied by pulse radiolysis. *Mar. Chem.* 30, 31–43. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(90\)90060-P](https://doi.org/10.1016/0304-4203(90)90060-P)
- Zafiriou, O.C., True, M.B., 1979. Nitrite photolysis in seawater by sunlight. *Mar. Chem.* 8, 9–32. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(79\)90029-X](https://doi.org/10.1016/0304-4203(79)90029-X)
- Zafiriou, O.C., True, M.B., Hayon, E., 1987. Consequences of OH Radical Reaction in Sea Water: Formation and Decay of Br₂⁻ Ion Radical, in: *Photochemistry of Environmental Aquatic Systems*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 89–105. <https://doi.org/10.1021/bk-1987-0327.ch007>
- Zehavi, D., Rabani, J., 1972. Oxidation of aqueous bromide ions by hydroxyl radicals. Pulse radiolytic investigation. *J. Phys. Chem.* 76, 312–319. <https://doi.org/10.1021/j100647a006>
- Zellner, R., Exner, M., Herrmann, H., 1990. Absolute OH quantum yields in the laser photolysis of nitrate, nitrite and dissolved H₂O₂ at 308 and 351 nm in the temperature range 278–353 K. *J.*

- Atmospheric Chem. 10, 411–425. <https://doi.org/10.1007/BF00115783>
- Zellner, R., Herrmann, H., 1995. Free radical chemistry of the aqueous atmospheric phase. *Spectrosc. Environ. Sci.* 381–451.
- Zenker, A., Cicero, M.R., Prestinaci, F., Bottoni, P., Carere, M., 2014. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *J. Environ. Manage.* 133, 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.017>
- Zepp, R.G., Hoigne, J., Bader, H., 1987. Nitrate-induced photooxidation of trace organic chemicals in water. *Environ. Sci. Technol.* 21, 443–450. <https://doi.org/10.1021/es00159a004>
- Zepp, R.G., Wolfe, N.L., Baughman, G.L., Hollis, R.C., 1977. Singlet oxygen in natural waters. *Nature* 267, 421–423. <https://doi.org/10.1038/267421a0>
- Zhang, P., Zhou, H., Li, K., Zhao, X., Liu, Q., Li, D., Zhao, G., Wang, L., 2018. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products, and their associated environmental risks in Guanting Reservoir and its upstream rivers in north China. *RSC Adv.* 8, 4703–4712. <https://doi.org/10.1039/C7RA12945A>
- Zhang, Q., Chen, J., Dai, C., Zhang, Y., Zhou, X., 2015. Degradation of carbamazepine and toxicity evaluation using the UV/persulfate process in aqueous solution: Degradation of carbamazepine and toxicity evaluation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90, 701–708. <https://doi.org/10.1002/jctb.4360>
- Zhou, X., Mopper, K., 1990. Determination of photochemically produced hydroxyl radicals in seawater and freshwater. *Mar. Chem.* 30, 71–88.
- Zhu, L., Santiago-Schübel, B., Xiao, H., Thiele, B., Zhu, Z., Qiu, Y., Hollert, H., Küppers, S., 2015. An efficient laboratory workflow for environmental risk assessment of organic chemicals. *Chemosphere* 131, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.031>
- Zoller, U., 2006. Estuarine and coastal zone marine pollution by the nonionic alkylphenol ethoxylates endocrine disruptors: Is there a potential ecotoxicological problem? *Environ. Int.* 32, 269–272. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.08.023>
- Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Melis, M., Fanelli, R., 2010. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 179, 1042–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.110>
- Zuccato, E., Castiglioni, S., Fanelli, R., 2005. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 122, 205–209. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.03.001>
- Zurita, J.L., Repetto, G., Jos, Á., Salguero, M., López-Artíguez, M., Cameán, A.M., 2007. Toxicological effects of the lipid regulator gemfibrozil in four aquatic systems. *Aquat. Toxicol.* 81, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.007>
- Zwiener, C., Seeger, S., Glauner, T., Frimmel, F., 2002. Metabolites from the biodegradation of pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 569–575. <https://doi.org/10.1007/s00216-001-1210-x>

Annexes

*Annexe 1 : Concentrations mesurées en entrée et sortie de STEU méditerranéennes en ng.L⁻¹
(moyenne, médiane, minimum-maximum)*

Analgésiques anti-inflammatoires	Pays	Entrée STEU *	Sortie STEU*	Références entrée STEU	Références sortie STEU
Diclofénac	Espagne	200-3600	<SD-2200	(Azzouz et al., 2010; Collado et al., 2014; Gómez et al., 2007; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012; Verlicchi et al., 2012a)	(Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gómez et al., 2007; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012; Kuster et al., 2008; Rodríguez-Navas et al., 2013)
	France	1300	100-1200	(Choubert et al., 2017)	(Andreozzi et al., 2003; Choubert et al., 2017; Ferrari et al., 2003; Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008)
	Croatie	50-540	<SD-390	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	360-480	220-5450		(Al Aukidy et al., 2012; Andreozzi et al., 2003; Ferrari et al., 2003; Verlicchi et al., 2012a)
	Grèce	<SD-4869	<SD-2668	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Kosma et al., 2010; Koutsouba et al., 2003; Papageorgiou et al., 2016; Samaras et al., 2013)	(Andreozzi et al., 2003; Dasenaki et Thomaidis, 2015; Ferrari et al., 2003; Kosma et al., 2010; Koutsouba et al., 2003; Papageorgiou et al., 2016; Samaras et al., 2013)
	Algérie	991-2319	1616-2711	(Kermia et al., 2016)	(Kermia et al., 2016)
	Turquie	295-1376	119-1012	(Sari et al., 2014)	(Sari et al., 2014)
	Tous pays	1136 / 776 <SD-4869	717 / 478 <SD-5450		
Ibuprofène	Espagne	1555-168000	<SD-28000	(Azzouz et al., 2010; Collado et al., 2014; Gómez et al., 2007; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)	(Collado et al., 2014; Gómez et al., 2007; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012; Kuster et al., 2008)
	France	Pas de donnée	18-1200		(Andreozzi et al., 2003; Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008; Vulliet et al., 2008)
	Croatie	<SD-900	40-800	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	930-1818	<SD-180	(Celano et al., 2014; Verlicchi et al., 2012a)	(Andreozzi et al., 2003; Castiglioni et al., 2005; Celano et al., 2014; Verlicchi et al., 2012a; Zuccato et al., 2005)
	Grèce	526-25400	<SD-2600	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Kosma et al., 2010; Koutsouba et al., 2003; Samaras et al., 2013)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Kosma et al., 2010; Koutsouba et al., 2003; Samaras et al., 2013)
	Algérie	1608-8613	341-431	(Kermia et al., 2016)	(Kermia et al., 2016)
	Tous pays	15088 / 1818 <SD-168000	1428 / 180 <SD-28000		
Kétoprofène	Espagne	410-1440	39-560	(Azzouz et al., 2010; Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)	(Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)
	France	2200	<SD-6000	(Choubert et al., 2017)	(Andreozzi et al., 2003; Choubert et al., 2017; Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008)
	Croatie	160-970	130-620	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	130-190	<SD-110	(Verlicchi et al., 2012a)	(Andreozzi et al., 2003; Verlicchi et al., 2012a)

Annexes

	Grèce	<SD-793	<SD-220	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016; Samaras et al., 2013)	(Andreozzi et al., 2003; Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016; Samaras et al., 2013)
	Algérie	<SD-565	<SD-1035	(Kermia et al., 2016)	(Kermia et al., 2016)
	Tous pays	555 / 410 <SD-2200	663 / 130 <SD-6000		
Naproxène	Espagne	35-7661	<SD-1942	(Azzouz et al., 2010; Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)	(Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)
	France	Pas de donnée	42-2000		(Andreozzi et al., 2003; Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008)
	Croatie	<SD-190	<SD-160	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	780-1099	<SD-5220	(Celano et al., 2014; Verlicchi et al., 2012a)	(Al Aukidy et al., 2012; Andreozzi et al., 2003; Celano et al., 2014; Verlicchi et al., 2012a)
	Grèce	<SD-2000	<SD-700	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Kosma et al., 2010; Papageorgiou et al., 2016; Samaras et al., 2013)	(Andreozzi et al., 2003; Dasenaki et Thomaidis, 2015; Kosma et al., 2010; Papageorgiou et al., 2016; Samaras et al., 2013)
	Algérie	1220-9585	<SD-338	(Kermia et al., 2016)	(Kermia et al., 2016)
	Tous pays	1797 / 866 <SD-9585	554 / 268 <SD-5220		
Acétaminophène	Espagne	12955-246000	<SD-4300	(Collado et al., 2014; Gómez et al., 2007; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)	(Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gómez et al., 2007; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)
	France	Pas de donnée	108-225000		(Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008)
	Croatie	130-26090	<SD-5990	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	500-1200	12-58	(Verlicchi et al., 2012a)	(Verlicchi et al., 2012a)
	Grèce	<SD-81016	<SD-7420	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Kosma et al., 2010; Papageorgiou et al., 2016)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Kosma et al., 2010; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	24480 / 3576 <SD-246000	17280 / 419 <SD-225000		
Acide Salicylique	Espagne	3224-13640	<SD-114	(Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)	(Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)
	Italie	210-1100	110-130	(Verlicchi et al., 2012a)	(Verlicchi et al., 2012a)
	Grèce	<SD-164400	<SD-10100	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Kosma et al., 2010; Papageorgiou et al., 2016)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Kosma et al., 2010; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	18358 / 6571 <SD-164400	1189 / 164 <SD-10100		
Acide Acétylsalicylique	Espagne	Pas de donnée	<SD-50		(Kuster et al., 2008)
	France	Pas de donnée	23-8100		(Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008)
	Grèce	5908-25900	392-7421	(Dasenaki et Thomaidis, 2015)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015)
	Tous pays	12958 / 10012 5908-25900	2247 / 1928 <SD-8100		

Régulateurs lipidiques	Pays	Entrée STEU *	Sortie STEU*	Références entrée STEU	Références sortie STEU
Bézafibrate	Espagne	121-424	<SD-87	(Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)	(Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)
	France	Pas de donnée	<SD-1070		(Andreozzi et al., 2003)
	Croatie	<SD-50	<SD-10	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)

Annexes

	Italie	63-120	<SD-910	(Verlicchi et al., 2012a)	(Andreozzi et al., 2003; Castiglioni et al., 2005; Verlicchi et al., 2012a; Zuccato et al., 2005)
	Grèce	<SD-52	<SD	(Papageorgiou et al., 2016)	(Andreozzi et al., 2003; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	128 / 90 <SD-424	110 / 29 <SD-1070		
Gemfibrozil	Espagne	924-5120	<SD-1018	(Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)	(Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)
	France	Pas de donnée	2-1340		(Andreozzi et al., 2003; Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008)
	Croatie	<SD-360	<SD-320	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	160-280	40-4760	(Verlicchi et al., 2012a)	(Andreozzi et al., 2003; Verlicchi et al., 2012a)
	Grèce	<SD-3300	1-1300	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Kosma et al., 2010; Papageorgiou et al., 2016)	(Andreozzi et al., 2003; Dasenaki et Thomaidis, 2015; Kosma et al., 2010; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	1015 / 360 115-5120	423 / 103 <SD-4760		
Atorvastatine	Espagne	97-182	9-111	(Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)	(Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)
	Italie	<SD-18	<SD-10	(Verlicchi et al., 2012a)	(Al Aukidy et al., 2012; Verlicchi et al., 2012a)
	Grèce	<SD	<SD	(Papageorgiou et al., 2016)	(Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	92 / 97 <SD-182	23 / 10 <SD-111		
Acide Clofibrrique	Espagne	<SD-15.9	<SD-105	(Azzouz et al., 2010)	(Kuster et al., 2008)
	France	Pas de donnée	<SD		(Andreozzi et al., 2003)
	Croatie	<SD-110	20-30	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	<SD-12	<SD-680	(Verlicchi et al., 2012a)	(Andreozzi et al., 2003; Castiglioni et al., 2005; Ferrari et al., 2003; Verlicchi et al., 2012a)
	Grèce	<SD	<SD-6	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Koutsouba et al., 2003; Papageorgiou et al., 2016)	(Andreozzi et al., 2003; Dasenaki et Thomaidis, 2015; Ferrari et al., 2003; Koutsouba et al., 2003; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	44 / 16 <SD-110	77 / 13 <SD-680		
Fénofibrate	France	Pas de donnée	20-120		(Andreozzi et al., 2003)
	Italie	<SD-20	<SD-160	(Verlicchi et al., 2012a)	(Andreozzi et al., 2003; Verlicchi et al., 2012a)
	Grèce	<SD	<SD-1100	(Kosma et al., 2010; Papageorgiou et al., 2016)	(Andreozzi et al., 2003; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	13 / 13 <SD-20	274 / 140 <SD-1100		

Psychotropes	Pays	Entrée STEU *	Sortie STEU*	Références entrée STEU	Références sortie STEU
Carbamazépine	Espagne	27-95	2-249	(Azzouz et al., 2010; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012)	(Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gómez et al., 2007; Gros et al., 2012; Rodríguez-Navas et al., 2013)
	France	500	15-1200	(Choubert et al., 2017)	(Andreozzi et al., 2003; Fenet et al., 2014; Ferrari et al., 2003; Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008)
	Croatie	<18-950	<10-630	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)

Annexes

	Italie	233-1170	<SD-1318	(Celano et al., 2014; Verlicchi et al., 2014, 2012a)	(Al Aukidy et al., 2012; Andreozzi et al., 2003; Castiglioni et al., 2005; Celano et al., 2014; Ferrari et al., 2003; Verlicchi et al., 2014, 2012a; Zuccato et al., 2005)
	Grèce	<SD-1713	<SD-1100	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016; Samaras et al., 2013)	(Andreozzi et al., 2003; Dasenaki et Thomaidis, 2015; Ferrari et al., 2003; Kosma et al., 2010; Papageorgiou et al., 2016)
	Tunisie	Pas de donnée	111-293		(Fenet et al., 2012)
	Tous pays	319 / 117 <SD-1713	267 / 157 <SD-1318		
Fluoxétine	Espagne	23	28	(Gros et al., 2012)	(Gros et al., 2012)
	France	25	10	(Choubert et al., 2017)	(Choubert et al., 2017)
	Croatie	<SD	<SD	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	55-190	10-63	(Verlicchi et al., 2012a)	(Verlicchi et al., 2012a)
	Tous pays	81 / 55 <SD-190	31 / 28 <SD-63		
Venlafaxine	Espagne	528-4108	<SD-2659	(Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)	(Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)
	Grèce	<SD-70.1	<SD-125	(Papageorgiou et al., 2016)	(Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	779 / 70 <SD-4108	303 / 201 <SD-2659		
Amitriptyline	France	37	<SD-25	(Choubert et al., 2017)	(Choubert et al., 2017; Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008)
	Tous pays	37	13 / 12 <SD-25		

Bétabloquants	Pays	Entrée STEU *	Sortie STEU*	Références entrée STEU	Références sortie STEU
Propranolol	Espagne	<SD-465	<SD-97	(Azzouz et al., 2010; Gros et al., 2012)	(Gros et al., 2012)
	France	250	10-155	(Choubert et al., 2017)	(Andreozzi et al., 2003; Choubert et al., 2017)
	Croatie	80-290	100-470	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	14-45	10-90	(Verlicchi et al., 2012a)	(Andreozzi et al., 2003; Verlicchi et al., 2012a)
	Grèce	<SD-82.2	<SD-90	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)	(Andreozzi et al., 2003; Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	115 / 53 <SD-465	83 / 63 <SD-470		
Aténolol	Espagne	2224-3856	53-2269	(Collado et al., 2014; Gros et al., 2012)	(Collado et al., 2014; Gros et al., 2012; Rodríguez-Navas et al., 2013)
	France	2100	600	(Choubert et al., 2017)	(Choubert et al., 2017)
	Croatie	<SD-740	<SD-1150	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	1800-2400	27-980	(Verlicchi et al., 2012a)	(Al Aukidy et al., 2012; Castiglioni et al., 2005; Verlicchi et al., 2012a; Zuccato et al., 2005)
	Grèce	<SD-2346	<SD-1866	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	1811 / 1821 <SD-3856	751 / 529 <SD-2269		
Sotalol	Espagne	<SD-99	<SD-81	(Gros et al., 2012)	(Gros et al., 2012)
	France	3250	1100	(Choubert et al., 2017)	(Choubert et al., 2017)

Annexes

	Croatie	120-200	<SD-210	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	370-640	152-470	(Verlicchi et al., 2012a)	(Al Aukidy et al., 2012; Verlicchi et al., 2012a)
	Tous pays	672 / 285 <SD-3250	320 / 258 <SD-1100		
Métoprolol	Espagne	<SD-393	<SD-169	(Azzouz et al., 2010; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012)	(Collado et al., 2014; Gros et al., 2012; Rodríguez-Navas et al., 2013)
	France	60	50-80	(Choubert et al., 2017)	(Andreozzi et al., 2003; Choubert et al., 2017)
	Croatie	<SD	<SD	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	220-290	10-219	(Verlicchi et al., 2012a)	(Al Aukidy et al., 2012; Andreozzi et al., 2003; Verlicchi et al., 2012a)
	Grèce	<SD-474	<SD-780	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)	(Andreozzi et al., 2003; Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	254 / 287 <SD-474	278 / 120 <SD-780		

Antibiotiques	Pays	Entrée STEU *	Sortie STEU*	Références entrée STEU	Références sortie STEU
Sulfaméthoxazole	Espagne	<SD-768	<SD-372	(Collado et al., 2014; García-Galán et al., 2010; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2013, 2012; Rodríguez-Mozaz et al., 2015)	(Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; García-Galán et al., 2010; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2013, 2012; Rodríguez-Mozaz et al., 2015)
	France	1000	70-300	(Choubert et al., 2017)	(Andreozzi et al., 2003; Choubert et al., 2017)
	Croatie	<SD-2033	<SD-1207	(Gros et al., 2006; Senta et al., 2013)	(Gros et al., 2006; Senta et al., 2013)
	Italie	105-740	<SD-317	(Celano et al., 2014; Verlicchi et al., 2012a; Zuccato et al., 2010)	(Al Aukidy et al., 2012; Andreozzi et al., 2003; Castiglioni et al., 2005; Celano et al., 2014; Verlicchi et al., 2012a; Zuccato et al., 2010, 2005)
	Grèce	<SD-507	<SD-169	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)	(Andreozzi et al., 2003; Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	394 / 252 <SD-2033	105 / 90 <SD-1207		
Triméthoprim	Espagne	54-204	7-125	(Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012; Rodríguez-Mozaz et al., 2015)	(Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012; Rodríguez-Mozaz et al., 2015)
	France	250	20-60	(Choubert et al., 2017)	(Andreozzi et al., 2003; Choubert et al., 2017)
	Croatie	<25-4220	70-1352	(Gros et al., 2006; Senta et al., 2013)	(Gros et al., 2006; Senta et al., 2013)
	Italie	59-73	<SD-130	(Verlicchi et al., 2014)	(Al Aukidy et al., 2012; Andreozzi et al., 2003; Verlicchi et al., 2014)
	Grèce	41-309	<SD-154	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)	(Andreozzi et al., 2003; Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	445 / 156 <25-4220	150 / 63 <SD-1352		

Annexes

Ofloxacin	Espagne	128-5700	61-191	(Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2013, 2012; Rodriguez-Mozaz et al., 2015)	(Andreozzi et al., 2003; Gros et al., 2013; Rodriguez-Mozaz et al., 2015)
	France	250	150-510	(Choubert et al., 2017)	(Andreozzi et al., 2003)
	Croatie	<SD	<SD	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	450-2200	220-1081	(Verlicchi et al., 2014, 2012b)	(Andreozzi et al., 2003; Verlicchi et al., 2014, 2012a; Zuccato et al., 2010)
	Grèce	116-180	62-460	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)	(Andreozzi et al., 2003; Dasenaki et Thomaidis, 2015)
	Tous pays	993 / 280 <SD-5700	346 / 255 <SD-1081		
Norfloxacin	Espagne	<SD-447	<SD-150	(Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2013)	(Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2013)
	France	Pas de donnée	50-80		(Andreozzi et al., 2003)
	Croatie	501-2937	279-1185	(Senta et al., 2013)	(Senta et al., 2013)
	Italie	150-310	60-70	(Verlicchi et al., 2014, 2012b)	(Andreozzi et al., 2003; Verlicchi et al., 2014, 2012a)
	Grèce	237-447	70-308	(Dasenaki et Thomaidis, 2015)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015)
	Tous pays	602 / 301 <SD-2937	200 / 140 <SD-1185		
Clarithromycin	Espagne	55-632	<SD-229	(Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2013, 2012; Rodriguez-Mozaz et al., 2015)	(Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2013, 2012; Rodriguez-Mozaz et al., 2015)
	France	750	250	(Choubert et al., 2017)	(Choubert et al., 2017)
	Italie	110-780	<SD-374	(Verlicchi et al., 2012a; Zuccato et al., 2010)	(Al Aukidy et al., 2012; Castiglioni et al., 2005; Verlicchi et al., 2014, 2012a; Zuccato et al., 2010, 2005)
	Grèce	671-2683	900-1476	(Dasenaki et Thomaidis, 2015)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015)
	Tous pays	598 / 461 55-2683	223 / 107 <SD-1476		
Azithromycin	Espagne	<SD-437	31-592	(Collado et al., 2014; Gros et al., 2013, 2012; Rodriguez-Mozaz et al., 2015)	(Collado et al., 2014; Gros et al., 2013, 2012; Rodriguez-Mozaz et al., 2015)
	Croatie	<SD-1139	50-210	(Gros et al., 2006; Senta et al., 2013)	(Gros et al., 2006; Senta et al., 2013)
	Italie	10-330	22-209	(Verlicchi et al., 2014, 2012b)	(Al Aukidy et al., 2012; Verlicchi et al., 2014, 2012a)
	Grèce	<SD-64	123-245	(Dasenaki et Thomaidis, 2015)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015)
	Tous pays	257 / 197 <SD-1139	126 / 116 22-245		
Erythromycin	Espagne	15-63	<SD-1202	(Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012)	(Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2012; Rodríguez-Navas et al., 2013)
	France	<SD	80	(Choubert et al., 2017)	(Choubert et al., 2017)
	Croatie	<SD	<SD	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	10-72	9-353	(Verlicchi et al., 2014, 2012a, 2012a; Zuccato et al., 2010)	(Castiglioni et al., 2005; Verlicchi et al., 2014, 2012a; Zuccato et al., 2010, 2005)
	Grèce	<SD-320	<SD	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	89 / 63	90 / 30		

Annexes

		<SD-320	<SD-1202		
Ciprofloxacine	Espagne	230-1558	<SD-245	(Collado et al., 2014; Ferrando-Climent et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2013, 2012; Rodriguez-Mozaz et al., 2015)	(Collado et al., 2014; Ferrando-Climent et al., 2014; Gracia-Lor et al., 2012; Gros et al., 2013, 2012; Rodriguez-Mozaz et al., 2015)
	France	200	60-175	(Choubert et al., 2017)	(Andreozzi et al., 2003; Choubert et al., 2017)
	Croatie	114-2610	45-201	(Senta et al., 2013)	(Senta et al., 2013)
	Italie	513-3700	10-1100	(Verlicchi et al., 2014, 2012a; Zuccato et al., 2010)	(Al Aukidy et al., 2012; Andreozzi et al., 2003; Castiglioni et al., 2005; Verlicchi et al., 2014, 2012a; Zuccato et al., 2010, 2005)
	Grèce	<SD-2881	<SD-1437	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)	(Andreozzi et al., 2003; Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	1053 / 639 <SD-3700	294 / 175 <SD-1437		
Métronidazole	Espagne	<SD-316	<SD-177	(Gros et al., 2013, 2012; Rodriguez-Mozaz et al., 2015)	(Gros et al., 2013, 2012; Rodriguez-Mozaz et al., 2015)
	France	800	250	(Choubert et al., 2017)	(Choubert et al., 2017)
	Italie	29-55	9-41	(Verlicchi et al., 2014)	(Al Aukidy et al., 2012; Verlicchi et al., 2014, 2012a)
	Grèce	<SD-490	<SD-186	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	185 / 95 <SD-800	83 / 35 <SD-250		
Amoxicilline	Espagne	<SD	nd-283	(Gros et al., 2013)	(Gros et al., 2013; Rodríguez-Navas et al., 2013)
	Italie	18	nd-120	(Zuccato et al., 2010)	(Castiglioni et al., 2005; Zuccato et al., 2010, 2005)
	Grèce	<SD-39	<SD-51	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	27 / 29 <SD-39	93 / 39 <SD-283		

Autres	Pays	Entrée STEU *	Sortie STEU*	Références entrée STEU	Références sortie STEU
Iopromide	Espagne	62-6263	195-8514	(Collado et al., 2014; Gros et al., 2012)	(Collado et al., 2014; Gros et al., 2012)
	Tous pays	2170 / 186 62-6263	3094 / 579 195-8514		
Enalapril	Espagne	20-290	<SD	(Gracia-Lor et al., 2012)	(Gracia-Lor et al., 2012)
	Italie	71-100	<SD	(Verlicchi et al., 2012a)	(Al Aukidy et al., 2012; Castiglioni et al., 2005; Verlicchi et al., 2012a; Zuccato et al., 2005)
	Tous pays	127 / 100 20-290	<SD / <SD		
Ranitidine	Espagne	592-1165	118-179	(Collado et al., 2014; Gros et al., 2012)	(Collado et al., 2014; Gros et al., 2012)
	Croatie	<SD-290	<20-200	(Gros et al., 2006)	(Gros et al., 2006)
	Italie	93-130	36-610	(Verlicchi et al., 2012a)	(Castiglioni et al., 2005; Verlicchi et al., 2012a)
	Grèce	<SD-1995	<SD-1377	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)

Annexes

	Tous pays	604 / 441 <SD-1995	365 / 230 <SD-1377		
Furosémide	Espagne	960-2761	<SD-724	(Collado et al., 2014; Gros et al., 2012)	(Collado et al., 2014; Gros et al., 2012; Rodríguez-Navas et al., 2013)
	Italie	390-470	<SD-2102	(Verlicchi et al., 2012a)	(Al Aukidy et al., 2012; Castiglioni et al., 2005; Verlicchi et al., 2012a; Zuccato et al., 2005)
	Grèce	<SD-15320	<SD-3383	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015; Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	4030/ 2242 <SD-15320	1172/ 585 <SD-3383		
Salbutamol	Espagne	44	48-234	(Gros et al., 2012)	(Gros et al., 2012; Rodríguez-Navas et al., 2013)
	France	10	<SD-4.5	(Choubert et al., 2017)	(Choubert et al., 2017; Muller et al., 2008)
	Italie	11-20	<SD-26	(Verlicchi et al., 2012a)	(Al Aukidy et al., 2012; Castiglioni et al., 2005; Verlicchi et al., 2012a; Zuccato et al., 2005)
	Grèce	<SD	<SD	(Papageorgiou et al., 2016)	(Papageorgiou et al., 2016)
	Tous pays	20 / 13 <SD-44	35 / 11 <SD-234		
Metformine	Grèce	97036-176417	885-4806	(Dasenaki et Thomaidis, 2015)	(Dasenaki et Thomaidis, 2015)
	Tous pays	136096 / 135467 97036-176417	2508 / 2180 885-4806		

Hormones	Pays	Entrée STEU *	Sortie STEU*	Références entrée STEU	Références sortie STEU
17β-estradiol	Espagne	<SD-33	Pas de donnée	(Azzouz et al., 2010; Pedrouzo et al., 2009)	
	France	13-28	<SD-3	(Choubert et al., 2017; Muller et al., 2008)	(Choubert et al., 2017; Muller et al., 2008)
	Italie	6-25	<SD-3.	(Baronti et al., 2000)	(Baronti et al., 2000; Castiglioni et al., 2005)
	Grèce	Pas de donnée	<SD		(Arditsoglou et Voutsas, 2008)
	Palestine et Israël	<SD-18	<SD	(Dotan et al., 2016)	(Dotan et al., 2016)
	Tous pays	14 / 11 <SD-33	1.5 / 1 <SD-3.5		
Estriol	Espagne	<SD	<SD	(Pedrouzo et al., 2009)	(Pedrouzo et al., 2009)
	France	19-225	<SD-3	(Choubert et al., 2017; Muller et al., 2008)	(Choubert et al., 2017; Muller et al., 2008)
	Italie	24-187	0.4-18	(Baronti et al., 2000)	(Baronti et al., 2000)
	Grèce	Pas de donnée	<SD		(Arditsoglou et Voutsas, 2008)
	Palestine et Israël	14-124	<SD-15	(Dotan et al., 2016)	(Dotan et al., 2016)
	Tous pays	72 / 64 <SD-225	3 / 1.4 <SD-18		
Estrone	Espagne	<SD-90	<SD-1.7	(Azzouz et al., 2010; Pedrouzo et al., 2009)	(Kuster et al., 2008; Pedrouzo et al., 2009)
	France	6-110	2-8	(Choubert et al., 2017; Muller et al., 2008)	(Choubert et al., 2017; Muller et al., 2008)

Annexes

	Italie	25-132	<SD-82	(Baronti et al., 2000)	(Baronti et al., 2000; Castiglioni et al., 2005)
	Grèce	Pas de donnée	<SD		(Arditsoglou et Voutsas, 2008)
	Palestine et Israe	<SD-181	<SD-34	(Dotan et al., 2016)	(Dotan et al., 2016)
	Tous pays	68 / 59 <SD-181	21 / 10 <SD-82		
Estrone-3-Sulfate	Espagne	52-160	<SD-0.55	(Pedrouzo et al., 2009)	(Kuster et al., 2008; Pedrouzo et al., 2009)
	Tous pays	93 / 64 52-160	0.2 / 0.2 <SD-0.55		
17 α -ethinylestradiol	Espagne	<SD-154	<SD	(Azzouz et al., 2010; Pedrouzo et al., 2009)	(Pedrouzo et al., 2009)
	France	<SD-20	<SD-2	(Choubert et al., 2017; Muller et al., 2008)	(Choubert et al., 2017; Muller et al., 2008)
	Italie	0.4-13	<SD-1.7	(Baronti et al., 2000)	(Baronti et al., 2000; Castiglioni et al., 2005; Zuccato et al., 2005)
	Tous pays	8 / 2 <SD-154	0.6 / 0.5 <SD-1.7		
Progestérone	Grèce	<SD-275	<SD	(Papageorgiou et al., 2016)	(Papageorgiou et al., 2016)
	France	25	0.3	(Choubert et al., 2017)	(Choubert et al., 2017)
	Tous pays	197 / 244 <SD-275	0.3 / 0.3 <SD-0.3		
Testostérone	France	180	1	(Choubert et al., 2017)	(Choubert et al., 2017)
	Tous pays	180	1		

Annexe 2 : Concentrations mesurées en rivières et dans la mer Méditerranée en ng.L⁻¹

(moyenne, médiane, minimum-maximum)

Analgésiques anti-inflammatoires	Pays	Rivières*	Mer*		Références Rivières	Références Mer
			d	d+p		
Diclofénac	Espagne	<SD-18740	<SD-59	<SD	(Azzouz et al., 2010; Banjac et al., 2015; Boix et al., 2015; Calderón-Preciado et al., 2011; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2007, 2006; Kuster et al., 2008; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012; Vazquez-Roig et al., 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Nödler et al., 2014; Rodríguez-Navas et al., 2013)
	France	1.4-33.2	nd-2	<SD-0.02	(Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	(Brumovský et al., 2017; Munaron et al., 2012; Tapie et al., n.d.)
	Italie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD		(Nödler et al., 2014)
	Grèce	Pas de donnée	<SD-16.3	<SD-14		(Alygizakis et al., 2016; Nödler et al., 2016)
	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-9.7		(Nödler et al., 2014)
	Turquie	<SD-45.7	Pas de donnée	Pas de donnée	(Aydin et Talinli, 2013)	
	Israël	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-6.1		(Nödler et al., 2014)
	Tous pays	238 / 25 <SD-18740	10 / 5.6 <SD-59	6.1 / 5.8 <SD-14		
Ibuprofène	Espagne	<SD-9890	<SD-130	<SD	(Azzouz et al., 2010; Banjac et al., 2015; Calderón-Preciado et al., 2011; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2007, 2006; Kuster et al., 2008; López-Roldán et al., 2010; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012; Vazquez-Roig et al., 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2014)
	France	<SD-5.5	Pas de donnée	<SD-1.08	(Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	(Brumovský et al., 2017)
	Italie	<SD-240	Pas de donnée	<SD-70	(Calamari et al., 2003; Celano et al., 2014)	(Loos et al., 2013; Nödler et al., 2014)
	Grèce	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-16		(Nödler et al., 2016)
	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-35		(Nödler et al., 2014)
	Turquie	<SD-263	Pas de donnée	Pas de donnée	(Aydin et Talinli, 2013)	

Annexes

	Israël	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-7.5		(Nödler et al., 2014)
	Tous pays	257 / 59 <SD-9890	57.7 / 36.7 <SD-130	13.9 / 1.1 <SD-70		
Kétoprofène	Espagne	<SD-2710	<SD-49.3	Pas de donnée	(Azzouz et al., 2010; Banjac et al., 2015; Calderón-Preciado et al., 2011; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2007, 2006; López-Roldán et al., 2010; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2014)
	France	<SD-14.5	<SD-3.5	<SD-0.18	(Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	(Brumovský et al., 2017; Munaron et al., 2012; Tapie et al., n.d.)
	Tous pays	85 / 15 <SD-2710	18 / 13.4 <SD-49.3	0.02 / 0.02 <SD-0.18		
Naproxène	Espagne	<SD-2060	<SD-69.7	<SD	(Azzouz et al., 2010; Banjac et al., 2015; Boix et al., 2015; Calderón-Preciado et al., 2011; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2007, 2006; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Nödler et al., 2014)
	France	<SD-9.1	<SD-0.05	0.5-1.7	(Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	(Brumovský et al., 2017; Tapie et al., n.d.)
	Italie	199	Pas de donnée	<SD-8.5	(Celano et al., 2014)	(Nödler et al., 2014)
	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD		(Nödler et al., 2014)
	Grèce	Pas de donnée	<SD-0.8	Pas de donnée		(Alygizakis et al., 2016)
	Turquie	2.6-12300	Pas de donnée	Pas de donnée	(Aydin et Talinli, 2013)	
	Tous pays	243 / 39 <SD-12300	15.3 / 2.5 <SD-69.7	2 / 1.5 <SD-8.5		
Acétaminophène	Espagne	<SD-9606	<SD-370	<SD	(Banjac et al., 2015; Boix et al., 2015; Calderón-Preciado et al., 2011; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2006; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012; Vazquez-Roig et al., 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Nödler et al., 2014)
	France	<SD-72.3	Pas de donnée	0.03-0.11	(Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	(Brumovský et al., 2017)
	Italie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-375		(Nödler et al., 2014)
	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-2983		(Nödler et al., 2014)

Annexes

	Grèce	Pas de donnée	<SD-40.5	<SD-725		(Alygizakis et al., 2016; Nödler et al., 2016)
	Israël	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-12		(Nödler et al., 2014)
	Tous pays	249 / 25 <SD-9606	47.7 / 20.3 <SD-370	219 / 5 <SD-2983		
Acide Salicylique	Espagne	<SD-89	<SD-217	Pas de donnée	(Collado et al., 2014; Gros et al., 2012; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2015, 2014)
	France	6.7	Pas de donnée	Pas de donnée	(Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Grèce	Pas de donnée	<SD-53.3	Pas de donnée		(Alygizakis et al., 2016)
	Tous pays	43 / 42 <SD-89	35.8 / 23.2 <SD-217	Pas de donnée		
Acide Acetylsalicylique	Espagne	<SD	Pas de donnée	Pas de donnée	(Kuster et al., 2008)	
	France	<SD	Pas de donnée	Pas de donnée	(Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008)	
	Tous pays	<SD	Pas de donnée	Pas de donnée		

Régulateurs lipidique	Pays	Rivières*	Mer*		Références Rivières	Références Mer
			d	d+p		
Bézafibrate	Espagne	<SD-15060	<SD-6.3	<SD	(Banjac et al., 2015; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2007, 2006; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012)	(Moreno-González et al., 2014; Nödler et al., 2014)
	France	3.4	Pas de donnée	Pas de donnée	(Comoretto et Chiron, 2005; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Italie	0.8-57	Pas de donnée	<SD-7.8	(Calamari et al., 2003)	(Loos et al., 2013; Nödler et al., 2014)
	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-3.5		(Nödler et al., 2014)
	Israël	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-3.8		(Nödler et al., 2014)
	Tous pays	218 / 5 <SD-15060	3.8 / 3.3 <SD-6.3	2.4 / 1.8 <SD-7.8		
Gemfibrozil	Espagne	<SD-7780	<SD-47.4	<SD / <SD	(Banjac et al., 2015; Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2007, 2006; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2015, 2014; Nödler et al., 2014)
	France	<SD-2.3	<SD-5	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Togola et Budzinski, 2008)	(Munaron et al., 2012; Tapie et al., n.d.)
	Italie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-5.2		(Loos et al., 2013; Nödler et al., 2014)

Annexes

	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-18		(Nödler et al., 2014)
	Israël	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD		(Nödler et al., 2014)
	Tous pays	336 / 26 <SD-7780	7.1 / 1.9 <SD-47.4	4.4 / 2.2 <SD-18		
Atorvastatine	Espagne	<SD-27	1	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Osorio et al., 2016, 2012)	(Gros et al., 2012)
	Tous pays	1.9 / 0.9 <SD-27	1	Pas de donnée		
Acide Clofibrrique	Espagne	<SD-2280	<SD	Pas de donnée	(Azzouz et al., 2010; Calderón-Preciado et al., 2011; Gros et al., 2007, 2006; Kuster et al., 2008; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2012)	(Azzouz et al., 2010)
	France	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD		(Brumovský et al., 2017)
	Italie	<SD-6	Pas de donnée	<SD-0.19	(Calamari et al., 2003)	(Loos et al., 2013)
	Tous pays	188 / 2.3 <SD-2280	<SD	0.12 / 0.1 <SD-0.19		
Fénofibrate	Espagne	<SD-1244	Pas de donnée	Pas de donnée	(López-Serna et al., 2012; Osorio et al., 2012; Vazquez-Roig et al., 2012)	
	Tous pays	105 / 19 <SD-1244	Pas de donnée	Pas de donnée		

Psychotropes	Pays	Rivières*	Mer*		Références Rivières	Références Mer
			d	d+p		
Carbamazépine	Espagne	<SD-267	<SD-154.1	<SD	(Azzouz et al., 2010; Banjac et al., 2015; Boix et al., 2015; Calderón-Preciado et al., 2011; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2007, 2006; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012; Vazquez-Roig et al., 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2015, 2014; Nödler et al., 2014)
	France	<SD-6720	0.01-0.38	0.004-0.01	(Comoretto et Chiron, 2005; Feitosa-Felizzola et Chiron, 2009; Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	(Brumovský et al., 2017; Fenet et al., 2014; Martínez Bueno et al., 2016; Munaron et al., 2012; Tapie et al., n.d.)
	Italie	7-50	Pas de donnée	<SD-6.5	(Celano et al., 2014; Verlicchi et al., 2014)	(Loos et al., 2013; Nödler et al., 2014)

Annexes

	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-22		(Nödler et al., 2014)
	Grèce	Pas de donnée	<SD-1.4	<SD-14		(Alygizakis et al., 2016; Nödler et al., 2016, 2014)
	Israël	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-8.8		(Nödler et al., 2014)
	Tous pays	237 / 24 <SD-6720	11.9 / 0.6 <SD-154.1	0.32 / 0.3 <SD-22		
Fluoxétine	Espagne	<SD-54	<SD	<SD	(Banjac et al., 2015; Gros et al., 2012, 2006; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2015; Nödler et al., 2014)
	France	<SD	Pas de donnée	Pas de donnée	(Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Israël	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD		(Nödler et al., 2014)
	Tous pays	8 / 4.2 <SD-54	<SD	<SD		
Venlafaxine	Espagne	<SD-1654	52	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012; Osorio et al., 2016)	(Gros et al., 2012)
	Tous pays	108 / 10 <SD-1654	52	Pas de donnée		
Amitriptyline	France	<SD	Pas de donnée	Pas de donnée	(Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008)	
	Tous pays	<SD	Pas de donnée	Pas de donnée		

Bétabloquants	Pays	Rivières*	Mer*		Références Rivières	Références Mer
			d	d+p		
Propranolol	Espagne	<SD-69	<SD-5.3	Pas de donnée	(Azzouz et al., 2010; Banjac et al., 2015; Gros et al., 2012, 2007, 2006; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012; Vazquez-Roig et al., 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2015, 2014)
	France	1.2	Pas de donnée	Pas de donnée	(Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Turquie	<SD-561	Pas de donnée	Pas de donnée	(Aydin et Talinli, 2013)	
	Tous pays	20.0 / 5 <SD-561	2.2 / 1.8 <SD-5.3	Pas de donnée		
Aténolol	Espagne	<SD-670	<SD-38	<SD	(Banjac et al., 2015; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2007, 2006; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Nödler et al., 2014; Rodríguez-Navas et al., 2013)
	France	4.7	Pas de donnée	<SD-20	(Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	(Brumovský et al., 2017)

Annexes

	Italie	3-241	Pas de donnée	<SD-22	(Zuccato et al., 2005)	(Esteban et al., 2014; Nödler et al., 2014)
	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-194		(Nödler et al., 2014)
	Grèce	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-20		(Nödler et al., 2016)
	Turquie	<SD-122	Pas de donnée	Pas de donnée	(Aydin et Talinli, 2013)	
	Israël	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD		(Nödler et al., 2014)
	Tous pays	77 / 22 <SD-670	10.8 / 6 <SD-38	32.8 / 20 <SD-194		
Sotalol	Espagne	<SD-788	<SD-22.3	<SD	(Banjac et al., 2015; Gros et al., 2012, 2006; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Nödler et al., 2014)
	Grèce	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-53		(Nödler et al., 2016)
	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-67		(Nödler et al., 2014)
	Italie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-12		(Nödler et al., 2014)
	Israël	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD		(Nödler et al., 2014)
	Tous pays	134 / 11 <SD-788	6.3 / 3.8 <SD-22.3	24.6 / 13 <SD-67		
Métoprolol	Espagne	<SD-8041	<SD-8	<SD	(Azzouz et al., 2010; Banjac et al., 2015; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2006; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012; Vazquez-Roig et al., 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Nödler et al., 2014; Rodríguez-Navas et al., 2013)
	France	0.8	Pas de donnée	Pas de donnée	(Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Italie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-0.07		(Loos et al., 2013; Nödler et al., 2014)
	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-6		(Nödler et al., 2014)
	Grèce	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-5		(Nödler et al., 2016, 2014)
	Israël	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-6.7		(Nödler et al., 2014)
	Tous pays	210 / 7.2 <SD-8041	1.2 / 0.35 <SD-8	5.1 / 5.8 <SD-6.7		

Antibiotiques	Pays	Rivières*	Mer*		Références Rivières	Références Mer
			d	d+p		
Sulfaméthoxazole	Espagne	<SD-11920	<SD-64.8	<SD	(Banjac et al., 2015; Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; García-Galán et al., 2011, 2010; Gros et al., 2012, 2007, 2006; López-Roldán et al., 2010;	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2015, 2014; Nödler et al., 2014)

Annexes

					López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012; Rodríguez-Mozaz et al., 2015; Vazquez-Roig et al., 2012)	
	France	<SD-1.9	Pas de donnée	0.007-0.02	(Feitosa-Felizzola et Chiron, 2009; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	(Brumovský et al., 2017)
	Lebanon	<SD	Pas de donnée	Pas de donnée	(Mokh et al., 2017)	
	Italie	1.8-13	Pas de donnée	<SD-7.2	(Celano et al., 2014; Zuccato et al., 2010)	(Loos et al., 2013; Nödler et al., 2014)
	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-11		(Nödler et al., 2014)
	Turquie	<SD-332	Pas de donnée	Pas de donnée	(Aydin et Talinli, 2013)	(Nödler et al., 2014)
	Grèce	Pas de donnée	<SD-6.3	Pas de donnée		(Alygizakis et al., 2016)
	Israël	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD		(Nödler et al., 2014)
	Tous pays	167 / 16 <SD-11920	19.5 / 12.3 <SD-64.8	1.9 / 0.1 <SD-11		
Triméthopri-me	Espagne	<SD-252	<SD-15.1	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2007, 2006; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012; Rodríguez-Mozaz et al., 2015; Vazquez-Roig et al., 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2015, 2014)
	France	0.9	Pas de donnée	Pas de donnée	(Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Lebanon	<SD	Pas de donnée	Pas de donnée	(Mokh et al., 2017)	
	Italie	2	Pas de donnée	Pas de donnée	(Verlicchi et al., 2014)	
	Grèce	Pas de donnée	<SD-3.4	Pas de donnée		(Alygizakis et al., 2016)
	Tous pays	23 / 5.6 <SD-470	2.1 / 1.2 <SD-15.1	Pas de donnée		
Ofloxacine	Espagne	<SD-8870	2	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2007, 2006; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012; Rodríguez-Mozaz et al., 2015; Vazquez-Roig et al., 2012)	(Gros et al., 2012)
	France	<SD-3.2	Pas de donnée	Pas de donnée	(Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Lebanon	<SD-148	Pas de donnée	Pas de donnée	(Mokh et al., 2017)	
	Italie	<SD-3.2	Pas de donnée	Pas de donnée	(Verlicchi et al., 2014)	

Annexes

	Grèce	Pas de donnée	<SD	Pas de donnée		(Alygizakis et al., 2016)
	Tous pays	229 / 28 <SD-8870	2 <SD-2			
Norfloxacin	Espagne	<SD-405	Pas de donnée	Pas de donnée	(López-Serna et al., 2012; Osorio et al., 2012; Vazquez-Roig et al., 2012)	
	Lebanon	<SD-50	Pas de donnée	Pas de donnée	(Mokh et al., 2017)	
	Italie	<SD	Pas de donnée	Pas de donnée	(Verlicchi et al., 2014)	
	Tous pays	57 / 32 <SD-405	Pas de donnée	Pas de donnée		
Clarithromycine	Espagne	<SD-2403	<SD-711	<SD	(Banjac et al., 2015; Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Osorio et al., 2016, 2012; Rodriguez-Mozaz et al., 2015)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2015, 2014; Nödler et al., 2014)
	France	<SD-2330	Pas de donnée	Pas de donnée	(Feitosa-Felizzola et Chiron, 2009)	
	Italie	1-45	Pas de donnée	<SD-8.7	(Verlicchi et al., 2014; Zuccato et al., 2010, 2005)	(Nödler et al., 2014)
	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-16		(Nödler et al., 2014)
	Grèce	<SD-8.3	<SD	<SD-8.3	(Nödler et al., 2016)	(Alygizakis et al., 2016; Nödler et al., 2016)
	Israel	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD		(Nödler et al., 2014)
	Tous pays	166 / 9 <SD-2403	127 / 9.6 <SD-711	10.4 / 8.6 <SD-16		
Azithromycine	Espagne	<SD-16633	<SD-11205	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2007, 2006; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012; Rodriguez-Mozaz et al., 2015)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2015, 2014)
	France	<SD	Pas de donnée	Pas de donnée	(Feitosa-Felizzola et Chiron, 2009; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Italie	7	Pas de donnée	Pas de donnée	(Verlicchi et al., 2014)	
	Tous pays	412 / 8.2 <SD-16633	942 / 109.4 <SD-11205	Pas de donnée		
Erythromycine	Espagne	<SD-365	<SD-78.4	<SD	(Banjac et al., 2015; Boix et al., 2015; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012, 2007, 2006; López-Roldán et al., 2010; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2015; Nödler et al., 2014)
	Lebanon	<SD-2806	Pas de donnée	Pas de donnée	(Mokh et al., 2017)	

Annexes

	Italie	<SD-16	Pas de donnée	<SD-5.8	(Verlicchi et al., 2014; Zuccato et al., 2010, 2005)	(Nödler et al., 2014)
	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD		(Nödler et al., 2014)
	Turquie	<SD-131	Pas de donnée	Pas de donnée	(Aydin et Talinli, 2013)	
	Israël	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD		(Nödler et al., 2014)
	Tous pays	18 / 4.6 <SD-2806	24.4 / 10.7 <SD-78.4		<SD-5.8	
Ciprofloxacine	Espagne	<SD-271	<SD	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Collado et al., 2014; Ferrando-Climent et al., 2014; Gros et al., 2012; López-Serna et al., 2012; Osorio et al., 2016, 2012; Rodriguez-Mozaz et al., 2015; Vazquez-Roig et al., 2012)	(Gros et al., 2012)
	France	<SD-9660	Pas de donnée	<SD	(Feitosa-Felizzola et Chiron, 2009)	(Brumovský et al., 2017)
	Lebanon	<SD-108	Pas de donnée	Pas de donnée	(Mokh et al., 2017)	
	Italie	<SD-125	Pas de donnée	Pas de donnée	(Verlicchi et al., 2014; Zuccato et al., 2010, 2005)	
	Turquie	<SD-13567	Pas de donnée	Pas de donnée	(Aydin et Talinli, 2013)	
	Tous pays	425 / 23 <SD-13567	<SD	<SD		
Métronidazole	Espagne	<SD-66	<SD	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Gros et al., 2012; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Osorio et al., 2016, 2012; Rodriguez-Mozaz et al., 2015)	(Gros et al., 2012)
	France	0.3	Pas de donnée	Pas de donnée	(Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Italie	<SD			(Verlicchi et al., 2014)	
	Grèce	Pas de donnée	<SD-8.2	Pas de donnée		(Alygizakis et al., 2016)
	Tous pays	8.3 / 1 <SD-66	<SD-8.2	Pas de donnée		
Amoxicilline	Italie	<SD	Pas de donnée	Pas de donnée	(Zuccato et al., 2010, 2005)	
	Turquie	<SD-1654	Pas de donnée	Pas de donnée	(Aydin et Talinli, 2013)	
	Grèce	Pas de donnée	<SD-127.8	Pas de donnée		(Alygizakis et al., 2016)
	Tous pays	103 / 10 <SD-1654	36.7 / 38.6 <SD-127.8	Pas de donnée		

Autres	Pays	Rivières*	Mer*		Références Rivières	Références Mer
			d	d+p		
Iopromide	Espagne	0.3-1371	<SD	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Gros et al., 2012; Osorio et al., 2016)	(Gros et al., 2012)
	Italie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-71		(Nödler et al., 2014)

Annexes

	Grèce Turquie	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD-199		(Nödler et al., 2014)
	Grèce	Pas de donnée	Pas de donnée	<SD		(Nödler et al., 2016)
	Tous pays	139 / 2.4 0.3-1371	<SD	102 / 90 <SD-199		
Enalapril	Espagne	<SD-108	Pas de donnée	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; López-Serna et al., 2012; Vazquez-Roig et al., 2012)	
	Italie	<SD-0.5	Pas de donnée	Pas de donnée	(Zuccato et al., 2005)	
	Tous pays	8.9 / 3.1 <SD-108	Pas de donnée	Pas de donnée		
Ranitidine	Espagne	<SD-570	<SD-28.1	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Gros et al., 2012, 2007, 2006; López-Roldán et al., 2010; López-Serna et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2014)
	Italie	<SD-39			(Zuccato et al., 2005)	
	Tous pays	25 / 6.1 <SD-570	8.6 / 5.3 <SD 28.1	Pas de donnée		
Furosémide	Espagne	<SD-340	<SD-47	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Collado et al., 2014; Gros et al., 2012; López-Serna et al., 2012; Osorio et al., 2016, 2012)	(Gros et al., 2012; Rodríguez-Navas et al., 2013)
	France	<SD	Pas de donnée	Pas de donnée	(Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Italie	1.7-256	Pas de donnée	Pas de donnée	(Zuccato et al., 2005)	
	Tous pays	52 / 28 <SD-340	<SD-47	Pas de donnée		
Salbutamol	Espagne	<SD-37.2	<SD-1	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2014; Muñoz et al., 2009; Osorio et al., 2016, 2012)	(Gros et al., 2012; Moreno-González et al., 2015)
	France	<SD	<SD	Pas de donnée	(Rabiet et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008)	(Tapie et al., n.d.)
	Italie	<SD-2.5			(Zuccato et al., 2005)	
	Tous pays	3.5 / 2.3 <SD-37.2	<SD-1	Pas de donnée		
Metformine	France	100.6-735	Pas de donnée	Pas de donnée	(Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Tous pays	345.2 / 200 100.6-735	Pas de donnée	Pas de donnée		

Hormones	Pays	Rivières*	Mer* d	Références Rivières	Références Mer
17β-estradiol	Espagne	<SD-33.1	Pas de donnée	(Azzouz et al., 2010; Banjac et al., 2015; Esteban et al., 2014; Rodríguez-Mozaz et al., 2004)	
	France	<SD-1.3	Pas de donnée	(Vulliet et al., 2008; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Grèce	<SD	<SD	(Arditsoglou et Voutsas, 2008)	(Arditsoglou et Voutsas, 2008)

Annexes

	Turquie	<SD-10.2	Pas de donnée	(Aydin et Talinli, 2013)	
	Tous pays	9.1 / 2.1 <SD-33.1	<SD		
Estriol	Espagne	<SD-5.3	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Esteban et al., 2014; Rodriguez-Mozaz et al., 2004)	
	Grèce	<SD	<SD	(Arditsoglou et Voutsas, 2008)	(Arditsoglou et Voutsas, 2008)
	Turquie	<SD-16	Pas de donnée	(Aydin et Talinli, 2013)	
	Tous pays	5.7 / 3.9 <SD-16	<SD		
Estrone	Espagne	<SD-48.6	Pas de donnée	(Azzouz et al., 2010; Banjac et al., 2015; Esteban et al., 2014; Kuster et al., 2008; López-Roldán et al., 2010; Rodriguez-Mozaz et al., 2004)	
	France	<SD-0.5	Pas de donnée	(Vulliet et al., 2008; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Grèce	<SD	<SD	(Arditsoglou et Voutsas, 2008)	(Arditsoglou et Voutsas, 2008)
	Turquie	<SD-6.0	Pas de donnée	(Aydin et Talinli, 2013)	
	Tous pays	9.1 / 4.3 <SD-48.6	<SD		
Estrone-3-Sulfate	Espagne	<SD-8.1	Pas de donnée	(Banjac et al., 2015; Esteban et al., 2014; Kuster et al., 2008; López-Roldán et al., 2010; Rodriguez-Mozaz et al., 2004)	
	Tous pays	2.5 / 0.9 <SD-8.1	Pas de donnée		
17 α -ethinylestradiol	Espagne	<SD	Pas de donnée	(Azzouz et al., 2010; Banjac et al., 2015; Esteban et al., 2014; Rodriguez-Mozaz et al., 2004)	
	France	<SD-2.6	Pas de donnée	(Vulliet et al., 2008; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Turquie	<SD-14	Pas de donnée	(Aydin et Talinli, 2013)	
	Tous pays	6.3 / 2.6 <SD-14	Pas de donnée		
Progestérone	Espagne	0.9-1.4	Pas de donnée	(Kuster et al., 2008)	
	France	1.6-3.5	Pas de donnée	(Vulliet et al., 2008; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Tous pays	1.8 / 1.6 0.9-3.5	Pas de donnée		
Testostérone	Espagne	2.2-3.4	Pas de donnée	(Vulliet et al., 2008; Vulliet et Cren-Olivé, 2011)	
	Tous pays	2.8 / 2.8 2.2-3.4	Pas de donnée		

* Concentration en ng.L⁻¹ ; <SD : inférieur au seuil de détection

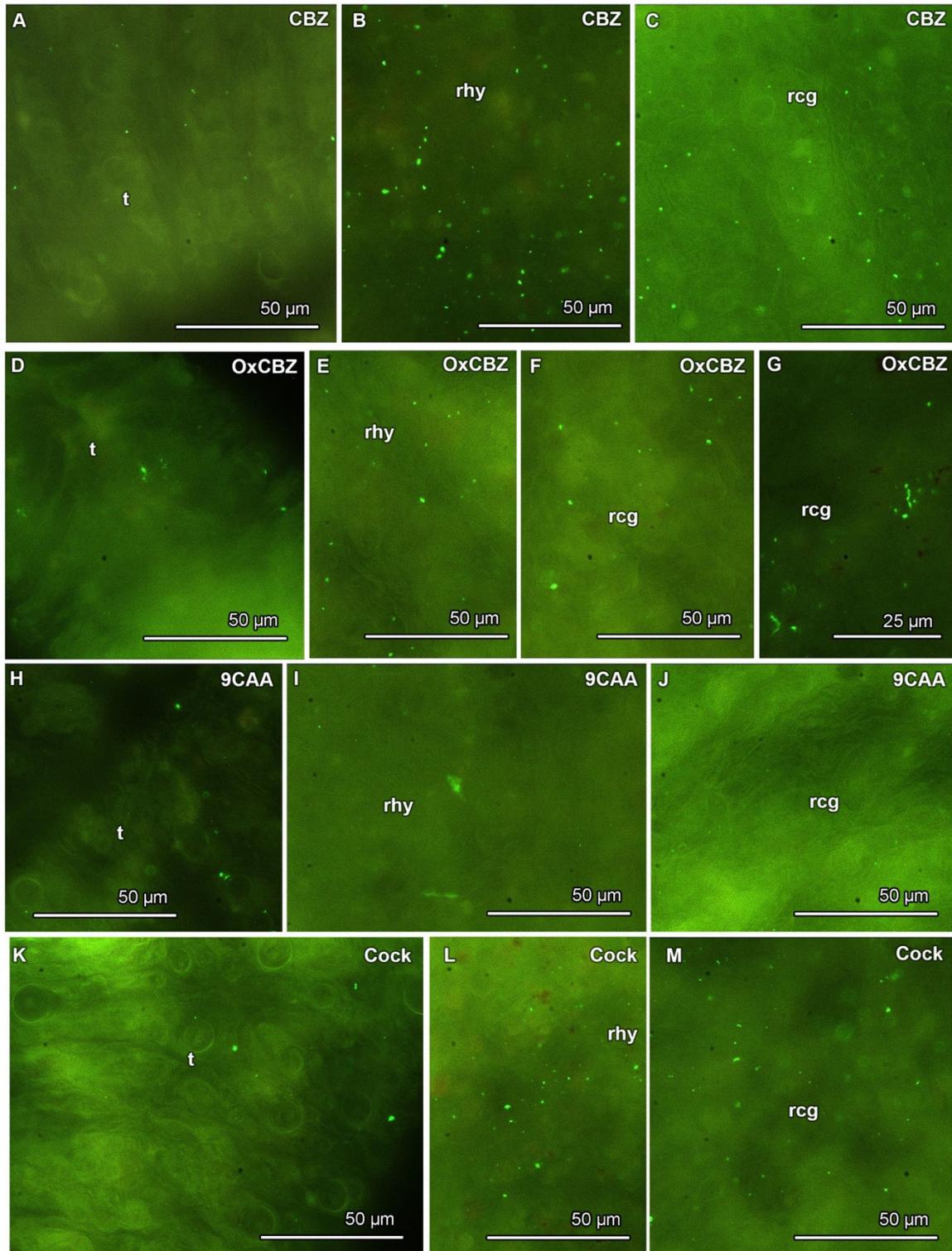
Annexe 3 : Références utilisées pour la base de donnée d'écotoxicité pour chaque composé

Compounds	References
Diclofénac	(Cleuvers, 2004, 2003, 2003; Farré et al., 2001; Ferrari et al., 2004, 2003; Kaza et al., 2007) (Czech et al., 2014; de Oliveira et al., 2016; Du et al., 2016; Han et al., 2006; Minguez et al., 2016; Nalecz-Jawecki et Persoone, 2006; Nica et al., 2017)
Ibuprofène	(Brain et al., 2004b; Cleuvers, 2004, 2003; Farré et al., 2001; Heckmann et al., 2007, 2005; Pomati et al., 2004) (Dave et Herger, 2012; Du et al., 2016; Han et al., 2006, 2010; Harada et al., 2008; Kim et al., 2009; Nica et al., 2017)
Naproxène	(Cleuvers, 2004, 2003; Farré et al., 2001; Harada et al., 2008; Isidori et al., 2005; Minguez et al., 2016)
Acétaminophène	(Backhaus et al., 2000; Calleja et al., 1994; Dave et Herger, 2012; Han et al., 2006; Henschel et al., 1997; Kim et al., 2007; Minguez et al., 2016; Watanabe et al., 2016) (de Oliveira et al., 2016; Du et al., 2016; Masteling et al., 2016; Nalecz-Jawecki et Persoone, 2006; Nunes et al., 2014, 2014)
Acide Salicylique	(Farré et al., 2001; Han et al., 2006; Henschel et al., 1997; Kim et al., 2007; Marques et al., 2004a)
Acide Acétylsalicylique	(Calleja et al., 1994; Cleuvers, 2004; Kaza et al., 2007; Lilius et al., 1995, 1994; Marques et al., 2004b; Nalecz-Jawecki et Persoone, 2006; Nica et al., 2017)
Kétoprofène	(Farré et al., 2001; Harada et al., 2008; Minguez et al., 2016; Watanabe et al., 2016)
Bézafibrate	(Han et al., 2006; Hernando et al., 2004; Isidori et al., 2007; Minguez et al., 2016; Nica et al., 2017; Watanabe et al., 2016)
Gemfibrozil	(Farré et al., 2001; Han et al., 2006; Hernando et al., 2004; Isidori et al., 2007; Minguez et al., 2016; Zurita et al., 2007)
Atorvastatine	(Brain et al., 2006, 2004a; Dussault et al., 2008)
Fénofibrate	(Hernando et al., 2004; Isidori et al., 2007; Minguez et al., 2016)
Acide Clofibrique	(Cleuvers, 2003; Ferrari et al., 2004, 2003; Han et al., 2006; Henschel et al., 1997; Hernando et al., 2004)
Carbamazépine	(Cleuvers, 2003; Dussault et al., 2008; Ferrari et al., 2004, 2003; Han et al., 2006; Harada et al., 2008; Kim et al., 2009, 2007; Lamichhane et al., 2013; Li et al., 2014; Minguez et al., 2016; Nica et al., 2017; Rivetti et al., 2016)
Fluoxétine	(Brain et al., 2004b; Brooks et al., 2003; Foran et al., 2004; Minguez et al., 2016, 2014b, 2014a; Péry et al., 2008; Varano et al., 2017)
Venlafaxine	(Bastos et al., 2017; Brooks et al., 2003; García-Galán et al., 2016; Minguez et al., 2016, 2014b)
Amitryptiline	(Calleja et al., 1994; Kaza et al., 2007; Lilius et al., 1995, 1994; Minguez et al., 2016, 2014b; Nalecz-Jawecki et Persoone, 2006)
Propanolol	(Cleuvers, 2005, 2003; de Oliveira et al., 2016; Dzialowski et al., 2006; Ferrari et al., 2004; Fraysse et Garric, 2005; Godoy et al., 2015; Huggett et al., 2002; Kaza et al., 2007; Kim et al., 2009; Lilius et al., 1995, 1994; Minguez et al., 2016; Nalecz-Jawecki et Persoone, 2006; Rivetti et al., 2016; Varano et al., 2017)
Aténolol	(Cleuvers, 2005; Fraysse et Garric, 2005; Hernando et al., 2004; Kim et al., 2009; Minguez et al., 2016; Winter et al., 2008)
Sotalol	(Hernando et al., 2004; Minguez et al., 2016)
Métoprolol	(Cleuvers, 2005, 2003; Czech et al., 2014; Dzialowski et al., 2006; Fraysse et Garric, 2005; Hernando et al., 2004; Huggett et al., 2002; Kaza et al., 2007; Minguez et al., 2016; Nalecz-Jawecki et Persoone, 2006)
Sulfaméthoxazole	(Eguchi et al., 2004; Ferrari et al., 2004; Iatrou et al., 2017; loele et al., 2016; Isidori et al., 2005; Jung et al., 2008; Kim et al., 2007; Minguez et al., 2016; Park et Choi, 2008; Yang et al., 2008)

Annexes

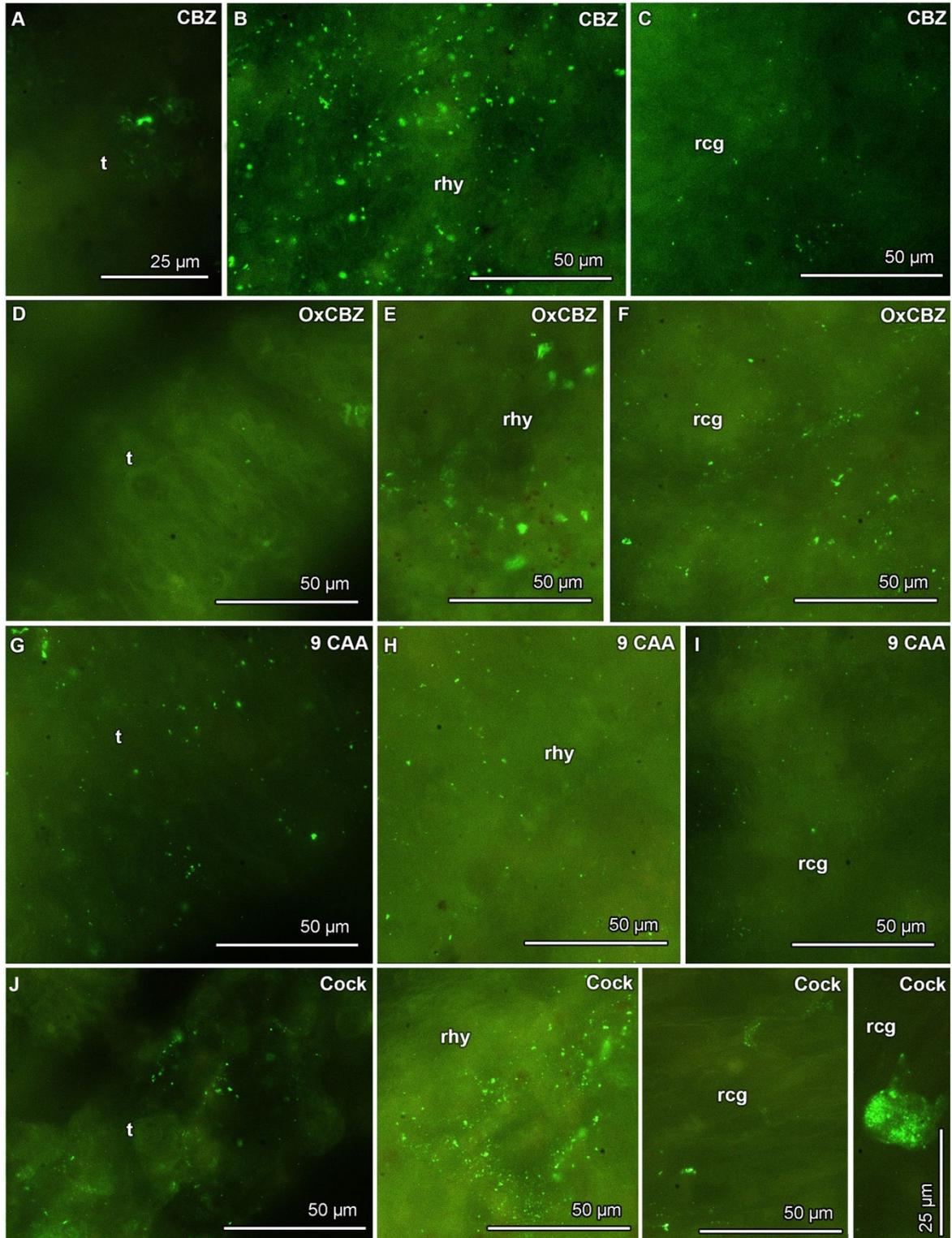
Triméthoprim	(Brain et al., 2004b; Dalla Bona et al., 2015; De Liguoro et al., 2012, 2009; Eguchi et al., 2004; Halling-Sorensen, 2000; Iatrou et al., 2017; Kim et al., 2007; Lützhøft et al., 1999; Minguez et al., 2016; Park et Choi, 2008; Yang et al., 2008)
Ofloxacin	(Backhaus et al., 2000; Brain et al., 2004b; Ferrari et al., 2004; Foran et al., 2004; Fu et al., 2017; loele et al., 2016; Isidori et al., 2005; Kümmerer et al., 2000; Li et al., 2014)
Norfloxacin	(Backhaus et al., 2000; Brain et al., 2004b; Eguchi et al., 2004; Fu et al., 2017; loele et al., 2016; Li et al., 2014; Yang et al., 2008)
Clarithromycin	(Ferrari et al., 2004; Harada et al., 2008; Isidori et al., 2005; Kim et al., 2009; Minguez et al., 2016; Watanabe et al., 2016; Yamashita et al., 2006; Yang et al., 2008)
Azithromycin	(Fu et al., 2017; Harada et al., 2008; Minguez et al., 2016)
Erythromycin	(Brain et al., 2004b; Eguchi et al., 2004; loele et al., 2016; Isidori et al., 2005; Kim et al., 2009; Pomati et al., 2004)
Ciprofloxacin	(Brain et al., 2004b; Dalla Bona et al., 2015; Dave et Herger, 2012; Ebert et al., 2011; Fu et al., 2017; Ji et al., 2013; Kümmerer et al., 2000; Li et al., 2014; Robinson et al., 2005; Yang et al., 2008)
Métronidazole	(Fu et al., 2017; Iatrou et al., 2017; Kümmerer et al., 2000; Lanzky et Halting-Sørensen, 1997; Wollenberger et al., 2000)
Amoxicillin	(Andreozzi et al., 2004; Brain et al., 2004b; Fu et al., 2017; loele et al., 2016; Ji et al., 2013; Lützhøft et al., 1999; Nica et al., 2017; Park et Choi, 2008)
Enalapril	(Nalecz-Jawecki et Persoone, 2006)
Furosémide	(Isidori et al., 2006; Nica et al., 2017)
Ranitidine	(Isidori et al., 2009)
Metformine	(Cleuvers, 2003)
17β-estradiol	(Bjerselius et al., 2001; Brennan et al., 2006; Jukosky et al., 2008; Kang et al., 2002; Schoenfuss et al., 2002)
17α-ethinylestradiol	(Colman et al., 2009; Dussault et al., 2008; Jukosky et al., 2008, 2008; Nash et al., 2004; Örn et al., 2003; Radix et al., 2002; Salierno et Kane, 2009; Sárria et al., 2011; Scholz et Gutzeit, 2000; Segner et al., 2003b, 2003a; Soares et al., 2009; Vandenberg et al., 2003)
Progestérone	(Kashian et Dodson, 2004)
Testostérone	(Kashian et Dodson, 2004; Radix et al., 2002)

Annexe 4 : Immuno-localisation de la dopamine dans les différentes régions du corps de l'hydre d'eau douce après 14 jours d'exposition à CBZ, OxCBZ, 9CAA et au mélange (cock) à 23°C



T, tentacules ;bg : bourgeon ; rcg : région de la cavité gastrique ; rhy : région de l'hypostome

Annexe 5 : Immuno-localisation de la sérotonine dans les différentes régions du corps de l'hydre d'eau douce après 14 jours d'exposition à CBZ, OxCBZ, 9CAA et au mélange (cock) à 23°C



T : tentacules ; bg : bourgeon ; rcg : région de la cavité gastrique ; rhy : région de l'hypostome

Annexe 6 : Publication : Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: Is there a risk for the Mediterranean aquatic environment?

Science of the Total Environment 639 (2018) 1334–1348



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Review

Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: Is there a risk for the Mediterranean aquatic environment?



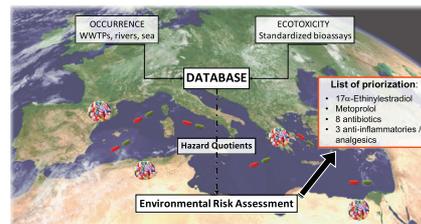
Fanny Desbiolles^{a,b}, Laure Malleret^{a,*}, Christophe Tiliacos^c,
Pascal Wong-Wah-Chung^a, Isabelle Laffont-Schwob^{b,d}

^a Aix Marseille Univ, CNRS, LCE, UMR 7376, ECCOREV FR 3098, Marseille, France^b Aix Marseille Univ, CNRS, IRD, Avignon Université, IMBE, Marseille, France^c Seakalia, Technopôle de Château Gombert, 3 allée des Maraîchers, 13013 Marseille, France^d Aix Marseille Univ, IRD, LPED, UMR 151, Marseille, France

HIGHLIGHTS

- 43 pharmaceuticals are targeted in the Mediterranean aquatic environment.
- Their concentrations in WWTP influent, effluent, river and seawater are gathered.
- Most used and sensitive bioassays are reviewed for ecotoxicity evaluation.
- Thirteen pharmaceuticals may present a threat to Mediterranean ecosystems.
- Three antibiotics and one hormone showed the highest environmental hazard.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2018

Received in revised form 10 April 2018

Accepted 25 April 2018

Available online xxxxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

Pharmaceuticals
Aquatic environment
Contamination levels
Ecotoxicological bioassays
Mediterranean Sea
Environmental risk

ABSTRACT

Due to their pseudo-persistence and their biological activity, pharmaceuticals are emerging contaminants of major concern for the environment. The aim of this review is to provide an updated inventory of the contamination of aquatic environments by 43 drugs representing different classes of pharmaceuticals, such as antibiotics, anti-inflammatory drugs, anti-depressants, sex hormones, lipid regulators and beta-blockers. The data collected is focused on contamination levels reported in marine coastal waters and in waste and river waters flowing into the Mediterranean Sea. The most widely produced/prescribed classes of medicines are compared with the substances most widely searched for in the environment. Ranges of pollution levels according to the type of water body are also presented, to examine the fate in sewage treatment plants and the persistence in the environment of the targeted molecules. Levels of pharmaceuticals ranged from 100 to 10,000 or even 100,000 ng·L⁻¹ in sewage waters, dropping to 1 to 10,000 ng·L⁻¹ in rivers and to not detected to 3000 ng·L⁻¹ in sea water. However, this paper evidences a lack of data for seawater and also for several countries along the southern coast of the Mediterranean Sea. In order to assess the risk for aquatic ecosystems associated with pharmaceuticals, experimental ecotoxicological values obtained using normalized acute and/or chronic bioassays carried out with different trophic levels were collected for each drug. Targeted biological species and associated bioassays are classified on the basis of their sensitivity to each class of compounds. Occurrence and ecotoxicology are then linked by using the Hazard Quotient (HQ) to assess the environmental risk caused by pharmaceuticals in the Mediterranean Basin. Correlations between HQ and frequency of detection of pharmaceuticals highlighted thirteen compounds that are cause for concern in Mediterranean fresh and sea waters, such as 17α-ethinylestradiol, metoprolol, 8 antibiotics and 3 analgesics/anti-inflammatories.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: laure.malleret@univ-amu.fr (L. Malleret).<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.351>

0048-9697/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1.	Introduction	1335
2.	Methodology	1336
2.1.	Compounds selection	1336
2.2.	Literature review for occurrence of compounds	1336
2.3.	Literature review for ecotoxicological values	1337
2.4.	Hazard quotient calculation and prioritization index	1337
3.	Pharmaceutical substances in the Mediterranean Basin	1338
3.1.	Prescription of pharmaceuticals in Mediterranean countries	1338
3.2.	Occurrence of pharmaceuticals in the aquatic environment	1338
3.2.1.	Sewage waters	1338
3.2.2.	Rivers and seawater	1339
4.	Impact of pharmaceutical substances on aquatic ecosystems	1342
4.1.	Acute and chronic ecotoxicological values of the 43 studied pharmaceuticals	1342
4.2.	Use and sensitivity of aquatic model organisms for pharmaceutical ecotoxicity assessment	1343
5.	Risk assessment in the Mediterranean watershed	1345
5.1.	Potential adverse effect in sewage waters	1345
5.2.	Rivers and seawater	1346
6.	Conclusions	1346
	Acknowledgement	1346
	Appendix A. Supporting information	1346
	References	1346

1. Introduction

Many classes of organic micro-pollutants have been detected in aquatic environments worldwide over the last few decades, owing to newly developed state-of-the-art analytical methods and growing concern regarding environmental preservation associated with the emergence of international guidelines and policies (Wenning and Martello, 2014). Among them, pharmaceuticals have emerged as substances that are becoming a worrying and one of the major concerns of the national public health authorities (Comber et al., 2018; Daughton, 2016; Ebele et al., 2017). In this line, seven pharmaceuticals were recently added into the watch list of substances monitored by European countries in the field of water policies (EU, 2015). Chronic exposure to trace levels of pharmaceutical mixtures can be substantial and may cause possible threats to the aquatic environment (Fent et al., 2006b) and also to human health (de Jesus Gaffney et al., 2015), with possible effects such as antibiotic resistance (Qiao et al., 2018; Sabri et al., 2018), and endocrine disruptive conditions (Fent et al., 2006a).

Pharmaceuticals have been described as “pseudo-persistent” pollutants (Daughton, 2003) due to their continuous release into aquatic environments through multiple pathways, including wastewater treatment plant (WWTP) effluents as primary source, and also domestic wastewaters, hospital discharges, improper manufacturer disposal, water treatment plant (WTP) effluents and run-off of veterinary medicines (Leung et al., 2012; Liu and Wong, 2013).

Secondary biological treatments in conventional WWTPs (i.e. activated sludge process) were originally designed for the removal of organic matter and suspended solids to meet the minimum discharge requirements (Barraqué, 2004; Blöch, 2005). For pharmaceuticals, highly variable removal efficiencies in WWTP were reported; e.g. higher to 80% for acetaminophen, ibuprofen but <20% for carbamazepine and atenolol (Miège et al., 2009). As studied by Ejhed et al. (2018), Grandclément et al. (2017), Miège et al. (2009), Petrovic et al. (2009) and Verlicchi et al. (2012), this variability is linked to the physico-chemical properties of the pharmaceuticals (chemical structure, pKa, logKow, biodegradability, sorption) and to operating parameters of the treatment facilities (hydraulic/sludge retention time, temperature, pH). Widespread consumption and the limited efficiency of sewage treatment processes have led to the extensive spread of pharmaceuticals in the aquatic environment. Hence, they are increasingly quantified at ng·L⁻¹ to µg·L⁻¹ concentration levels in sewage waters and various

receiving water bodies, such as freshwater, ground waters, drinking water resources and seawater (Arpin-Pont et al., 2016; Benotti et al., 2009; Ebele et al., 2017; Kolpin et al., 2002; Liu and Wong, 2013; Pal et al., 2010; Watkinson et al., 2009; Yang et al., 2017).

During the past decade, several review articles have been published focusing on the occurrence, sources and fate of pharmaceuticals (Andreozzi et al., 2004; Halling-Sørensen et al., 1998; Kermia et al., 2016), on their removal mechanisms and the effectiveness of sewage treatment (Gracia-Lor et al., 2012; Grandclément et al., 2017; Papageorgiou et al., 2016; Yang et al., 2017), and on the ecotoxicological effects of pharmaceuticals on aquatic organisms (Orias and Perrodin, 2013; Pal et al., 2010; Santos et al., 2010). Occurrence has mostly been dealt with at an international level (Gogoi et al., 2018; Li, 2014; Tran et al., 2018; Wilkinson et al., 2017; Yang et al., 2017). Only few recently published papers examined the impact of pharmaceuticals at a local scale, for instance in India (Balakrishna et al., 2017), or China (Bu et al., 2013; Liu and Wong, 2013).

The Mediterranean basin includes high income and lower to upper middle income countries having key differences covering factors such as population and demographics, economic growth and industrialization, pharmaceutical manufacture and prescription, treatment, disposal and reuse of waste and wastewater (Gürlük, 2009; Kookana et al., 2014). Markedly different water management and policies lead to average treat ca. 70% of the generated wastewater in high income countries, such as France, Italy, Israel, followed by upper middle income countries (38%) such as Algeria, Croatia, Turkey and lower middle income countries (28%) such as Morocco, Syria and Tunisia (Madikizela et al., 2017; Sato et al., 2013; World bank list of economies, 2017). In North African countries, sewerage connectivity is generally low, and in some areas, waste is collected predominantly in septic systems (Bouchaala et al., 2017; Plan bleu pour la Méditerranée, 2009; Salama et al., 2014). Furthermore, the Mediterranean basin includes countries ranking in the top 10 of European pharmaceutical producers and exporters, such as France, Italy and Spain (10, 5 and 4% respectively of total exported pharmaceuticals and medicines in Europe in 2016) (Eurostat, 2017). There are also several major consumers of medical drugs following official reports, such as Greece, France, Italy, Spain, Slovenia (OECD, 2016). Compared to high income countries, lower income countries consume less by value of the world's medicines (World Health Organization, 2004), but have higher rates of over-the-counter self-medication and of occurrence of infectious diseases (Segura et al., 2015).

The Mediterranean Sea is also of great concern because it constitutes the ultimate receptacle of rivers and wastewaters of highly urbanized and industrialized countries and it is almost completely landlocked, making it a more sensitive aquatic ecosystem than other seas and oceans. These observations give rise to a variety of questions regarding the impact of drugs on the specific aquatic environment of the Mediterranean watershed. Worldwide occurrence of pharmaceuticals is of great concern from a global point of view as well as case studies per country for economic and political management. However, from an environmental standpoint it is of particular interest to consider a whole hydrographic basin.

The aim of this review is to present an updated inventory of pharmaceuticals occurring in sewage and natural surface waters flowing into the Mediterranean Basin (including watersheds and the Mediterranean Sea). The study has focussed on the 19 Mediterranean coastal countries and screened 43 substances belonging to different pharmaceutical classes, such as antibiotics, anti-inflammatory drugs, anti-depressants, sex hormones, lipid regulators, and beta-blockers. With the aim of assessing order to assess the hazards associated with these chemicals, the ecotoxicological effects of each substance determined by standardized acute and chronic ecotoxicological bioassays carried out with different trophic levels were also inventoried. On the basis of these data, the risk associated with pharmaceuticals for the Mediterranean Basin is assessed and discussed by relating ecotoxicological hazard to the frequency and levels of pharmaceutical detection.

2. Methodology

This meta-analysis was possible by matching data on selected compounds with concentration levels in different types of waters and their potential ecotoxicological effect.

2.1. Compounds selection

A set of 43 active pharmaceutical substances was initially selected based on several criteria. Firstly, all the substances selected have been routinely evidenced in an international context (Santos et al., 2010), especially in wastewater effluents. Secondly, each chosen molecule must also comply to at least one of the three following criteria: i) poor removal efficiency in conventional WWTP (<20%, e.g. carbamazepine, atenolol) (Miège et al., 2009), ii) predominantly distributed in the dissolved phase ($\text{LogKow} < 3$, e.g. norfloxacin, metronidazole, acetaminophen), iii) being proved to have an ecotoxicological impact at environmental level (within the tens $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ range, e.g. propranolol, fluoxetine) (Fent et al., 2006b).

This list includes 7 analgesics and anti-inflammatories (one of which is a derivative: salicylic acid is a human urinary metabolite of acetyl salicylic acid (aspirin) (Hutt et al., 1986)), 5 lipid regulators (one of which is a derivative: clofibrac acid is the active plasma metabolite of clofibrate (Du et al., 2003)), 4 psychiatric drugs, 10 antibiotics, 4 beta-blockers, 7 hormones (5 oestrogens, 1 progestogen and 1 androgen) and 6 other compounds belonging to stimulant, cardiovascular, diuretic, contrast media, antihistamine and bronchodilator classes (Table 1).

2.2. Literature review for occurrence of compounds

Publications were screened from scientific research databases such as ScienceDirect, PubMed, TitaneScience and search engines such as Google Scholar and Web of science. The literature review was performed using the following keywords: pharmaceuticals, each class of pharmaceuticals independently (e.g. antibiotics, beta-blockers, hormones, ...), occurrence, wastewater treatment plants, sewage, surface water, seawater, Mediterranean Sea and each of the 19 countries bordering the Mediterranean Sea. Moreover, when no or very few references were found for one compound, we searched directly by using its specific name as query. Thus, 67 publications (see supporting

Table 1
Therapeutic classes and targeted molecules.

Therapeutic class	Molecules
Analgesic anti-inflammatory drugs	Diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, acetaminophen, salicylic acid, acetylsalicylic acid
Lipid regulators	Bezafibrate, gemfibrozil, atorvastatin fenofibrate, clofibrac acid
Psychotropic drugs	Carbamazepine, fluoxetine, venlafaxine, amitriptyline
Beta-blockers	Propranolol, atenolol, sotalol, metoprolol
Antibiotics	Sulfamethoxazole, trimethoprim, ofloxacin, norfloxacin, clarithromycin, azithromycin, erythromycin, ciprofloxacin, metronidazole, amoxicillin
Contrast products	Iopromide
Cardiovascular products	Enalapril
Antihistamines	Ranitidine
Diuretics	Furosemide
Bronchodilators	Salbutamol
Anti-diabetics	Metformin
Hormones	17 β -Estradiol, estriol, estrone, estrone-3-sulfate, 17 α -ethinylestradiol, progesterone, testosterone

information) published between 2002 and 2018 in international journals were used to build our occurrence database. This database includes 6072 concentrations values, consisting in 904 values for WWTP influents, 1451 for WWTP effluents, 2964 for rivers, and 753 for seawaters. All the reported data for influents and effluents were obtained from domestic and municipal conventional WWTPs (including primary treatment followed eventually by secondary biological treatment). Moreover, all the data considered were measured in sea samples and in tributaries of the Mediterranean Sea (i.e. WWTP effluents and rivers entering up in the Mediterranean Sea). The concentrations correspond to the dissolved phase (d) except for the Mediterranean Sea (dissolved and particulate, d + p). From data obtained using passive sampling, to enable comparison between all concentration values, only those converted and expressed in mass per litre of water were kept, while values reported in mass per gram of sample were discarded.

Fig. 1 maps the geographical locations of WWTPs, rivers and sea samples reference in the 67 papers reporting pharmaceutical concentrations in the Mediterranean watershed. Occurrence of pharmaceuticals was mostly studied in the European Mediterranean countries, i.e. Spain (28 articles), France (15 articles), Italy (14 articles), Greece (11 articles) accounting for 83% of the data. Conversely, this map highlights the lack of data published in international scientific papers in countries such as Morocco, Albania, Libya, and very little data in other Southern Mediterranean countries, i.e. Turkey (4 articles), Croatia (2 articles), Palestine and Israel (2 articles), Tunisia (1 article), Lebanon (1 article) and Algeria (1 article). This gap can be explained by the extensive monitoring of organic compounds required in Europe through the water framework directives (EU, 2015). This disparity may also be partly due to some nations having more funding for research and academic laboratories with sophisticated instrumentation capable of these measurements (Madikizela et al., 2017). Moreover, only scientific papers published in English were selected and none using other languages.

We favoured studies presenting individual values of concentrations, whatever the sample size. Nonetheless, when only statistical data were accessible, we decided to use also as individual concentrations minimum (min, when above the method detection limit, DL), maximum (max), median and mean values and the sample size equalized to four in this case. Tables S1 (sewage waters) and S2 (water bodies) in supporting information present the minimum and maximum concentrations measured for a pharmaceutical compound in each country. Then, the mean and the median values (in bold and italic, respectively) were calculated on all non-zero values obtained for one molecule in all countries. To limit zero values and still account for low levels in the calculation of the average, a concentration at quantification limit (QL)/3 was set as an estimation for a compound mentioned as detected, but

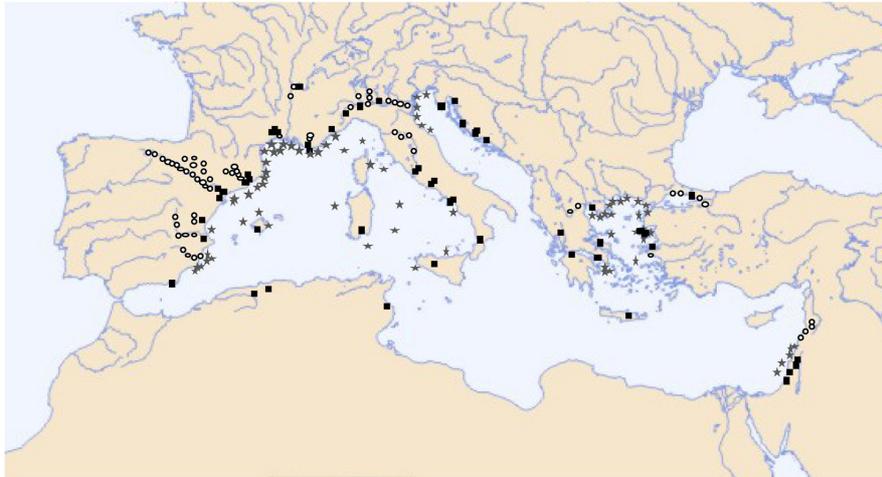


Fig. 1. Locations of WWTPs (■), rivers (○) and sea (★) samples referenced in the 67 articles published from 2002 to 2018 and used in the database.

below the QL. To avoid misinterpretation, when a compound was searched for but not detected, the indication “below the detection limit of available analytical techniques” (bdl) is given, while a lack of data, for a compound not even searched for, is indicated as “no data” (see “no data”, in figures and tables).

The frequency of detection for each molecule was calculated as the ratio of the number of values higher than the detection limit specific to each molecule and to each study over the total number of samples where the molecule was searched for. When the total number of samples was below 3, the frequency of detection was not calculated. When only statistical values were reported (min, max, median, mean) without specifying the sample size, if the min value was above the detection limit, we took a ratio of 4 positive values over a total of 4 samples. If the min value was below the detection limit, this set of data was not considered in the calculation of the frequency of detection, since we did not know how many negative values were recorded.

2.3. Literature review for ecotoxicological values

Publications were also screened from the previously cited scientific research databases. The keywords “pharmaceuticals” and also each class of pharmaceuticals independently (i.e. “antibiotics”, “lipid regulator”, ...) as classified in Table 1, was crossed with “ecotoxicology” and each species used in standardized bioassays. Moreover, when no article or very few articles were found for a given molecule, a further search was performed by using its specific name as query. The studies, which were included in our database, must have met the following four criteria: (1) testing a single molecule (no mixture), (2) applying at least one of the standardized bioassays listed in Tables S3–S4, (3) monitoring endpoints such as mortality or functional impairment (i.e. reproduction, growth, bioluminescence or mobility) or even disruptive effects for fishes (changes in hatching, in courtship, in sex ratio, in fecundity), (4) reporting their results as EC_{10} , IC_{10} , LC_{50} , EC_{50} , IC_{50} , $LOEC$ or $NOEC$. Deleterious effects at the molecular or genotoxicological level were discarded due to their wide diversity and heterogeneity, but this may miss effect at lower concentrations. These filters were applied to enable the comparison of the ecotoxicological values obtained for a compound, and between compounds and to report the molecule’s impacts at various trophic levels in order to define a PNEC (Predicted No Effect Concentration).

Thus, 98 publications from international indexed scientific journals, published between 1993 and 2018, were recorded in the database and

used for this study. The assessment of pharmaceutical ecotoxicity is based on a total of 691 values obtained at different trophic levels through acute or chronic ecotoxicity bioassays, i.e. 356 EC_{50} , 101 LC_{50} , 22 IC_{50} , 5 IC_{10} and 7 EC_{10} for acute ecotoxicity on the one hand and 110 $NOEC$ and 90 $LOEC$, for chronic ecotoxicity on the other hand. The PNEC is the concentration of a substance in any environment, below which adverse effects will most likely not occur during short or long-term exposure. Thus, PNEC was calculated using the EC_{50} (the effective concentration of a drug impacting growth or reproduction for 50% of organisms exposed) obtained for the most sensitive species on 3 trophic levels for short-term exposure and using an assessment factor (AF) of 1000 (see Table 2) (TGD, 2003). When data for 3 different trophic levels were not available, first the $NOEC$ (No Observed Effect Concentration) or, if lacking, the $LOEC/2$ (Lowest Observed Effect Concentration) of the most sensitive species was considered and the relevant AF was applied according to Table 2.

2.4. Hazard quotient calculation and prioritization index

To assess the potential risk for the environment, the Hazard Quotient (HQ) was used. According to (U.S. EPA, 2009), the HQ is defined as the ratio of the potential exposure to a substance to the level at which no adverse effect is expected. It is calculated by dividing the measured environmental concentration (MEC) in a given environment by the PNEC.

Since the reported concentrations vary orders of magnitude, HQ values were represented by boxplots recording the ranges of the MEC.

Furthermore, to highlight the pharmaceuticals of greatest concern in the Mediterranean watershed, prioritization indexes (PI) were calculated, as the result of the hazard quotient (calculated for the worst scenario, i.e. for the highest MEC) multiplied by the frequency of detection.

Table 2
Assessment factors used for PNEC calculation.

Available data	Assessment factors
Acute effects at 3 trophic levels (EC_{50})	1000
Chronic effects at 1 trophic level ($NOEC$ or $LOEC/2$)	100
Chronic effects at 2 trophic levels ($NOEC$ or $LOEC/2$)	50
Chronic effects at 3 trophic levels ($NOEC$ or $LOEC/2$)	10

3. Pharmaceutical substances in the Mediterranean Basin

3.1. Prescription of pharmaceuticals in Mediterranean countries

Table 3 shows pharmaceutical prescription in different Mediterranean countries in 2013 (except for France in 2009 and Israel in 2014), as given by the World Health Organization (WHO) Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. The defined daily dose (DDD) is specified by the WHO as “the assumed average maintenance dose per day of a drug used for its main indication for adults”. The averages of the DDD for all the countries combined show the highest prescription by far of agents acting on the renin-angiotensin system, belonging to the ATC C class (cardiovascular system). Their elevated prescriptions can be linked to a worldwide public health problem concerning cardiovascular diseases. Lipid regulators, antidiabetics and antihistamines also show significant and equivalent prescription rates. Analgesics represent the least prescribed class of drugs, but the prescription is not a reliable source for this class of compounds, which are mostly sold over-the-counter. For hormones also, the prescription is not the only source since they are naturally occurring in wastewaters through human metabolism.

3.2. Occurrence of pharmaceuticals in the aquatic environment

To have a better overview of the contamination levels around the Mediterranean Sea, we examined each class of active substance and each compound belonging to a class, by taking into account separately each type of water (i.e. sewage waters, rivers and seawater), as presented in the two following sections.

3.2.1. Sewage waters

Pharmaceutical aqueous concentrations and frequency of detection (FD) in the dissolved phase for WWTP influents and effluents are shown in Fig. 2 (i.e. antibiotics, analgesics/anti-inflammatories and hormones) and Fig. 3 (i.e. lipid regulators, psychotropic drugs, beta-blockers and others). When frequency of detection was below 50%, the range of method detection limits reported in the studies are given as data label ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) of the bar graphic.

As shown by the large number of points on Fig. 2 (top), a lot of studies have been carried out to measure the occurrence of antibiotics in Mediterranean countries. FD revealed that 5 compounds out of 10 were quantified in >90% of the cases (Fig. 2) at median values ranging from 90 to 461 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ in WWTP waters. This class is found ubiquitously (China, America, Europe) as shown by Liu and Wong (2013), Pal et al.

(2010), Van Doorslaer et al. (2014) and Yang et al. (2017) with concentrations up to several $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Table S2). In the Mediterranean Basin, as worldwide (Balakrishna et al., 2017; Liu and Wong, 2013; Pal et al., 2010; Yang et al., 2017), analgesics and anti-inflammatories are revealed to be the most abundant pharmaceuticals in wastewaters. As mentioned in section 3-1, these drugs are widely consumed. The median concentrations ranged from 410 (ketoprofen) to 10,000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (acetylsalicylic acid) and FD from 80 to 100%, except for acetaminophen and ibuprofen with FD ca. 10–15%, justified by high removal efficiencies (>80% by activated sludge, (Miège et al., 2009)). Hormones, although mediated for their endocrine disruptive effects, were less frequently searched for in WWTPs waters, since their LogK_{ow} ranging from 3 to 4.2 have oriented their measurements rather in sludge. Nonetheless, estrogens were found in sewage waters with FD around 70–80%, but at quite low levels as expected (about 50 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ and below 10 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, in influents and effluents, respectively). Testosterone and progesterone were hardly ever searched for.

For psychotropic drugs (Fig. 3), such as the highly studied carbamazepine, concentrations ranging in Mediterranean WWTPs (hundreds to 1000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, with same order of magnitude in inlets and outlets), corroborate previous results published in Europe and USA (Deblonde et al., 2011; Verlicchi et al., 2012). Among the pharmaceuticals from ATC class C “cardiovascular system”, lipid regulators are sought as often as beta-blockers and are detected in 70 to 85% of cases. Gemfibrozil and atenolol were the most studied pharmaceuticals in class C, which is in line with their presence at the highest levels (hundreds to 1000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) in their respective classes. Surprisingly, metoprolol and propranolol, which are excreted as their parent form at only 10% (Godoy et al., 2015), were still detected in sewage waters at non negligible concentrations levels (about 200 and 50 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ for metoprolol and propranolol, respectively).

Accordingly, it seems then relevant to include known urinary metabolites of these drugs, such as α -hydroxymetoprolol (Xu et al., 2013), into the targeted analytes and to further study the metabolization pathways. In the same line, the search for fenofibric acid could be more appropriate than its parent form fenofibrate (Verlicchi et al., 2012). However, clofibric and fenofibric acids were little-detected as already stated by Deblonde et al. (2011).

Some compounds, such as carbamazepine, venlafaxine or propranolol, revealed median concentrations higher in effluents than in influents. This was already observed and explained by the cleavage of glucuronide conjugates by enzymatic processes in WWTPs (Ternes, 1998; Vieno et al., 2007), leading to the increase of the measured concentrations throughout the treatment processing chain.

Table 3
Prescription of the selected therapeutic classes in Mediterranean countries in 2013 (OECD, 2016).

Therapeutic class	ATC code	DDD per 1000 inhabitants and per day in 2013							Total
		France*	Greece	Israel**	Italy	Slovenia	Spain	Turkey	
Analgesics	N02	n.d.	4.3	7.9	17	18.2	37	8.3	93
Anti-inflammatory drugs	M01A	54.2	12	12.5	48.6	39.6	49.5	47.6	264
Anti-depressants	N06A	49.8	44.7	42.1	42.5	53.3	65.2	36.3	334
Lipid-regulators	C10	91.7	102.9	109.3	82.6	109.9	96.2	18.3	611
Beta-blockers	C07	56.8	44.1	26.3	50.3	42.9	21.5	16.6	249
Agents acting on the renin-angiotensin system	C09	144.8	176.1	115.1	233.1	263.3	162.6	74.4	1169
Diuretics	C03	n.d.	23.2	20.8	44.1	35.5	41.6	7	172
Anti-diabetics	A10	65.7	85	55.3	66.7	73.2	66.6	58.4	471
Antihistamines	A02	66.4	57.8	62	94	58.8	121.8	53	514
Bronchodilators	R03	n.d.	50	20.9	40.7	38.5	45.2	28.8	224
Antibiotics	J01	29.6	18	22.1	30.1	14.5	19.5	41.1	175
Hormones	G03	n.d.	3.7	17.1	41.8	44.4	16.9	22.8	147
Total		559	622	511	791	792	744	413	4432

ATC: anatomic therapeutic chemical classification; DDD: defined daily dose.
Values for antibiotics in 2013 (DDD): Croatia: 21.1; Malta: 23.8; Cyprus: 28.2
http://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=HEALTH_PHMC - data extracted on 2017/12/06.
n.d. for not documented.

* Values in 2009.

** Values in 2014.

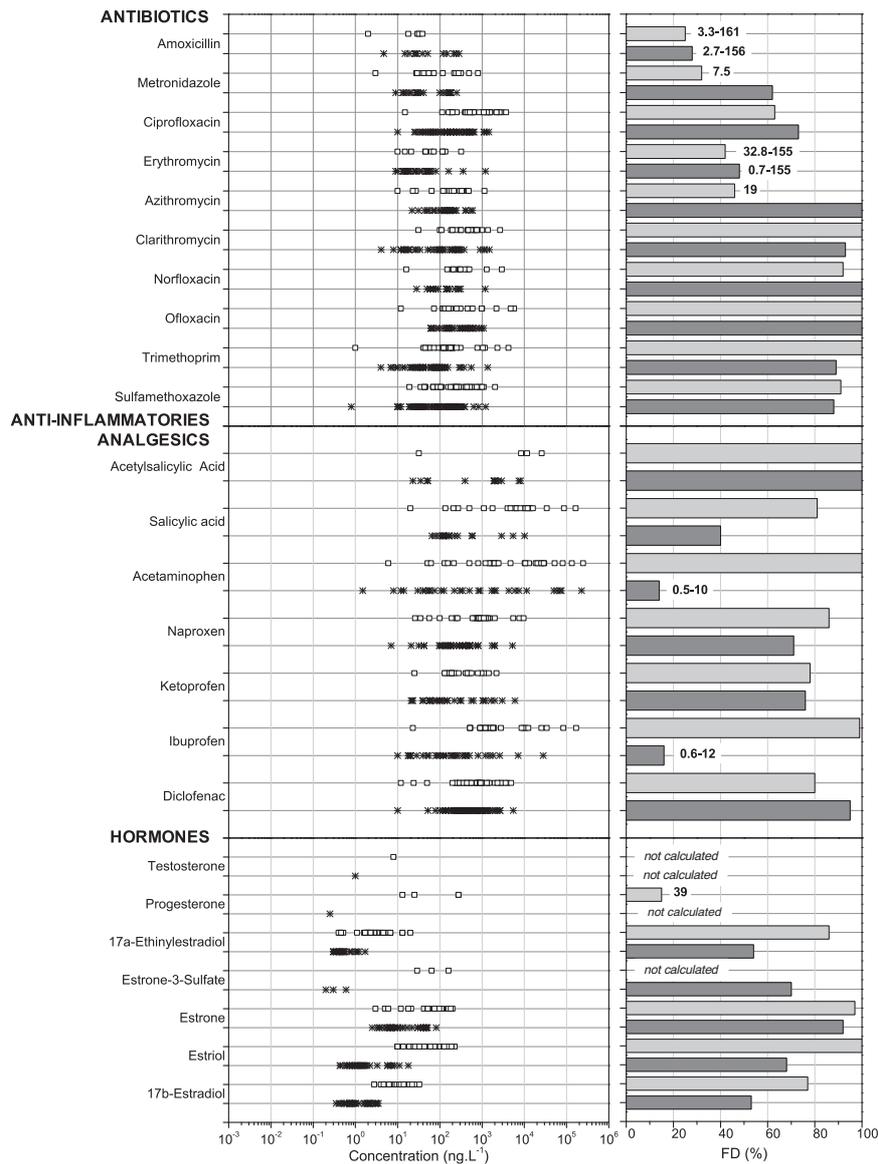


Fig. 2. Concentrations in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ of 3 classes of pharmaceuticals (i.e. antibiotics, anti-inflammatories/analgesics and hormones) in WWTP influents (\square) and effluents ($*$) in the dissolved phase of filtered samples from Mediterranean countries (Spain, France, Italy, Greece, Turkey, Israel, Lebanon, Tunisia, Algeria, Croatia, Palestine) and frequency of detection in WWTP influents (light grey) and in effluents (dark grey) according to 67 scientific papers from 2002 to 2018. Data tag on FD graphic, represent the method detection limit in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ when a compound is detected below 50%.

Three drugs from three different classes, namely ranitidine, furosemide and metformin, are also present at levels as high as analgesics, and proved to be poorly removed in the WWTP. Very little data can be found for iopromide, metformin and enalapril. We have only considered municipal and domestic WWTPs. Yet, the search for iopromide, which is a contrast product, is certainly more appropriate in hospital effluents. Metformin presented FD of 100% in inlets and outlets of WWTPs. It is a very polar compound with $\text{Log}K_{\text{ow}}$ of -2.4 , which is still particularly difficult to extract from waters. Thus, laboratories performing this analysis are still scarce. Enalapril was the solely anti-hypertensive drug

included in our study. Yet, this pharmaceutical class gathers a large number of compounds, which are very little (valsartan, losartan) or even, not studied, whereas their consumptions had increased drastically since two decades in many areas of the world (Godoy et al., 2015; Pereira et al., 2016).

3.2.2. Rivers and seawater

Pharmaceutical aqueous concentrations and frequency of detection in the dissolved phase for rivers and in dissolved and particulate phases for seawater are shown in Fig. 4 (i.e. antibiotics, analgesics/anti-

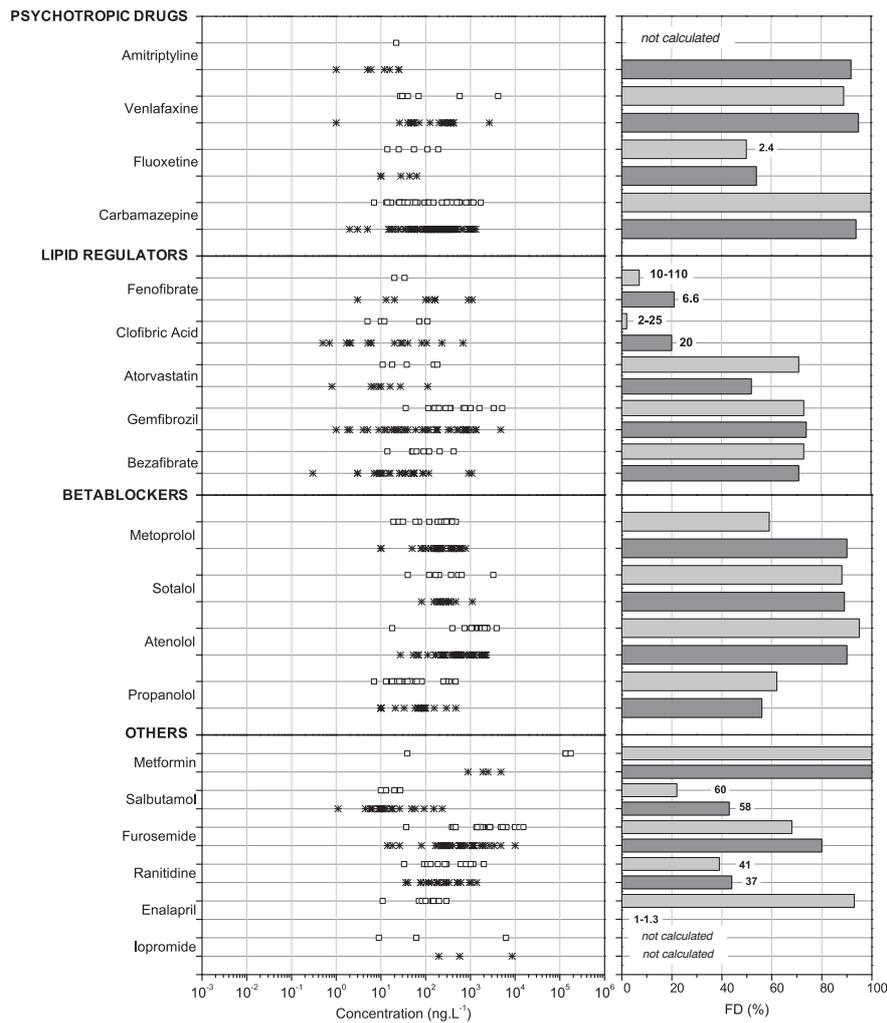


Fig. 3. Concentrations in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ of 4 classes of pharmaceuticals (i.e. lipid regulators, psychotropic drugs, beta-blockers and others) in WWTP influents (\square) and effluents ($+$) in the dissolved phase of filtered samples from Mediterranean countries (Spain, France, Italy, Greece, Turkey, Israel, Lebanon, Tunisia, Algeria, Croatia, Palestine) and frequency of detection in WWTP influents (light grey) and effluents (dark grey) according to 67 scientific papers from 2002 to 2018. Data tag on FD graphic, represent the method detection limit in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ when a compound is detected below 50%.

inflammatories and hormones) and in Fig. 5 (i.e. lipid regulators, psychotropic drugs, beta-blockers and others).

The frequencies of detection in rivers and seawater were often below 60%, showing that in many cases, compounds were below methods detection limits. Overall, 41 out of the 43 selected pharmaceuticals were detected in river waters of the Mediterranean Basin. As expected, median concentrations, ranging from about 1 (atorvastatin, metronidazole, estrone-3-sulfate) to $43 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (salicylic acid), found in rivers were significantly lower than in WWTP effluents, as a result of the dilution effect. Some other biotic and abiotic processes such as biodegradation (Quintana et al., 2005), sorption by sediments and suspended particulate material, phototransformation (Ménager et al., 2007; Wong-Wah-Chung et al., 2007), hydrolysis (Białk-Bielińska et al., 2012) and volatilization (Tissier et al., 2005) could also act as natural detoxification for the elimination of organic micropollutants (Banjac et al., 2015).

Nevertheless, the range of concentrations found in rivers is impressively wide, covering 6 log₁₀ units. The surprisingly high concentration levels were related to river or sea case studies carried out next to WWTPs outfall or in seafront of major cities. For instance, azithromycin was measured at $16,633 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ in tributary of El Albujoñ (Moreno-González et al., 2014) and acetaminophen was measured at $3000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ in front of Thessaloniki, a large Greek city (Nödler et al., 2014). Some drugs classes, such as analgesics, antibiotics and beta-blockers, were still quantified at levels between 0.3 (metoprolol) and hundreds of $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (azithromycin) in seawater. In particular, six substances (e.g. azithromycin, amoxicillin, venlafaxine, salicylic acid, acetaminophen and ibuprofen) were quantified at median concentrations higher than $20 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Noteworthy, pharmaceuticals were also found in coastal and oceanic waters adjacent to the Strait of Gibraltar (Biel-Maeso et al., 2018) and along the North Portugal coast (Lolić et al., 2015) at concentrations levels very similar to the ones presented here.

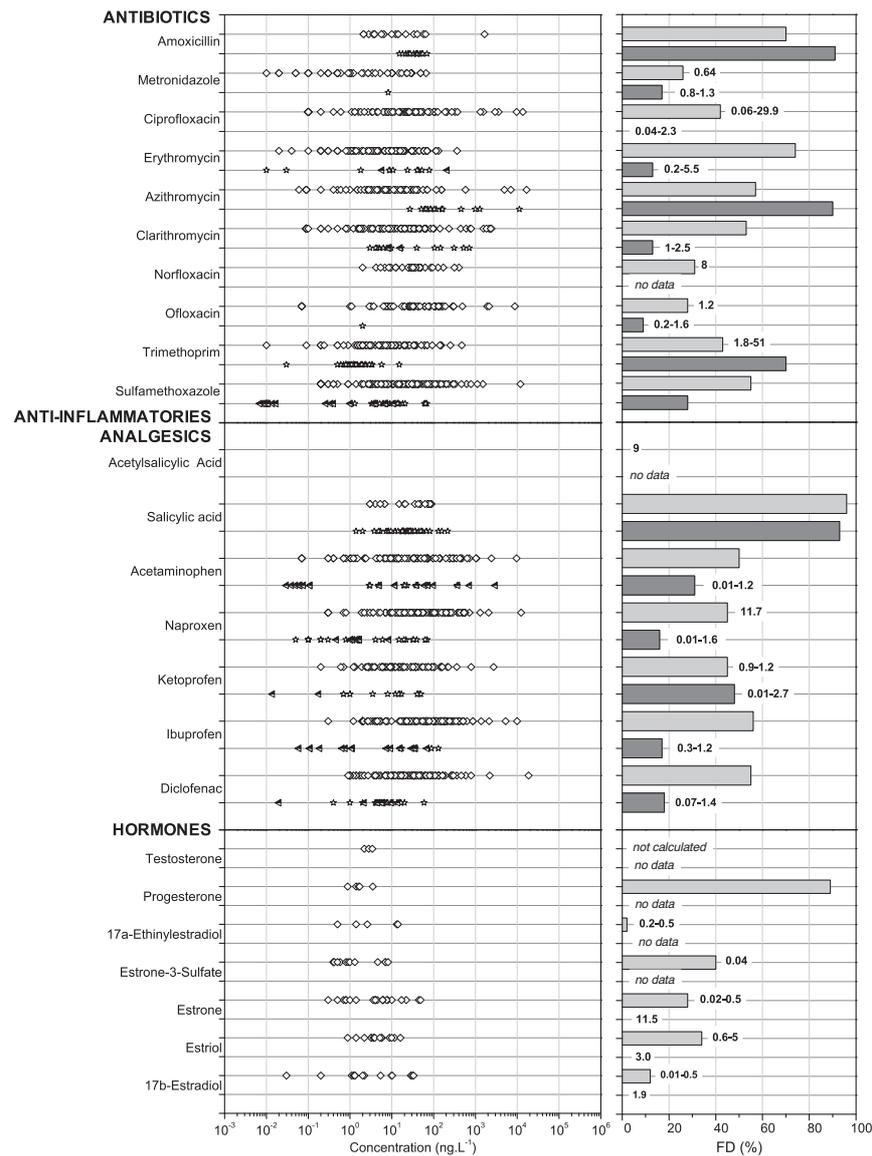


Fig. 4. Concentrations in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ of 3 classes of pharmaceuticals (i.e. antibiotics, anti-inflammatories/analgesics and hormones) in rivers (\diamond) and in Mediterranean seawater ($*$) in the dissolved phase of filtered samples and in both dissolved and particulate phases (\blacktriangleleft) of unfiltered samples from Mediterranean countries (Spain, France, Italy, Greece, Turkey, Israel, Lebanon, Tunisia, Algeria, Croatia, Palestine) and frequency of detection in rivers (light grey) and in Mediterranean seawater (dark grey) according to 67 scientific papers from 2002 to 2018. Data tag on FD graphic, represent the method detection limit in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ when a compound is detected below 50%.

This occurrence of pharmaceuticals confirms that the Mediterranean Sea has become a vulnerable ecosystem, owing to its position as ultimate receptacle of pollutants and the fact of this sea being almost land-locked. That point has already been established for other organic micropollutants, such as hydrocarbons (Guigue et al., 2011; Mille et al., 2007), pesticides (Moreno-González et al., 2013; Sánchez-Avila et al., 2012; Syakti et al., 2012), alkylphenols (Robert-Peillard et al., 2015; Zoller, 2006) and heavy metals (El-Serehy et al., 2012; Lopes-Rocha et al., 2017), that were found in the Mediterranean Sea and in aquatic organisms, such as mussels and oysters (Maurice, 1996).

There is still a considerable lack of study for a thorough examination of the Mediterranean Sea given that no data were found for 10 compounds out of the 43 studied. Moreover, data were mostly issued from marine waters offshore of Spain, France, Italy and Greece. Thus, there is still room for improvement, especially concerning the sensitivity of the analytical methods and the representativeness of the data, through innovative marine sampling techniques, with a view to demanding robust environmental policies and the enhancement of the environmental quality in order to support the conservation of the biodiversity (Daumalin and Schwob, 2016).

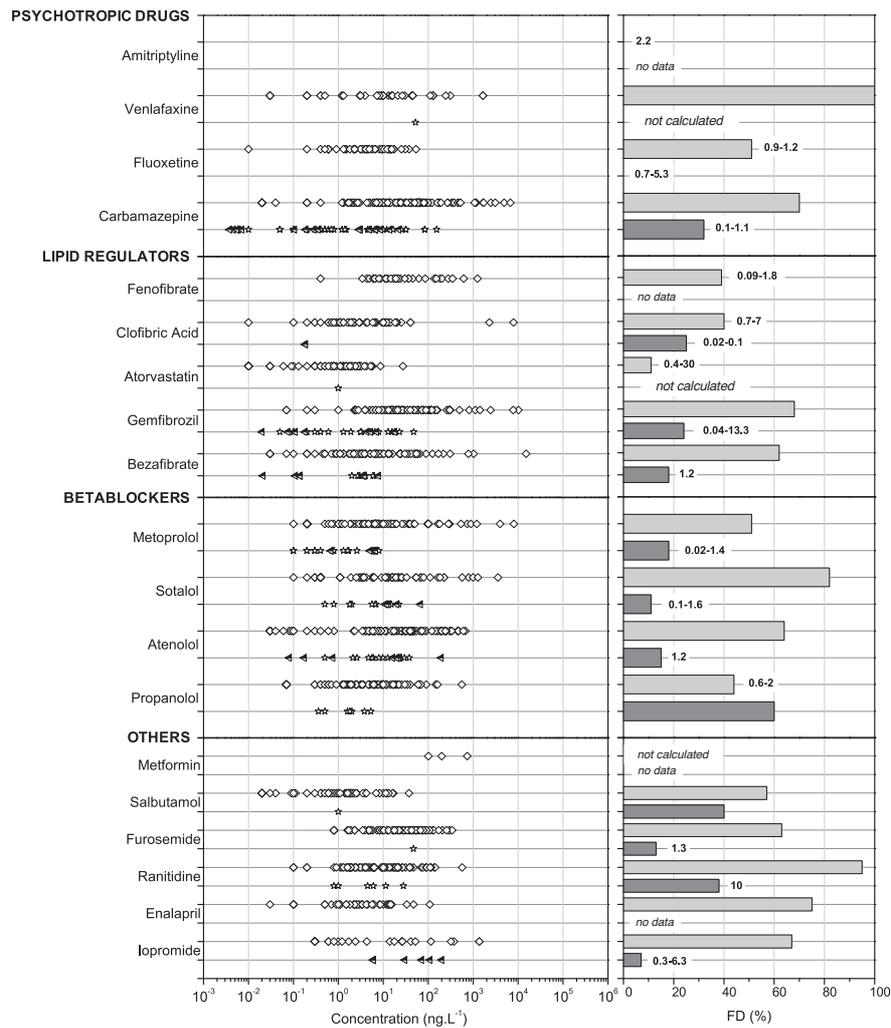


Fig. 5. Concentrations in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ of 4 classes of pharmaceuticals (i.e. lipid regulators, psychotropic drugs, beta-blockers and others) in rivers (\diamond) and in Mediterranean seawater (\ast) in the dissolved phase of filtered samples and in both dissolved and particulate phases (\blacktriangleleft) of unfiltered samples from Mediterranean countries (Spain, France, Italy, Greece, Turkey, Israel, Lebanon, Tunisia, Algeria, Croatia, Palestine) and frequency of detection in rivers (light grey) and in Mediterranean seawater (dark grey) according to 67 scientific papers from 2002 to 2018. Data tag on FD graphic, represent the method detection limit in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ when a compound is detected below 50%.

4. Impact of pharmaceutical substances on aquatic ecosystems

In order to address the issue of the potential risk due to pharmaceuticals in the Mediterranean Sea, a generally accepted method is to investigate the impact of these substances on aquatic organisms as a proxy. To gather enough ecotoxicological data and also to obtain a set of consistent and comparable values, our review was focused on standardized bioassays using aquatic species. Nowadays, a wide range of standardized ecotoxicological bioassays are available (Tables S3 and S4). On one hand, the availability of tests at different trophic levels may help to provide an accurate and broad assessment of the ecotoxicity of one compound. Due to the large spectrum of pharmaceuticals' active substances, several aquatic organisms should be screened in order to take into account most of the impacts throughout various trophic levels, such as bacteria, algae, crustaceans and fishes. On the other hand, the multiplicity of tests complicates data comparison.

4.1. Acute and chronic ecotoxicological values of the 43 studied pharmaceuticals

To rigorously set priorities for water quality improvement, there is a need to compare the ecotoxicological values of a given pharmaceutical to the ecotoxicological values of others. All bioassays should be carried out with the same model organism, the same endpoint and by applying strictly the same experimental protocol. Consequently, this will lead to a typology of pharmaceuticals and thereafter provide a basis for ranking them according to their hazard potential for the ecosystems. Such a typology would be useful to establish a prioritization of effluent management according to the type of pharmaceuticals occurring.

The assessment of pharmaceutical ecotoxicity is presented in Fig. 6 for acute ecotoxicity (left part) and chronic ecotoxicity (right part). The PNEC calculated on the basis of these ecotoxicological concentrations are given in the right-hand of Fig. 6. These figures clearly show

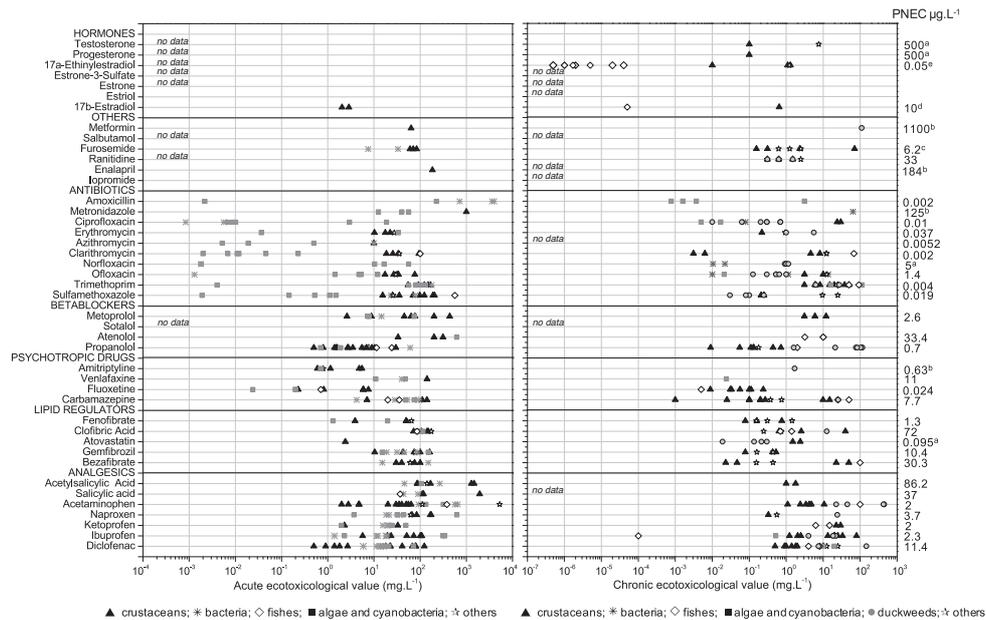


Fig. 6. Ecotoxicological values for acute (left) (i.e. EC_{10} , EC_{50} , LC_{10} , LC_{50}) and chronic (right) (i.e. $NOEC$, $LOEC$) bioassays grouped by trophic level (i.e. crustaceans, bacteria, fishes, algae and cyanobacteria, duckweeds and others), assessing the impact of 43 pharmaceuticals from 98 scientific papers from 1993 to 2018 and their associated PNEC (a: $LOEC$ value at one chronic trophic level ($NOEC = LOEC/2$ and $PNEC = NOEC/100$); b: EC_{50} value at one chronic trophic level ($PNEC = EC_{50}/100$); c: $NOEC$ at 2 chronic trophic levels ($PNEC = NOEC/50$); d: LC_{50} at one chronic trophic level ($PNEC = LC_{50}/100$); e: $NOEC$ at 3 chronic trophic levels ($PNEC = NOEC/10$)). All references were reported in Table S5.

that acute ecotoxicity bioassays are more frequently applied than the chronic ones. Acute ecotoxicity bioassays (Table S3) investigate short time exposure (15 min to 96 h, depending on the lifespan of the tested organism) at “high” chemical concentrations, when compared to environmental concentrations, and results are mostly expressed as mortality rates. These tests are often applied due to their simplicity and rapidity, indeed they are well-suited in scenarios of exposure related to an accidental release of micropollutants. Chronic ecotoxicity (see Table S4) is assessed through extended exposure time at lower concentration levels or for chemical mixtures. Owing to longer exposure time monitoring, involving greater difficulty for implementation, chronic ecotoxicity bioassays are less often applied.

Values for acute ecotoxicity covered a wide range of concentrations from $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ to $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, whereas chronic ecotoxicity values covered a narrower range of concentrations from $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ to $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. This highlights the very extensive range of impact intensity, depending on the pharmaceutical tested and the model organism used. According to the acute ecotoxicity values, the pharmaceutical classes can be roughly ranked as follows: antibiotics are the most hazardous class, followed by psychotropics; the other classes are roughly equivalent in terms of acute ecotoxicity. Almost the same ranking can be derived from chronic ecotoxicity values, but at lower levels of concentration. For both acute and chronic ecotoxicity assessments, knowledge on ecotoxicological effects are lacking for several pharmaceuticals, especially hormones, metformin, salbutamol, ranitidine, enalapril, iopromide and sotalol.

However, a more detailed examination of the data highlights that for several substances, the ecotoxicological values (acute and chronic) determined at a same trophic level for a single substance, can vary drastically (1 to 3 \log_{10} units). For instance, EC_{50} values for salicylic acid on crustaceans have been determined at $118 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Henschel et al., 1997) and $1945 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Marques et al., 2004), or $NOEC$ values for carbamazepine on algae at $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Harada et al., 2008) and $>100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Ferrari et al., 2004, 2003). This may be due to alterations

of the standardized methods introduced in the course of application. With the increase of knowledge on ecotoxicity, the standardized tests are updated or optimized, sometimes leading to the coexistence of more than two versions of the same standardized bioassay, thus causing some confusion (Table S3 and S4). For example, for algae, the standardized tests were updated 3 times from the first formalization in 1989 until 2012, and twice between 1984 and 2002, respectively for norm ISO 8692 and test 201 OECD.

The low PNEC values obtained for antibiotics (PNEC values about $\text{tens ng}\cdot\text{L}^{-1}$), and to a lesser extent for hormones (PNEC values about $\text{tens pg}\cdot\text{L}^{-1}$ to $\text{hundreds ng}\cdot\text{L}^{-1}$), suggest a potentially high hazard of the latter compounds for ecosystems. For the other classes, the higher PNEC values (ranging from 1 to $\text{tens } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) indicate a potentially lower hazard for aquatic species.

4.2. Use and sensitivity of aquatic model organisms for pharmaceutical ecotoxicity assessment

Concerning the determination of pharmaceutical ecotoxicity, besides hormones, organisms from 3 trophic levels are mainly used (Fig. 7), with crustaceans as the major taxon used (41%, e.g. *Daphnia magna*), then algae (18%, e.g. *Pseudokirchneriella subcapitata*) and bacteria (12%, e.g. *Vibrio fischeri*). This could be directly justified by the fact that these bioassays are easy and quick to implement. In the specific case of the assessment of hormone ecotoxicity, 2 trophic levels are mainly assessed (Fig. 8) with principally fishes (58% e.g. *Danio rerio*) and crustaceans (21% e.g. *Daphnia magna*).

However, the long-term impact of pharmaceuticals on the aquatic biocoenosis cannot really be properly assessed, with at best twenty-seven species tested, belonging to only nine trophic levels, poorly representing the trophic web. Furthermore, 60% of the papers in our bibliometric analysis deal with a single organism bioassay, 16% with two organisms, but only 23% with three or more, *Daphnia magna* being the most widely used organism. In addition, in order to perform

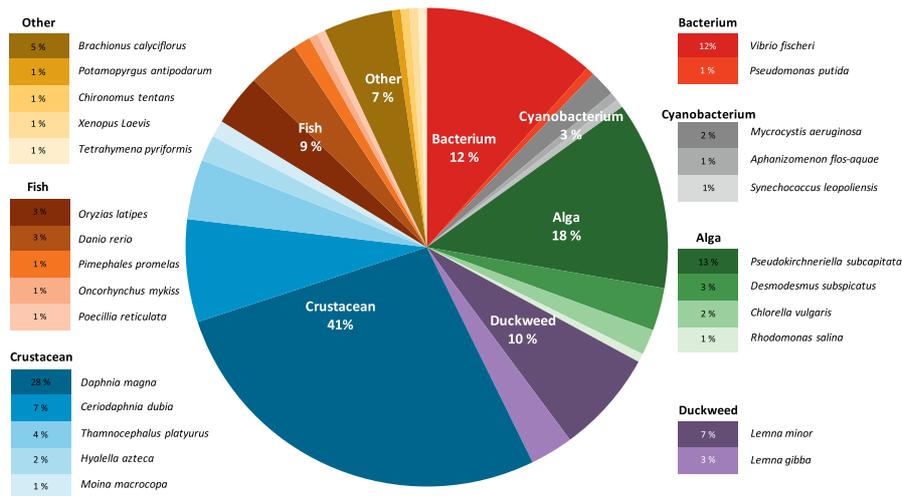


Fig. 7. Percentage of the 80 scientific papers (1993–2018) discussing pharmaceuticals' ecotoxicity (except hormones), classified on the basis of trophic levels and organisms used.

risk analysis, it is recommended to assess the ecotoxicological impact of the studied substance on no less than three trophic levels. A weak ecotoxicological impact of a molecule (meaning high ecotoxicological concentration level) on a model organism is no guarantee, nor even an indication, of the impact of that molecule on another model organism living in the same ecosystem.

For each class of pharmaceuticals, the most sensitive species for acute or chronic exposure were investigated in order to identify which organisms are the most relevant.

Crustaceans seem to be the most sensitive to 4 analgesic and anti-inflammatory drugs out of 7. Ibuprofen and naproxen have respectively the lowest NOEC ($0.52 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Harada et al., 2008) and EC_{50} ($0.33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Isidori et al., 2005), and thus exhibit the highest ecotoxicity. In general, for this pharmaceutical class, not much is known about the ecotoxicological effects on fishes, according to Fent et al. (2006b). In the case of lipid regulators (blood lipid lowering agent), *Ceriodaphnia magna* is also the most vulnerable organism, and atorvastatin the most hazardous compound for *Lemna gibba* with a LOEC of $0.019 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Brain et al., 2006). Fluoxetine is apparently the

most toxic pharmaceutical reported, with a NOEC of $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the fish *Oryzias latipes* (Foran et al., 2004). This class of pharmaceuticals appears as the most hazardous, with some ecotoxicity values lower than $1.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

As previously pointed out by Fent et al. (2006b), the toxicity of beta-blockers has still not been extensively studied with, for example, only one data for sotalol. Propranolol is the most widely studied because of its high toxicity (NOEC: $9 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), in particular for crustaceans (Ferrari et al., 2004). Growth inhibition measurements on algae have shown the high sensitivity of these organisms to antibiotics with low NOEC, measured at $3.1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for clarithromycin (Yamashita et al., 2006) and at $0.78 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for amoxicillin (Andreozzi et al., 2004). There is a lack of data for iopromide, salbutamol and enalapril in the scientific literature. Among this class, the drug with the highest identified ecotoxicity is the diuretic furosemide, having the lowest NOEC ($0.156 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) determined for *Ceriodaphnia dubia* (Isidori et al., 2006).

Hormones, particularly estrogens, may alter several physiological functions in fishes, such as sex determination. 17β -estradiol and 17α -ethinylestradiol being the most toxic out of the 4 tested hormones,

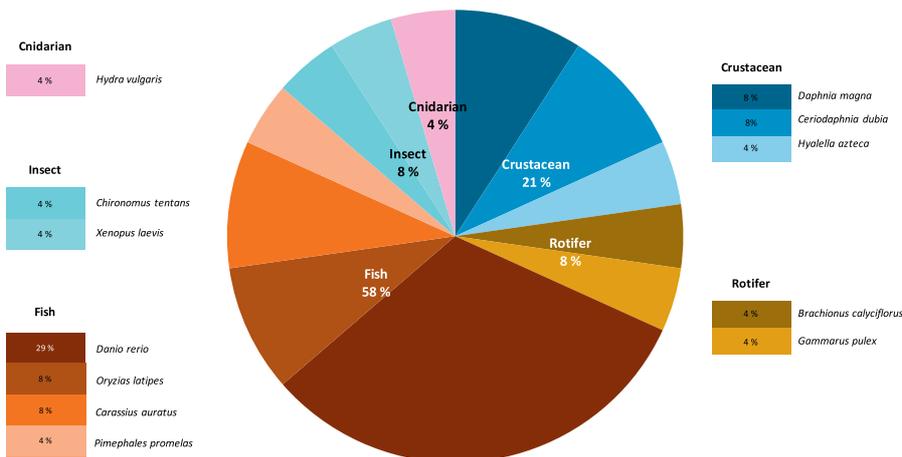


Fig. 8. Percentage of the 18 scientific papers (1993–2018) discussing hormones' ecotoxicity on the basis of trophic levels and organisms used.

with a NOEC below $29.3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ for the fish *Oryzias latipes* (Kang et al., 2002), and a NOEC of $0.5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ for the fish *Danio rerio* (Nash et al., 2004). However, ecotoxicity values for progestogen and androgen are still lacking.

5. Risk assessment in the Mediterranean watershed

The Hazard Quotient (HQ) offers a basis for considering both occurrence and ecotoxicological data to define the environmental hazard caused by a pollutant. The higher the HQ value is, the greater the hazard, for the tested organism. If $0.1 < \text{HQ} \leq 1$, the hazard is low, but potential adverse effects should be considered; and if $1.0 < \text{HQ} \leq 10$, some adverse effects or moderate hazard is probable. If $\text{HQ} > 10$, high hazard is anticipated (EC, 1996; Hernando et al., 2006). The aim of calculation of the PI is to rank the most hazardous substances, in order to provide assistance for environmental agencies for the up-dating of priority substances lists. HQs were calculated for WWTP effluents, rivers and seawater and are presented as boxplots for the selected pharmaceuticals (Fig. 9), except for estriol, estrone, estrone-3-sulfate, iopromide sotalol and salbutamol, since ecotoxicological data were not available.

5.1. Potential adverse effect in sewage waters

Six antibiotics (amoxicillin, ciprofloxacin, azithromycin, clarithromycin, trimethoprim, sulfamethoxazole) and one hormone (17 α -ethinylestradiol) are pointed out as the most hazardous class of pharmaceuticals, representing a high hazard (HQs > 10) in 75% of samples for the Mediterranean WWTPs. In comparison, ciprofloxacin, clarithromycin and sulfamethoxazole were also revealed as the most hazardous substances in Asian sewage waters (Ashfaq et al., 2017; Liu et al., 2017). In addition, sulfamethoxazole and trimethoprim were identified as pharmaceuticals potentially harmful in Mexico (South America) (Rivera-Jaimes et al., 2018). Yet, very close to the Mediterranean Sea, in Spanish effluents near the Cadiz gulf (tributaries of the Atlantic Ocean), ofloxacin was the only antibiotic posing a high hazard (Biel-Maeso et al., 2018). To a lesser extent, erythromycin and fluoxetine ($1 < \text{HQ} < 10$ in 50% of WWTPs samples) present a moderate hazard and several analgesics (acetaminophen, naproxen, ketoprofen and ibuprofen) and atorvastatin could cause potential adverse effects ($0.1 < \text{HQ} < 1$ in 50% of WWTPs samples). Acetaminophen, naproxen, ibuprofen, diclofenac were the most hazardous substances in Pakistan (Ashfaq et al., 2017).

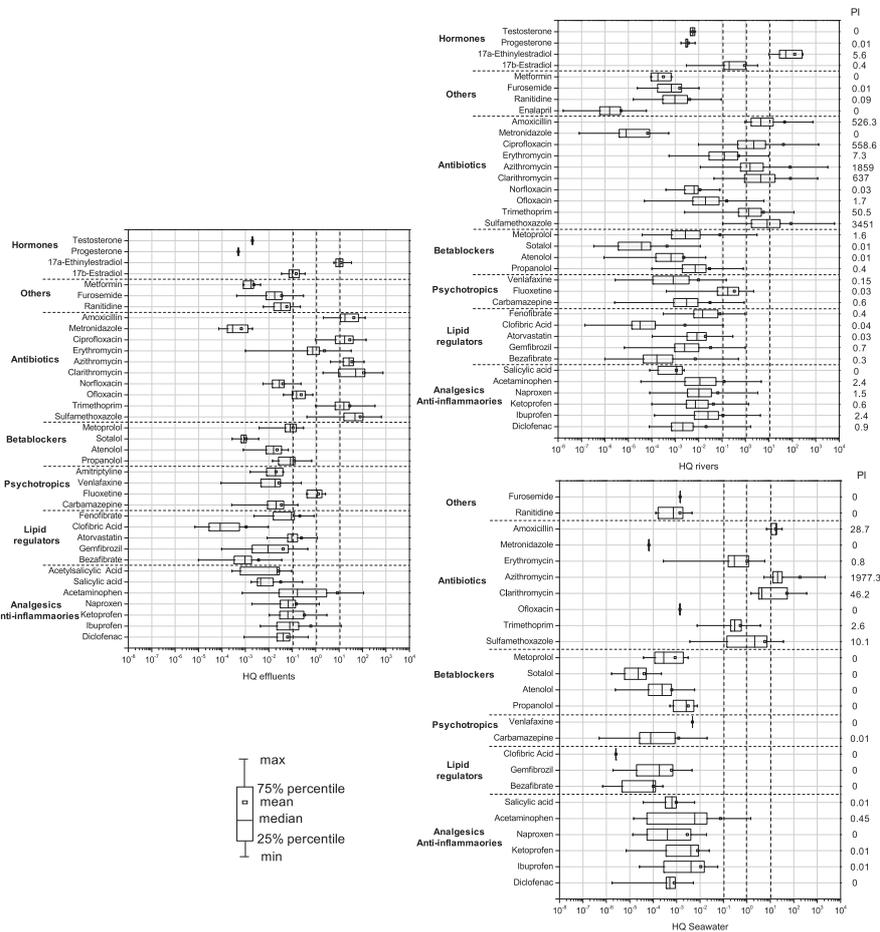


Fig. 9. Boxplot representing calculated Hazard Quotient (HQ) and Prioritization Index (PI) in effluents, rivers and seawater for 25 to 37 pharmaceuticals classified by pharmaceutical classes. PI is Prioritization Index (HQ x FD).

5.2. Rivers and seawater

The same six antibiotics as in sewage waters may represent a moderate hazard for non-target organisms from the Mediterranean ecosystem in 50 to >75% of rivers samples. More surprisingly, 17 α -ethinylestradiol exhibits a high hazard in 100% of samples. Erythromycin, fluoxetine and 17 β -estradiol can generate potential adverse effects in 50 to 75% of river samples. In seawater, amoxicillin, azithromycin, clarithromycin represent a high hazard and trimethoprim, sulfamethoxazole and also erythromycin may cause some adverse effects. Trimethoprim, erythromycin, clarithromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole were also revealed as problematic in freshwaters in China and in South America (Rivera-Jaimes et al., 2018; Wang et al., 2017; Wu et al., 2014; Zhang et al., 2018). In an international review, Godoy et al. (2015) demonstrated that beta-blockers, especially atenolol and propranolol may induce moderate to high hazard in both freshwater and seawater. On the opposite, in Mediterranean watershed, this class of pharmaceuticals does not apparently constitute any risk.

At another level, the risk that pharmaceuticals may pose to aquatic species is not only directly related to toxicity of dissolved substances but also to possible bioaccumulation through the food web (Ruhí et al., 2016; Zenker et al., 2014). This is another important factor to further study and consider in environmental risk assessment due to pharmaceuticals.

Prioritization index takes into account MEC, PNEC and also FD. This index allows to smooth out the impact of compounds with high HQ but rarely detected. Conversely, it enables to include compounds having low HQ but high FD. Thirteen pharmaceuticals, out of the 43 studied, with PI > 1 can be pointed out in waters from the Mediterranean basin as follows: 17 α -ethinylestradiol, amoxicillin, ciprofloxacin, erythromycin, azithromycin, clarithromycin, ofloxacin, trimethoprim, sulfamethoxazole, metoprolol, acetaminophen, naproxen and ibuprofen. In addition to antibiotics and hormone, analgesic/anti-inflammatories and beta-blockers are included in this priority list, in support to their hazard reported in other part of the world (Godoy et al., 2015; Mutiyar et al., 2018). Noteworthy, four of these substances (i.e. 17 α -ethinylestradiol, erythromycin, azithromycin, clarithromycin) were recently added to the watch list of the European community in the field of water policies (EU, 2015).

6. Conclusions

This review has demonstrated that many pharmaceutical classes, including analgesics, antibiotics, diuretics, hormones and antihistamines, are present in different types of water flowing into the Mediterranean Sea. Drug contamination levels reach hundreds ng·L⁻¹ to few μ g·L⁻¹ in sewage waters, while the levels in natural surface waters are in the range of tens ng·L⁻¹ in rivers or below in seawater, mainly owing to the dilution effect. Even if their consumption has highly increased, the antihypertensive pharmaceuticals were rarely measured in the Mediterranean basin like worldwide. Moreover, some cardiovascular drugs, such as enalapril, are quickly bio-metabolized into secondary biological by-products, which should also be tracked in the different types of water.

Considering the other field dealt with in this review, ecotoxicological values for acute and chronic exposures are well-documented for analgesics, lipid regulators, psychotropics, beta-blockers and antibiotics. Among them, the latter class induces adverse effects in aquatic organisms at the lowest concentration levels (μ g·L⁻¹). Nevertheless, published values can differ, notably for the same bioassay applied to the same molecule. Moreover, the ecotoxicity of hormones and of some frequently detected drugs, namely iopromide, enalapril, sotalol or salbutamol, were poorly or even not assessed using standardized bioassays. The greater or lesser sensitivity of the different aquatic species used in standardized bioassays to the different active substances present in the various classes of pharmaceuticals was investigated in this review paper. Our analysis raises questions about the choice of the most

suitable organisms to accurately determine the ecotoxicity of a group of drugs. Further consideration should be also given to the possible additive or synergic effects of pharmaceutical mixtures, which is still underestimated.

Environmental occurrence and ecotoxicology were linked by determining the hazard quotient and prioritization index, which highlighted some worrying potential risks for the Mediterranean ecosystem linked to the presence eight antibiotics, one hormone, one beta-blocker and three analgesics/anti-inflammatories classes. But this approach was somewhat limited due to the lack of certain concentration data or ecotoxicological values.

We still only have a partial vision of the pharmaceutical impact on the Mediterranean aquatic ecosystem, which cannot be extrapolated to the whole Mediterranean Basin. Data are still scarce in countries along the southern shores of the Mediterranean Sea, due to differences in terms of industrial growth and environmental legislation, compared to EU countries (EU, 2015). Therefore, further research and collaborative projects must be undertaken to complete the picture on the basis of programmes such as Horizon 2020, Mediterranean Action Plan (Program for the Assessment and Control of Marine Pollution) and Mediterranean Strategy for Sustainable Development.

More broadly, the findings of this review emphasise the importance of research dealing with the development and optimization of new tertiary treatment processes to more efficiently remove pharmaceuticals in WWTP (Meribout et al., 2016).

Acknowledgement

The authors thank the Provence-Alpes-Côte d'Azur regional council and the company Seakalia (Marseille, France) for funding this research through a PhD grant (DEB no 141198/2014), the ECCOREV federation, for funding the POPMETABOTOX project (2015) and to Michael Paul, for revising the English of this text.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.351>.

References

- Andreozzi, R., Caprio, V., Ciniglia, C., de Champdoré, M., Lo Giudice, R., Marotta, R., Zuccato, E., 2004. Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environ. Sci. Technol.* 38: 6832–6838. <https://doi.org/10.1021/es049509a>.
- Arpin-Pont, L., Bueno, M.J.M., Gomez, E., Fenet, H., 2016. Occurrence of PPCPs in the marine environment: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23:4978–4991. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3617-x>.
- Ashfaq, M., Nawaz Khan, K., Saif Ur Rehman, M., Mustafa, G., Faizan Nazar, M., Sun, Q., Iqbal, J., Mulla, S.I., Yu, C.-P., 2017. Ecological risk assessment of pharmaceuticals in the receiving environment of pharmaceutical wastewater in Pakistan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 136:31–39. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.029>.
- Balakrishna, K., Rath, A., Praveenkumarreddy, Y., Guruge, K.S., Subedi, B., 2017. A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 137:113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.014>.
- Banjac, Z., Ginebreda, A., Kuzmanovic, M., Marcé, R., Nadal, M., Riera, J.M., Barceló, D., 2015. Emission factor estimation of ca. 160 emerging organic microcontaminants by inverse modeling in a Mediterranean river basin (Llobregat, NE Spain). *Sci. Total Environ.* 520:241–252. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.055>.
- Barraqué, B., 2004. Normes de qualité de l'eau: histoire et prospective. 15^{èmes Journées Scientifiques de l'Environnement-Usages de l'eau: Synergies et Conflits}. HAL.
- Benotti, M.J., Stanford, B.D., Wert, E.C., Snyder, S.A., 2009. Evaluation of a photocatalytic reactor membrane pilot system for the removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds from water. *Water Res.* 43:1513–1522. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.049>.
- Białk-Bielińska, A., Stolte, S., Matzke, M., Fabiańska, A., Maszkowska, J., Kołodziejka, M., Liberek, B., Stepnowski, P., Kumirska, J., 2012. Hydrolysis of sulphonamides in aqueous solutions. *J. Hazard. Mater.* 221:264–274. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.044>.
- Biel-Maeso, M., Baena-Nogueras, R.M., Corada-Fernández, C., Lara-Martín, P.A., 2018. Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). *Sci. Total Environ.* 612:649–659. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.279>.

- Blösch, H., 2005. European Union Legislation on Wastewater Treatment and Nutrients Removal.
- Bouchaala, L., Charchar, N., Gherib, A.E., 2017. Ressources hydriques: traitement et réutilisation des eaux usées en Algérie. *Algerian J. Arid Environ.* 7, 84–95.
- Brain, R.A., Reitsma, T.S., Lissimore, L.I., Bestari, K. (Jim), Sibley, P.K., Solomon, K.R., 2006. Herbicidal effects of statin pharmaceuticals in *Lemma gibba*. *Environ. Sci. Technol.* 40: 5116–5123. <https://doi.org/10.1021/es0600274>.
- Bu, Q., Wang, B., Huang, J., Deng, S., Yu, G., 2013. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: a review. *J. Hazard. Mater.* 262:189–211. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.040>.
- Comber, S., Gardner, M., Sörme, P., Leverett, D., Ellor, B., 2018. Active pharmaceutical ingredients entering the aquatic environment from wastewater treatment works: a cause for concern? *Sci. Total Environ.* 613–614:538–547. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.101>.
- Daughton, C., 2003. Chemicals from pharmaceuticals and personal care products.
- Daughton, C.G., 2016. Pharmaceuticals and the Environment (PIE): evolution and impact of the published literature revealed by bibliometric analysis. *Sci. Total Environ.* 562: 391–426. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.109>.
- Daumalin, X., Laffont-Schwob, I., 2016. Les Calanques industrielles de Marseille et leurs pollutions: une histoire au présent = Pollution of Marseille's industrial Calanques: the impact of the past on the present. *REF. 2C, Aix-en-Provence*.
- de Jesus Gaffney, V., Almeida, C.M.M., Rodrigues, A., Ferreira, E., Benoliel, M.J., Cardoso, V.V., 2015. Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. *Water Res., Occurrence, Fate, Removal and Assessment of Emerging Contaminants in Water in the Water Cycle (from wastewater to drinking water)*. 72:pp. 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.027>.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., 2011. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214:442–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>.
- Du, L., Xu, Y., Musson, D.G., 2003. Simultaneous determination of clofibrate and its active metabolite clofibric acid in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. B* 794: 343–351. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00500-2](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00500-2).
- Ebele, A.J., Abou-Elwafa Abdallah, M., Harad, S., 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg. Contam.* 3:1–16. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>.
- EC, 1996. Technical Guidance Documents in Support of the Commission Directive 93/667/EEC on risk assessment for new notified substances and the Commission regulation (EC) 1488/94 on Risk substances. *Ispra, Italy (part 1, 2 and 3)*.
- Ejhed, H., Fäng, J., Hansen, K., Graae, L., Rahmberg, M., Magnér, J., Dorgeloh, E., Plaza, G., 2018. The effect of hydraulic retention time in onsite wastewater treatment and removal of pharmaceuticals, hormones and phenolic utility substances. *Sci. Total Environ.* 618:250–261. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.011>.
- El-Serehy, H.A., Aboulela, H., Al-Misned, F., Kaiser, M., Al-Rasheid, K., El-Din, H.E., 2012. Heavy metals contamination of a Mediterranean coastal ecosystem, Eastern Nile Delta, Egypt. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 12.
- EU, 2015. Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 Establishing a Watch List of Substances for Union-wide Monitoring in the Field of Water Policy Pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (Notified Under Document C(2015) 1756) Text With EEA Relevance.
- Eurostat, 2017. International Trade in Medicinal and Pharmaceutical Products - Statistics Explained [WWW Document]. URL: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/International_trade_in_medical_and_pharmaceutical_products#Further_Eurostat_information, Accessed date: 20 January 2018.
- Fent, Karl, Escher, C., Caminada, D., 2006a. Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. *Reprod. Toxicol.* 22: 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.04.010>.
- Fent, Karl, Weston, A., Caminada, D., 2006b. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76:122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>.
- Ferrari, B., Paxeus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garric, J., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 359–370.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Frayse, B., Paxæus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garric, J., 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1344–1354.
- Foran, C.M., Weston, J., Slattery, M., Brooks, B.W., Huggett, D.B., 2004. Reproductive assessment of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-3042-5>.
- Godoy, A.A., Kummrow, F., Pamplin, P.A.Z., 2015. Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment - a review. *Chemosphere* 138:281–291. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.024>.
- Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V.K., Tushara Chaminda, G.G., An, A.K., Kumar, M., 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: a review. *Groundw. Sustain. Dev.* 6:169–180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>.
- Gracia-Lor, E., Sancho, J.V., Serrano, R., Hernández, F., 2012. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere* 87:453–462. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.025>.
- Grandclément, C., Seyssieq, I., Piram, A., Wong-Wah-Chung, P., Vanot, G., Tiliacos, N., Roche, N., Doumenq, P., 2017. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: a review. *Water Res.* 111:297–317. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.005>.
- Guigou, C., Tedetti, M., Giorgi, S., Goutx, M., 2011. Occurrence and distribution of hydrocarbons in the surface microlayer and subsurface water from the urban coastal marine area off Marseilles, northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 62: 2741–2752. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.013>.
- Gürllük, S., 2009. Economic growth, industrial pollution and human development in the Mediterranean region. *Ecol. Econ.* 68:2327–2335. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2009.03.001>.
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H.C., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. *Chemosphere* 36:357–393. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00354-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00354-8).
- Harada, A., Komori, K., Nakada, N., Kitamura, K., Suzuki, Y., 2008. Biological effects of PPCPs on aquatic lives and evaluation of river waters affected by different wastewater treatment levels. *Water Sci. Technol.* 58:1541. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.742>.
- Henschel, K.-P., Wenzel, A., Diedrich, M., Fliedner, A., 1997. Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 25, 220–225.
- Hernando, M., Mezcuca, M., Fernandezalba, A., Barcelo, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69:334–342. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.037>.
- Hutt, A.J., Caldwell, J., Smith, R.L., 1986. The metabolism of aspirin in man: a population study. *Xenobiotica* 16:239–249. <https://doi.org/10.3109/00498258609043527>.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtera, L., Rubino, M., 2005. Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Sci. Total Environ.* 348:93–101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.068>.
- Isidori, M., Nardelli, A., Parrella, A., Pascarella, L., Previtera, L., 2006. A multispecies study to assess the toxic and genotoxic effect of pharmaceuticals: furosemide and its photoproduct. *Chemosphere* 63:785–793. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.078>.
- Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H., Honjo, T., 2002. Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 47, 71–80.
- Kermia, A.E.B., Fouial-Djebbar, D., Trari, M., 2016. Occurrence, fate and removal efficiencies of pharmaceuticals in wastewater treatment plants (WWTPs) discharging in the coastal environment of Algiers. *Comptes Rendus Chim.* 19:963–970. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.05.005>.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1202–1211. <https://doi.org/10.1021/es011055j>.
- Kookana, R.S., Williams, M., Boxall, A.B.A., Larsson, D.G.J., Gaw, S., Choi, K., Yamamoto, H., Thatikonda, S., Zhu, Y.-G., Carriquiriborde, P., 2014. Potential ecological footprints of active pharmaceutical ingredients: an examination of risk factors in low-, middle- and high-income countries. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369:20130586. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0586>.
- Leung, H.W., Minh, T.B., Murphy, M.B., Lam, J.C.W., So, M.K., Martin, M., Lam, P.K.S., Richardson, B.J., 2012. Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China. *Environ. Int.* *Emerging Environmental Health Issues in Modern China*. 42:pp. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.004>.
- Li, W.C., 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ. Pollut.* 187:193–201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.015>.
- Liu, J.-L., Wong, M.-H., 2013. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China. *Environ. Int.* 59:208–224. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.012>.
- Liu, H.-Q., Lam, J.C.W., Li, W.-W., Yu, H.-Q., Lam, P.K.S., 2017. Spatial distribution and removal performance of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment plants in China. *Sci. Total Environ.* 586:1162–1169. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.107>.
- Lolić, A., Paiga, P., Santos, L.H.M.L.M., Ramos, S., Correia, M., Delerue-Matos, C., 2015. Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: occurrence and environmental risk. *Sci. Total Environ.* 508:240–250. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.097>.
- Lopes-Rocha, M., Langone, L., Miserocchi, S., Giordano, P., Guerra, R., 2017. Detecting long-term temporal trends in sediment-bound metals in the western Adriatic (Mediterranean Sea). *Mar. Pollut. Bull.* 124:270–285. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.026>.
- Madikizela, L.M., Tavengwa, N.T., Chimuka, L., 2017. Status of pharmaceuticals in African water bodies: occurrence, removal and analytical methods. *J. Environ. Manag.* 193: 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.02.022>.
- Marques, C.R., Abrantes, N., Gonçalves, F., 2004. Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans: I. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid: acute and chronic effects of acetylsalicylic acid on cladocerans. *Environ. Toxicol.* 19:518–526. <https://doi.org/10.1002/tox.20059>.
- Maurice, M., 1996. L'écotoxicologie appliquée au milieu marin (No. R.INT.DEU96. 11/ NANTES). IFREMER.
- Ménager, M., Pan, X., Wong-Wah-Chung, P., Sarakha, M., 2007. Photochemistry of the pesticide azinphos methyl and its model molecule 1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one in aqueous solutions: kinetic and analytical studies. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 192, 41–48.
- Meribout, R., Zuo, Y., Khodja, A.A., Piram, A., Lebarillier, S., Cheng, J., Wang, C., Wong-Wah-Chung, P., 2016. Photocatalytic degradation of antiepileptic drug carbamazepine with bismuth oxychlorides (BiOCl and BiOCl/AgCl composite) in water: efficiency evaluation and elucidation degradation pathways. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 328: 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.04.024>.
- Miège, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., Coquery, M., 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – conception of a database and first results. *Environ. Pollut.* 157:1721–1726. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.045>.

- Mille, G., Asia, L., Guiliano, M., Malleret, L., Doumenq, P., 2007. Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean sea (Gulf of Fos area, France). *Mar. Pollut. Bull.* 54:566–575. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.12.009>.
- Moreno-González, R., Campillo, J.A., León, V.M., 2013. Influence of an intensive agricultural drainage basin on the seasonal distribution of organic pollutants in seawater from a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain). *Mar. Pollut. Bull.* 77:400–411. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.09.040>.
- Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Gros, M., Pérez-Cánovas, E., Barceló, D., León, V.M., 2014. Input of pharmaceuticals through coastal surface watercourses into a Mediterranean lagoon (Mar Menor, SE Spain): sources and seasonal variations. *Sci. Total Environ.* 490:59–72. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.097>.
- Mutyar, P.K., Gupta, S.K., Mittal, A.K., 2018. Fate of pharmaceutical active compounds (PhACs) from River Yamuna, India: an ecotoxicological risk assessment approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 150:297–304. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.041>.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ. Health Perspect.* 112:1725–1733. <https://doi.org/10.1289/ehp.7209>.
- Nödler, K., Voutsas, D., Licha, T., 2014. Polar organic micropollutants in the coastal environment of different marine systems. *Mar. Pollut. Bull.* 85:50–59. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.024>.
- OECD, 2016. OECD Health Statistics 2016. Pharmaceutical Market: Pharmaceutical consumption [WWW Document]. OECD.Stat URL. http://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=HEALTH_PHMC, Accessed date: 6 December 2017.
- Orias, F., Perrodin, Y., 2013. Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: a review. *Sci. Total Environ.* 454:250–276. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.064>.
- Pal, A., Gin, K.Y.-H., Lin, A.Y.-C., Reinhard, M., 2010. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci. Total Environ.* 408:6062–6069. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.026>.
- Papageorgiou, M., Kosma, C., Lambropoulou, D., 2016. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Sci. Total Environ.* 543:547–569. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.047>.
- Pereira, C.D.S., Maranhão, L.A., Cortez, F.S., Pusceddu, F.H., Santos, A.R., Ribeiro, D.A., Cesar, A., Guimarães, L.L., 2016. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Sci. Total Environ.* 548–549:148–154. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.051>.
- Petrović, M., de Alda, M.J.L., Diaz-Cruz, S., Postigo, C., Radjenovic, J., Gros, M., Barceló, 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. A Math. Phys. Eng. Sci.* 367:3979–4003. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0105>.
- Plan bleu pour la Méditerranée (Ed.), 2009. *Etat de l'environnement et du développement en Méditerranée*. PNUE/PAM, Athènes.
- Qiao, M., Ying, G.-G., Singer, A.C., Zhu, Y.-G., 2018. Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environ. Int.* 110:160–172. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.016>.
- Quintana, J.B., Weiss, S., Reemtsma, T., 2005. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceuticals and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Res.* 39:2654–2664. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.068>.
- Rivera-Jaimes, J.A., Postigo, C., Melgoza-Alemán, R.M., Aceña, J., Barceló, D., López de Alda, M., 2018. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Mexico: occurrence and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 613–614:1263–1274. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.134>.
- Robert-Peillard, F., Syakti, A.D., Coulomb, B., Doumenq, P., Malleret, L., Asia, L., Boudenne, J.-L., 2015. Occurrence and fate of selected surfactants in seawater at the outfall of the Marseille urban sewerage system. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 12:1527–1538. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0577-0>.
- Ruñf, A., Acuña, V., Barceló, D., Huerta, B., Mor, J.-R., Rodríguez-Mozaz, S., Sabater, S., 2016. Bioaccumulation and trophic magnification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in a Mediterranean river food web. *Sci. Total Environ.* 540:250–259. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.009>.
- Sabri, N.A., Schmitt, H., Van der Zaai, B., Gerritsen, H.W., Zuidema, T., Rijnaarts, H.H.M., Langenhoff, A.A.M., 2018. Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *J. Environ. Chem. Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.004>.
- Salama, Y., Chennaoui, M., Sylla, A., Mountadar, M., Rihani, M., Assobhei, O., 2014. Review of wastewater treatment and reuse in the Morocco: aspects and perspectives. *Int. J. Env. Pollut. Res.* 2, 9–25.
- Sánchez-Avila, J., Tauler, R., Lacorte, S., 2012. Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: sources distribution and potential risk. *Environ. Int.* 46:50–62. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.04.013>.
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175:45–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>.
- Sato, T., Qadir, M., Yamamoto, S., Endo, T., Zahoor, A., 2013. Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment, and use. *Agric. Water Manag.* 130:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.08.007>.
- Segura, P.A., Takada, H., Correa, J.A., El Saadi, K., Koike, T., Onwona-Agyeman, S., Ofosu-Anim, J., Sabi, E.B., Wasonga, O.V., Mghalu, J.M., dos Santos, A.M., Newman, B., Weerts, S., Yargeau, V., 2015. Global occurrence of anti-infectives in contaminated surface waters: impact of income inequality between countries. *Environ. Int.* 80:89–97. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.04.001>.
- Syakti, A.D., Asia, L., Kanzari, F., Umasangadji, H., Malleret, L., Ternois, Y., Mille, G., Doumenq, P., 2012. Distribution of organochlorine pesticides (OCs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in marine sediments directly exposed to wastewater from Cortiou, Marseille. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19:1524–1535. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0640-z>.
- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Dedicated to Professor Dr. Klaus Haberer on the occasion of his 70th birthday. *Water Res.* 32:3245–3260. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00099-2).
- TGD, 2003. TGD, Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment of New Notified Chemicals and Commission Regulation (EC) No.1488/94 on Risk Assessment of Existing Chemicals. 1996.
- Tissier, C., Morvan, C., Bocquené, G., Grosse, H., James, A., Marchand, M., 2005. Les Substances Prioritaires de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) - Fiches de synthèse.
- Tran, N.H., Reinhard, M., Gin, K.Y.-H., 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions—a review. *Water Res.* 133:182–207. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.029>.
- U.S. EPA, 2009. Risk Assessment Guidance for Superfund Volume I: Human Health Evaluation Manual (Part F, Supplemental Guidance for Inhalation Risk Assessment). Office of Superfund Remediation and Technology Innovation Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Van Doorslaer, X., Dewulf, J., Van Langenhove, H., Demeestere, K., 2014. Fluoroquinolone antibiotics: an emerging class of environmental micropollutants. *Sci. Total Environ.* 500–501:250–269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.075>.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Zambello, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—a review. *Sci. Total Environ.* 429:123–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>.
- Vieno, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L., 2007. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Res.* 41:1001–1012. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.017>.
- Wang, Z., Du, Y., Yang, C., Liu, X., Zhang, J., Li, E., Zhang, Q., Wang, X., 2017. Occurrence and ecological hazard assessment of selected antibiotics in the surface waters in and around Lake Honghu, China. *Sci. Total Environ.* 609:1423–1432. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.009>.
- Watkinson, A.J., Murby, E.J., Kolpin, D.W., Costanzo, S.D., 2009. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *Sci. Total Environ.* 407:2711–2723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.059>.
- Wenning, R.J., Martello, L., 2014. Chapter 8 - POPs in Marine and Freshwater Environments. In: O'Sullivan, G., Sandau, C. (Eds.), *Environmental Forensics for Persistent Organic Pollutants*. Elsevier, Amsterdam:pp. 357–390 <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59424-2.00008-6>.
- Wilkinson, J., Hooda, P.S., Barker, J., Barton, S., Swinden, J., 2017. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: an overarching review of the field. *Environ. Pollut.* 231:954–970. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.032>.
- Wong-Wah-Chung, P., Rafiqah, S., Voyard, G., Sarakha, M., 2007. Photochemical behaviour of triclosan in aqueous solutions: kinetic and analytical studies. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 191, 201–208.
- World bank list of economies, 2017. WWW Document. URL. data.worldbank.org/data/download/site-content/CLASS.xls.
- World Health Organization, 2004. World medicines situation. [WWW Document]. URL. <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s6160e/s6160e.pdf>, Accessed date: 4 April 2018.
- Wu, C., Huang, X., Witter, J.D., Spongberg, A.L., Wang, K., Wang, D., Liu, J., 2014. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products and associated environmental risks in the central and lower Yangtze river, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106:19–26. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.029>.
- Xu, T., Bao, S., Geng, P., Luo, J., Yu, L., Pan, P., Chen, Y., Hu, G., 2013. Determination of metoprolol and its two metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and its application in pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B* 937:60–66. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.017>.
- Yamashita, N., Yasojima, M., Nakada, N., Miyajima, K., Komori, K., Suzuki, Y., Tanaka, H., 2006. Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. *Water Sci. Technol.* 53:65. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.338>.
- Yang, Y., Ok, Y.S., Kim, K.-H., Kwon, E.E., Tsang, Y.F., 2017. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: a review. *Sci. Total Environ.* 596:303–320. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102>.
- Zenker, A., Cicero, M.R., Prestinaci, F., Bottoni, P., Carere, M., 2014. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *J. Environ. Manag.* 133:378–387. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.017>.
- Zhang, P., Zhou, H., Li, K., Zhao, X., Liu, Q., Li, D., Zhao, G., Wang, L., 2018. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products, and their associated environmental risks in Guanting Reservoir and its upstream rivers in north China. *RSC Adv.* 8:4703–4712. <https://doi.org/10.1039/C7RA12945A>.
- Zoller, U., 2006. Estuarine and coastal zone marine pollution by the nonionic alkylphenol ethoxylates endocrine disruptors: is there a potential ecotoxicological problem? *Environ. Int.* 32:269–272. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.08.023>.

Résumé

Résumé :

La carbamazépine (CBZ) est un antiépileptique largement consommé et peu dégradé (abattement < 20%) dans les stations de traitement des eaux usées. Par conséquent, il est rejeté en quantité significative sous sa forme originale dans les eaux de surface. Ainsi, cette thèse visait à étudier le devenir de CBZ et de deux de ses métabolites biologiques connus, à savoir l'oxcarbazépine (OxCBZ) et l'acide 9-carboxylique acridine (9-CAA), sous irradiation par la lumière solaire dans des eaux naturelles douces et salées. Les suivis cinétiques et analytiques ont permis de mettre en évidence des comportements différents en fonction des composés mais aussi des types d'eaux. La phototransformation de OxCBZ s'est avérée être la plus efficace suivie par celle de 9-CAA et enfin celle de CBZ. Les processus régissant leur transformation dépendent des composés. Dans tous les cas, on constate un mécanisme de dégradation induite et c'est le seul mis en jeu pour CBZ. Pour OxCBZ et 9-CAA, la photolyse directe est aussi observée ainsi que des réactions d'atténuation naturelle, notamment pour OxCBZ, mais dans une moindre mesure. La contribution relative de ces différents processus est dépendante du milieu naturel. Pour expliquer les différences constatées selon le type d'eaux, le contenu chimique et les espèces chimiques réactives générées dans ces milieux ont été étudiés. La formation de radicaux hydroxyles ($^{\bullet}\text{OH}$) a été mise en évidence dans les eaux en utilisant une sonde chimique et confirmée par des expériences en spectrophotométrie résolue en temps. La formation de radicaux carbonates ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) a été clairement montrée dans l'eau de l'Arc et dans une moindre mesure celle des radicaux bromures ($\text{Br}_2^{\bullet-}$) dans les autres eaux. Ces deux dernières espèces chimiques réactives sont générées par les radicaux $^{\bullet}\text{OH}$ et les ions inorganiques présents dans les eaux naturelles. Les constantes de réaction entre les composés et les radicaux identifiés ont été déterminées en mettant en œuvre des réactions de compétition. Ces constantes montrent une réactivité des radicaux hydroxyles avec les composés au moins 100 fois plus grande que celle des radicaux $\text{CO}_3^{\bullet-}$ et $\text{Br}_2^{\bullet-}$. Ces résultats justifient la dégradation induite de CBZ par les radicaux $^{\bullet}\text{OH}$ dans l'eau de l'Arc et sa dégradation plus faible dans les eaux salées, où la formation des radicaux bromures est favorisée. Pour préciser les processus de dégradation, les produits de transformation de CBZ, OxCBZ et 9-CAA ont été identifiés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution. Des voies réactionnelles ont été proposées en lien avec la formation de dérivés issus de processus d'hydroxylation, d'oxydation, de contraction de cycle, de perte de la fonction latérale, et d'ouverture de cycle aromatique suivi d'un réarrangement. Dans les eaux salées, la dégradation induite de CBZ et de 9-CAA génèrent aussi des sous-produits organo-bromés et chlorés. Afin d'évaluer les conséquences de ces transformations photochimiques pour l'écosystème, l'écotoxicité aiguë et chronique de CBZ, OxCBZ et 9-CAA a été évaluée sur 3 espèces vivantes de différents niveaux trophiques en mesurant les paramètres suivants : luminescence sur la bactérie *Vibrio fischeri*, croissance et développement et phytométabolites sur la lentille d'eau *Lemna minor* L. et altération aux niveaux population, cellulaire et moléculaire sur le cnidaire *Hydra circumcincta* Schulze. Les composés pharmaceutiques ont été testés individuellement et en mélange à doses environnementales. Un effet à faible concentration a été mis en évidence sur *Hydra circumcincta*. L'approche développée dans ce travail pourra être appliquée à l'étude du devenir d'autres molécules pharmaceutiques persistantes.

Mots clés : Carbamazépine, oxcarbazépine, acide 9-carboxylique acridine, devenir environnemental, écotoxicité aiguë et chronique, eaux douces et salées

Abstract :

Carbamazepine (CBZ) is a widely consumed anti-epileptic pharmaceutical drug. It has been proved to be inefficiently removed in activated sludge secondary treatment process (removal rate < 20%). Consequently, it is almost completely rejected in its original form into fresh and marine surface waters. Hence, this thesis aimed to study the fate of CBZ and two of its known bio-metabolites, i.e. oxcarbazepine (OxCBZ) and 9-carboxylic acridine acid (9-CAA), under solar light irradiation, after their release into natural surface waters. Kinetic and analytical monitoring showed that degradation mechanisms are both compound and water types dependent. The phototransformation of OxCBZ proved to be the most effective followed by 9-CAA and CBZ. Processes involved in these transformations are compound dependent. In any case the induced degradation of these compounds occurs and this is even the exclusive way for CBZ. For 9-CAA and OxCBZ, direct photolysis is also observed together with natural attenuation, especially for OxCBZ, but in a lesser extent. The contribution of these processes is dependent on the type of water. To deeper understand the differences noted, the nature and the abundance of the reactive chemical species were investigated and related to the chemical content of each water. The formation of hydroxyl radicals ($^{\bullet}\text{OH}$) in waters was evidenced using a probe compound as well as laser flash photolysis experiments. The formation of carbonate radicals ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) was clearly demonstrated in Arc water and to a lesser extent bromide radical's formation ($\text{Br}_2^{\bullet-}$) in other waters. Both latter reactive chemical species were generated by $^{\bullet}\text{OH}$ radicals and inorganic ions present in waterbodies. By implementing competition reactions, the rate constants of each compound with each chemical radical species were determined. In comparison to bromide and carbonate radicals, much higher reaction rates of hydroxyl radicals (more than 100 times higher) were observed with all the compounds. These results justify the noticeable induced degradation of CBZ by $^{\bullet}\text{OH}$ radicals in Arc water and its less significant transformation in saline waters, where the formation of bromide radicals is favoured. To get deeper insight in degradation processes, the transformation products of CBZ, OxCBZ and 9-CAA were identified by using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. Mechanistic pathways were proposed according to the formation of derivatives from hydroxylation, oxidation, ring contraction, loss of side function, aromatic ring opening and rearrangement reactions. In saline waters, induced degradation of CBZ and 9-CAA generated also organo-brominated and chlorinated by-products. To investigate the consequences of photochemical transformation for the ecosystem, acute and chronic ecotoxicity of CBZ, OxCBZ and 9-CAA were investigated on 3 living species from different trophic levels. The following endpoints were monitored: luminescence on the bacteria *Vibrio fischeri*, growth and development and phytometabolites on the duckweed *Lemna minor* L. and alterations at the population, cellular and molecular levels on the cnidarian *Hydra circumcincta* Schulze. Pharmaceuticals were tested individually and in mixture at low environmental concentration levels. An effect at low concentration was evidenced on *Hydra circumcincta*. The methodology developed in the present work can be applied to further study the environmental fate of other persistent pharmaceuticals.

Keywords: Carbamazepine, oxcarbazepine, 9-carboxylic acridine acid, environmental fate, acute and chronic ecotoxicity, fresh and salty waters.