



**HAL**  
open science

# An Integrated approach for identifying contaminants of concern in environment

Laura Fuster

► **To cite this version:**

Laura Fuster. An Integrated approach for identifying contaminants of concern in environment. Analytical chemistry. Université de Bordeaux, 2017. English. NNT : 2017BORD0880 . tel-01842145

**HAL Id: tel-01842145**

**<https://theses.hal.science/tel-01842145>**

Submitted on 18 Jul 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES CHIMIQUES  
SPÉCIALITÉ CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENTALE

Par Laura FUSTER

**MISE EN ŒUVRE D'UNE DÉMARCHE INTÉGRÉE POUR  
IDENTIFIER DES CONTAMINANTS PERTINENTS DANS  
L'ENVIRONNEMENT**

Sous la direction de : Hélène BUDZINSKI, Patrick MAZELLIER  
(Encadrante scientifique : Marie-Hélène DÉVIER)

Thèse soutenue le 15 décembre 2017  
Président du jury : M. BARCELÓ, Damià

Membres du jury :

M. BALAGUER, Patrick	Directeur de Recherche, IRCM, Montpellier	Rapporteur
M. BARCELÓ, Damià	Directeur de Recherche, ICRA, Girona	Rapporteur
Mme. VULLIET, Emmanuelle	Chargée de Recherche, ISA, Lyon	Examineur
Mme GOMEZ, Eléna	Professeur, Université de Montpellier	Examineur
Mme DÉVIER Marie-Hélène	Maitre de conférence, Université de Bordeaux	Invité



# Mise en œuvre d'une démarche intégrée pour identifier des contaminants pertinents dans l'environnement.

## Résumé :

De nos jours, l'évaluation de la qualité d'un milieu naturel repose traditionnellement sur des analyses ciblant des molécules déjà connues pour être biologiquement actives. Cependant ces molécules ne reflètent que partiellement les effets biologiques observés et la complexité des matrices environnementales. Par ailleurs, les contaminants dans l'environnement subissent des phénomènes de dégradation (hydrolyse, biodégradation, photodégradation). Ces processus peuvent conduire à la génération de produits de transformation qui sont encore trop peu pris en compte dans l'évaluation du risque, alors qu'ils sont susceptibles d'occasionner des effets toxiques plus importants que les molécules mères. L'impact écotoxicologique de ces mélanges nécessite préalablement l'obtention d'une vision globale quant à la présence et au devenir de ces molécules.

Dans ce contexte, ces travaux appliquent une méthodologie pluridisciplinaire afin d'identifier des molécules préoccupantes et pertinentes à surveiller. Pour cela, ce travail s'appuie sur des analyses ciblées ultra-traces, des outils bioanalytiques, et des analyses non ciblées, qui ont été appliqués sur des échantillons environnementaux ou issus d'études en laboratoire mimant l'évolution des matrices environnementales. Au final, cette étude a permis : (1) d'identifier des molécules préoccupantes en estuaire de Seine sur la base de leur occurrence et de leur persistance, (2) d'identifier de nouveaux produits de transformation et (3) d'identifier les molécules responsables d'activités biologiques dans des matrices très complexes.

**Mots clés :** contaminants émergents, produits de transformation, analyse dirigée par les effets (EDA), spectrométrie de masse haute résolution, tests *in vitro*, évaluation du risque.



# An Integrated approach for identifying contaminants of concern in environment.

## Abstract:

To date, environmental risk assessment is based on a restricted number of molecules assessed by targeted chemical analyses. However, this approach give a partial picture of co-occurrence of known and unknown compounds. Moreover, in the aquatic environment, chemicals are not completely mineralized and are subject to abiotic and biotic processes. Transformation products (TPs) can be more toxic and more persistent than the parent compound. However, TPs are not typically included in classical monitoring and risk assessment. Because of complexity and variability of these matrices and the restricted number of molecules focused in targeted chemical analyses, selection of relevant molecules for environmental monitoring is often laborious.

In this context, an integrative approach was used in order to identify chemicals of concern for a classical monitoring. This work has been realized on environmental complex samples and on laboratory-generated samples. A combination of targeted, non-targeted analyses and *in vitro* bioassays was performed and allowed to: (1) identify polar chemical of concern in the Seine estuary on the basis of occurrence and persistence, (2) identify new transformation products and (3) identify compounds responsible of biological activity observed in complexes matrices.

**Keywords:** emerging contaminants, transformation products, Effect-Directed Analysis (EDA), high resolution mass spectrometry, *in vitro* bioassays, risk assessment.



## **Unité de recherche**

Université de Bordeaux

UMR 5805, Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC)

L'équipe de Physico-Toxico-Chimie (LPTC)

Bâtiment A12, 2<sup>ème</sup> étage ouest

351 cours de la Libération

33405, Talence

France

---



## Avant Propos

*Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury. Merci à Damià Barceló, directeur de Recherche (ICRA, Girona), et Patrick Balaguer, directeur de Recherche (IRCM, Montpellier), de m'avoir fait l'honneur de rapporter ce travail et d'y apporter un regard critique et constructif. Je tiens également à remercier Elena Gomez, professeure à l'université de Montpellier et Emmanuelle Vulliet, chargée de Recherche (ISA, Lyon) d'avoir examiné ces travaux. J'ai pris plaisir à échanger avec vous le 15 décembre.*

*J'adresse également mes plus sincères remerciements à mes directeurs et encadrant de thèse : Hélène Budzinski, Patrick Mazellier et Marie-Hélène Dévier qui m'ont accompagnée tout le long de travail.*

*Hélène, je te remercie de m'avoir proposé de travailler sur ce sujet de thèse, fait confiance pour le mener à bien et ce dans des conditions de travail et humaines exceptionnelles. Merci pour nos échanges scientifiques et ta disponibilité qui m'ont permis de m'enrichir un peu plus chaque jour. Je te tenais également à te remercier de m'avoir permis d'être au cœur de différents projets de recherche et notamment du projet CRAPPSE. Merci de m'avoir transmis ta passion pour la chimie analytique environnementale, et pour la Science en générale !*

*Marie-Hélène, je te remercie également pour tes conseils tout le long de ses travaux notamment en HRMS mais aussi pour la réflexion et la rédaction des différentes publications. Bénéficier de ton recul scientifique a été une réelle chance pour moi.*

*Pendant ces 4 années, j'ai eu le plaisir de travailler dans l'UMR EPOC et plus particulièrement au sein d'équipe LPIC, avec de nombreuses personnes qui m'ont appris beaucoup professionnellement et humainement. Je tenais à exprimer ma gratitude envers toutes les personnes que j'ai côtoyées, tous clusters confondus, lors de cette période qui n'a pas toujours été facile.*

*Merci à Karyn, Patrick P. et Sylvie pour leur aide, leur formation lors des analyses en GC et LC-MS/MS. Merci Karyn, travailler avec toi a été très enrichissant que cela soit pour les analyses en GC mais aussi sur le plan organisationnel. Merci également pour ta bonne humeur, ton dynamisme ! Merci à Sylvie également de m'avoir épaulé sur l'UPLC et plus largement au quotidien. Venant d'une filière plutôt biologiste, j'étais novice en arrivant au LPIC. J'ai énormément appris en chimie analytique grâce à toi Patrick., et maintenant, je n'ai plus peur de toucher ces « grosses machines ». Merci pour ta pédagogie et ta disponibilité qui m'ont permis de m'améliorer.*

*Merci à Marie-Hélène, Emmanuel, et Caroline avec qui j'ai tout appris sur l'analyse non ciblée. Grâce à vous j'ai pu me confronter à la spectrométrie de masse haute résolution qui était, il y a encore 4 ans, un gros mot dans mon esprit.*

*Je tenais également à remercier sincèrement Nathalie T. qui m'a accompagnée de nombreuses fois en Seine pour réaliser diverses campagnes d'échantillonnage.*

*Tancarville, Rouen, Barrage de Poses ont été nos destinations de prédilection... Merci pour ces bons moments et merci pour tout ce que tu m'as transmis sur le terrain et sur les échantillonneurs passifs !*

*Merci également à mes différents petits stagiaires que j'ai pris plaisir à encadrer : Bettie, Giovanni, Lucas, Simon, j'ai vraiment apprécié ces quelques mois passés à travailler avec vous. Merci Tony pour m'avoir appris la patience, le discernement et la maîtrise de soi.*

*J'adresse un remerciement particulier à la team EDA : Caroline et Max. Caro merci pour tout...à mon arrivée au LPIC, c'est toi qui m'a « recueilli » et m'a transmis ton savoir en EDA, fractionnement, et haute réso. Cela été un plaisir de partager ton bureau, et de pouvoir échanger avec toi ! Max, merci pour tous ces moments de rire que cela soit au bureau ou dans la cave de culture cellulaire.*

*Plus globalement, j'aimerais remercier l'ensemble des personnes que j'ai pu côtoyer au LPIC. Pierre L., Laurent, Emmanuelle, avec qui je n'ai pas eu la chance de travailler mais avec qui j'ai toujours pris plaisir à discuter. Je voudrais également remercier l'ensemble du personnel contractuel et post-doc avec qui j'ai travaillé, et échangé. Un merci particulier à Céline, Mylène, Jérémy, Juliette, Geoffroy, Thomas, Lucas, Habib, Valentin, Laura, Pierre avec qui j'ai, de nombreuses fois, échangé sur de nombreux domaines.*

*J'ai une pensée sincère pour l'ensemble de la communauté doctorante qui a marqué ces années de doctorat : Coralie, Yann, Perrine, Hugues, Caroline GP., Justine, Jérémie, Julie, Gabriel, Max, Nathalie D., Nathalie C., Mathilde, Vincent, Caroline CSL, Laurine, Manon, Daniel, Théo, Daphné, Ignacio ... Merci à Yann qui m'a encadré durant mon stage de M1 au LPIC et avec qui j'ai pris plaisir à travailler durant ma thèse sur les expériences d'incubation. Merci à Mathilde avec qui j'ai vécu des moments particuliers durant ces 4 ans !! Merci Justine, Julie, et Hugues pour votre bonne humeur et nos échanges passionnés sur la Science !!! J'ai pu vivre des moments inoubliables avec beaucoup d'entre vous au quotidien au labo, en congrès ou encore autour d'un verre vin et un bon morceau de fromage. Merci aux collègues du Labex que j'ai pu croiser chaque jour durant ces quatre années et en particulier Claire, Adrien et Julien. Vous avez été une réelle source de sourire, de bonne humeur et d'excellence !*

*Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de différents projets: TOXLIX, CRAPPSE et MOSAIC. Je tenais donc remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué au bon déroulement de ces différentes études. Merci aux membres du GIP Seine Aval qui m'ont permis d'acquérir une bonne connaissance du fonctionnement de l'estuaire de Seine. Merci également à Laurent M. avec qui j'ai eu le plaisir de travailler dans le cadre du projet TOXLIX.*

*J'ai une pensée toute particulière pour Selim, Nicolas et Emmanuelle qui m'ont accueillie au sein de l'unité ECOT (INERIS) pour réaliser des bioessais *in vitro*. Selim merci beaucoup pour ta disponibilité, l'ensemble de nos échanges qui ont été un réel*

*plaisir et très enrichissant. Merci également à Margaux, Clémentine et Hélène qui ont toujours fait de mes séjours à Verneuil-en-Halatte ou à Leipzig un moment agréable.*

*Je tenais également à adresser mes remerciements à Jérôme avec qui j'ai beaucoup interagit lors du projet CRAPPSE. Merci de ton accueil au sein de TOXEM afin que je puisse réaliser le SOS chromotest sur les échantillons de lixiviat. Merci pour l'ensemble de nos échanges au cours du projet CRAPPSE et notamment pour les campagnes d'échantillonnage. Merci également à Géraldine et Géraldine qui m'ont accueillie à bras ouvert et qui ont rendu mon séjour au Havre agréable.*

*Merci à Aurélien, Patrick M. et Montaha pour les échanges que nous eut dans le cadre des expériences de photodégradation. J'ai pris beaucoup de plaisir à interagir avec vous sur ce domaine qui m'était totalement obscure au début de mon doctorat. Merci également de m'avoir accueillie à Périgueux afin de mener à bien certaines expérimentations.*

*J'adresse également mes remerciements à l'ensemble du consortium de MOSAIC avec qui j'ai eu la joie d'interagir. Merci à Edith, Jérémie, Clara, Mahaut, Arnaud et Alexandre pour avoir ouvert mon esprit aux problématiques liées à la matière organique.*

*Comment oublier comment tout ceci à commencer... le Master Exce. Deux années inoubliables qui m'ont donné le goût de la chimie environnementale et de l'écotoxicologie. Je voulais remercier l'ensemble du corps enseignant qui m'a vraiment fait partager sa passion pour ce domaine. Merci en particulier à Nathalie G et Magalie B. qui m'ont permis de vivre cette aventure. Merci également aux Exécrables avec qui j'ai partagé 2 années inoubliables : Régis, Sarah, Steven, Claire, Payton, Jess, Florent, Charlotte !!!*

*Merci à l'ensemble de mes amis qui m'ont supporté pendant cette période, qui m'ont toujours fait revenir à la réalité. Un immense merci, en particulier, à Lalie, Delphine, Caroline, Sarah, Titi, Matthieu, Bijoux, Julie, Nacho, Tanou, Coicoi, Chowchow... Vous avez été une bouffée d'oxygène, de rire, de folie et de bonheur !!! J'ai une pensée émue pour Hadès et Loki, des bibis d'exception qui m'ont apporté énormément de joie au quotidien.*

*Merci à mes parents et à mon frère qui m'ont toujours aidé à réaliser mes ambitions. Vous avez été d'un réel soutien durant toutes mes années d'études et vous avez fortement participé à mon accomplissement et épanouissement.*

*Merci à Vincent pour mille et une choses. Nous avons commencés en M1 ensemble il y a maintenant 6 ans. Pendant ces 4 ans, nous avons vécu ensemble, travailler ensemble, affronter les désagréments du quotidien ensemble, pour finalement réussir ensemble. Merci d'être toujours là pour moi, de me soutenir quel que soit mes choix, de me re-booster quand je doute, merci de me faire rire, merci de m'écouter...Merci pour ces années.*





# Sommaire

<b>Sommaire</b> .....	13
<b>Listes des figures</b> .....	17
<b>Liste des tableaux</b> .....	23
<b>Listes des abréviations</b> .....	27
<b>Introduction générale</b> .....	31
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b> .....	37
1. Evolution des enjeux de la surveillance chimique.....	38
1.1 La surveillance de la qualité des eaux.....	38
1.2 Les limites et challenges de la surveillance chimique.....	41
2. Vers l'utilisation de méthodes de plus en plus intégratives.....	48
2.1 L'évolution des analyses chimiques.....	49
2.2 Les outils bioanalytiques.....	55
2.3 Prise en compte des produits de transformation.....	61
2.4 Stratégie d'échantillonnage : à la base des analyses intégratives.....	63
3. Présence, devenir et priorisation des contaminants dans les eaux de surfaces.....	67
3.1 Des contaminants d'intérêt émergent dans les eaux de surface.....	67
3.2 L'effort d'identifier et prioriser les molécules pertinentes.....	69
3.3 Devenir des contaminants d'intérêt émergent dans les milieux aquatiques.....	71
<b>Objectifs des travaux</b> .....	75
<b>Chapitre II : Matériels et méthodes</b> .....	79
1. Objectifs des travaux et vision globale de la stratégie appliquée.....	80
2. Stratégie d'échantillonnage et sites d'étude.....	81
2.1 Études <i>in situ</i> .....	81
2.2 Expériences <i>in vitro</i> en laboratoire.....	92
3. Stratégies de caractérisation des échantillons.....	97
4. Détection, Identification et quantification des contaminants organiques.....	98
4.1 Choix des molécules ciblées et vision d'ensemble des procédures d'analyses.....	98
4.2 Préparation des échantillons.....	100
4.3 Extraction et fractionnement dans le cadre de l'approche EDA.....	102
4.4 Approche ciblée.....	104
4.5 Approche non ciblée par spectrométrie de masse haute résolution.....	109
5. Évaluation de la présence de molécules actives.....	114
5.1 Présence de composés œstrogéniques et de type dioxine-like.....	114
5.2 Présence de composés génotoxiques : SOS Chromotest.....	116

<b>Chapitre III : Apports en contaminants émergents en estuaire de Seine</b> .....	121
1. Apports en contaminants organiques en estuaire de Seine .....	122
1.1 Acquis antérieurs .....	122
1.2 Etats des lieux des niveaux de concentrations .....	123
1.3 Bilan global et comparaison à d'autres estuaires.....	132
2. Apports de molécules biologiquement actives en estuaire de Seine.....	139
2.1 Composés génotoxiques .....	139
2.2 Perturbateurs endocriniens et dioxine-like.....	140
3. Publications.....	147
3.1 Occurrence of polar pesticides in the Seine estuary (France).....	147
3.2 Pharmaceuticals in the Seine estuary: 15 years of survey (2002-2017).....	167
<b>Chapitre IV : Vers une meilleure estimation de la contamination en zone estuarienne</b> .....	191
1. Présence de composés traceurs de l'amont vers l'aval .....	192
1.1 Sélection des molécules ciblées.....	192
1.2 Niveaux de concentration des composés traceurs dans l'estuaire.....	193
1.3 Variabilité spatiale et temporelle : intérêt de l'échantillonnage passif.....	197
1.4 Dynamique de la contamination en estuaire moyen .....	203
2. Réactivité de contaminants apportés en Seine .....	209
2.1 Photodégradation d'un effluent de STEU .....	209
2.2 Devenir des contaminants en conditions environnementales variables .....	213
3. Publications.....	229
3.1 Suspended solids moderate the degradation and sorption of waste water-derived pharmaceuticals in estuarine waters (accepted in Science of Total Environment).....	229
3.2 Priorization of polar pesticides and pharmaceuticals with taking account into their persistence in dissolved phase: Case of the Seine estuary.....	255
<b>Chapitre V : Apports de la spectrométrie de masse haute résolution à la surveillance chimique</b> .....	279
1. Identification de composés non ciblées par analyses classiques.....	280
2. Identification de produits de transformation générés en laboratoire.....	284
2.1 Méthodologie générale appliquée et exemple d'identification des photoproduits de l'ofloxacin .....	285
2.2 Bilan des composés et limites de l'identification .....	290
2.3 Pertinence environnementale.....	294
3. Identification de composés actifs par une approche EDA .....	300
3.1 Mise en évidence de composés biologiquement actifs .....	301
3.2 Identification des composés responsables de l'œstrogénicité observée.....	304

4. Publications.....	311
4.1 Photodegradation of novel oral anticoagulants under sunlight irradiation in aqueous matrices (acceptée dans Chemosphere).....	311
4.2 Bisphenols as major contributors of estrogenic activity in landfill leachates- Investigations by Effect-Directed Analysis (EDA) .....	333
<b>Conclusions et perspectives</b> .....	<b>353</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>361</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>403</b>





## Listes des figures

Figure 1 : Historique et calendrier prévisionnel de la DCE. ....	38
Figure 2 : Une réglementation intégrée à plusieurs niveaux. ....	40
Figure 3 : Procédure d'évaluation du risque environnemental des composés chimiques (Guillén et al., 2012). ....	40
Figure 4 : Mise en évidence du risque de contamination chimique aigu (A) et chronique (B) Le code couleur représente le niveau de risque : d'un faible niveau de risque (bleu) à très élevée (rouge)(Malaj et al., 2014). ....	41
Figure 5 : Exemples non exhaustifs de grandes familles chimiques de perturbateurs endocriniens. ....	43
Figure 6 : Représentation schématique de la formation et du traitement des lixiviats issus des ISDND. ....	45
Figure 7 : Sources et vecteurs des contaminants émergents et de leurs produits de transformation (PT) dans l'environnement. (Lapworth et al., 2012). ....	47
Figure 8 : De l'analyse ciblée au criblage non-ciblé (Schymanski et al., 2014a; Togola et al., 2015; Acena et al., 2016). ....	51
Figure 9 : L'approche d'identification des molécules et niveaux de confiance (Schymanski et al., 2015). ....	52
Figure 10 : Domaines d'application de la chromatographie en phase gazeuse (GC) et de la chromatographie en phase liquide (CL) (Brack et al., 2016). ....	55
Figure 11 : Principe de la « mass balance analysis » (MBA) d'après Ait-aissa (2009) et Creusot (2011). ....	58
Figure 12 : Principe de l'analyse dirigée par les effets (Brack, 2003). ....	59
Figure 13 : Stratégie générale d'identification de produits de transformation générés dans l'environnement. PT : produit de transformation. ....	61
Figure 14 : Stratégie d'identification de produits de transformation (PT) pertinents par l'approche dirigée par l'exposition et l'approche dirigée par les effets (Escher et Fenner, 2011). P : composé parent, PT : produit de transformation. ....	63
Figure 15 : Fenêtre d'échantillonnage des principaux échantillonneurs passifs en fonction du log $K_{ow}$ (Vrana et al., 2005a; Mazzella et al., 2011). ....	64
Figure 16 : Principe de quantification par la démarche corrective utilisant des PRC. ....	65
Figure 17 : Devenir des contaminants dans les écosystèmes aquatiques (BioA : bioaccumulation, BioM : biomagnification). ....	71
Figure 18 : Principaux paramètres influençant le devenir des contaminants en zone estuarienne. ....	73
Figure 19 : A : Représentation schématique des différents types d'échantillonnage et de leur intégration de la contamination ; B : vue éclatée d'un échantillonneur passif de type POCIS. C : Photographies de gauche à droite d'un POCIS, d'un holder et d'une cage. ....	82
Figure 20 : Le bassin versant de la Seine et son estuaire. ....	85

Figure 21 : Usages principaux du bassin versant de l'estuaire de Seine ; apport en eaux douces de la Seine et de ses affluents, et positionnement des principales STEU (>10 000 équivalent habitants). PQ : Petit Quevilly (Rouen) et GQ : Grand Quevilly (Rouen). Carte réalisée à partir des données de débits de Seine Aval, (2008) ; fond de carte : « Corine Land Cover » ( <a href="http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/clc/carte/metropole">http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/clc/carte/metropole</a> ) et données des STEU ( <a href="http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr/">http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr/</a> ). .....	86
Figure 22 : Onde de marée (A) et gamme de salinité dans les différentes sections de l'estuaire. (C) formation de la zone maximale de turbidité (TMZ). (Brenon et Le Hir, 1999; Lemoine et Verney, 2015). .....	87
Figure 23 : L'estuaire de Seine : zone d'étude et campagnes d'échantillonnage.....	89
Figure 24 : Récapitulatif des différentes campagnes d'échantillonnage réalisées au niveau de Poses et de la sortie de la STEU de Rouen. ....	90
Figure 25 : Récapitulatif des différentes campagnes d'échantillonnage réalisées au niveau d'Oissel, La Bouille, Caudebec. ....	91
Figure 26 : Comparaison des spectres d'émission du simulateur solaire et du rayonnement solaire naturel en mai à Périgueux (Nassar, 2014). ....	92
Figure 27 : Sites de prélèvement des eaux de bouchon vaseux (en jaune) prélevées en Seine et en Gironde. ....	95
Figure 28 : Résumé des conditions expérimentales mises en place lors des expériences d'incubation en présence des bouchons vaseux de la Seine et de la Gironde. ....	96
Figure 29 : Dispositif expérimental schématisé.....	97
Figure 30 : Représentation schématique du traitement des échantillons en fonction du type d'analyses réalisées (chimiques ciblées et non ciblées, bioessais). Chaque partie sera abordée en détail dans les sections suivantes. ....	97
Figure 31 : Nombre des molécules qui ont été recherchées et qui sont incluses dans les listes de surveillance de directives, programmes français et européens. ....	98
Figure 32 : Chromatogramme de référence pour le fractionnement en phase inverse. ....	104
Figure 33 : Récapitulatif du principe des méthodes de quantification utilisées. ....	105
Figure 34 : Récapitulatif des limites de quantification (LQP) obtenues sur les échantillons d'eau. Les cercles gris indiquent le nombre des molécules concernées. ....	108
Figure 35 : Récapitulatif des limites de quantification (ng.L <sup>-1</sup> ) extrapolées obtenues sur les échantillonneurs passifs. ....	108
Figure 36 : Récapitulatif des limites de quantification obtenues sur les échantillons ponctuels récoltés durant les campagnes DYANOSEINE. ....	109
Figure 37 : Représentation simplifiée de l'analyse en Q-TOF. ....	111
Figure 38 : Stratégie d'identification en LC-QTOF (Gardia-Parège, 2015) et échelle de niveau d'identification des composés (Schymanski et al., 2015). ....	113
Figure 39 : Détermination équivalent biologique (CE 20 : Concentration efficace 20 %). ....	116
Figure 40 : Principe du SOS Chromotest (Quillardet and Hofnung, 1985). ....	117

Figure 41 : Répartition des apports (flux en $\text{kg}\cdot\text{an}^{-1}$ ) en médicaments en estuaire de Seine réalisé à partir des données obtenues sur 17 composés à partir des données de Togola (2006).....	122
Figure 42 : Concentrations moyennes cumulées (A) et empreintes de contamination moyennes (B) au niveau de Poses et de l'effluent de la STEU de Rouen réparties en fonction des différentes classes thérapeutiques recherchées. Le graphique regroupe les résultats de 6 campagnes d'échantillonnage réalisées de mai 2014 à mars 2015. ....	124
Figure 43 : Niveaux de concentration (n=6 campagnes) en (A) ibuprofène (IBU) et 2-hydroxy-ibuprofène (IBU-OH) et en (B) de carbamazépine (CBZ) et des certains produits de transformation : Trans-10,11 dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine (CBZ-DiOH) ; 2-hydroxy-carbamazépine (CBZ-2OH) et ; 3-hydroxy-carbamazépine (CBZ-3OH). <i>Les résultats présentent les concentrations sous forme de box-plot et le pourcentage molécule mère / produits de transformation à Poses et au niveau de l'effluent de la STEU de Rouen.</i> Le graphique regroupe les résultats de 6 campagnes d'échantillonnage réalisées de mai 2014 à mars 2015. ....	125
Figure 44 : Concentrations moyennes cumulées en filtres UV (A) et empreintes de contamination moyennes (B) au niveau de Poses et de l'effluent de la STEU de Rouen. Le graphique regroupe les résultats de 6 campagnes d'échantillonnage réalisées de mai 2014 à mars 2015.....	127
Figure 45 : Pesticides majoritairement retrouvés au niveau de Poses (A) et de l'effluent de la STEU de Rouen. Les résultats expriment les concentrations moyennes obtenues entre mai 2014 et mars 2015. Le diagramme dans les encadrée gris présente la répartition en fonction des usages, des pesticides retrouvés en moyenne à Poses et dans l'effluent de la STEU de Rouen Les couleurs de box plot renseignent sur les usages autorisés de ces pesticides dans la législation française. Le graphique regroupe les résultats de 6 campagnes d'échantillonnage réalisées de mai 2014 à mars 2015. ....	128
Figure 46 : Concentrations en métolachlore, chlortoluron et isoproturon mesurées au niveau du barrage de Poses de mai 2014 à mars 2015. ....	130
Figure 47 : Concentration de métolachlore et ses métabolites (métolachlore OA et ESA) et rapport entre composé parent / métabolites de mai 2014 à mars 2015 au niveau du site de Poses. ....	131
Figure 48 : Concentration en fipronil au niveau du barrage de Poses (A) de l'effluent de la STEU de Rouen (B). ....	131
Figure 49 : Flux annuel extrapolés (en $\text{kg}\cdot\text{an}^{-1}$ ) en pesticides, filtres UV et composés pharmaceutiques entrants dans l'estuaire de Seine par le barrage de Poses et par la sortie de la STEU de Rouen. Le graphique regroupe les résultats de 6 campagnes d'échantillonnage réalisées de mai 2014 à mars 2015.....	133
Figure 50 : Empreinte globale des apports en contaminants en estuaire de Seine. Rapport des flux annuels à Poses sur les flux en sortie de STEU par rapport aux concentrations moyennes au niveau du Site de Poses sur la période de mai 2014 à mai 2015. Un rapport de 100000 a été attribué arbitrairement aux composés uniquement apportés par Poses. ....	134
Figure 51 : Mise en évidence des composés problématiques apportés en Seine en fonction du risque (MEC95/PNEC) associé nombre de dépassement de la PNEC sur la base de 6 échantillonnages ponctuels. ....	137

Figure 52 : Génotoxicité des extraits des différentes campagnes de prélèvements en équivalents de molécules de références (A : B[a]P avec S9 ; B : NQO sans S9).....	140
Figure 53 : Evolution des activités <i>in vitro</i> de type (A) œstrogénique (ER), (B) glucocorticoïde (GR) et (C) HAP-like (AhR) dans l'eau de Seine à Poses et l'effluent de STEU à Rouen au cours des 6 campagnes de mai 2014 à mars 2015. STEU de Rouen = <i>prélèvement moyenné 24 h</i> ; eau de Seine à Poses = <i>prélèvement ponctuel</i> . n.d. <i>activité non détectée</i> ; n.m. <i>non mesurée (pas de donnée)</i> . ....	142
Figure 54 : Représentativité des molécules sélectionnées : (a) pharmaceutiques et (b) pesticides. ....	193
Figure 55 : Concentrations mesurées en pesticides recherchés dans les échantillons ponctuels récoltés au niveau d'Oissel, La Bouille et Caudebec, de décembre 2016 à mai 2017 (n=18). ....	194
Figure 56 : Concentrations moyennes des pesticides recherchés dans les échantillons ponctuels récoltés au niveau d'Oissel, La Bouille et Caudebec, de décembre 2016 à mai 2017 (n=18). ....	195
Figure 57 : Synthèse des concentrations (A) et abondance relative (B) en pharmaceutiques recherchés dans le sédiment et dans les phases dissoute et particulaire. (<LQ : inférieur à la limite de quantification, nd : non déterminé). Les résultats synthétisent les données obtenus durant la campagne d'avril 2016). ....	196
Figure 58 : Evolution de la concentration (trait plein) et du pourcentage porté par les particules (trait en pointillé) dans la colonne d'eau (dissous+ particulaire) de Rouen à La Carosse pour la somme de 8 composés pharmaceutiques.....	197
Figure 59 : Concentrations en composés pharmaceutiques (A et B) et en pesticides (C et D) dans l'estuaire de Seine. Les concentrations ont été évaluées à partir des échantillonnages ponctuels (A et C) et POCIS (B et D) sur les périodes de décembre 2016, février 2017, avril 2017. OIS : oissel, LaB : La Bouille et CAU : Caudebec.....	200
Figure 60 : Classement des composés en fonction de la saisonnalité du rapport de concentration composés/ carbamazépine à La Bouille (trait noir) et débit extrapolé à Poses (histogramme). ....	201
Figure 61 : Ensoleillement et débit durant la période d'échantillonnage (a) et relation entre fipronil/fipronil-desulfinyl et ensoleillement (b).....	202
Figure 62 : Comparaison des concentrations en composés pharmaceutiques (a et b) et en pesticides (c et d) lors de deux campagnes réalisées en avril et en septembre 2015 au niveau de Caudebec, Fatouville et Honfleur en basse mer (BM) et pleine mer (PM). ....	204
Figure 63 : Evolution des concentrations (ng.L <sup>-1</sup> ) moyenne (basse, pleine mer et jusant) en composés pharmaceutiques de l'amont vers l'aval : Dynamique de la contamination au cours d'un cycle de marée. Le graphique central représente les concentrations moyennes en avril et septembre 2015 de Caudebec à Honfleur. Les graphiques a, b, c, d, e, f représentent les variations de concentrations au niveau de Tancarville (a,d), Fatouville (b,e) et Honfleur (c,f) au cours d'un même cycle de marée. Les échantillons ont été prélevés à basse mer (BM), jusant (Ju) et pleine mer (PM).....	205
Figure 64 : Dynamique de la contamination en pesticides au cours d'un cycle de marée. Les graphiques a, b, c, d, e, f représentent les variations de concentrations au niveau d'un site au cours d'un même cycle de marée. Les échantillons ont été prélevés à basse mer (BM), jusant (Ju) et pleine mer (PM). ....	206

Figure 65 : Photodégradation du fipronil dans l'effluent de la STEU de Rouen .....	212
Figure 66 : Effet de la concentration en matières en suspension (LSS, MSS, HSS), de l'empoisonnement au chlorure mercurique (HgCl <sub>2</sub> ) et de la salinité (HSAL) sur l'évolution des concentrations globales des pesticides et des composés pharmaceutiques dans les eaux estuariennes de la Seine (a) et de la Garonne. Les données représentent la concentration en composé normalisée par celle de la carbamazépine et exprimée en pourcentage du T0. ....	215
Figure 67 : (a) Evolution de l'indice humification (HIX) et (b) de l'indice d'activité biologique (BIX) mesurés à 0, 7, 14, 17 et 21 jours d'incubation dans les eaux estuariennes de la Seine .....	217
Figure 68 : Comportements types des molécules détectées dans les incubations <i>in vitro</i> en Seine. Les données représentent la concentration en composé normalisé par celle de la carbamazépine et exprimées en pourcentage du T0.....	219
Figure 69 : Evaluation du risque dans différentes conditions de turbidité. Le graphique supérieur provient de Dupont et al., (2009). LSS : MES en faibles concentrations, MSS : MES en concentrations intermédiaires, HSS : MES en hautes concentrations. ....	223
Figure 70: Mise en évidence des composés problématiques en Seine et en Garonne en fonction du risque (MEC95/PNEC) associé mais également de leur niveau de persistance en Seine et en Gironde. Les encadrés noirs correspondent au numéro de la catégorie. Les MEC95 proviennent des données récotées à Poses lors cette étude et des travaux en Garonne de Aminot (2013) et Cruz (2015). ....	225
Figure 71 : Evolution des concentrations en diuron et en ses produits de transformation dans les différentes conditions expérimentales de l'expérience dans les eaux de Seine (A) et dans les eaux de la Garonne (B). ....	226
Figure 72: Experimental set up. ....	258
Figure 73 : Comparaison des chromatogrammes des extraits T0 et T21 (a) Masse moléculaire en fonction du temps de rétention des composés détectés (b). La flèche indique un exemple de polymères. ....	282
Figure 74 : (a) Schéma résumant les signaux détectés dans les incubations et (b) répartition des signaux détectés en mode d'ionisation positif en fonction de la masse uniquement dans T0 (éliminés), uniquement dans T4 (nouvellement détectés) et dans les 2 temps (persistants).....	283
Figure 75 : Exemple de l'ofloxacin : Comparaison des échantillons par <i>MassProfiler</i> (a), chromatogramme de l'ofloxacin avant et après 80h d'irradiation solaire (b) et focus sur les ions détectés dans l'échantillon irradié 80 h (c).....	286
Figure 76 : Exemple de résultat obtenu sur le logiciel MetFrag : Comparaison de la fragmentation <i>in silico</i> (a) de la déméthyl-ofloxacin et du spectre de fragmentation du photoproduit OFX-2 (b) de l'ofloxacin-n-oxide et du spectre de fragmentation du photoproduit OFX-3.....	289
Figure 77 : Comparaison des spectres de fragmentation des photoproduits détectés dans les échantillons irradiées avec les standards analytiques du N-déméthyl-ofloxacin (a) et de l'ofloxacin-n-oxide (b).....	290
Figure 78 : Chromatogramme de la danofloxacin avant et après 20h d'irradiation solaire (b) et focus sur les ions détectés dans l'échantillon irradié 20 h. ....	291

Figure 79 : a. Chromatogramme représentant le rivaroxaban (RIV) et son photoproduit (RIV-1). Spectres de fragmentation du rivaroxaban (b) et du photoproduit RIV-1 à une énergie de collision 20 eV. ....	292
Figure 80 : Comparaison des spectres de fragmentation de l'abacavir et de ces produits de transformation avec la fragmentation <i>in silico</i> des structures figurant dans le Tableau 39. ....	294
Figure 81 : Activité dioxin-like mesurée sur les cellules PLHC-1 suite à une exposition de 4 ou 24h à des différents extraits organiques de lixiviats. <i>Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport à la Tcdd (1 nM) et représentent la moyenne de 3 répliquats et écart-type.</i> ....	303
Figure 82 : Bilan et comparatif des activités biologiques mesurées dans les différents lixiviats étudiés. ....	304
Figure 83 : Mise en évidence des composés présents dans la fraction 15 en mode de ionisation positif (a) et négatif (b) . Les points noirs représentent les données du blanc protocole et les points bleus, les données de la fraction 15. La taille de chaque point est dépendante de l'abondance moléculaire. ....	307
Figure 84 : Comparaison du profil d'activité des fractions (a), des chromatogrammes HPLC, de l'extrait organique site1-LB (b) et d'une solution étalon de 8 composés appartenant à différentes classes (c). <i>Les fractions, collectées toutes les 3 minutes. (E1 : Œstrone, EE2 : Ethinylestradiol ; TPP : triphénylphosphate ; DTT : Dichlorodiphényltrichloroéthane ; BbF : benzo(b)fluoranthène ; DaA : Dibenzo(ah)anthracène).</i> .....	308
Figure 85: Récapitulatif des méthodes mises en œuvre pour évaluer la présence de molécules préoccupantes. ....	354
Figure 86 : Récapitulatifs des approches nécessaires afin de mettre en évidence des molécules préoccupantes (Slobodnik and Dulio, 2014). ....	356

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Sources majeures de contaminants à intérêts émergents (Mandaric et al., 2015; Stewart et al., 2016; Montes-grajales et al., 2017). .....	43
Tableau 2 : Rendements d'élimination de procédés de traitement tertiaire (Choubert et al., 2012).....	46
Tableau 3 : Comparaison de différents spectromètres de masse (Krauss et al., 2010b; Holcapek et al., 2012).....	50
Tableau 4 : Exemples récents d'application de criblage suspect et non ciblés. [1] (Ibanez et al., 2008) ; [2] (Deeb et al., 2017) ; [3] (Gago-Ferrero et al., 2016) ; [4] (Wode et al., 2014) ; [5] (Hug et al., 2014) ; [6] (Schymanski et al., 2014b) ; [7] (Kern et al., 2009) ; [8] (Bueno-Martínez et al., 2012) ; [10] (Müller et al., 2011) ; [11] (Masiá et al., 2014).....	53
Tableau 5 : Exemples des différents bioessais en fonction de différents niveaux de mécanismes d'action (Poulsen et al., 2011). .....	56
Tableau 6 : Quelques exemple d'application de l'approche de type EDA. [1] (Creusot et al., 2013a); [2] (Legler et al., 2011) ; [3] (Lei et Aoyama, 2010a) ; [4] (Regueiro et al., 2013) [5] (Creusot et al., 2014) ; [6] (Schulze et al., 2010) ; [7] (Booij et al., 2014) ; [8] (Liscio et al., 2014) ; [9] (Simon et al., 2013)..	60
Tableau 7 : Exemples d'application des échantillonneurs passif de type POCIS. [1] (Bueno-Martínez et al., 2014) ; [2] (Li et al., 2010) ; [3] (Gonzalez-rey et al., 2015) ; [4] (Li et al., 2016) ; [5] (Vermeirssen et al., 2010) ; [6] (Tapie et al., 2011) ; [7] (Jálová et al., 2013) ; [8] (Long et al., 2014) ; [9] (Soulier et al., 2016) ; [10] (Creusot et al., 2014) ; [11] (Booij et al., 2014) ; [12] (Liscio et al., 2014). .....	66
Tableau 8 : Liste des catégories d'action identifiées sur la base des manques d'information / connaissance et des actions à mettre en œuvre (Dulio et Andres, 2012). .....	70
Tableau 9 : Récapitulatif global de la stratégie appliquée.....	80
Tableau 10 : Récapitulatif des caractéristiques et paramètres des différents échantillons prélevés....	84
Tableau 11 : Récapitulatif des conditions d'échantillonnage dans le cadre du projet MOSAIC C : Caudebec, T : Tancarville, F : Fatouville, H : Honfleur, LC : La Carosse. ....	91
Tableau 12 : Récapitulatif des molécules mères étudiées dans les expériences sous irradiation solaire : identification des produits de transformation majoritaires. * dans cette étude, [1] (Nakata et al., 2005), [2] (Tamtam et al., 2007), [3] (Iglesias et al., 2014), [4] (Aminot et al., 2015), [5] (Funke et al., 2016), [6] (Vasquez et al., 2013), [7] (Zivanovic et al., 2006), [8] (Zgadaj et al., 2015), [9] (Hubicka et al., 2013), [10] (Calza et al., 2008), [11] (Hubicka et al., 2014), [12] (Sturini et al., 2012a), [13] (Sturini et al., 2015), [14] (Ge et al., 2015), [15] (Kusari et al., 2009), [16] (Prabhakaran et al., 2009), [17] (Kurmi et al., 2017). (U= usage).....	93
Tableau 13 : Résumé des différentes filières analytiques utilisées en fonction des groupes de molécules ciblées.....	99
Tableau 14 : Récapitulatif des différentes méthodes d'extraction sur phase solide. ....	101
Tableau 15 : Conditions de fractionnement par chromatographie en phase liquide haute performance. ....	103
Tableau 16 : Récapitulatif des systèmes de séparation et de détection employés. ....	104



Tableau 17 : Synthèse du nombre d'échantillons analysés et du nombre de molécules recherchées. ....	107
Tableau 18 : Récapitulatif des méthodes chromatographiques appliquées en LC-QTOF. ....	110
Tableau 19 : Paramètres de la source d'ionisation utilisés pour les analyses en QTOF. ....	111
Tableau 20 : liste des différents bioessais réalisés lors de ces travaux : <sup>a</sup> bioessais effectués à l'INERIS dans le cadre du projet TOXLIX et <sup>b</sup> réalisés par l'INERIS dans le cadre du projet CRAPPSE. [1] : (Balaguer et al., 1999) ; [2] : (Wilson et al., 2002) ; [3] : (Kinani et al., 2016). ....	115
Tableau 21 : Evolution des concentrations de quelques molécules « traceurs » à Poses (A) et en sortie du petit Quevilly (B). <i>Les données représentent les concentrations moyennes en ng/l [min-max].</i> (Togola et Budzinski, 2007b; Budzinski et al., 2014).....	124
Tableau 22 : Comparaison des concentrations moyennes en médicaments retrouvées dans les rivières et estuaires aux niveaux : français, européen et mondial. ....	126
Tableau 23 : Comparaison des concentrations (ng.L <sup>-1</sup> ) en pesticides dans la Seine à Poses (2014-2015) avec les données disponibles dans la littérature. *cette étude, (a) Botta et al., (2009), (b) Tapie et al., (2011), (c) Cruz, (2016), (d) Tousova et al., (2017), (e) Caracciolo et al., (2012), (f) Orlikowska et al., (2015). [min – max].....	132
Tableau 24 : Evaluation du risque potentiel des molécules quantifiées à Poses. Les PNEC sont issus de la littératures : [1] (Minguez et al., 2016), [2] (Tousova et al., 2017), [3] (Von der Ohe et al., 2011)[4] (Anses, 2017), [5] (INERIS, 2017) [6](Besse et Garric, 2008), [7] (Dulio et al., 2013), [8] (Botta et Dulio, 2014), [9] (Directive 98/8/EC, 2015). ....	135
Tableau 25 : Comparaison des concentrations et flux en molécules préoccupantes avec deux estuaires européens [1] (Aminot et al., 2016), [2](Aminot, 2013), [3](Cruz, 2016) et [4] (Ter Laak et al., 2010). C <sub>moy</sub> : concentration moyenne ; F <sub>moy</sub> : flux moyen, M : médicament, P/B : pesticides/biocides, FUV : filtres UV. ....	138
Tableau 26 : Suivi des activités ER, GR/AR et AhR dans les extraits de POCIS déployés sur les sites de Poses et de Rouen. <i>n.d. non détecté.</i> ....	143
Tableau 27 : Comparaison des limites de quantification « protocole » (ng.L <sup>-1</sup> ) entre échantillons ponctuels et passif. ....	198
Tableau 28 : Concentrations (ng.L <sup>-1</sup> ) en composés pharmaceutiques et en pesticides dans l'estuaire de Seine. Les concentrations ont été évaluées par échantillonnage ponctuel et par POCIS sur les périodes de décembre 2016-mai 2017. [1](Aminot, 2013), [2] (Dufour, 2017), [3] (Belles, 2012). ....	199
Tableau 29 : Corrélation de Pearson entre le rapport de concentration composés/ carbamazépine et les heures cumulés d'ensoleillement. ....	203
Tableau 30 : Matrice de corrélation de Pearson des données recueillies à Fatouville en septembre 2015. ....	207
Tableau 31 : Activités biologiques de l'effluent de la STEU de Rouen avant (t <sub>initial</sub> ) et après 24h d'irradiation solaire (t <sub>24h irradié</sub> ). ....	209
Tableau 32 : Persistance des molécules dans l'effluent de Rouen après 24h d'irradiation simulée. M : médicaments, P/B : pesticides/biocides. ....	211

Tableau 33 : Récapitulatif des paramètres physico-chimiques majeurs lors des incubations Seine et Garonne. LSS : témoin sans bouchon vaseux, MSS : bouchon vaseux, HSS : bouchon vaseux concentré, HSAL : impact salinité, HgCl <sub>2</sub> : témoin abiotique.....	213
Tableau 34 : Récapitulatif des activités biologiques observées lors des expériences d'incubation en présence du bouchon vaseux de la Seine (a) et de la Garonne (b). + : échantillon actif ; - : échantillon inactif. ....	217
Tableau 35 : Temps de demi-vie (jours) et indice de persistance calculés à partir des incubations Seine et Garonne.....	219
Tableau 36 : Liste des molécules probablement présentes (niveau 2 d'identification selon Schymanski et al., 2014a) dans les échantillons d'Oissel (O), Caudebec (C), La Bouille, et de la sortie de la STEU (E). Les échantillons de type POCIS ont été analysés en LC-QTOF (ionisation positive).....	281
Tableau 37 : Temps de demi-vie (h) calculés de certaines molécules artificiellement dopées dans différentes matrices irradiés en laboratoires (Yassine, 2016). (- : non étudié ; n.d. : non déterminée par absence de points expérimentaux). ....	285
Tableau 38 : Récapitulatif des données de HRMS dans la littérature concernant les produits de transformation (PT) de l'ofloxacin. * cette étude, [1] (Calza et al., 2008); [2] (Gros et al., 2014); [3] (Tay et Madehi, 2015); [4] (Carbajo et al., 2015).....	288
Tableau 39 : Récapitulatifs de l'ensemble des photoproduits détectés et identifiés (PT : photoproduits, TR : temps de rétention, d(m/Z) : différence de masse, NI : niveau d'identification, DAB : dabigatran, RIV, rivaroxaban, API : apixaban, * : composé parent).....	296
Tableau 40 : Facteur d'induction SOS suite à une exposition des bactéries à du milieu supplémenté ou non par du S9 et contaminé par des concentrations non cytotoxiques d'extraits organiques. Les résultats représentent la moyenne des facteurs d'induction SOS de 3 répliquats ± écart-type ; * Signifie qu'IF ≥ 1,2 avec un seuil $\alpha < 0.05$ (Test de Student). ....	301
Tableau 41 : Comparaison des équivalents œstrogéniques théoriques (Chem-EEQ) aux équivalents extrapolés à partir du test œstrogénique réalisé sur les extraits organiques des lixiviats (Bio-EEQ). na : non actifs, nd : non calculé car composés non détectés). ....	302
Tableau 42 : Comparaison des équivalents biologiques théoriques (Chem-BEQ) aux équivalents extrapolés à partir du test AhR (4h) réalisé sur les extraits organiques des lixiviats (Bio-BEQ). na : non actifs, nd : non calculé car composés non détectés). ....	303



# Listes des abréviations

<b>ABA</b>	Abacavir	<b>LQP</b>	Limites de quantification de la procédure
<b>AD</b>	Ajouts dosés	<b>m/z</b>	Rapport masse sur charge
<b>AhR</b>	Aryl hydrocarbon receptor	<b>MBA</b>	mass balance analysis
<b>API</b>	Apixaban	<b>MEC</b>	concentrations environnementales mesurées
<b>AR</b>	androgènes	<b>MES</b>	Matière en suspension
<b>B(a)P</b>	Benzo(a)pyrène	<b>MFE</b>	Feature by Molecular Extraction
<b>B(a)P</b>	benzo(a)pyrène	<b>MRM</b>	multiple reaction monitoring
<b>BEFi</b>	Facteur d'équivalence biologique	<b>MS</b>	spectrométrie de masse
<b>BEQ-bio</b>	Equivalents biologiques	<b>MS/MS</b>	spectrométrie de masse en tandem
<b>BEQ-chim</b>	Equivalents chimique	<b>NACO</b>	Nouveaux anticoagulants
<b>Bio-EEQ</b>	Equivalent œstradiol biologique	<b>NQE</b>	Norme de qualité environnementale
<b>BPA</b>	Bisphénol A	<b>NQO</b>	4-nitroquinoline-N-oxide
<b>BPS</b>	Bisphénol S	<b>OFX</b>	Ofloxacin
<b>BV</b>	Bouchon vaseux	<b>ONPG</b>	Orthonitrophényl-β-galactoside
<b>CE20</b>	Concentration efficace 20 %	<b>PdM</b>	Programme de mesures
<b>Chem-EEQ</b>	Equivalent œstradiol chimique	<b>PE</b>	perturbateur endocrinien
<b>DAB</b>	Dabigatran	<b>PEC</b>	concentrations environnementales prédites
<b>DAN</b>	Danofloxacin	<b>PNEC</b>	concentrations prédites sans effet
<b>DCE</b>	Directive cadre sur l'eau	<b>PNPP</b>	P-nitro-phenylphosphate
<b>DEX</b>	Dexaméthasone	<b>PNRPE</b>	Programme national de recherche sur les perturbateurs endocriniens
<b>DHT</b>	Dihydrotestostérone	<b>POCIS</b>	Polar Organic Chemicals Integrative Sampler
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde	<b>PRC</b>	Performance Reference Compound
<b>E1</b>	Œstrone	<b>PT</b>	Produits de transformation
<b>E2</b>	Œstradiol	<b>PXR</b>	pregnan X receptor
<b>ECHA</b>	Agence européenne des produits chimiques	<b>QQQ</b>	spectromètre de masse de type triple quadripôle
<b>EDA</b>	Effect-Directed analysis	<b>QSAR</b>	relation quantitative structure à propriété
<b>EE</b>	Etalonnage externe	<b>Q-TOF</b>	Spectromètre de masse hybride quadripôle/temps de vol
<b>EE2</b>	Ethinylestradiol	<b>REACH</b>	Régulation, Evaluation, et autorisation des produits chimiques
<b>EI</b>	Etalonnage interne	<b>RIVA</b>	Rivaroxaban
<b>E-PRTR</b>	Déclaration annuelle des émissions polluantes et des déchets	<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>ER</b>	œstrogénique	<b>SARA</b>	Sarafloxacin
<b>EROD</b>	éthoxyrésorufin-O-Dééthylase	<b>SBSE</b>	Stir Bar Sorptive Extraction
<b>ESI</b>	electrospray	<b>SDAGE</b>	Schéma directeur d'aménagement de gestion des eaux
<b>ESI</b>	ionisation par electrospray	<b>SDF</b>	Structure data file
<b>Filtres UV</b>	Filtres ultra-violet	<b>SIF</b>	Facteur d'induction SOS
<b>GC</b>	Chromatographie en phase gazeuse	<b>SPE</b>	Solide phase extraction
<b>GR</b>	Glucocorticoïde	<b>SPMD</b>	Semi-Permeable Membrane devices
<b>HAP</b>	Hydrocarbures aromatiques polycycliques	<b>SPME</b>	Micro-extraction sur phase solide
<b>HPLC</b>	Chromatographie en phase liquide haute performance	<b>STEU</b>	Station de traitement des eaux usées
<b>HRMS</b>	Spectrométrie de masse haute résolution	<b>Tcdd</b>	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
<b>ISDND</b>	Installation de stockage des déchets non dangereux	<b>TR</b>	Temps de rétention
<b>Ki</b>	coefficient de réponse	<b>UE</b>	Union européenne
<b>LC</b>	Chromatographie en phase liquide	<b>ZTM</b>	Zone de turbidité maximale
<b>LDI</b>	Limites de détection instrumentales		
<b>LDPE</b>	Low Density PolyEthylene		
<b>LQI</b>	Limites de détection et de quantification instrumentales		





# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**



## Introduction générale

L'eau est une ressource vitale pour la société et plus largement pour le bon fonctionnement de tout écosystème. Cependant, l'eau douce est actuellement limitée tant en quantité qu'en qualité en raison de l'augmentation croissante des pressions associées à l'activité humaine. Ainsi, la préservation de la qualité de l'eau vis-à-vis des contaminations chimiques fait partie des préoccupations sociétales actuelles. Parvenir à un bon état des masses d'eau européennes est l'objectif ambitieux mis en place en 2000 et encadré par la directive cadre sur l'eau (DCE). Ces 15 dernières années, l'application de la DCE et de ses directives filles a permis un effort coordonné afin d'implémenter les connaissances quant à la contamination par grands bassins hydrographiques. Cependant, en dépit des progrès et connaissances acquises, la contamination chimique présente un risque pour près de la moitié des masses d'eau suivies (European Environment Agency, 2012; Malaj et al., 2014). Ce constat est en partie dû au nombre restreint de molécules concernées par la surveillance chimique des masses d'eau (Carere et al., 2012; Brack et al., 2017). En effet, en comparaison des 70 000 molécules utilisées quotidiennement, seulement 45 substances prioritaires / prioritaires dangereuses sont concernées par la surveillance chimique (2013/39/CE), pour des raisons de faisabilité économique ou technique.

Pourtant, le nombre de composés identifiés n'a cessé d'augmenter depuis ces dernières années grâce aux progrès de la chimie analytique et notamment de la spectrométrie de masse (Richardson, 2012; Noguera-oviedo et Aga, 2016). Ces avancées ont permis la mise en évidence de nouvelles molécules dites d'intérêt émergent dont font partie les composés polaires et leurs produits de transformation (Geissen et al., 2015; Mandaric et al., 2015). Même à faibles concentrations, certains de ces composés peuvent engendrer une toxicité et des activités biologiques comme notamment des effets génotoxiques ou encore des perturbations endocriniennes. Ainsi, sous l'impulsion de la stratégie commune d'implémentation (*i.e.* *Common implementation strategy*, CIS) de la DCE, la considération d'un plus grand nombre de composés dans les suivis des masses d'eau est devenu une nécessité (Carere et al., 2012). Cet effort doit être considéré à deux échelles : d'une part au niveau européen afin de définir un cadre légal commun mais également de manière plus spécifique au niveau de chaque bassin versant (Dulio et Slobodnik, 2015; Brack et al., 2017). En effet, à l'échelle d'un bassin versant, d'une rivière ou d'un estuaire, la contamination chimique et le risque associé sont très dépendants de l'occupation du territoire, des caractéristiques hydrologiques du milieu récepteur et de sa dynamique qui conditionnent les apports en contaminants mais aussi leur devenir (Grindlay et al., 2011; Geissen et al., 2015). Plusieurs campagnes prospectives à grandes échelles ont été menées ces dernières années et ont conclu à un manque de données



concernant la présence, la persistance et la toxicité de nombreuses molécules, empêchant d'établir une évaluation du risque fiable (Von der Ohe et al., 2011; Malaj et al., 2014).

Rechercher l'ensemble des molécules présentes dans une matrice dans le cadre de monitoring, est impossible pour des raisons de faisabilité. Ainsi, un des challenges majeurs relatifs à la surveillance et la régulation des contaminations organiques réside dans l'identification des molécules préoccupantes. Pour évaluer le niveau de préoccupation associé aux molécules dans l'environnement, l'approche classique consiste à établir des listes de molécules préoccupantes à partir de données d'occurrence et de toxicité (priorisation; Von der Ohe et al., 2011; Tousova et al., 2017). Cependant ces approches restent limitées aux molécules qui sont déjà connues et référencées. Un bon exemple des limites associées à cette démarche réside dans l'absence de la prise en compte des produits de transformation. En effet, la métabolisation, les processus de traitement de l'eau, mais également les phénomènes de dégradation (photo-oxydation, dégradation microbienne, ... ) dans le milieu récepteur peuvent conduire à la génération de produits de transformation qui sont encore trop peu pris en compte dans l'évaluation du risque (Drewes et Letzel, 2016; Yin et al., 2017). Différentes études ont déjà démontré que ces produits sont susceptibles d'occasionner des effets toxiques plus importants que les molécules mères (Fenner et al., 2013; Cwiertny et al., 2014).

L'identification des molécules responsables des effets biologiques observés dans l'environnement, s'avère donc souvent être une tâche ardue en raison de la grande complexité des matrices environnementales. Les techniques actuelles développées en chimie analytique telle que la spectrométrie de masse haute résolution permettent d'identifier des composés non ciblés et ainsi d'étendre le nombre de molécules criblées (Krauss et al., 2010a; Schymanski et al., 2015). Cependant, ce type d'approche à elle seule est incapable de mettre en évidence les molécules réellement problématiques au sein de mélanges. Dans l'optique de répondre à cet enjeu, des approches bioanalytiques ont été développées et permettent d'établir un lien entre effets biologiques observés et composés chimiques présents (Dévier et al., 2011; Brack et al., 2016).

Dans ce contexte, ces travaux appliquent une méthodologie pluridisciplinaire afin d'identifier des molécules préoccupantes et pertinentes à surveiller. Une grande partie de ces travaux a été focalisée sur l'estuaire de Seine qui reçoit les eaux d'un des bassins versants les plus anthropisés d'Europe. Ainsi, l'apport et le devenir en contaminants polaires (composés pharmaceutiques, pesticides) aux niveaux de l'estuaire de Seine ont tout particulièrement été étudiés. Pour cela, ce travail s'est appuyé sur des analyses ciblées ultra-traces, des outils bioanalytiques, et des analyses non ciblées, réalisées sur des échantillons environnementaux ou issus d'études en laboratoire mimant l'évolution des matrices environnementales.

Un **premier chapitre** dresse un état des lieux non exhaustif sur les enjeux actuels de la surveillance chimique et les développements méthodologiques qui ont été mis en place pour répondre à ces enjeux. Une section de ce chapitre est également consacrée à un état des lieux non exhaustifs des connaissances concernant la présence, le devenir et la priorisation des contaminants dans les eaux de surfaces.

La démarche expérimentale globale appliquée ainsi que les sites d'étude, techniques d'échantillonnage ainsi que les méthodes de caractérisation sont développés dans le **chapitre II**. Les **chapitres III à V** décrivent les principaux résultats obtenus lors de ces travaux sur la base d'une discussion générale et d'articles plus approfondis.

L'objectif majeur du **chapitre III** a été de dresser un état des lieux de l'apport en estuaire de Seine d'une large gamme de contaminants polaires en incluant des médicaments, des pesticides et des filtres UV mais également des molécules biologiquement actives (perturbateurs endocriniens, dioxin-like, génotoxiques). Cet état des lieux est complété par deux publications plus spécifiques. La première publication « *Occurrence of polar pesticides in the Seine estuary (France)* » met en évidence les apports et la présence dans l'estuaire de Seine, de pesticides polaires à usages divers. La deuxième publication « *Pharmaceuticals in the Seine estuary: 13 years of survey (2002-2015)* » offre une rétrospective sur plus de 10 ans de la contamination de l'estuaire de Seine en médicaments grâce à la comparaison de données actuelles à des données antérieures à ces travaux.

Le **chapitre IV** discute la complexité d'évaluer la contamination en phase dissoute au niveau des zones estuariennes qui sont généralement très dynamiques et variables. La variabilité spatiale, et la dynamique temporelle de la contamination au niveau de l'estuaire y sont notamment abordées. Une partie est consacrée à l'utilisation d'échantillonneurs passifs afin de réaliser une évaluation plus intégrée des contaminants en Seine. Enfin, l'utilisation d'expériences en laboratoire pour mimer les processus de photodégradation ou la complexité estuarienne (bouchon vaseux) sont décrites dans le but de mettre en évidence des comportements typiques des contaminants étudiés. En complément de cette synthèse, un premier article annexe est focalisé sur le devenir des médicaments dans les eaux estuariennes de la Garonne qui a été initié antérieurement à ses travaux « *Suspended solids moderate the degradation and sorption of waste water-derived pharmaceuticals in estuarine waters* ». Le second article de ce chapitre, « *Priorization of polar pesticides and pharmaceuticals with taking account into their persistence in dissolved phase: Case of the Seine estuary* », met en avant l'intérêt de prendre en considération la persistance de pesticides et de médicaments en estuaire de Seine par une étude *in vitro*.

**Le chapitre V** se focalise sur l'identification de nouvelles molécules pertinentes et des produits de transformation par des approches en spectrométrie de masse haute résolution, réalisées sur des échantillons environnementaux ou des matrices artificiellement enrichies en composés. Cette partie se finalise par l'utilisation d'une approche bioanalytique pour identifier des molécules préoccupantes au niveau d'une matrice extrêmement complexe : des lixiviats d'installation de stockage de déchets. De manière plus spécifique, la publication 5 «*Photodegradation of novel oral anticoagulants under sunlight irradiation in aqueous matrices*» étudie les cinétiques de dégradation et photoproduits de trois nouveaux anticoagulants. La dernière publication «*Bisphenols as major contributors of estrogenic activity in landfill leachates-Investigations by Effect-Directed Analysis (EDA)*» se focalise sur l'identification des composés œstrogéniques au niveau d'un lixiviat par une approche dirigée par les effets.

Finalement, la dernière partie de ce manuscrit est consacrée à la discussion des principales conclusions et perspectives résultant de ce travail.



# **Synthèse bibliographique**



# Chapitre I : Synthèse bibliographique

## Table des matières

1.	Evolution des enjeux de la surveillance chimique.....	38
1.1	La surveillance de la qualité des eaux .....	38
1.2	Les limites et challenges de la surveillance chimique .....	41
1.2.1	Un monde chimique vaste.....	41
1.2.2	Les contaminants d'intérêt émergent et biologiquement actifs.....	42
1.2.3	Les produits de transformation : un nouvel enjeu .....	47
2.	Vers l'utilisation de méthodes de plus en plus intégratives.....	48
2.1	L'évolution des analyses chimiques .....	49
2.1.1	Evolution des analyseurs .....	49
2.1.2	Séparation et ionisation des contaminants.....	54
2.2	Les outils bioanalytiques .....	55
2.2.1	Biodétection et « mass balance analysis».....	56
2.2.2	Analyse dirigée par les effets .....	59
2.3	Prise en compte des produits de transformation .....	61
2.4	Stratégie d'échantillonnage : à la base des analyses intégratives .....	63
3.	Présence, devenir et priorisation des contaminants dans les eaux de surfaces.....	67
3.1	Des contaminants d'intérêt émergent dans les eaux de surface.....	67
3.2	L'effort d'identifier et prioriser les molécules pertinentes .....	69
3.3	Devenir des contaminants d'intérêt émergent dans les milieux aquatiques .....	71
	Objectifs des travaux.....	75

# 1. Evolution des enjeux de la surveillance chimique

## 1.1 La surveillance de la qualité des eaux

La directive cadre sur l'eau (2000/60/CE), représente le plus important cadre législatif européen dans l'évaluation de la qualité des eaux. Initialement, l'objectif principal de la DCE était d'assurer un bon état écologique et chimique des masses d'eau grâce à la mise en œuvre de plans de gestion au niveau de grands bassins hydrographiques. La mise en œuvre de la DCE comprend ainsi trois cycles de 6 ans (2010-2015, 2016-2021, 2022-2027) (Figure 1). Chaque cycle se déroule suivant le même processus : un premier état des lieux des masses d'eau permettant de définir les objectifs de chaque bassin définis par le schéma directeur d'aménagement de gestion des eaux (SDAGE). Les SDAGE sont également complétés par un programme de mesures (PdM) qui identifie les principales actions à conduire pour atteindre ces objectifs (Figure 1).

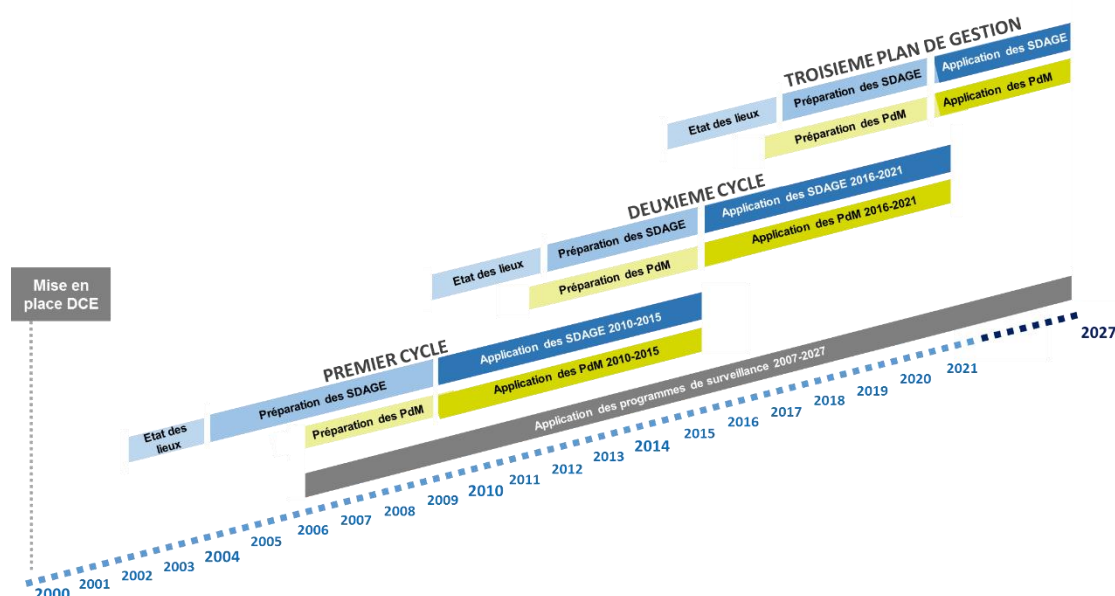


Figure 1 : Historique et calendrier prévisionnel de la DCE.

Le bon état d'une masse d'eau reflète deux paramètres :

- Le **bon état écologique** prend en compte notamment les effets observés au niveau des populations et des communautés. Il est défini à partir de paramètres biologiques et physico-chimiques.
- Le **bon état chimique** prend en compte le non dépassement d'une liste de polluants dits prioritaires par rapport à une norme de qualité environnementale (NQE) relative à des concentrations seuils à ne pas dépasser. Les NQE sont établies en tenant compte des effets sur les organismes aquatiques benthiques et pélagiques, mais également des effets indirects sur les prédateurs et la santé humaine. Elles sont calculées à partir de

concentrations prédites sans effet (PNEC) obtenues sur la base d'essais écotoxicologiques aigus et chroniques

Les NQE de 33 substances prioritaires ont été établies par la directive 2008/105/UE, puis implémentées pour 12 nouvelles substances prioritaires dans la directive 2013/39/UE. En 2015, une liste de vigilance (« Watch list ») de 10 molécules considérées comme pertinentes à surveiller a été établie par une décision d'exécution (2015/495). En définitive, ces NQE portent soit sur la concentration moyenne annuelle (NQE-MA) soit sur une concentration maximale (NQE-CMA) à ne pas dépasser. Actuellement, 45 molécules sont concernées par cette législation et visent à répondre à 2 objectifs : suppression des rejets pour les substances dangereuses prioritaires ou réduction des rejets pour les substances prioritaires. La mise en œuvre de cette directive impose trois niveaux de contrôle : (1) les contrôles de surveillance qui permettent d'établir l'état général des masses d'eau ; (2) les contrôles opérationnels destinés à évaluer l'état des masses d'eau identifiées comme problématiques pour l'atteinte des objectifs fixés par la DCE ; et (3) les contrôles d'enquête voués à identifier les causes d'une mauvaise qualité des eaux ou bien d'évaluer l'ampleur et l'incidence d'une pollution accidentelle.

Afin de limiter les usages et restreindre l'utilisation des molécules les plus préoccupantes, différentes directives se sont peu à peu mises en place à plusieurs niveaux (Figure 2). Ainsi les réglementations visant à préserver le milieu, sont soutenues par des réglementations au niveau des sources et de la mise sur le marché et l'usage comme notamment REACH (Régulation, Evaluation, et autorisation des produits chimiques), les directives « Biocides », « Phytosanitaires » ou encore réglementant les médicaments à usages humains et vétérinaires. Enfin, différentes mesures permettent de contrôler les rejets ou vecteurs de contamination ; c'est le cas des directives réglementant les émissions industrielles, la collecte, le transport et le traitement des eaux usées ou encore l'enregistrement de la déclaration des rejets (E-PTR). L'ensemble de ces réglementations viennent ainsi compléter les suivis et les réglementations relatives au milieu récepteur. A ce jour, des directives filles, complémentaires à la DCE ont été adoptés (Figure 2) afin de préserver des milieux spécifiques comme les eaux souterraines (2006/118/CE) ou encore les milieux marins (DCSMM, 2008/56/CE).



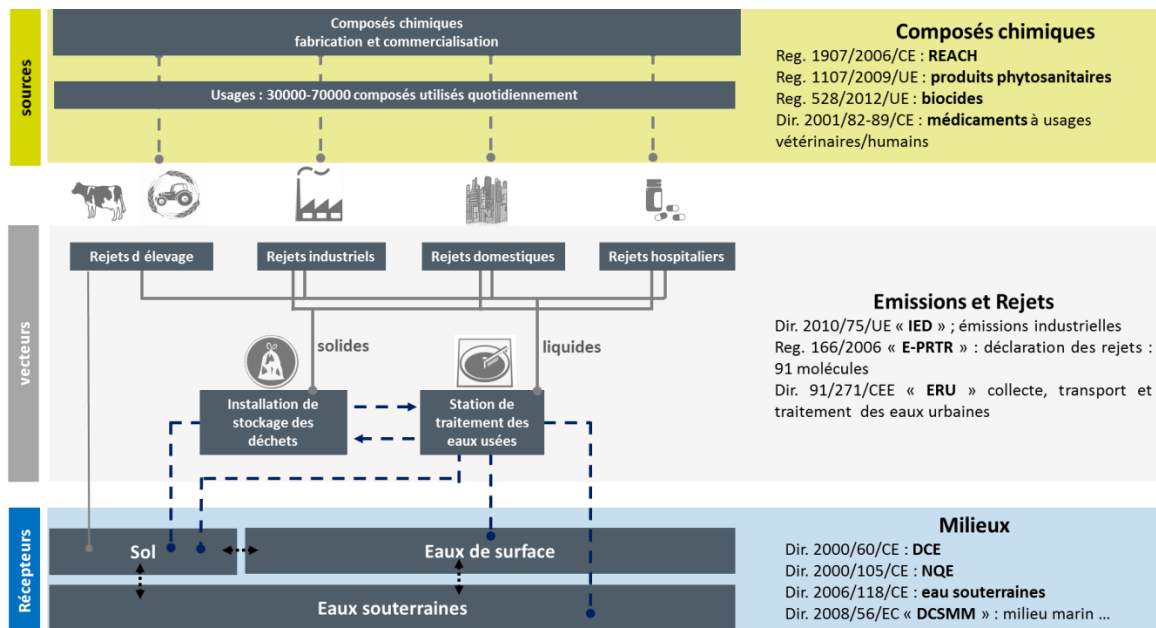


Figure 2 : Une réglementation intégrée à plusieurs niveaux.

A l'heure actuelle, l'évaluation du risque environnemental s'exerce à plusieurs niveaux mais sur un nombre limité de molécules. Le schéma classique d'évaluation du risque est présenté Figure 3. Traditionnellement, le risque environnemental engendré par une molécule est évalué en rassemblant des données d'exposition qui permettent l'estimation de concentrations environnementales prédites ou mesurées (PEC ou MEC), et des données de toxicité qui amènent aux concentrations prédites sans effet (PNEC) via des essais écotoxicologiques ou des modélisations *in silico* (QSAR : relation quantitative structure à propriété). Une fois ces données obtenues, le rapport PEC ou MEC/PNEC permet de calculer un risque. Le risque est avéré si ce rapport est supérieur 1.

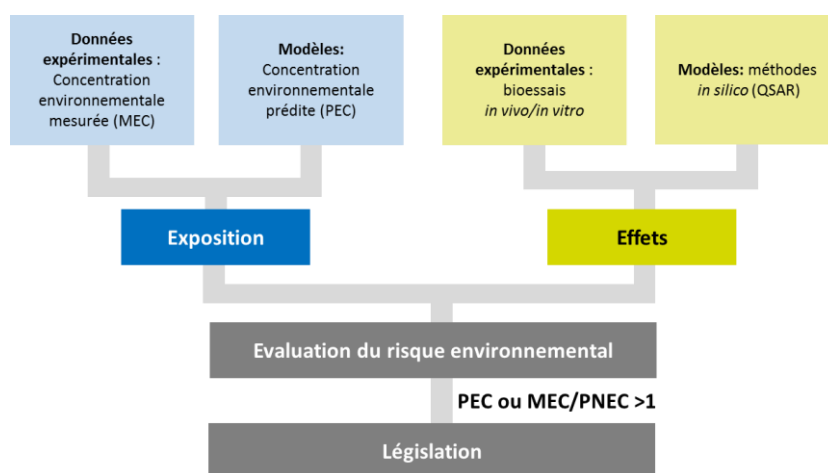


Figure 3 : Procédure d'évaluation du risque environnemental des composés chimiques (Guillén et al., 2012).

La France est divisée en 6 bassins hydrographiques : Artois-Picardie, Seine-Normandie, Rhin-Meuse, Loire-Bretagne, Adour-Garonne, Rhône-Méditerranée-Corse. La comparaison des états écologiques et chimiques des masses d'eau laissent entrevoir la première limite du cadre réglementaire actuel. Les bassins versants classés en bon état chimique ne sont pas systématiquement dans un bon état écologique. Malgré les démarches mises en place au niveau européen, plus de la moitié des masses d'eau surveillées sont concernées par un risque chimique non négligeable (European Environment Agency, 2012; Malaj et al., 2014; Tsakiris, 2015). En effet, Malaj et son équipe ont évalué le risque chimique aigu et chronique au niveau des 91 bassins hydrographiques européens (Figure 4) sur la base de 223 molécules. Un risque chimique chronique élevé a notamment été mis en évidence au niveau des bassins versants du nord-ouest de l'Europe comme la Loire, la Seine, du Rhin. Le risque chimique est, de plus, sous-évalué car il se base notamment sur l'évaluation individuelle d'un nombre limité de molécules.

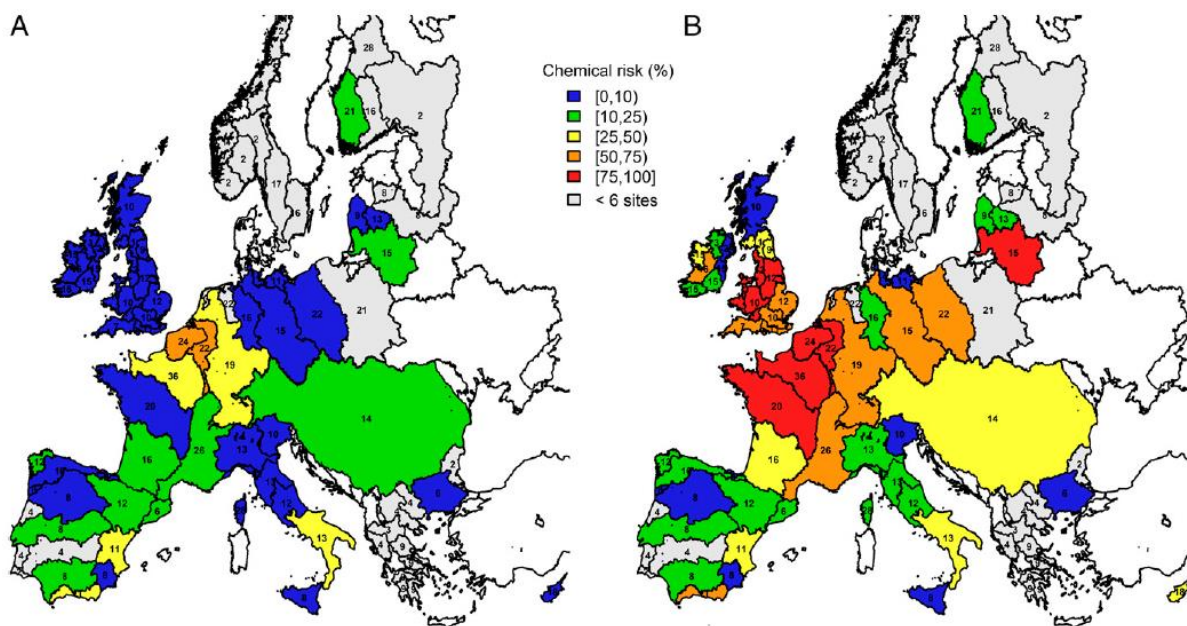


Figure 4 : Mise en évidence du risque de contamination chimique aigu (A) et chronique (B) Le code couleur représente le niveau de risque : d'un faible niveau de risque (bleu) à très élevée (rouge)(Malaj et al., 2014).

## 1.2 Les limites et challenges de la surveillance chimique

### 1.2.1 Un monde chimique vaste

Les progrès de la chimie analytique ont montré que les molécules recherchées et réglementées ne représentent qu'une infime partie de celles qui sont réellement présentes dans l'environnement. En effet, des études ont déjà permis de mettre en évidence la présence de milliers de molécules dans les eaux de surfaces (Schymanski et al., 2015).

Le monde chimique est vaste et regroupe à la fois des molécules naturelles, synthétiques (fabriquées par l'Homme) et artificielles (inventées par l'Homme). En juillet 2017, le nombre de substances (organiques et inorganiques) indexées par l'agence américaine des composés chimiques (American Chemical Society) s'élève à plus de 230 millions. Près de 30 000 à 70 000 molécules sont utilisées quotidiennement dans une large gamme de produits (Loos et al., 2015). Des données statistiques publiées en 2016 par Eurostat révèlent que plus 40 % des composés produits en Europe (Europe-28 membres) sont considérés comme dangereux pour les écosystèmes aquatiques. Ces données ont peu fluctué depuis 2004 : Environ 134-155 millions de tonnes de composés sont produits chaque année en Union Européenne (Eurostat, 2016).

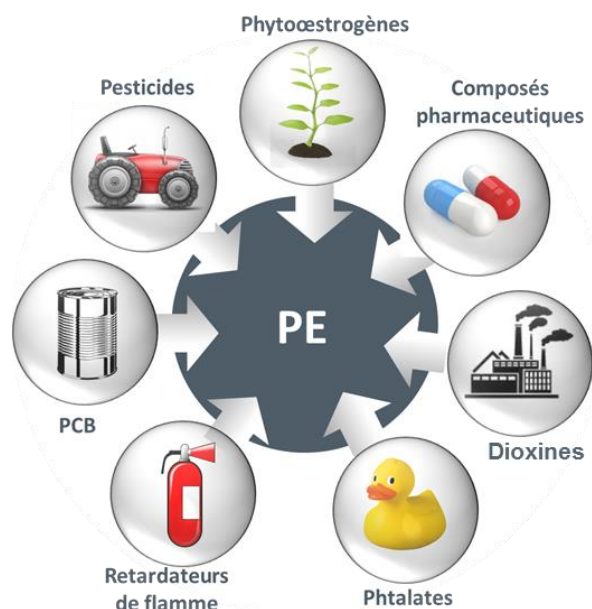
## **1.2.2 Les contaminants d'intérêt émergent et biologiquement actifs**

### **a. Généralités**

On distingue actuellement des contaminants dits historiques et des contaminants dits à intérêts émergents (Namiesnik et al., 2014). Le réseau NORMAN (i.e. Norman Network) définit les composés émergents comme « toute substance ayant été détectée dans l'environnement, non incluse dans le suivi de routine au niveau européen, et dont le devenir et/ou le comportement ne sont pas encore étudiés ou compris ». Ainsi ce réseau recense 1036 molécules suspectes et d'intérêt émergent. Une classification claire de ces composés est encore à l'heure actuelle difficile à établir car l'univers des contaminants dits émergents inclut différentes classes chimiques, différents types d'usage, types d'effets, types de sources, types de voies d'exposition. Ils sont actuellement déclinés en une vingtaine de classes en fonction de leur origine. Depuis 2005, le réseau NORMAN a initié une mission de priorisation à l'échelle européenne afin d'obtenir des informations sur la contamination des masses d'eau mais également d'harmoniser les méthodes d'analyses utilisées.

A ce jour, un des effets les plus préoccupants dus à la présence des contaminants d'intérêt émergent est la perturbation endocrinienne. Le concept de contaminants d'intérêt émergent est intimement lié au concept de perturbateurs endocriniens. La définition même d'un perturbateur endocrinien est encore à l'heure actuelle très controversée au niveau européen. Cependant, la définition la plus employée est celle de l'OMS (2002) : "Un perturbateur endocrinien potentiel est une substance ou un mélange exogène, possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de (sous)-populations". De nombreuses études recensent des cas de féminisation, de baisse de la fertilité, ou des cas d'hermaphrodisation d'organismes aquatiques (Mills et Chichester, 2005; Adeogun et al., 2016). Ces dernières années, le nombre de molécules suspectées d'engendrer une perturbation endocrinienne n'a cessé de croître et

a conduit à l'établissement par l'Union européenne d'une liste de molécules suspectes (European Parliament, 2016; Trasande et al., 2017). Ainsi une grande partie des molécules d'intérêt émergent sont actuellement suspectées d'être des perturbateurs endocriniens et sont résumées sous forme de classes non exhaustives, dans la Figure 5.



**Figure 5 : Exemples non exhaustifs de grandes familles chimiques de perturbateurs endocriniens.**

**b. Identification des vecteurs principaux de contamination**

Les principales sources en contaminants ont d'ores et déjà étaient identifiées. Ainsi, en fonction des contaminants recherchés et de leurs usages dans la société actuelle, les contaminants dits émergents proviennent des eaux usées domestiques, industrielles, hospitalières mais également des déchets solides, des rejets plus diffus associés à l'agriculture ou les activités récréatives (Tableau 1).

**Tableau 1 : Sources majeures de contaminants à intérêts émergents** (Mandarić et al., 2015; Stewart et al., 2016; Montes-grajales et al., 2017).

Classes	Eaux usées	Eaux de pluies	Lixiviat de décharge	Agriculture	Aquaculture	Activités récréatives
Pharmaceutiques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Plastifiants	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
Filtres UV	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Hormones stéroïdiennes	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Pesticides / Biocides	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

Les déchets ont été définis dans la directive 2008/98/CE, comme «toute substance ou tout objet dont le détenteur se défait ou dont il a l'intention ou l'obligation de se défaire». En

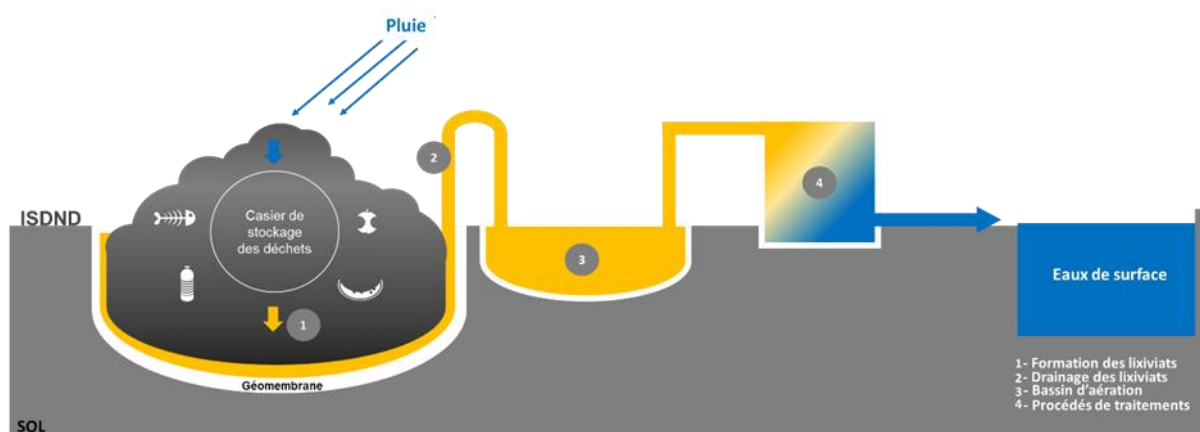
fonction de leurs types origines, les déchets sont classés à différents niveaux de dangerosité. On discerne ainsi les :

- Les déchets dangereux qui possèdent une ou plusieurs propriétés dangereuses : inflammable, cancérigène, corrosif ;
- les déchets non dangereux, non inertes, qui rassemblent les déchets recyclables et les déchets organiques et proviennent des ménages et des entreprises ;
- les déchets non dangereux inertes qui ne sont pas dangereux et non évolutifs.

Dans l'Union Européenne, le traitement des déchets est encore disparate. Malgré le développement concomitant du recyclage, du compostage ou de la méthanisation, la mise en décharge concerne encore environ 30 % des déchets ménagers et assimilés (Eurostat). Par conséquent, les installations de stockage des déchets non dangereux (ISDND) reçoivent une grande diversité de produits de consommation et donc des dizaines de milliers de contaminants organiques (Brack, 2003).

Au sein des ISDND, les déchets sont stockés dans des casiers ou alvéoles. La percolation de l'eau au travers des massifs de déchets est à l'origine de la formation d'un effluent très complexe, chargé chimiquement et bactériologiquement, nommée lixiviat. La formation des lixiviats fait intervenir des processus physico-chimiques et biologiques complexes et variés. De plus, la compréhension de ces réactions nécessite d'être à la fois renseigné sur la nature initiale des déchets, le mode d'exploitation de la décharge et les interactions entre l'eau et les déchets. Ainsi le processus de formation et la composition des lixiviats sont dépendants de multiples facteurs (Renou et al., 2008).

Afin de limiter les risques de contamination des sols et des eaux souterraines, les installations de stockage modernes sont équipées de couches de matières plastiques imperméables nommées géomembranes. De plus, les lixiviats sont récoltés puis traités par des usines de traitement des eaux sur site ou hors site. En dépit de ces dispositifs, une contamination de l'environnement ne peut être écartée. En effet, ces effluents bruts peuvent potentiellement engendrer une contamination du milieu naturel, et en particulier des eaux souterraines, en cas de rupture des géomembranes ou de transfert diffusif à travers ces dernières (Mery et al., 2014). D'autre part, une contamination des eaux de surface est également possible si les procédés de traitement des lixiviats mis en œuvre avant rejet dans le milieu naturel ne sont pas totalement efficaces vis-à-vis des polluants présents dans les lixiviats. Une contamination des eaux naturelles par des lixiviats peut sérieusement affecter la reproduction des organismes exposés (Noaksson et al., 2003).



**Figure 6 : Représentation schématique de la formation et du traitement des lixiviats issus des ISDND.**

De nombreuses études ont déjà rapporté la présence d'une grande diversité de contaminants organiques (Ramakrishnan et al., 2014). Parmi les contaminants les plus cités, on retrouve des contaminants émergents comme les composés perfluorés (Busch et al., 2010), certains composés pharmaceutiques (Clarke et al., 2015), des insecticides (Ramakrishnan et al., 2014), des produits de soins corporels (Eggen et al., 2010) à des concentrations allant du  $\text{ng.L}^{-1}$  au  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Par ailleurs, d'autres études ont mis en évidence le potentiel œstrogénique des lixiviats de décharge (Behnisch et al., 2001; Coors et al., 2003; Gong et al., 2014). Bien qu'ils représentent une source non négligeable en perturbateurs endocriniens, les lixiviats sont encore peu étudiés en comparaison aux stations de traitement des eaux usées. Une étude récente a été réalisée afin d'évaluer la présence de 202 contaminants d'intérêts émergents dans des lixiviats provenant de 19 installations de stockage de déchets américaines : 129 ont été détectés avec des concentrations allant de 1 à 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour les composés d'origine ménagère, de 0,1 à 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour les composés pharmaceutiques et de 1 à 100  $\text{ng.L}^{-1}$  pour les hormones stéroïdiennes (Masoner et al., 2014).

En considérant le nombre de molécules présentes dans le commerce, il a été estimé qu'entre 80 000 à 100 000 molécules sont présentes dans les eaux usées (Drewes et Letzel, 2016). Les stations de traitement des eaux usées (STEU) n'ont pas été initialement conçues pour éliminer les contaminants organiques. Ainsi, elles sont à l'heure actuelle, considérées comme le principal vecteur de contamination vers les eaux de surfaces. La DCE et l'enregistrement E-PRTR CE/166/2006 (Registre européen des rejets et transfert de polluants ; i.e. *European pollutant release and transfer register*) visent à surveiller et réduire les rejets des composés les plus problématiques. Ce registre inclus ainsi la surveillance de 91 molécules incluant, par exemple, des métaux (cadmium) des solvants organiques (dichlorométhane), de composés halogénés, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (naphtalène, anthracène) mais également quelques pesticides (diuron, atrazine, isoproturon).

La composition et les niveaux de contamination des effluents d'entrée de STEU sont directement liés aux usages des composés. Ainsi, des variations journalières (antibiotiques), hebdomadaires (drogues) et saisonnières (filtres UV) de certains contaminants émergents ont déjà été mises en évidence (Petrie et al., 2014). Une grande variété de traitements chimiques et biologiques est utilisée actuellement. En France, un projet a fortement contribué aux connaissances actuelles sur le devenir des contaminants dans les processus de traitement : le projet AMPERES. Près de 125 molécules (prioritaires et d'intérêt émergent) ont été recherchées dans divers processus de traitement (primaire, secondaire et tertiaire) provenant de 29 STEU (Tableau 2). Les traitements conventionnels (primaire et secondaire) permettent d'éliminer une grande partie des micropolluants. Cependant, près de 27 molécules sur les 125 ont présenté un rendement d'abattement inférieur à 30 % dans les filières secondaires conventionnelles (boues activées). En effet, ces molécules faiblement hydrophobes ne présentent qu'une faible affinité pour les boues et ne sont que très peu éliminées par les traitements primaires et secondaires comme le traitement par boues activées (Choubert et al., 2012). En raison de leur forte solubilité, les molécules les plus réfractaires sont généralement les composés polaires à semi-polaires (pesticides, pharmaceutiques)

**Tableau 2 : Rendements d'élimination de procédés de traitement tertiaire** (Choubert et al., 2012)

Familles	Composés	Lagunage de finition	Décantation rapide	Filtration sur sable	Osmose inverse	Ozonation	Filtration sur charbon actif	
Pesticides	glyphosate, AMPA	■	■	■	■	■	■	
	atrazine, simazine	■	■	■	■	■	■	
	diuron, isoproturon	■	■	■	■	■	■	
Phtalates	DEHP	■	■	■	■	■	■	
Additifs	benzothiazoles	■	■	■	■	■	■	
Hormones	œstrone, éthynylestradiol	■	■	■	■	■	■	
Pharmaceutiques	bisoprolol aténolol, sotalol, diclofénac, paracétamol	■	■	■	■	■	■	
	timolol, nadolol	■	■	■	■	■	■	
	propranolol	■	■	■	■	■	■	
	carbamazépine, diazépam, nordiazépam, alprazolam, acébutolol	■	■	■	■	■	■	
	métoprolol, roxythromycine	■	■	■	■	■	■	
	kétoprofène, salbutamol	■	■	■	■	■	■	
	aspirine	■	■	■	■	■	■	
	sulfaméthoxazole, bromazépam	■	■	■	■	■	■	
			■	■	■	■	■	■
			■	■	■	■	■	■

■ Rendement non calculable	■ 30 % < Rendement < 70 %
■ Rendement <30 %	■ Rendement > 70 %

AMPA: acide aminométhylphosphonique

DEHP: Di(2-ethylhexyl) phtalate

Alors que les traitements tertiaires d'affinage (lagunage, décantation, filtration) sont peu efficaces (Tableau 2), l'utilisation de traitements tertiaires avancés (osmose inverse, ozonation, filtration sur charbon actif) permet d'atteindre des abattements de 70 % (Choubert et al., 2011, 2012). De part de leur abattement partiel, une large gamme de contaminants

polaires est retrouvée au niveau des effluents de STEU qui représentent ainsi le vecteur majoritaire de contamination vers les eaux de surface (Petrie et al., 2014).

### 1.2.3 Les produits de transformation : un nouvel enjeu

Très peu de molécules organiques sont inertes. Ainsi par des processus biotiques et/ou abiotiques les composés organiques vont subir des transformations. La résultante est dans certains cas la formation de produits de transformation. Il existe deux grandes catégories de produits de transformations (PT) : (1) les PT biotiques issus de processus de transformation par les humains, les animaux, les plantes ou bactéries ; (2) les PT abiotiques issus de processus d'hydrolyse, de réactions photocatalytiques ou de processus de photodégradation (Bletsou et al., 2015). L'ensemble de ces produits peut être généré dans l'environnement mais également lors de processus de stockage ou encore de traitement des eaux (Figure 7).

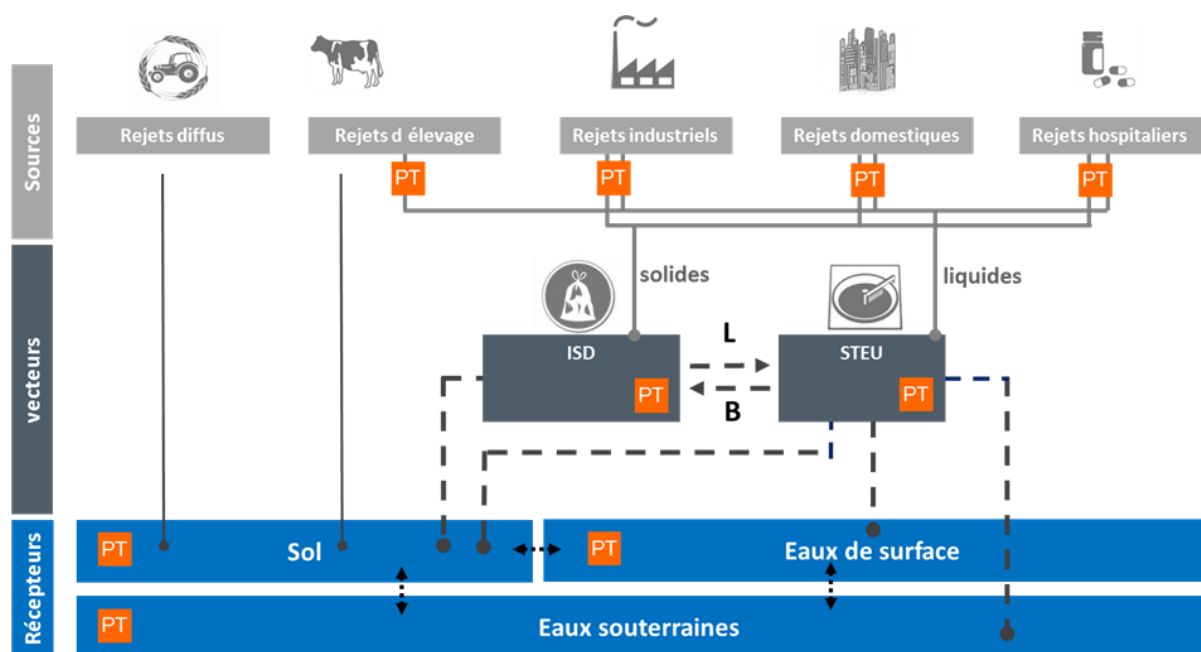


Figure 7 : Sources et vecteurs des contaminants émergents et de leurs produits de transformation (PT) dans l'environnement. (Lapworth et al., 2012).

Actuellement, la prise en compte des produits de transformation dans l'évaluation du risque environnemental n'est que très peu réalisée. Pourtant, certaines études ont déjà démontré que certains produits de transformations peuvent être plus toxiques et plus persistants que la molécule initiale (Sinclair and Boxall, 2009; Escher et Fenner, 2011). A titre d'exemple, le potentiel toxique du diuron et de ses produits de transformation a déjà été évalué individuellement et en mélange par Escher et al., 2009. Bien que les produits de transformation sont individuellement moins toxiques que le diuron, leur non prise en compte engendre une sous-estimation de 70 % dans l'évaluation du risque environnemental (Escher et Fenner, 2011).



Une équipe de recherche a mis en évidence une augmentation du retard de développement de truite arc-en-ciel exposés après des traitements d'ozonation (Stalter et al., 2010). Les hormones stéroïdiennes (progestatifs, œstrogènes, glucocorticoïdes, androgènes) possèdent un squelette chimique commun. De ce fait, une modification mineure des groupements fonctionnels peut conduire à la formation d'un composé capable de se fixer sur différents récepteurs (Cwiertny et al., 2014). La biodégradation aérobie de la progestérone conduit à la formation de PT qui sont actifs sur le récepteur de la progestérone mais également sur les récepteurs des androgènes et des œstrogènes (Sangster et al., 2016; Ojogoro et al., 2017).

**Bilan :**

- **La surveillance chimique se base actuellement sur une liste restreinte de molécules et l'évaluation du risque est réalisée en prenant en considération des molécules individuelles.**
- **Pourtant des milliers de molécules sont utilisés quotidiennement et peuvent être introduites dans l'environnement. De plus, à différents niveaux, les contaminants peuvent être dégradés et générer des produits de transformation. Les effluents de STEU, les lixiviats d'ISDND représentent des vecteurs importants de contaminants émergents dans l'environnement.**
- **L'ensemble de ces molécules mères et produits de transformation se retrouvent en mélange et peuvent présenter des effets additifs ou synergiques.**
- **Face à ces constats, il est devenu indispensable de considérer ces molécules dans leur globalité en (1) identifiant des produits de transformation (2) identifiant les molécules réellement actives en mélange (3) en prenant compte les effets mélange de ces composés à des concentrations ultra-traces.**

## **2. Vers l'utilisation de méthodes de plus en plus intégratives**

La surveillance chimique est en pleine évolution et doit répondre à différents enjeux afin d'évaluer le risque environnemental. L'identification et la quantification de contaminants dans les masses d'eau est complexe et doit répondre à différentes problématiques:

- Présence d'une multitude de composés avec des structures et propriétés chimiques très différentes ( $\log K_{ow}$ ,  $pK_a$ ...).
- Présence de molécules actives / toxiques parfois à l'état de traces voire ultra-traces.
- Difficulté pour identifier les molécules actives au sein des matrices environnementales.
- Présence de molécules mères inconnues, peu ou pas de prise en compte des produits de transformation.

Pour répondre à ces enjeux, la chimie analytique et les méthodes bioanalytiques ont connu un réel essor depuis les années 2000 (Richardson, 2012; Noguera-oviedo and Aga, 2016). Les efforts produits par la communauté scientifique se sont focalisés sur différents points clés qui conditionnent toute interprétation de la contamination. Ainsi cette section dresse un état des lieux non exhaustif des méthodologies mises en œuvre afin d'améliorer la surveillance chimique des masses d'eau.

## **2.1 L'évolution des analyses chimiques**

La quantification des contaminants à des niveaux ultra-traces, l'identification de nouvelles molécules et de produits transformation représentent des enjeux majeurs de la chimie analytique actuelle. Ainsi le nombre de molécules identifiées et suivies dans l'environnement n'a cessé d'augmenter des dernières années (Janssen et Roose, 2011). Ce constat est le résultat de l'évolution des outils et des méthodes analytiques qui ont été développés (Perez-Fernandez et al., 2017).

### **2.1.1 Evolution des analyseurs**

La spectrométrie de masse permet de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur masse et de fragments spécifiques et ainsi de caractériser leur structure chimique. Les ions ainsi formés sont séparés selon leur rapport masse ( $m$ ) sur charge ( $z$ ) avant d'arriver à un détecteur qui compte et amplifie le signal émis par les ions. Ce signal est alors traité informatiquement afin d'obtenir un spectre de masse des ions détectés où le rapport  $m/z$  correspond aux abscisses et l'abondance relative de ces ions aux ordonnées.

Il existe à l'heure actuelle une grande diversité de systèmes d'analyse qui diffèrent principalement par la technique d'ionisation et le type d'analyseur employés. Les analyseurs les plus fréquemment utilisés sont les quadripôles, les trappes ioniques ou encore les analyseurs à temps de vol. Les performances des spectromètres de masse sont évaluées au travers, de leur vitesse d'acquisition (*exprimée en Hz*), de leur gamme dynamique de réponse (*exprimée en décade*), de leur sensibilité (*exprimée en concentration massique ou molaire*), de leur résolution (sans unité) et de leur précision sur la mesure des rapports  $m/z$  (*exprimée en ppm*) (Tableau 3). La résolution est définie comme l'aptitude à séparer des ions de masses très proches. L'utilisation d'un spectromètre de masse haute résolution permet de mesurer la masse d'un ion de manière suffisamment précise pour déterminer sa formule brute. Ainsi, le couplage d'analyseur très résolutif (Temps de vol) avec des analyseurs spécifiques (quadripôle) permet (1) d'obtenir la masse exacte d'une molécule et (2) de fragmenter ce composé afin d'obtenir des informations spécifiques quant à sa structure (spectres de fragmentation) (Petrovic et al., 2010).

**Tableau 3 : Comparaison de différents spectromètres de masse** (Krauss et al., 2010b; Holcapek et al., 2012).

	Vitesse d'acquisition (Hz)	Résolution (FWHM) [ $\times 10^3$ ]	Précision en masse (ppm)	Gamme dynamique	Sensibilité (masse absolue)
Quadripôle (Q)	2-10	3-5	faible	$10^5$ - $10^6$	fg-pg
Piège ionique quadripolaire (IT)	2-10	4-20	faible	$10^4$ - $10^5$	fg-pg
Temps de vol (TOF)	10-50	10-20	1-5	$10^4$ - $10^5$	fg-pg
Orbitrap	1-5	100-240	1-3	$5 \times 10^3$	fg-pg
Résonnance cyclonique d'ion (ICR)	0,5-2	750-2500	0,3-1	$10^4$	pg

### c. Approche quantitative

**L'analyse ciblée** a pour but de détecter et quantifier des composés connus (étalon analytique disponible) et présélectionnés dans une matrice donnée. Cette approche se base sur des développements et optimisations analytiques à partir d'étalons analytiques. Ce type d'analyse fait généralement appel à deux modes d'acquisition : la spectrométrie de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS). La MS/MS se distingue de la MS par une étape supplémentaire de fragmentation des ions sélectionnés (ions précurseurs). En effet, la spectrométrie de masse simple (MS) identifie un composé par sa masse et son temps de rétention obtenu par chromatographie (en phase liquide ou gazeuse).

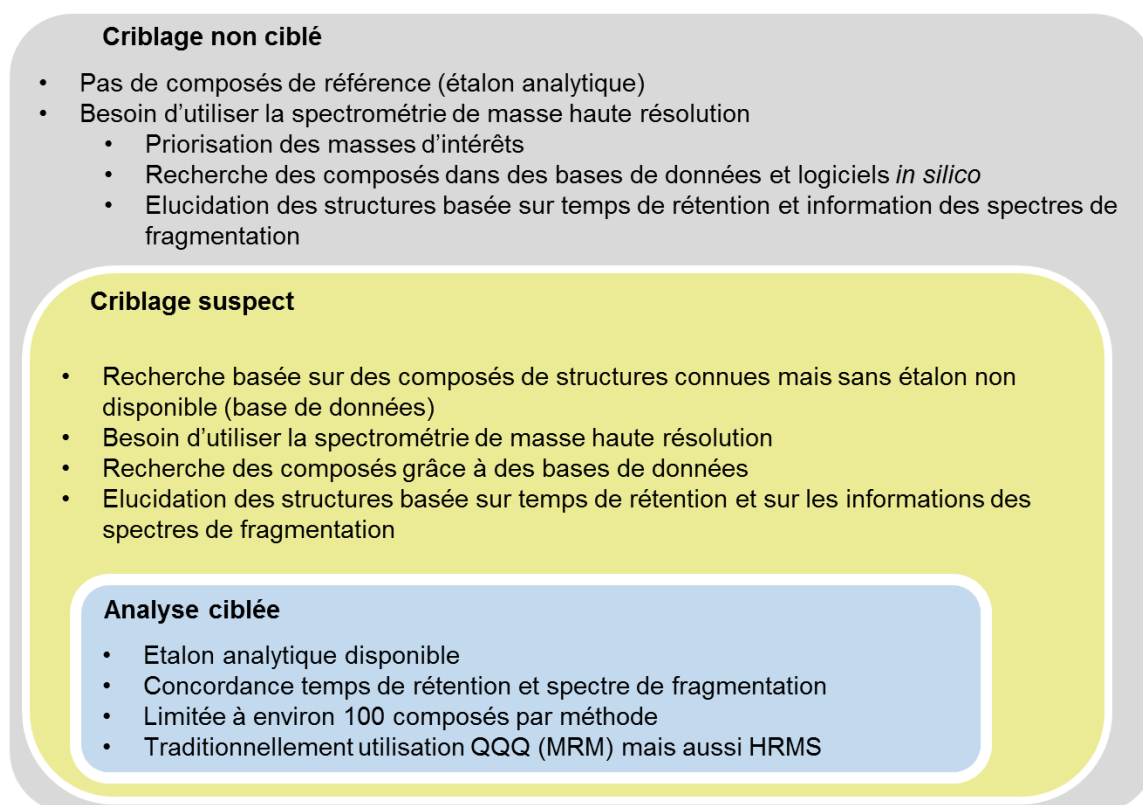
La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) en couplage avec une séparation chromatographique permet d'ajouter un niveau de contrôle supplémentaire. Ainsi, pour la recherche d'une liste finie de molécules, l'utilisation de spectromètre de masse de type triple quadripôle (QQQ) s'est largement imposée ces dernières années (Petrovic et al., 2010). Le premier quadripôle filtre les ions parents des analytes d'intérêt qui vont être fragmenté en ion fils au niveau du deuxième analyseur quadripolaire (chambre de collision). Le dernier quadripôle filtre par la masse de l'ion fragment. Ce mode de détection également appelé MRM (i.e. multiple reaction monitoring), constitue une référence dans l'analyse ciblée car il permet d'atteindre une bonne sensibilité ( $\text{ng.L}^{-1}$ ) avec une spécificité assurée par une ou plusieurs transitions de masse entre ions précurseurs et fragments.

Ces méthodes ont largement été développées et appliquées à différentes classes de contaminants émergents (Dévier et al., 2013; Robles-molina et al., 2014; Le Coadou et al., 2016) comme les médicaments (Panditi et Batchu, 2013; Aminot et al., 2015; Briudes et al., 2016), les drogues illicites (Baker et Kasprzyk-hordern, 2011), les pesticides (Campos-manas et al., 2017), divers perturbateurs endocriniens (Gorga et al., 2013), mais également certains de leurs produits de transformation (Petrovic et Barcelo, 2007; Noguera-oviedo et Aga, 2016). Bien qu'elles soient considérées comme les plus sensibles, ces méthodes sont limitées à un

nombre restreint de composés (50-150 par méthode analytique) (Agüera et al., 2013). Une méthode alternative est d'utiliser la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) (Moschet et al., 2014). Une étude prometteuse utilisant une méthode multi-résidue en HRMS a été développée sur des extraits SPE (solid phase extraction, OASIS HLB®) pour cribler la présence de 430 composés prioritaires et émergents provenant de classes chimiques très différentes (médicaments, drogues, pesticides, retardateurs de flammes, plastifiants). Sur l'ensemble des molécules recherchées, 44 % ont des limites de quantification comprises en 1-10 ng.L<sup>-1</sup> (Robles-molina et al., 2014).

#### d. Approches qualitatives : criblage

Il existe actuellement trois grandes procédures de criblage utilisant la HRMS (Figure 8). Les contaminants peuvent être identifiés par des méthodes analytiques ciblées en utilisant des étalons analytiques et des listes de molécules. Cependant ces méthodes requièrent des étapes de présélection et de priorisation. A l'inverse, des méthodes de criblage non ciblé permettent d'identifier la présence d'une molécule alors qu'elle n'était pas préalablement ciblée, recherchée, ou priorisée (Figure 8).

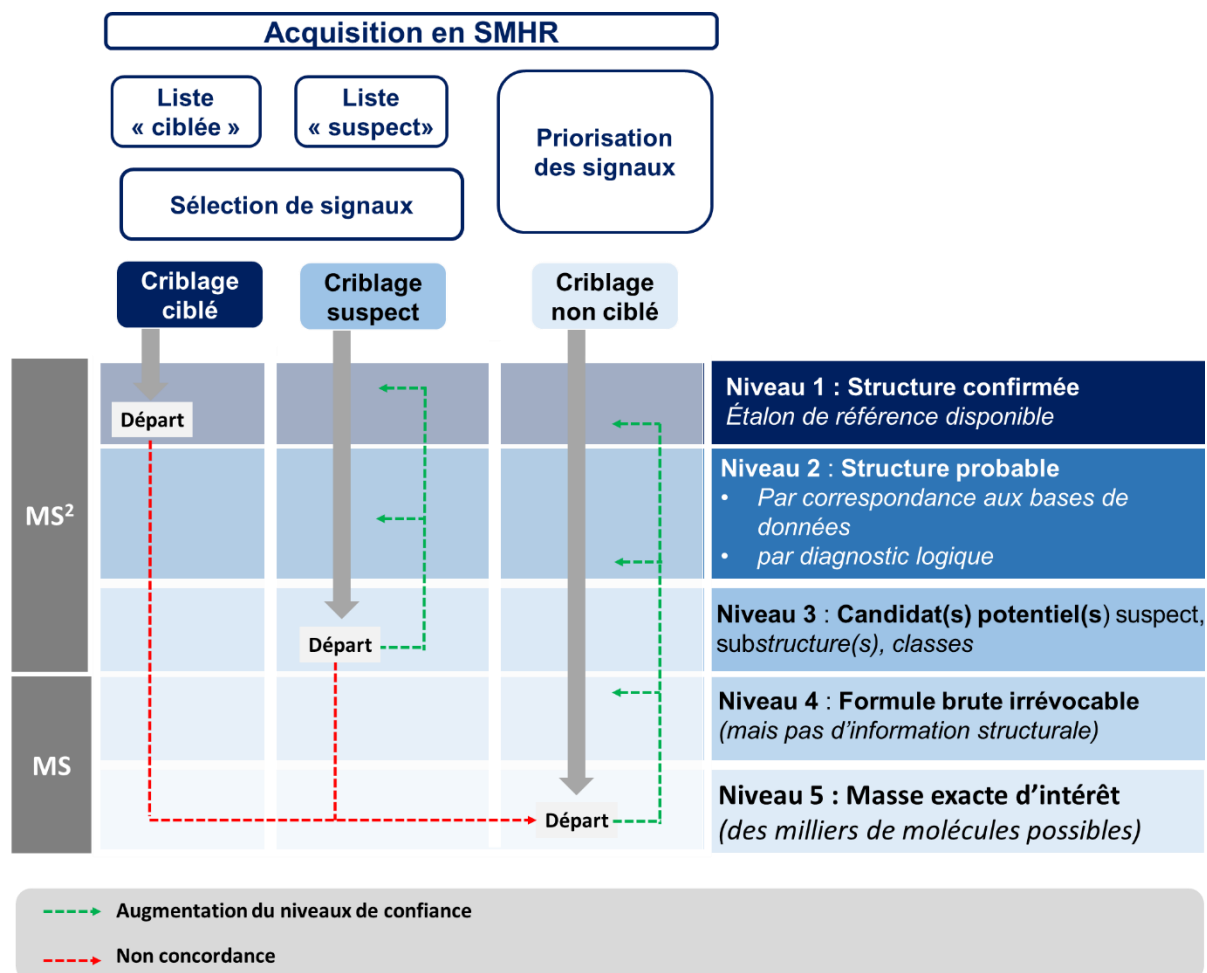


**Figure 8 : De l'analyse ciblée au criblage non-ciblé** (Schymanski et al., 2014a; Togola et al., 2015; Acena et al., 2016).

De manière qualitative, l'utilisation de méthodes de criblage permet d'englober à la fois des molécules connues mais également inconnues. Effectivement en théorie, la HRMS permet

de déterminer simultanément la présence de tous les composés présents dans un échantillon (Krauss et al., 2010b). Dans le cadre d'un criblage suspect, l'absence d'étalon analytique est compensée par une identification des molécules grâce à des bases de données spectrales. Ainsi, la présence d'un composé est confirmée sur la base du temps de rétention, la masse exacte, le massif isotopique mais également par le spectre de fragmentation.

La démarche d'identification est plus ou moins longue en fonction du type de criblage réalisé (ciblé, suspect, non ciblé). Cinq degrés de confiance accordés à l'identification ont notamment été mis en place dans le cadre du projet NORMAN (Schymanski et al., 2015). Par définition, les criblages ciblés, suspects et non ciblés débutent respectivement à un niveau 1 (composés étalon), niveau 3 (candidat potentiel) et niveau 5 (pas d'information) d'identification (Figure 9). A l'inverse, si une absence de concordance entre le composé inconnu et l'étalon analytique (ciblé) / candidat potentiel (suspect) est observée, le composé devient un composé inconnu d'intérêt (niveau 5).



**Figure 9 : L'approche d'identification des molécules et niveaux de confiance** (Schymanski et al., 2015).

Au final, différentes études utilisant des méthodes de criblage suspect et non ciblé ont été réalisées ; quelques exemples récents sont présentés Tableau 4. Les eaux usées, les effluents de STEU et les eaux de surface ont été caractérisés par des criblages qui permettent de suspecter la présence de plus de 2000 molécules incluant des médicaments, des pesticides, des drogues mais également de nombreux produits de transformation. L'emploi d'analyses non ciblées est également recensé dans de récentes études se focalisant sur les eaux usées, les effluents de STEU, les eaux de surface et les lixiviats d'installation de stockage (Tableau 4).

Cependant, l'identification structurale n'est pas toujours faisable et fortement dépendante de l'évolution des techniques de sélection des signaux d'intérêt, de l'implémentation des bases de données, du développement des outils de fragmentation *in silico* et de la disponibilité des étalons analytiques. En raison de la forte complexité des matrices environnementales, la sélection des signaux d'intérêt pour l'identification est une étape clé. Différentes méthodes de sélection et de déconvolution, ont été mises en place : analyses statistiques, diagramme de Venn (Müller et al., 2011; Schollée et al., 2015; Bade et al., 2016) ; cependant ces méthodes restent encore longues et difficiles à mettre en œuvre. Par ailleurs, l'élucidation des structures reste encore à l'heure actuelle, une étape laborieuse malgré le développement d'outils de fragmentation *in silico* tel que Metfrag (Ruttkies et al., 2016) ou encore d'outils de prédiction des temps de rétention chromatographique (Gago-Ferrero et al., 2016)

**Tableau 4 : Exemples récents d'application de criblage suspect et non ciblés.** [1] (Ibanez et al., 2008) ; [2] (Deeb et al., 2017) ; [3] (Gago-Ferrero et al., 2016) ; [4] (Wode et al., 2014) ; [5] (Hug et al., 2014) ; [6] (Schymanski et al., 2014b) ; [7] (Kern et al., 2009) ; [8] (Bueno-Martínez et al., 2012) ; [10] (Müller et al., 2011) ; [11] (Masiá et al., 2014).

Matrice	Méthode	Nombre de suspect / méthode de priorisation des signaux	Tentative de structure	Composés confirmés	Ref.
<b>Criblage suspect</b>					
Eaux usées	UHPLC-ESI-QTOF	± 500	9	0	[1]
Eaux usées	UHPLC-ESI-QTOF	245	189	0	[2]
Eaux usées	UHPLC-ESI-QTOF	284	14	0	[3]
Eaux usées	UHPLC-ESI-LTQ-Orbitrap	2188	160	55	[4]
Effluent STEU	HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap	2031	13	6	[5]
Effluent STEU	HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap	394	69	0	[6]
Eaux de surface	HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap	1846	19	12	[7]
Eaux de surface	UHPLC-ESI-QTOF	1200	5	0	[8]
Eaux de surface	UHPLC-ESI-QTOF	2369	44	3	[9]
<b>Criblage non ciblé</b>					
Lixiviât d'ISD	HPLC-ESI-QTOF	Diagramme de Venn	21	12	[10]
Eaux usées	HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap	Intensité des pics	7	1	[5]
Effluent STEU	HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap	-	4	5	[4]
Eau de surface	UHPLC-ESI-QTOF	Analyses en composante principale	1	0	[11]

## 2.1.2 Séparation et ionisation des contaminants

L'exhaustivité de la HRMS n'est pas totale et reste fortement dépendante des techniques (1) de préparation-extraction, (2) de séparation et (3) d'ionisation des échantillons.

### a. Préparation des échantillons

Les méthodes conventionnelles d'extraction (hors ligne) sur cartouches sont encore les plus utilisées en raison de leur flexibilité et de leur simplicité d'application. Les procédures d'extraction pour les analyses ciblées dépendent de l'analyte et de la matrice considérée. Bien que de nouvelles phases aient été développées, les extractions sur phase solide de type OASIS® HLB restent les plus fréquentes (Richardson et Kimura, 2016). Dans le cas des analyses non ciblées, le plus grand nombre de composés doit être pris en considération. Les injections directes d'échantillons peuvent représenter une solution intéressante à condition que la sensibilité de l'analyseur soit assez élevée (Gago-Ferrero et al., 2016). Dans la plupart des cas, une méthode d'extraction et pré-concentration est souvent nécessaire. Des méthodes combinant plusieurs phases adsorbantes ont également été appliquées. Ainsi l'utilisation de cartouches multicouches de phase adsorbante aux propriétés différentes (Oasis HLB, Involute ENV+, Strata X-AW, Strata X-CW) a permis la mise en évidence de 139 molécules en criblage ciblé, 262 molécules en criblage suspect et 13820 en criblage non ciblé, dans des effluents de STEU (Schymanski et al., 2014). Des approches récentes se focalisent également sur le développement de méthodes automatisées qui sont directement couplées à la chaîne analytique comme c'est le cas par exemple de la SPE (solid phase extraction) ou, de la SPME (solid phase micro-extraction) en ligne (Guillén et al., 2012).

### b. Séparation et ionisation des échantillons

Les analyses par chromatographie couplées à la spectrométrie de masse se sont imposées dans le cadre de la surveillance chimique des eaux en permettant l'analyse à des niveaux ultra-traces d'une grande diversité de composés organiques (Dévier et al., 2011).

La Figure 10 recense les domaines d'application de quelques contaminants emblématiques. L'utilisation la chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide va être conditionnée en majorité par l'hydrophobie et la volatilité des contaminants recherchés. La chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à la spectrométrie de masse a fortement contribué à l'analyse de composés apolaires et volatils. En raison des propriétés chimiques des contaminants émergents, son utilisation est moins répandue qu'avant. Les méthodes de séparation par chromatographie en phase liquide (LC) sont plus adaptées aux composés polaires comme les stéroïdes, les médicaments, les pesticides (Brack et al., 2016), mais également les produits de dégradation qui sont généralement plus polaires que les molécules

parents (Picó et Barceló, 2015). Par ailleurs, ces méthodes sont également à opposer en termes de méthodes d'ionisation : la GC est souvent associée à une ionisation des molécules par impact électronique qui permet d'obtenir des spectres riches en informations et reproductibles. En effet, les bases de données telles que la « NIST and Wiley Library » recensent des centaines de milliers de spectres de fragmentation. A l'inverse, la CL est typiquement associée à des méthodes d'ionisation plus douces telle que l'electrospray (ESI) ou encore l'ionisation à pression atmosphérique (APCI). L'implémentation des bases de données spectrales est nettement plus limitée que celles dédiées à l'impact électronique. Ceci s'explique par deux raisons : premièrement, les spectres de fragmentation sont très variables en fonction des conditions expérimentales d'acquisition et deuxièmement les méthodes d'acquisition elles même sont plus récentes que celles utilisant l'impact électronique (Brack et al., 2016).

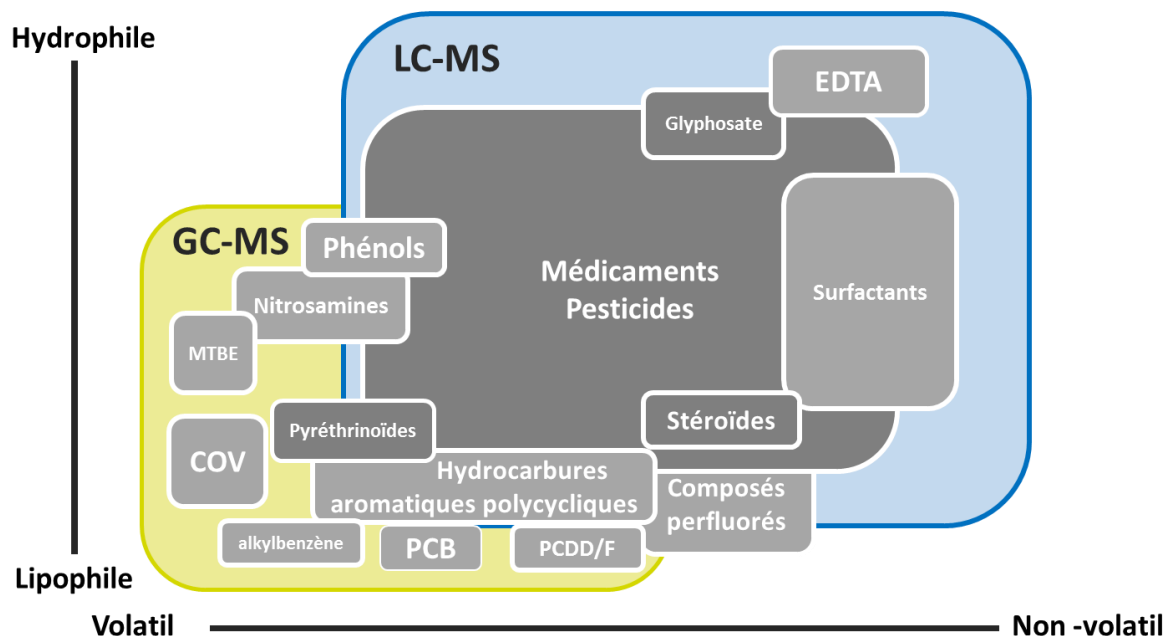


Figure 10 : Domaines d'application de la chromatographie en phase gazeuse (GC) et de la chromatographie en phase liquide (CL) (Brack et al., 2016).

## 2.2 Les outils bioanalytiques

Les analyses chimiques représentent des méthodes qualitatives ou/et quantitatives pour évaluer la présence d'une molécule individuelle. Cependant, elles ne permettent pas de prendre en compte la présence de composés inconnus comme les produits de transformation ou encore les composés non ciblés par les techniques classiques. Par ailleurs, elles ne permettent pas de prendre en considération de potentielles interactions entre les composés pouvant engendrer des effets mélanges de type additif ou synergique. Afin de pallier ces différentes limites, des méthodes intégratives permettant d'établir un lien entre effet biologique



et composés chimiques ont été développées. Ces approches qui couplent les domaines de la biologie avec de la chimie analytique, sont qualifiés d'outils bioanalytiques.

### 2.2.1 Biodétection et « mass balance analysis »

Les outils bioanalytiques sont basés sur l'utilisation de bioessais *in vitro* ou *in vivo* permettant de mesurer une réponse biologique précoce et/ou spécifique d'un mode d'action particulier. Ces outils permettent ainsi de détecter l'activité ou la toxicité qui est engendrée par un mélange en prenant en compte l'ensemble des composés présents dans un échantillon.

Les biotests sont par exemple réalisés sur des cellules isolées à partir d'un organe (cultures primaires) ou d'une tumeur immortalisée (lignées cellulaires permanentes). L'utilisation de bioessais *in vitro* n'a cessé d'augmenter en raison de leur facilité d'utilisation, leur sensibilité, mais également du fait de la diversité des effets étudiés. De plus, les possibilités d'automatisation de ces techniques de biodétection, en font des outils de choix pour un monitoring des masses d'eau. Sans être imposées par la directive cadre sur l'eau, ces méthodes sont fortement suggérées par le groupe de travail « surveillance chimique et contaminants émergents » dans le cadre la stratégie commune d'implémentation de la DCE (récital 18, 2013/39/EU) (Carere et al., 2012; Wernersson et al., 2015).

Il existe à l'heure actuelle des bioessais non-spécifiques qui permettent d'évaluer des paramètres globaux comme la cytotoxicité, la croissance et la viabilité cellulaire et des bioessais visant à mettre en évidence des toxicités dites réactives comme la génotoxicité. Enfin, des bioessais dits spécifiques permettent de mettre en évidence la présence de molécules impliquées dans l'activation de certains métabolismes ou encore d'interagir avec certains récepteurs spécifiques (Tableau 5).

**Tableau 5 : Exemples des différents bioessais en fonction de différents niveaux de mécanismes d'action** (Poulsen et al., 2011).

Mode d'action	Exemples
Non spécifiques	cytotoxicité, viabilité cellulaire, croissance
Réactives	génotoxicité, système de réparation SOS, espèces réactives de l'oxygène
Spécifiques	perturbations endocriniennes par fixation à un récepteur, activité dioxin-like, inhibition d'enzymes spécifiques

Les tests faisant appel à des récepteurs spécifiques permettent en définitive de mettre en évidence la présence de composés ou groupe de composées ayant le même mécanisme d'action (Van Der Osst et al., 2017b). La mesure peut être ainsi qualifiée de biodétection, et

ne représente pas l'effet réel sur un organisme exposé. Devant l'intérêt croissant de la mise en évidence de perturbateurs endocriniens, les bioessais basés sur les récepteurs nucléaires se sont grandement développés (Balaguer et al., 2001). La superfamille des récepteurs nucléaires participe à la régulation de nombreux gènes impliqués par exemple dans la différenciation sexuée, la prolifération et différenciation cellulaire, l'homéostasie et le métabolisme. Les xénobiotiques peuvent activer différentes catégories de récepteurs, qu'il est possible de regrouper en deux types : les récepteurs endogènes et notamment hormonaux (aux œstrogènes, aux androgènes, aux glucocorticoïdes), et les récepteurs aux xénobiotiques tels que les récepteurs AhR (aryl hydrocarbure) ou PXR (pregnenolone X receptor).

Actuellement, les bioessais *in vitro* basés sur l'expression de gènes naturels ou rapporteurs sont les plus utilisés pour la détection de molécules actives dans des extraits environnementaux. L'un des grands intérêts de ces outils ciblant un mécanisme d'action est qu'ils permettent de donner une valeur quantitative de l'effet précoce mesuré. Ainsi la présence de molécules capables d'interagir avec le récepteur étudié va induire l'activation d'un gène rapporteur. L'intensité de la réponse est considérée comme proportionnelle à la concentration de molécules actives. L'activité biologique engendrée par un échantillon complexe peut être comparée à celle induite par un composé de référence à une concentration connue (facteur d'équivalent toxique).

Pour une évaluation pertinente de la présence de molécules actives comme les perturbateurs endocriniens, l'utilisation d'une batterie de bioessais *in vitro* a déjà démontré sa pertinence. Ce profilage multi-récepteurs permet notamment de hiérarchiser des sites par profil de contamination (Creusot et al., 2013b; Leusch et al., 2013; Jia et al., 2016). Une démonstration conséquente de profilage a été réalisée par Escher et son équipe en 2014. Dans cette étude, 103 tests *in vitro* (spécifiques, non spécifiques, réactifs) ont été utilisés afin de caractériser 10 eaux australiennes (effluent de STEU, eau pluviales, eaux de surface). Soixante-cinq bioessais ont été positifs au moins une fois, démontrant ainsi l'intérêt de réaliser des batteries de bioessais pour caractériser la qualité des eaux (Escher et al., 2014). L'intérêt d'utiliser une batterie de bioessais a également été démontré dans le cadre d'une étude prospective française en 2012. Cette méthode a notamment permis de hiérarchiser les niveaux et les profils contamination d'un grand nombre de sites (Aït-Aïssa et al., 2014). Par ailleurs, des stratégies récentes visent à établir à partir des bioessais *in vitro* des seuils de non dangers (i.e. effect base trigger) (Jarošová et al., 2014; Kunz et al., 2015; Van Der Osst et al., 2017b).

Bien qu'ils donnent une image intégrée de la présence de molécules actives, les bioessais *in vitro* ne peuvent pas remplacer les informations données par les analyses chimiques. En effet, utiliser seuls, ils sont incapables d'identifier les molécules qui sont actives.

L'approche « mass balance » ou équilibre des masses (MBA) combine des analyses chimiques ciblées aux outils de biodétection afin de tenter, au moins en partie, d'expliquer la réponse biologique observée par des contaminants connus (Figure 11). Pour cela, une comparaison des équivalents biologiques (BEQ-bio) déterminés par les tests *in vitro* aux équivalents biologiques déterminés par les analyses chimiques (BEQ-chim) est réalisée (Figure 11).

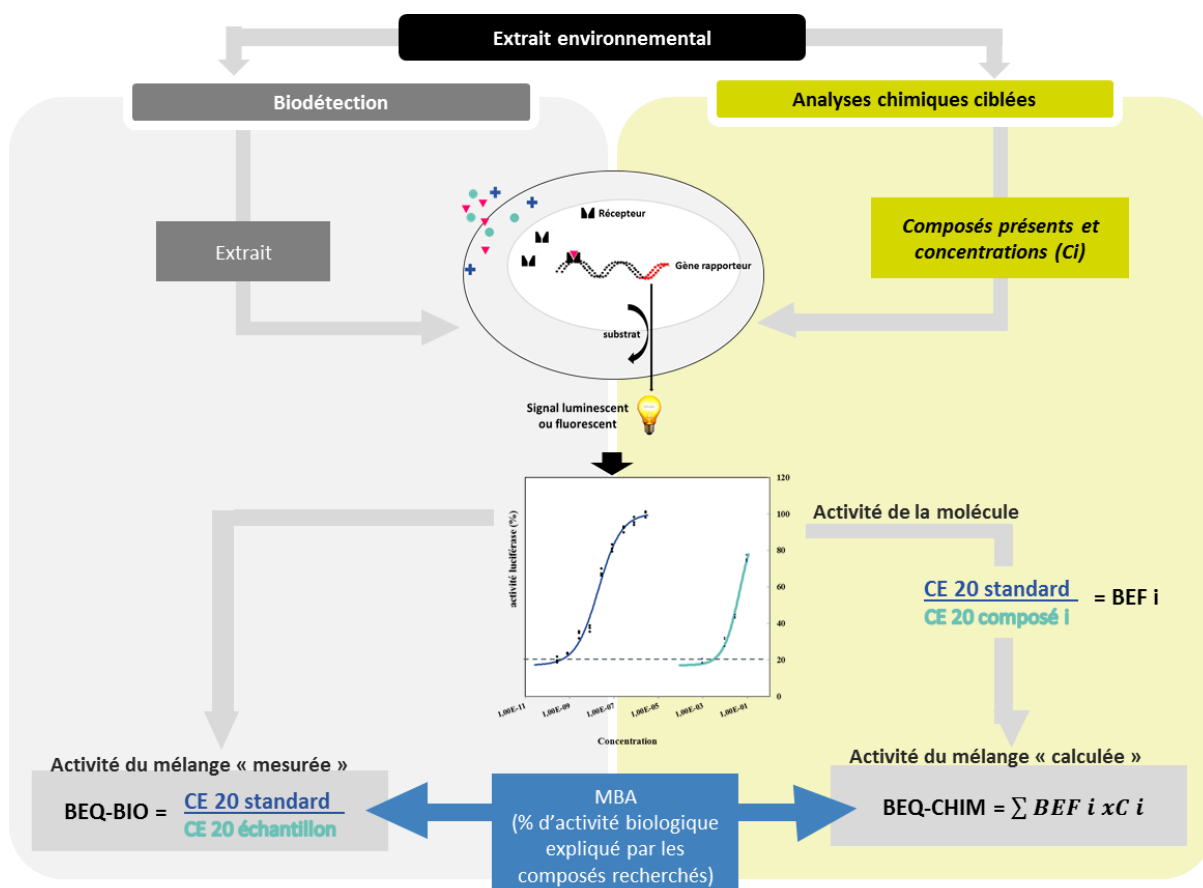


Figure 11 : Principe de la « mass balance analysis » (MBA) d'après Ait-aissa (2009) et Creusot (2011).

Cependant, les molécules ciblées ne permettent pas toujours d'expliquer la totalité des effets biologiques observés. En effet, une récente étude a utilisé l'approche MBA pour évaluer la présence de perturbateurs endocriniens aux niveaux de 4 rivières européennes. Globalement, les analyses chimiques ciblant des molécules connues pour être des ligands avérés des récepteurs hormonaux, n'expliquent que de 0 à 77 % de l'activité œstrogénique, 1,5 % de l'activité androgénique et entre 2,2 et 28 % de l'activité glucocorticoïde (Tousova et al., 2017). De nombreuses études tendent à faire le même constat dans différentes matrices et notamment dans les eaux de surface et les effluents de STEU (Cargouët et al., 2004; Bellet et al., 2012; Creusot et al., 2014; Köning et al., 2017; Neale et al., 2017). Ce constat souligne

le besoin d'identifier les molécules actives sans pré-sélection d'une liste finie de molécules dans les échantillons environnementaux.

## 2.2.2 Analyse dirigée par les effets

L'identification des molécules responsables des effets biologiques observés dans un échantillon, s'avère souvent être une tâche ardue en raison de la grande complexité des matrices environnementales. Dans cette optique, il est crucial de réduire la complexité des matrices environnementales et de limiter le nombre de molécules suspectes. Dans l'optique de répondre à cet enjeu, l'approche dirigée par les effets, dite EDA (i.e. Effect-Directed Analysis) a été développée dans les années 80 (Brack, 2003).

Cette approche qui combine des étapes de fractionnement, des biotests et des méthodes de chimie analytique performantes, a pour objectif ultime d'établir le lien entre effets biologiques observés et composés chimiques présents (Figure 12). Ainsi, elle permet de réduire la complexité d'un échantillon en isolant des groupes de composés par fraction. Seules les fractions ayant une activité biologique sont analysées par des analyses chimiques ciblées et non ciblées dans le but d'identifier les composés responsables des activités observées.

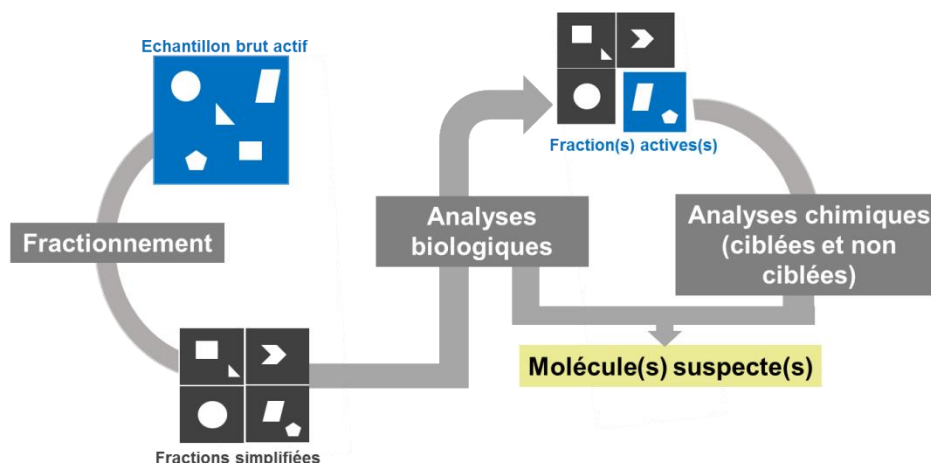


Figure 12 : Principe de l'analyse dirigée par les effets (Brack, 2003)

Cette approche fait partie des outils prometteurs pour identifier les molécules actives et toxiques dans les mélanges complexes. En quelques années, l'utilisation et le développement des approches EDA ont connu un intérêt grandissant. En 2011, un premier ouvrage consacré à cette approche dresse un premier état de l'art des différentes étapes de la démarche (Brack, 2011). De 2011 à 2015, le programme EDA-EMERGE a rassemblé 14 laboratoires provenant de 8 pays européens dans le but de développer les différentes étapes de l'EDA (extraction, fractionnement, bioessais, identification) et d'appliquer la démarche au niveau européen (Brack et al., 2013). En 2016, un état de l'art complet est remis à jour et contextualise le

positionnement de l'approche EDA en outil de suivi environnemental des masses d'eau. (Brack et al., 2016).

La réussite de cette approche est directement liée au développement des méthodes d'échantillonnage, d'identification par spectrométrie de masse et des bioessais *in vitro* qui ont été précédemment discutés. Le fractionnement est un des points clés de cette approche. Ainsi, différents points sont indispensables à la réussite de cette étape: (1) permettre une sélection/discrimination des molécules actives (2) engendrer le moins de pertes de composés possibles, (3) ne pas apporter de contaminations parasites susceptibles d'entraîner des effets biologiques artefactuels (Brack, 2011). L'extraction de l'échantillon est considérée comme une première étape de fractionnement. Effectivement, elle permet d'éliminer certains éléments (acides humiques, pigments, lipides) qui pourraient interférer avec les bioessais et les analyses chimiques. Les méthodes de séparation sont encore une fois très diversifiées et sont généralement basées sur les principes d'adsorption, de partition, d'échange ionique (Brack et al., 2016). Ce type d'approche a été appliqué avec succès à différentes matrices comme les sédiments, les sols d'installation de stockage, au niveau des eaux de surface douces et estuariennes, et également au niveau du biote.

**Tableau 6 : Quelques exemples d'application de l'approche de type EDA.** [1] (Creusot et al., 2013a); [2] (Legler et al., 2011) ; [3] (Lei et Aoyama, 2010a) ; [4] (Regueiro et al., 2013) [5] (Creusot et al., 2014) ; [6] (Schulze et al., 2010) ; [7] (Booij et al., 2014) ; [8] (Liscio et al., 2014) ; [9] (Simon et al., 2013).

<i>Matrice</i>	<i>Type de fractionnement</i>	<i>Cibles biologiques</i>	<i>Analyses chimiques</i>	<i>Molécules identifiées actives</i>	<i>Ref.</i>
Sédiment	RP-HPLC	ER, hPXR, AhR	GC-MS	D-iso-octyl-phtalate, 2,4-di-tert-butylphenol	[1]
Sol de décharge	RP-HPLC	bioessai embryotoxicité (Zebrafish)	GC-MS	Retene, 2-phenylquinoline, n-ethyl-toluene	[2]
lixiviat de décharge	RP-HPLC	Microtox	GC-MS	Bisphenol A	[3]
Sédiment	NP-HPLC	cytotocité (MTT), activité EROD	GC-MS	Anti-inflammatoires, pesticides, HAP	[4]
Eau de surface	RP-HPLC	ER, AR/GR, PR, MR, PXR, AhR	LC-MS/MS	Composés pharmaceutiques, Stéroïdes	[5]
Eau dopée et irradiée artificiellement	RP-HPLC	Inhibition de la photosynthèse	GC-MS	2-[(2-chlorophényl)-amino]benzaldéhyde (Produit transformation diclofénac)	[6]
Eau estuarienne	RP-HPLC	Inhibition de la photosynthèse	LC-QTOF	Pesticides, N,N-diéthyl-3-méthyl-benzamide, tris(2-chloroéthyl)phosphate	[7]
Eau de rivière	RP-HPLC	YAS	GC-MS et LC-QTOF	Composés pharmaceutiques et pesticides	[8]
Plasma d'ours polaire	-	TR	LC-QTOF	Nonylphénol, PCB, OH-PCB	[9]

**Fractionnement** en phase inverse (RP) ou phase normale (NP) par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC),

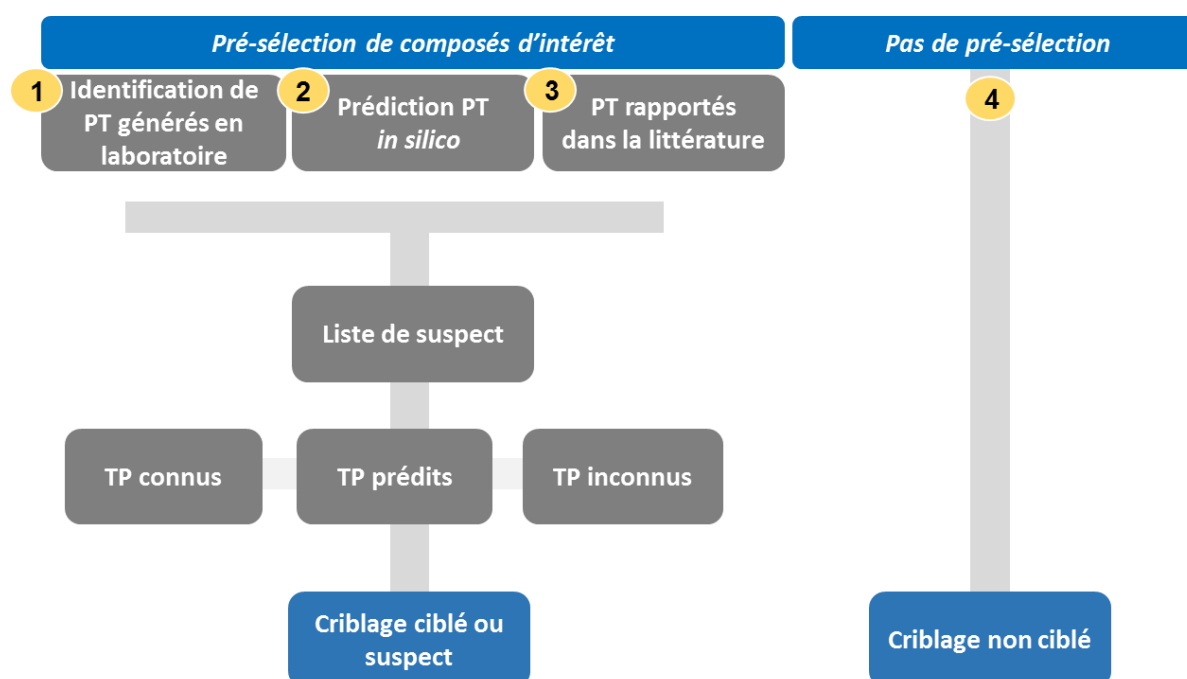
**Tests biologiques** : AhR : récepteur aryl hydrocarbène, AR : récepteur aux androgènes, ER : récepteurs aux œstrogènes, GR : récepteur aux glucocorticoïdes, MR : récepteur aux minéralocorticoïdes, MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium, PR : récepteur aux progestérones, PXR : récepteur X des prégnanes, YAS : « yeast androgen screen ».

**Analyses chimiques** : GC: chromatographie en phase gazeuse, LC : chromatographie en phase liquide, MS : spectrométrie de masse, MS/MS : spectrométrie de masse en tandem, Q : quadripôle, TOF : temps de vol.

## 2.3 Prise en compte des produits de transformation

La recherche des produits de transformation pertinents représente un véritable enjeu et son développement a été permis grâce à l'essor de la spectrométrie de masse haute résolution (Zonja et al., 2014).

Quatre grandes stratégies peuvent être mises en évidence. Trois des méthodologies appliquées nécessitent une pré-sélection d'un ou des composés mères d'intérêt dans une matrice donnée. (Figure 13) : (1) simuler en laboratoire des conditions mimant des processus de dégradation (expérience en batch, photodégradation, dégradation en STEU) afin d'identifier les PT majoritaires ; (2) prédire *in silico* les produits générés (3) rechercher par des méthodes de criblage suspect des produits de transformation déjà recensés dans la littérature. Sans sélection préliminaire, il est possible d'étudier directement des matrices environnementales et des effluents de STEU (Picó et Barceló, 2015) par des méthodes de criblage non ciblé (4). Néanmoins, comme énoncé précédemment, l'utilisation de criblage non ciblé sur des échantillons environnementaux peut s'avérer une tâche longue et difficile à réaliser.



**Figure 13 : Stratégie générale d'identification de produits de transformation générés dans l'environnement. PT : produit de transformation.**

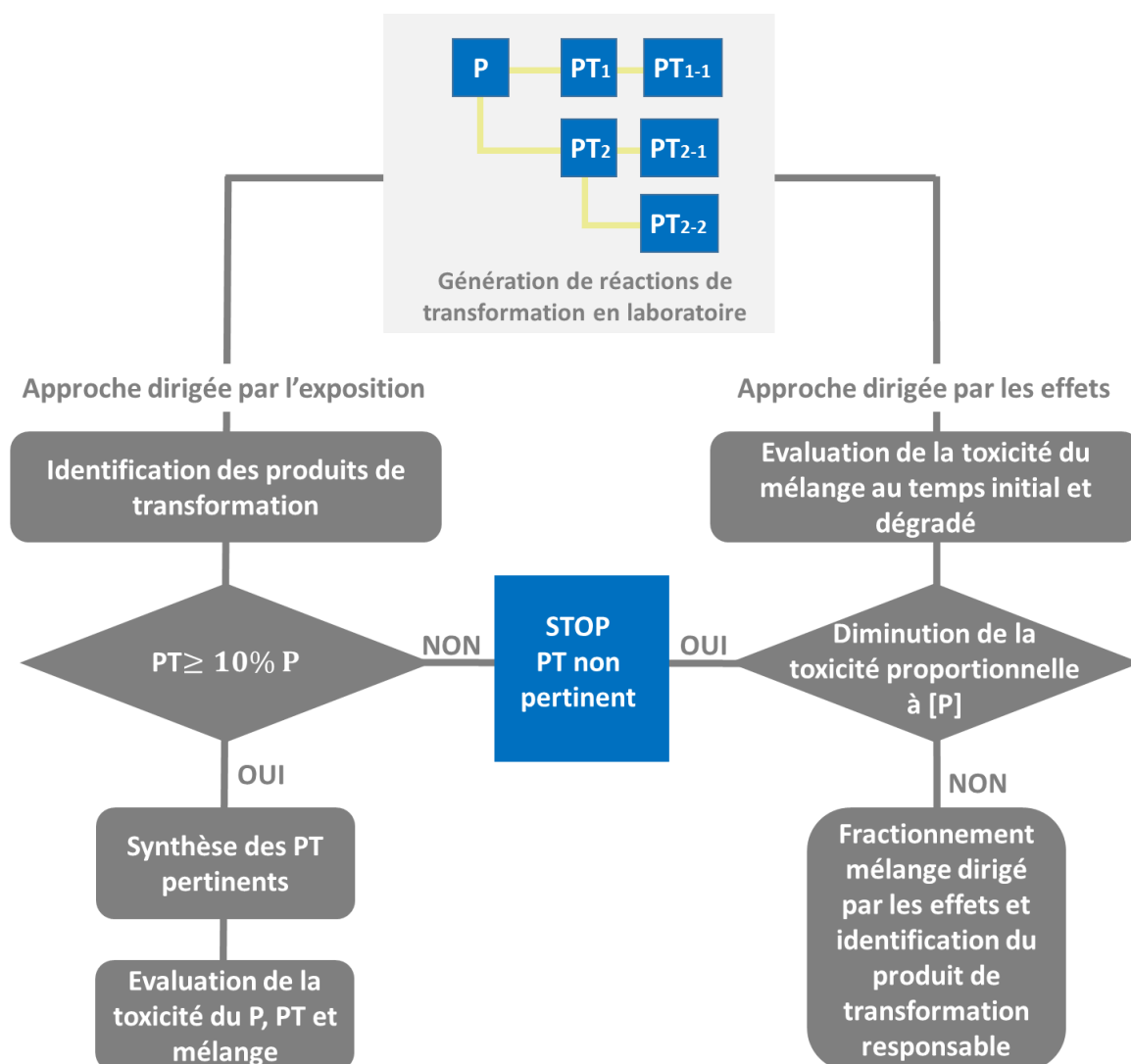
Les modèles de prédiction assistés par ordinateur ne sont pas les plus couramment employés. Cependant, ils représentent une avancée non négligeable dans l'identification de produits de transformation pertinents. Il existe actuellement plusieurs modèles permettant de prédire les produits de transformation générés par dégradations microbiennes (EAWAG-Path Prediction, envipath), par des dégradations du métabolisme humain (Pathpred) ou encore par des dégradations abiotiques (CATALOGIC) (Escher et Fenner, 2011).

Après la génération des PT en laboratoire, différentes approches complémentaires mais opposées sont développées pour tenter d'identifier de nouveaux produits de transformation pertinents (Escher et Fenner, 2011; Chibwe et al., 2016). Il existe deux types d'approches : les approches dirigées par l'exposition et les approches dirigées par les effets (Figure 14).

L'approche dirigée par l'exposition est la plus courante (Escher et Fenner, 2011). Elle consiste, dans un premier temps, à simuler la dégradation d'un composé individuel afin d'identifier les PT générés. L'élucidation de la structure des PT majoritaires est suivie par une évaluation du risque environnemental en combinant des données de présence dans l'environnement avec des essais de toxicité (Figure 14). Ce type de démarche peut également conduire à l'évaluation à la fois de la toxicité de chaque produit de transformation (individuellement) mais également du mélange des PT et de la molécule mère (Białk-Bielinska et al., 2017). L'approche dirigée par l'exposition est notamment exigée dans le cadre de certaines réglementations telles que les réglementations européennes relatives à la mise sur le marché des biocides et des pesticides (European Commission, 1998). Cependant, seuls les photoproduits majoritaires (concentration du PT au moins 10 % de la concentration initiale du produit parent) sont pris en compte dans ce type d'approche.

L'approche alternative (dirigée par les effets) consiste à réaliser en parallèle des analyses chimiques classiques, des bioessais afin d'évaluer l'évolution de la toxicité associée. A l'heure actuelle, les bioessais utilisés ciblent généralement des modes d'action non spécifiques tels que la toxicité cellulaire ou bactérienne comme, par exemple, l'inhibition de luminescence *Vibrio fischeri* (Vasquez et al., 2013; Gros et al., 2015; Sturini et al., 2015; Llorca et al., 2017). Dans le cas de certains antibiotiques comme les fluoroquinolones, les bioessais s'orientent sur l'évaluation du pouvoir antibactérien des produits générés (Kusari et al., 2009; Paul et al., 2010). Par ailleurs, l'utilisation de plusieurs bioessais spécifiques de certains récepteurs hormonaux peut également être envisagée et semble être une voie d'étude prometteuse, malgré qu'elle soit encore trop peu utilisée. L'étude de la photodégradation du fluorène couplée à une batterie de bioessais *in vitro*, a permis de mettre en évidence la formation de deux photoproduits plus actifs (activité œstrogénique et dioxin-like) que la molécule initiale (Kinani et al., 2016) . Pour aller plus loin, l'utilisation de méthodes de type EDA a, par exemple, permis d'identifier le 2-[2-(chlorophenyl)amino]benzaldehyde comme photoproduit phytotoxique du diclofénac (Schulze et al., 2010). La photolyse de l'œstrone a également été étudiée par ce type d'approche (Soussi et al., 2014). Ainsi la combinaison, d'outils de fractionnement, de bioessais *in vitro* et d'outils *in silico* a permis de mettre évidence (1) des photoproduits plus actifs que l'œstrone (œstrone hydroxylée) mais également (2) de

mieux comprendre quels sites permettaient la liaison entre photoproduits et récepteurs aux œstrogènes.



**Figure 14 : Stratégie d'identification de produits de transformation (PT) pertinents par l'approche dirigée par l'exposition et l'approche dirigée par les effets (Escher et Fenner, 2011).** P : composé parent, PT : produit de transformation.

## 2.4 Stratégie d'échantillonnage : à la base des analyses intégratives

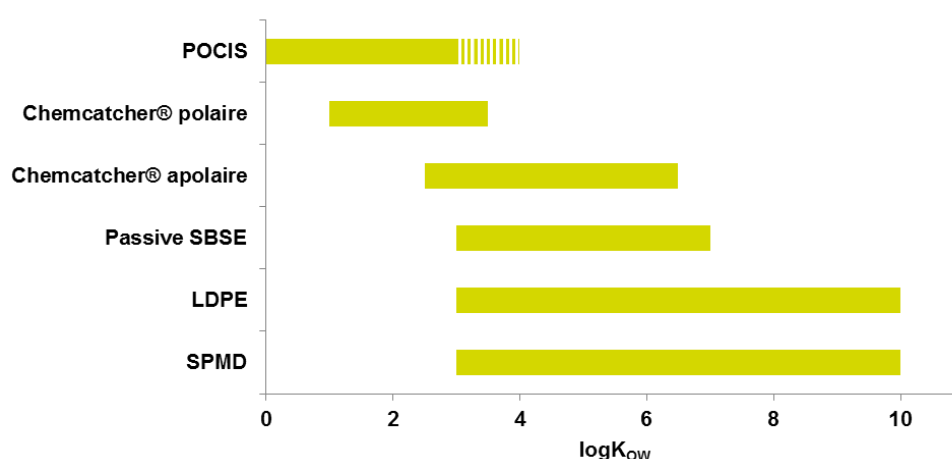
Les réglementations actuelles imposent un nombre toujours croissant d'informations quant à la contamination des masses d'eau. L'échantillonnage actif ponctuel est actuellement la méthode la plus largement utilisée pour le suivi de la qualité des milieux, et ce pour des raisons de simplicité de mise en œuvre. Toutefois, la contamination ultra-trace associée à une toxicité à faibles concentrations (NQE faible), impose une sensibilité accrue des analyses chimiques. De plus, ce type d'échantillonnage ne représente qu'une image figée de la contamination. Plus le pas de temps sera important entre deux prélèvements, plus la représentativité sera faible. Or, la composition des échantillons environnementaux est



fortement dépendante des conditions hydromorphologiques du système étudié, des conditions climatiques, du type de contamination (diffus ou ponctuel), des usages associés à ces contaminations, etc.

Afin d'accroître la sensibilité et la représentativité temporelle des analyses environnementales, des techniques alternatives d'échantillonnage ont été développées ces 20 dernières années. L'échantillonnage passif permet d'accumuler des contaminants sur un outil qui est immergé dans l'eau. Ces techniques permettent d'extraire et concentrer *in situ* les composés, tout en intégrant, sur une période donnée, la contamination. Ce type d'échantillonnage est basé sur la diffusion de molécules échantillonnées vers une phase réceptrice (Vrana et al., 2009). Pour ces raisons, l'utilisation d'échantillonneurs passifs semble tout à fait adaptée dans le cadre de la surveillance chimique et notamment dans l'application de la DCE (Poulier et al., 2014). De nombreux types d'échantillonneurs passifs (Figure 15) ont été développés avec des phases adsorbantes ou absorbantes de diverses natures et adaptées à différentes gammes d'hydrophobicité (Mazzella et al., 2011).

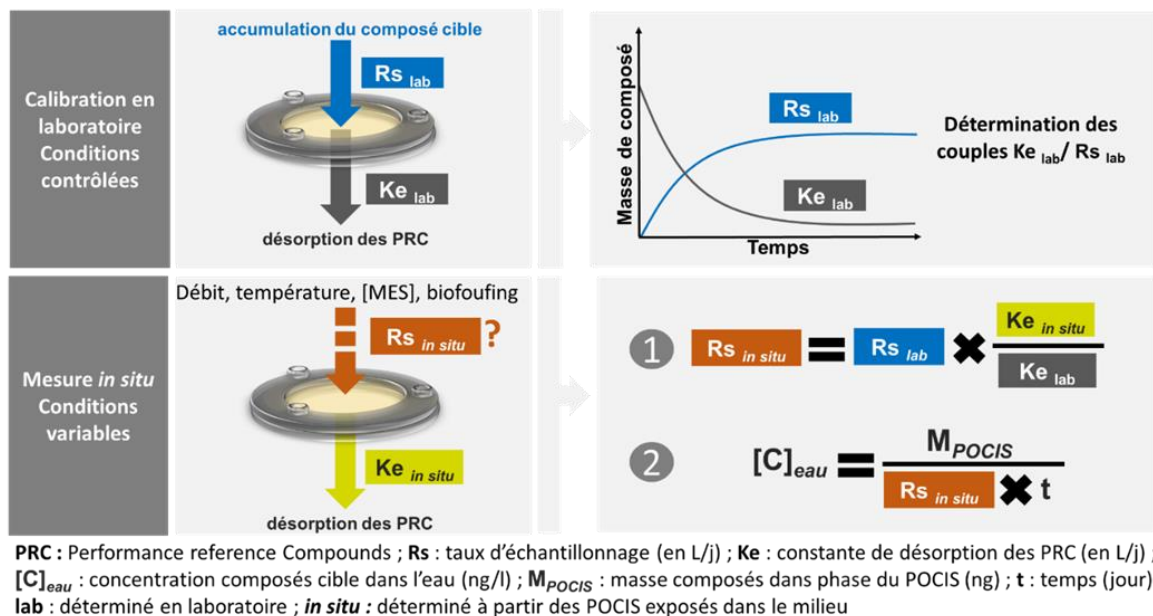
Alors que les SPMD (Semi-Permeable Membrane devices), les LDPE (Low Density PolyEthylene) et SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) sont très utilisés pour échantillonner les contaminants hydrophobes, les POCIS (Polar Organic Chemicals Integrative Sampler) sont plutôt adaptés aux composés polaires.



**Figure 15 : Fenêtre d'échantillonnage des principaux échantillonneurs passifs en fonction du log K<sub>ow</sub>** (Vrana et al., 2005a; Mazzella et al., 2011).

L'utilisation des échantillonneurs passifs s'est démocratisée pour rechercher divers contaminants émergents. La cinétique d'échange entre le milieu et l'échantillonneur suit deux régimes : un régime linéaire et régime d'équilibre. En régime linéaire, il est possible à partir du taux d'échantillonnage de calculer une concentration moyenne sur l'ensemble de la période d'échantillonnage (i.e. time weight average concentration, TWAC). Toutefois le taux d'échantillonnage peut être affecté par les conditions environnementales telles que la

température, le débit, la salinité ou le biofouling (Togola et Budzinski, 2007a). Dans le cas d'une caractérisation d'un point de vue chimique par échantillonnage passif, l'utilisation de l'approche PRC (Performance Reference Compound) permet d'améliorer l'aspect quantitatif de l'outil d'échantillonnage (Figure 16). Les PRC sont des molécules non interférentes, isotopiquement substituées dont la désorption durant la période d'immersion permet de calculer indirectement un taux d'échantillonnage ( $R_s$ ). En effet, la désorption des PRC ( $K_e$  *lab*) et l'absorption des composés cibles ( $R_s$  *lab*) dans l'outil sont calibrées lors d'études en laboratoire (Vrana et al., 2005b; Mazzella et al., 2010; Belles et al., 2014b). Le  $R_s$  en conditions réelles étant fortement soumis aux conditions du milieu tels que la température, le débit, le biofouling ou encore la salinité, à partir de la constante de désorption des PRC du POCIS vers le milieu ( $K_e$  *in situ*), il est possible de déterminer la constante d'absorption des composés dans les conditions d'exposition réelles ( $R_s$  *in situ*) (Figure 16).



**Figure 16 : Principe de quantification par la démarche corrective utilisant des PRC.**

Ainsi différentes applications des POCIS peuvent être citées (1) suivi environnemental de différentes classes chimiques (Vrana et al., 2016), (2) mise en évidence de la présence de molécules biologiquement actives (Vrana et al., 2015) et (3) identification de nouvelles molécules par des analyses non ciblées ou de type EDA (Creusot et al., 2014). Une synthèse non exhaustive des différentes applications des POCIS est présentée Tableau 7.

Les composés pharmaceutiques, les pesticides, les hormones et les perturbateurs endocriniens sont autant de molécules qui ont été suivies dans différents types d'eaux (rivières, estuaires, eaux marines et lacustres) grâce aux échantillonneurs passifs. Leur utilisation dans ce cas permet d'intégrer des pics de contamination, et d'abaisser les limites

de quantification (Vrana et al., 2009). Encore peu de travaux recensent l'utilisation des échantillonneurs passifs dans le cadre de la recherche de produits de transformation en milieu dilué. Pourtant, les produits de transformation déjà recherchés grâce aux POCIS se retrouvent parfois à de très faibles concentrations. Une étude a notamment démontré la présence de produits de transformation de la carbamazépine dans les eaux côtières de la méditerranée alors qu'un échantillonnage ponctuel ne le permettait pas (Bueno-Martínez et al., 2014).

**Tableau 7 : Exemples d'application des échantillonneurs passif de type POCIS.** [1] (Bueno-Martínez et al., 2014) ; [2] (Li et al., 2010) ; [3] (Gonzalez-Rey et al., 2015) ; [4] (Li et al., 2016) ; [5] (Vermeirssen et al., 2010) ; [6] (Tapie et al., 2011) ; [7] (Jálová et al., 2013) ; [8] (Long et al., 2014) ; [9] (Soulie et al., 2016) ; [10] (Creusot et al., 2014) ; [11] (Booij et al., 2014) ; [12] (Liscio et al., 2014).

Milieu	Analyses chimiques classiques	Présence molécules actives	Identification de nouvelles molécules	Réf.
Marin	M + PT	-	-	[1]
Lac	M, PSC, PE	-	-	[2]
Eaux estuariennes	M+ P+ PT	-	-	[3]
Rivière	M + PT	-	-	[4]
Effluent STEU	P+M	algues (inhibition luminescence)	-	[5]
Rivière	M+ HAP + H + P + P	activité ER, AhR, AR	-	[6]
Rivière + effluent STEU	P+ M+ PFC	activité ER, AhR, AR	-	[7]
Rivière	P, PE, PFC, P	activité ER, AhR, AR	-	[8]
Eaux souterraines	-	-	Criblage non ciblée	[9]
Rivière	M, S	activité ER, AhR, AR, GR, anti-MR, PXR	Approche EDA	[10]
Eaux estuariennes	-	inhibiteurs photosynthèse	Approche EDA	[11]
Rivière	-	anti-AR	Approche EDA	[12]

Du fait de leur forte capacité de concentration, les échantillonneurs passifs représentent des outils de choix pour la réalisation de bioessais *in vitro*. Les tests *in vitro* sont souvent appliqués sur des extraits préparés sur des grands volumes d'eau, ce qui les rend parfois difficiles à mettre en œuvre (Jálová et al., 2013). Pour aller plus loin l'utilisation des échantillonneurs passifs avec les approches de type EDA représente une démarche prometteuse pour la détection et l'identification de molécules actives dans des milieux dilués (Booij et al., 2014; Creusot et al., 2014; Liscio et al., 2014; Brack et al., 2016).

#### **Bilan :**

**L'évolution de la chimie environnementale a permis l'obtention de méthodes complémentaires qui permettent :**

- **de détecter des contaminants au niveau ultra-trace grâce à des méthodes multi-résidus basées généralement sur la spectrométrie de masse triple quadripôle,**
- **d'identifier des molécules non initialement recherchées grâce à l'essor de la spectrométrie de masse haute résolution,**
- **de générer et d'identifier de nouveaux produits de transformation grâce à la mise en place d'expérimentations en laboratoire ou d'outils *in silico*,**
- **de mettre en évidence la présence de molécules actives grâce aux développements de batteries de bioessais basés sur différents modes d'action,**
- **d'identifier des molécules actives dans des mélanges complexes grâce à des méthodes couplant le fractionnement, les analyses chimiques et biologiques : approche EDA.**

### **3. Présence, devenir et priorisation des contaminants dans les eaux de surfaces.**

#### **3.1 Des contaminants d'intérêt émergent dans les eaux de surface**

Différentes études prospectives ont été menées ces dernières années afin de mettre en évidence les contaminants les plus retrouvés dans les eaux de surfaces. Une recherche de 223 molécules potentiellement toxiques a été menée afin de réaliser une première évaluation du risque chimique au niveau de 91 bassins hydrographiques européens. En définitive, 14 % des bassins suivis présentent un risque de contamination aiguë et 42 % sont concernés par un risque chronique (Malaj et al., 2014).

Busch et son équipe ont recherché 970 molécules dans différentes rivières européennes. Sur l'ensemble des molécules recherchées, 426 ont été détectées au moins une fois. Les pesticides, les médicaments et les biocides sont les molécules les plus représentées avec respectivement 41, 30 et 21% des molécules retrouvées. Cette étude à grande échelle, a également permis de mettre en évidence que seulement 2 % des composés pouvaient être considérés comme apolaires et 56 % sont sous forme neutre à pH7 (Busch et al., 2016). Une combinaison d'analyses en mode non ciblée, suspect et ciblée a également permis d'identifier 250 composés appartenant à diverses familles chimiques dans 12 eaux de surface espagnoles. Parmi ces 250 molécules, 32 % étaient des pesticides, 10 % des médicaments (Hernández et al., 2015). Au niveau français, deux études de grande envergure ont été menées en 2011 et 2012 ; la campagne exceptionnelle (Lopez et Laurent, 2013) et l'étude prospective de 2012 qui s'intègre au Plan Micropolluants (Botta et Dulio, 2014) : Cette dernière

étude prospective à grande échelle a été réalisée sur 735 sites français (métropolitains et ultramarins). Elle a permis notamment de mettre en évidence la présence de 114 pesticides et médicaments dans les eaux de surface françaises mais également certains de leurs produits de transformation.

**Les médicaments** représentent un groupe diversifié de molécules qui sont destinées à des usages humains ou vétérinaires. Les médicaments sont des molécules modérément solubles qui sont produites dans le but d'avoir des effets sur le vivant à de faibles doses. Leur production et consommation n'ont cessé de croître en raison de l'augmentation de la population et des changements des structures démographiques. Leur autorisation de mise sur le marché (AMM) est réglementée par l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de la santé (ANSM) et par l'agence européenne du médicament (EMA). La directive 2004/27/CE impose une évaluation du risque (PEC/PNEC) que pourrait poser le médicament pour l'environnement. A l'échelle de la France, trois plans nationaux des résidus de médicaments ont été mis en place afin de renseigner l'occurrence des médicaments dans les eaux française, d'évaluer le risque pour l'environnement et de définir des mesures de gestion (PNSE 1,2 et 3). La présence des médicaments dans les eaux de surface est maintenant bien renseignée. Leur concentration est fortement variable en fonction des pays et même des régions étudiées (Ebele et al., 2017). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antibiotiques, les stéroïdes font partis des classes les plus documentées (Despo Fattakassinou et al., 2011). Globalement, encore peu d'études s'intéressent à l'occurrence des produits de transformation de médicaments dans les eaux de surfaces. Effectivement, la plupart des études se focalisent sur leur présence durant les phases de traitement ainsi que dans les effluents de STEU, pourtant la concentration de certains métabolites et/ ou de certains produits de transformation est parfois largement supérieure à celle de la molécule d'origine. Ce constat a été fait concernant le métabolite de la venlafaxine, le o-desméthylvenlafaxine qui a été retrouvée à des concentrations 128 à 208 % supérieures à celles du produit parent (Jongh et al., 2012).

Le terme **pesticide** regroupe l'ensemble des molécules destinées à repousser, détruire et combattre les ravageurs et espèces indésirables. Ce terme englobe les produits phytopharmaceutiques (ou phytosanitaires), les produits biocides, les antiparasitaires à usages humains et vétérinaires. Leur utilisation est généralisée à divers secteurs d'activité autres que l'agriculture comme le milieu hospitalier, le secteur à activité concernant l'entretien de jardins domestiques et espaces urbains, celui des matériaux de construction. Par conséquent ces composés sont vectorisés dans l'environnement par le biais des STEU mais également par des apports directs (épandage, lessivage, dépôts atmosphériques). En France, l'usage des pesticides est réglementés par quatre textes de loi : la réglementation

phytosanitaires (1107/2009/CE), la réglementation biocides (528/2012/CE), la directive sur les antiparasitaires à usage humain (2004/27/CE), et la directive sur les antiparasitaires vétérinaires (2004/28/CE). Il est possible pour une même substance d'être autorisée ou interdite sur une ou plusieurs de ces réglementations. De nombreuses études recensent la présence de divers pesticides et de certains de leur produits de transformation dans les eaux de surface (Metre et al., 2017; Rousis et al., 2017).

### **3.2 L'effort d'identifier et prioriser les molécules pertinentes**

Les avancées en chimie analytique ont permis d'augmenter le nombre possible de molécules suivies dans l'environnement. Cependant, d'un point de vue réglementaire, les molécules suivies ne représentent qu'une infime partie de celles qui sont réellement présentes dans l'environnement. Rechercher l'ensemble des molécules présentes dans une matrice dans le cadre de monitoring, est impossible pour des raisons de faisabilité. Dans ce contexte, il apparaît primordial de développer des méthodologies afin d'identifier des molécules actives pertinentes et des démarches de priorisation afin d'établir des listes de molécules pertinentes à surveiller.

Dans cette optique, différents exercices de priorisation ont été conduits ces dernières années (Besse et Garric, 2008; Götz et al., 2010; Von der Ohe et al., 2011; Dulio et Andres, 2012; Jean et al., 2012; Kuzmanovi et al., 2014; Di Nica et al., 2015). La méthodologie la plus avancée est sûrement celle appliquée par le réseau NORMAN (Dulio et Von der Ohe, 2013; Brack et al., 2017). Cette méthode a été appliquée à la priorisation de 500 contaminants organiques au niveau 4 bassins versants Européens (Von der Ohe et al., 2011). Le schéma de priorisation est basé sur des données d'occurrence mesurée (MEC) ou prédite (PEC) et des données de toxicité aiguë et chronique (PNEC) permettant de classer les molécules en 6 catégories, basés sur le niveau des informations disponibles et exploitables. Le descriptif des 6 catégories et des actions à mettre en œuvre est récapitulé Tableau 8. Cette méthode de priorisation permet ainsi de mettre en évidence (1) les molécules qui peuvent au vue des connaissances actuelles être inclus dans des programmes de surveillance réguliers (catégorie 1), les molécules dont le risque environnemental est écarté (catégorie 6) et (3) les composés dont les données d'occurrence et/ou de toxicité sont insuffisantes pour statuer (catégories 2,3,4,5). Le manque de données concernant l'occurrence, la toxicité et le devenir pour un grand nombre de composés (parents + produits de transformation) représente un réel frein à l'exercice de priorisation (Dulio et Slobodnik, 2015).

**Tableau 8 : Liste des catégories d'action identifiées sur la base des manques d'information / connaissance et des actions à mettre en œuvre (Dulio et Andres, 2012).**

Catégorie	Situation actuelle	Actions à mettre en œuvre
Cat. 1	Substances pour lesquelles les niveaux d'exposition et les risques associés sont suffisamment connus	Substances candidates aux programmes de surveillance réguliers, ou plus spécifiquement, au statut de «substances pertinentes à surveiller dans le milieu aquatique» ou de «polluants spécifiques de l'état écologique»
Cat. 2	Substances pour lesquelles les niveaux d'occurrence dans le milieu aquatique ne sont pas suffisamment connus	Campagnes de mesure dédiées à l'acquisition d'information sur les niveaux d'occurrence dans le milieu aquatique
Cat. 3	Substances pour lesquelles manquent les données pour une évaluation rigoureuse des effets écotoxiques	Développement / amélioration de tests d'écotoxicité
Cat. 4	Substances pour lesquelles les performances analytiques ne sont pas compatibles avec les objectifs de protection des écosystèmes	Développement / amélioration des méthodes analytiques plus performantes (capables de mesurer de valeurs de concentration plus faibles dans les milieux aquatiques)
Cat. 5	Substances pour lesquelles manquent à la fois des données sur les niveaux d'occurrence et des données expérimentales sur les effets écotoxiques	Développement à la fois de tests d'écotoxicité et de méthodes analytiques Campagnes de mesure dédiées à l'acquisition d'information sur les niveaux d'occurrence dans le milieu aquatique
Cat. 6	Substances pour lesquelles il n'y a pas des risques identifiés, au vu des résultats des programmes de surveillance et des tests d'écotoxicité	Substances qui pourraient être exclues des listes des programmes de surveillance régulière (ou recherchées avec une fréquence réduite) dans le milieu aquatique

D'autres méthodologies de priorisation ne se basent pas seulement sur des données d'occurrence, mais également sur le potentiel de bioaccumulation des composés (Jean et al., 2012). Une première étape a permis d'évaluer les molécules potentiellement bioaccumulables (données QSAR) parmi une liste initiale de 960 composés pharmaceutiques consommés dans l'hôpital étudié. Une étude au cas par cas sur les 70 molécules sélectionnées a permis d'obtenir des informations complémentaires concernant des données de quantités consommées, des données d'excrétion, des données écotoxicologiques et de biodégradabilité. Parmi les 70 molécules étudiées, 14 ont été sélectionnées comme étant des substances à risque, parmi lesquelles, on retrouve par exemple le tamoxifène (antinéoplasique), l'amitriptyline (antidépresseur) et l'éthinylestradiol (hormone de synthèse) (Jean et al., 2012).

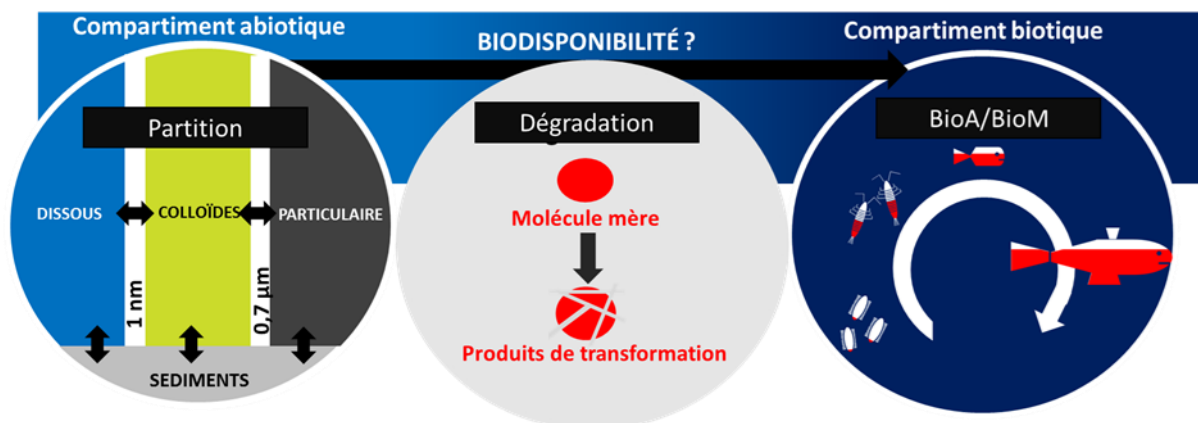
Afin de faire évoluer les listes de molécules à suivre dans les eaux suisses, une étude a adopté une stratégie de priorisation alternative se basant sur leur persistance dans l'eau (Götz et al., 2010). Un premier filtre basé sur les propriétés physico-chimiques a été utilisé afin de se focaliser uniquement sur les molécules majoritairement présentes dans l'eau (phase dissoute). Un deuxième filtre a été appliqué afin de discriminer les molécules rapidement

dégradables, les molécules modérément dégradables et les composés très persistantes. Pour cela, des données expérimentales d'hydrolyse et des données de biodégradabilité issus de modèles *in silico* (BIOWIN d'EPI suite<sup>PM</sup>) ont été utilisées. Une dernière étape évalue le type d'apport dans l'environnement des molécules en différenciant les apports continus des apports périodiques. Ainsi 250 molécules de diverses classes chimiques ont été classées en 5 catégories d'exposition prenant en compte le type d'apport et la persistance.

Ainsi, diverses approches sont actuellement disponibles afin de sélectionner des molécules pertinentes à suivre dans les eaux de surface. Cependant, le manque d'information concernant l'occurrence, la toxicité et la persistance des contaminants reste encore un frein à une évaluation du risque fiable. Par ailleurs, l'évaluation de la persistance des contaminants dans l'environnement représente un point clé pour une représentation plus réaliste des molécules pertinentes à suivre (Amiard et Amiard-triquet, 2015).

### 3.3 Devenir des contaminants d'intérêt émergent dans les milieux aquatiques

Les concentrations des contaminants dans l'eau sont gouvernées par des processus physiques comme la dilution et la diffusion, la sorption mais également par des processus chimiques (abiotiques) et biochimiques (biotiques) (Figure 17). Alors que les processus physiques semblent être relativement communs à l'ensemble des contaminants, les phénomènes biotiques et abiotiques peuvent être très différents en fonction du composé considéré.



**Figure 17 : Devenir des contaminants dans les écosystèmes aquatiques (BioA : bioaccumulation, BioM : biomagnification).**

Ainsi, le devenir d'une molécule dans l'environnement va dépendre de trois grands facteurs : (1) ses propriétés intrinsèques, (2) des facteurs environnementaux et (3) des facteurs anthropiques, principalement reflète des apports (périodiques ou continus). Premièrement, le devenir d'une molécule est gouverné par ses propriétés chimiques et

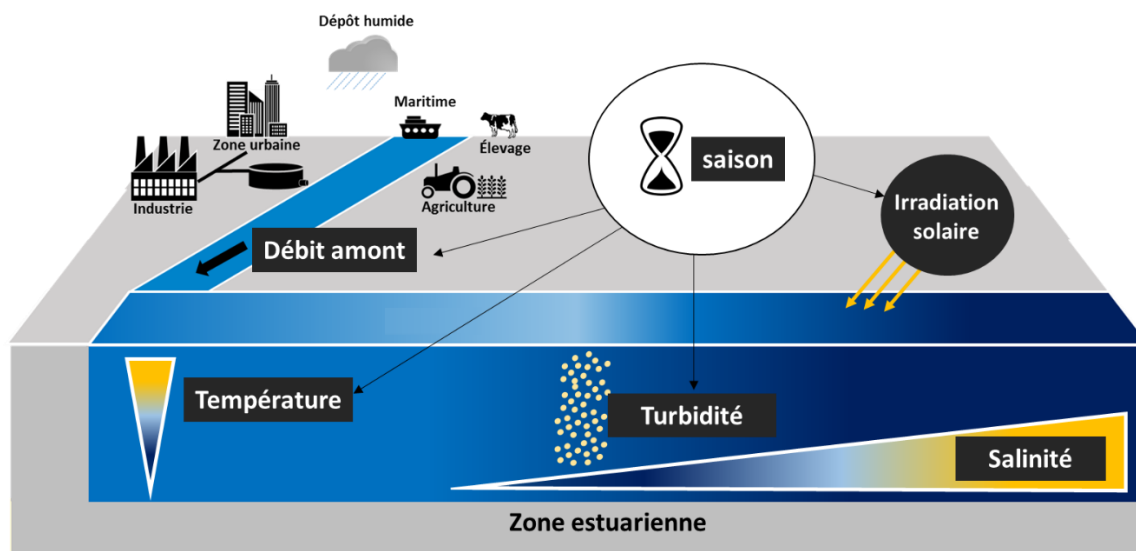


physiques comme les constantes de partition, sa solubilité, sa constante de dissociation ionique (pKa). L'ensemble de ces propriétés vont conditionner sa réactivité dans les compartiments abiotiques (adsorption, hydrolyse, volatilisation, photodégradation) mais également les compartiments biotiques (bioaccumulation, métabolisation). Deuxièmement, les paramètres environnementaux (matière organique, ensoleillement, pH, présence de microorganismes) jouent un rôle central dans le devenir des molécules organiques. Outre les phénomènes de dilution, d'adsorption et d'hydrolyse, deux processus jouent un rôle central dans l'atténuation naturelle des contaminants organiques : La photodégradation et la biodégradation.

La **photodégradation** causée par l'irradiation solaire est considérée comme une voie majeure de l'élimination des composés dans l'environnement et en particulier pour les composés pharmaceutiques qui ont été conçus pour être résistants à l'hydrolyse (Belgiorno et Rizzo, 2012). Deux types de processus photochimiques peuvent être distingués : (1) des réactions de phototransformation directes qui dépendent de paramètres intrinsèques à la molécule comme le coefficient d'absorption molaire ou le rendement quantique ; (2) des réactions de phototransformations indirectes qui dépendent de l'action intermédiaire d'espèces chimiques oxydantes qui sont générées par les rayonnements solaires. Ainsi, la génération d'espèces réactives est le résultat de la réactivité de certains éléments constitutifs de l'eau comme les nitrates ou les acides humiques. Les réactions de photodégradation sont généralement complexes et impliquent de multiples réactions qui peuvent être en compétition. La **biodégradation** joue également un rôle majeur sur le devenir des contaminants dans les eaux de surface. Ce phénomène est fortement dépendant des conditions environnementales telles que la température, le potentiel redox, la présence et le type de communautés microbiennes (Mandaric et al., 2015).

Une attention particulière doit être portée aux zones estuariennes qui sont des zones de transitions relativement complexes à étudier et à fort enjeu écologique. Effectivement, outre les phénomènes de saisonnalité, les zones estuariennes sont caractérisées par de fortes variations de certains paramètres environnementaux tels que la salinité, les matières en suspension (Figure 18). Ce dynamisme s'opère à différentes échelles spatiales et temporelles. Par exemple, le comportement des médicaments est ainsi fortement influencé par les cycles tidaux. L'impact de la marée sur les concentrations en pharmaceutiques a déjà été observé dans l'estuaire de Seine (Togola, 2006), dans l'estuaire Yangtze (Yang et al., 2011; Zhao et al., 2015). Des tendances saisonnières ont également déjà été mises en évidence au niveau de l'estuaire de Yangtze et de la rivière Pearl (Yang et al., 2011; Liang et al., 2013). Par ailleurs, une étude a également mis en évidence une atténuation estivale plus marquée des

concentrations en pharmaceutiques au niveau de l'estuaire de la Gironde ; ce phénomène a été imputé notamment aux changements des temps de résidence, de température, et des concentrations en matières en suspension qui influent sur la stabilité des molécules (Togola, 2006; Benotti et Brownawell, 2009; Aminot et al., 2016).



**Figure 18 : Principaux paramètres influençant le devenir des contaminants en zone estuarienne.**

Face à cette complexité, l'évaluation de la persistance des contaminants dans les zones estuariennes reste encore un véritable défi. Un des moyens les plus utilisés pour étudier leur persistance est de réaliser des expériences en laboratoire. Différents phénomènes peuvent ainsi être étudiés dans des conditions contrôlées : dégradation par irradiation solaire grâce à des lampes à Xénon (Challis et al., 2014), expérience en « batch » pour mimer des phénomènes de biodégradation (Benotti et Brownawell, 2009) ayant lieu dans l'environnement. La complexité des matrices utilisées détermine la représentativité de l'expérimentation. En effet, à l'heure actuelle un grand nombre des études menées se réalise sur des matrices simples (eau ultrapure ou eaux minérales) qui sont artificiellement enrichies à de très fortes concentrations avec les composés d'intérêts. Ces matrices enrichies sont alors soumises à des irradiations solaires, ou à certaines souches bactériennes ou encore à certains traitements utilisés en STEU (chlore, UV). Seulement quelques études ont été menées avec des matrices environnementales. Par exemple, les expériences d'incubation réalisées par Benotti et Brownawell (2009) ont montré une différence de cinétique de biodégradation entre les molécules d'intérêt : le temps de demi-vie du paracétamol est inférieur à 1 jour contre plus de 100 jours pour la carbamazépine, la biodégradabilité étant corrélée à leur dégradabilité en STEU. Par ailleurs, des cinétiques plus rapides ont été observées dans les eaux les plus côtières, également les plus eutrophisées. Récemment, une étude a été réalisée en laboratoire afin d'évaluer la dégradation (photodégradation et biodégradation) de 33 composés

pharmaceutiques dans des eaux de rivières et marines. Des différences de comportement ont été mises en évidence entre les deux matrices. Alors que le pH des eaux joue un rôle central dans la photodégradation des composés ciblés, la salinité et l'origine de l'échantillon affecte la biodégradation (Baena-nogueras et al., 2017).

La variation de la persistance des molécules en fonction du milieu considéré représente un réel challenge. En effet, déterminer les variations de persistance (temporelles et spatiales) des contaminants au sein d'une rivière ou d'un estuaire pourrait apporter à terme de nouveaux éléments quant à la priorisation des molécules pertinentes à suivre dans l'environnement.

- **La présence d'une grande diversité de contaminants émergents a été mise en évidence ces dernières années. Les composés pharmaceutiques et les pesticides font partie des molécules les plus représentées.**
- **Dans un contexte de suivi régulier, la recherche de l'ensemble des molécules connues et identifiées est impossible. En ce sens, diverses méthodes de priorisation ont été mises en place afin de sélectionner des molécules dites pertinentes à suivre dans l'environnement. Ces démarches se basent généralement sur des données d'occurrence, de toxicité, de bioamplification et de persistance. Le manque de données sur la présence et le devenir des contaminants émergents représente un réel frein à la démarche de priorisation.**
- **De plus, le devenir d'une molécule dans les écosystèmes aquatiques est complexe. En effet, il dépend de paramètres intrinsèques à chaque composé mais également de paramètres biotiques, abiotiques et environnementaux. Cette complexité est accentuée dans les zones de transition comme les estuaires.**

## Objectifs des travaux

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans le cadre de l'implémentation de nouvelles molécules à suivre dans les écosystèmes aquatiques et en particulier dans les zones estuariennes. Ainsi ces travaux visent à utiliser différentes méthodes afin d'identifier des molécules préoccupantes qui pourraient représenter de bons candidats pour un suivi plus poussé dans l'environnement.

Une grande partie de ces travaux a été consacrée à l'étude d'un estuaire particulièrement impacté par les activités anthropiques. En effet, l'estuaire de Seine est situé à l'exutoire d'un bassin versant regroupant  $\frac{1}{4}$  de la population française et 30 % de l'activité agricole du territoire. En raison de cette forte pression anthropique, l'estuaire de Seine est potentiellement exposé à une contamination par une large gamme de contaminants organiques, notamment des médicaments et des pesticides. Les données obtenues par le passé ont déjà démontré la présence de composés pharmaceutiques dans cet estuaire (Togola and Budzinski, 2008).

Dans ce contexte, le **premier objectif** de ces travaux a été d'évaluer la présence de 200 composés organiques, ainsi que de molécules biologiquement actives (perturbateurs endocriniens, composés génotoxiques), ceci afin d'évaluer leurs apports respectifs en estuaire de Seine. Ces connaissances, associées à des données de toxicité, ont pour finalité l'identification des molécules les plus problématiques apportées en Seine.

Comme il a été décrit dans le chapitre I, les estuaires sont des milieux dynamiques. L'évaluation fiable des concentrations en contaminants et du risque environnemental associé dans un estuaire peut s'avérer compliqué. Ainsi, le **second objectif** de ces travaux a été de mettre en œuvre des études afin de mieux comprendre et mieux évaluer la variabilité spatiale et temporelle de la contamination en estuaire de Seine. Des expériences en laboratoire visant à simplifier la complexité estuarienne ont également été réalisées afin de mieux estimer et anticiper la persistance des composés pharmaceutiques et des pesticides dans ces zones particulières de transition entre milieu continental et milieu marin.

Enfin, le **dernier objectif** a été de mettre en avant l'intérêt de la spectrométrie de masse haute résolution afin d'identifier de nouvelles molécules. Pour cela, cette approche a été utilisée sur des échantillons environnementaux afin (1) d'identifier des molécules non initialement suivies, (2) d'identifier de produits de transformations par le biais d'expériences menées en laboratoire, et (3) d'identifier des molécules biologiquement actives grâce à l'utilisation d'approches dirigées par les effets (EDA).





## CHAPITRE II

### Matériels et méthodes



## Chapitre II : Matériels et méthodes

### Table des matières

1.	Vision globale de la stratégie appliquée.....	80
2.	Stratégie d'échantillonnage et sites d'étude.....	81
2.1	Études <i>in situ</i> .....	81
2.1.1	Description des différents types d'échantillonnage réalisés.....	81
2.1.2	Lixiviats d'installation de stockage des déchets.....	82
2.1.3	Etude de l'estuaire de Seine.....	84
2.2	Expériences <i>in vitro</i> en laboratoire .....	92
2.2.1	Irradiation solaire dans un réacteur photochimique .....	92
2.2.2	Étude de la dégradation des contaminants en microcosmes .....	94
3.	Stratégies de caractérisation des échantillons.....	97
4.	Détection, Identification et quantification des contaminants organiques .....	98
4.1	Choix des molécules ciblées et vision d'ensemble des procédures d'analyses .....	98
4.2	Préparation des échantillons.....	100
4.2.1	Prétraitement analytique des échantillons.....	100
4.2.2	Extraction sur phase solide (SPE) .....	100
4.2.3	Micro-extraction sur phase solide (SPME) .....	101
4.2.4	Extraction des composés à partir des échantillonneurs passifs de type POCIS.....	102
4.3	Extraction et fractionnement dans le cadre de l'approche EDA.....	102
4.4	Approche ciblée.....	104
4.4.1	Méthodes instrumentales et retraitement des données.....	104
4.4.2	Méthodes de quantification.....	105
4.4.3	Qualité des analyses et synthèse des performances analytiques.....	106
4.5	Approche non ciblée par spectrométrie de masse haute résolution.....	109
4.5.1	Appareillage et méthodes analytiques.....	109
4.5.2	Assurance qualité des analyses non ciblées.....	111
4.5.3	Retraitement et stratégie d'identification .....	112
5.	Évaluation de la présence de molécules actives .....	114
5.1	Présence de composés œstrogéniques et de type dioxine-like.....	114
5.2	Présence de composés génotoxiques : SOS Chromotest.....	116



# 1. Objectifs des travaux et vision globale de la stratégie appliquée.

Les travaux de thèse sont découpés en 3 axes de recherche (Tableau 9):

- Suivi de composés organiques polaires au sein d'un estuaire fortement anthropisé : l'estuaire de Seine.
- Devenir des contaminants d'intérêt au sein de matrices complexes.
- Apport de la spectrométrie de masse haute résolution pour l'identification de nouvelles molécules.

L'ensemble de ces travaux ont été réalisés dans le cadre de différents projets de recherche : Deux projets se focalisant sur l'estuaire de Seine : CRAPPSE et MOSAIC et un projet dédié à l'étude des lixiviats de décharge : TOXLIX. Les objectifs de ces travaux multi-partenariaux ont été détaillés dans les parties 2.1.2 et 2.1.3. Une vision globale des travaux et de la démarche adoptée est présentée Tableau 9.

**Tableau 9 : Récapitulatif global de la stratégie appliquée**

	AXE 1 Apports en contaminants émergents en estuaire de Seine	AXE 2 Devenir des contaminants en estuaire de Seine	AXE 3 Apport de la SMHR à l'identification de nouvelles molécules
<b>Projets de Recherche</b>	CRAPPSE	CRAPPSE MOSAIC	TOXLIX CRAPPSE
<b>Cadre d'étude</b>	Estuaire de Seine	Estuaire de Seine	Eaux artificiellement dopées Installation de stockage des déchets
<b>Resumé des objectifs</b>	1/Identifier les apports en contaminants émergents dans un hydrosystème fortement anthropisé  2/Prioriser les molécules les plus préoccupantes apportées en Seine	1/ Evaluer la variabilité spatio-temporelle de la contamination au sein d'un estuaire macrotidal  2/ Evaluer la stabilité des contaminants dans des milieux complexes grâce des expériences en laboratoire	2/ Identifier de nouveaux produits transformations et confirmer leur présence dans l'environnement  2/ Identifier les composés préoccupants au sein d'effluents complexes : les lixiviats de décharge
<b>Approche</b>	<i>in situ</i>	en laboratoire + <i>in situ</i>	en laboratoire + <i>in situ</i>
<b>Échantillonnage</b>	Ponctuel Moyenné 24h	Ponctuel Passif de type POCIS	Ponctuel
<b>Méthodes analytiques utilisées</b>	<b>Ciblée</b> : Multi-résidus/ ultra-traces	<b>Ciblée</b> : Multi-résidus/ ultra-traces <b>Non ciblée</b> : Identification par spectrométrie de masse haute résolution	<b>Ciblée</b> : Multi-résidus/ ultra-traces <b>Non ciblée</b> : Identification par spectrométrie de masse haute résolution
<b>Activités biologiques recherchées</b>	œstrogénique, dioxine-like, androgénique, glucocorticoïdes, génotoxiques	œstrogénique, dioxine-like, androgénique, glucocorticoïdes, génotoxiques	œstrogénique, dioxine-like, génotoxiques

## 2. Stratégie d'échantillonnage et sites d'étude

### 2.1 Études in situ

#### 2.1.1 Description des différents types d'échantillonnage réalisés

Lors de ces différents travaux, trois types d'échantillonnage ont été appliqués avec des objectifs et une représentativité différente (Figure 19 A).

##### *Echantillonnage actif*

L'échantillonnage ponctuel est un prélèvement d'eau à un temps et un endroit donné. Il représente une image instantanée de la contamination. En ce sens, il n'est pas toujours représentatif des fluctuations des concentrations dans le compartiment dissous. Les échantillons ponctuels ont été prélevés à l'aide d'un préleveur manuel, dans des bouteilles ambrées préalablement calcinées.

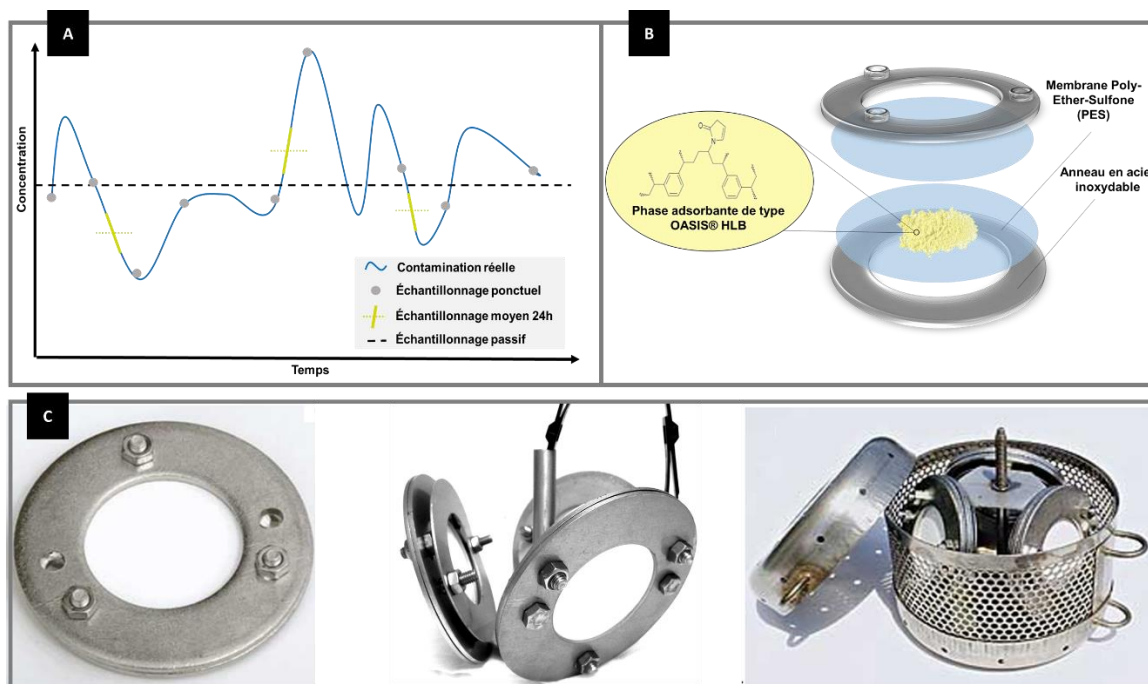
Dans le cas, des effluents de STEU, des échantillons moyennés 24h asservis au débit ont été prélevés. Ce type de prélèvement est un mélange de plusieurs prélèvements réalisés au même endroit mais à des temps différents, il permet ainsi de lisser les concentrations journalières. Ce type d'échantillonnage a donc été choisi pour caractériser le rejet de la station d'épuration qui peut être variable au cours d'une journée. L'échantillon a été collecté dans un bidon de 10 L en polypropylène haute densité (PEHD) par les exploitants de la STEU. Après homogénéisation, le prélèvement est transféré dans des flacons de 1 L et acheminé en laboratoire en conditions réfrigérées.

##### *Echantillonnage passif*

Dans le but de pallier les problèmes de variabilités temporelles et de suivre l'évolution de la contamination sur plusieurs jours, des échantillonneurs passifs de type POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) ont été associés à certains prélèvements ponctuels. Ce type d'échantillonneur est particulièrement adapté aux molécules polaires qui possèdent un log  $K_{ow}$  compris entre 2 et 4. Le POCIS a été utilisé dans sa configuration dite « pharmaceutique » c'est-à-dire avec une phase constituée de copolymère de divinylbenzène et n-vinylpyrrolidone.

Chaque POCIS assemblé en laboratoire, contient 200 mg de phase solide absorbante (OASIS<sup>®</sup> HLB : copolymère de divinylbenzène et n-vinylpyrrolidone) emprisonnée entre deux membranes semi-perméables en polyéthersulfone (PES) de 0,1  $\mu\text{m}$  de diamètre de pores. L'ensemble est maintenu entre deux anneaux en acier inoxydable (Figure 19 B). Avant montage, phase et membranes sont préalablement nettoyées par trois immersions successives dans du méthanol. La phase est enrobée avec les marqueurs deutérés destinés

à servir de PRC. L'enrobage consiste à répartir de manière homogène dans la phase réceptrice le marqueur deutéré. Pour ce faire la phase réceptrice préalablement nettoyée par trois bains successifs de 15 min dans du méthanol est introduite avec la quantité adéquate de composé PRC dans un ballon d'évaporateur rotatif avec du dichlorométhane. Le solvant est ensuite éliminé jusqu'à obtention d'une phase sèche à l'aspect poudreux, à 55°C et à pression atmosphérique.



**Figure 19 : A : Représentation schématique des différents types d'échantillonnage et de leur intégration de la contamination ; B : vue éclatée d'un échantillonneur passif de type POCIS. C : Photographies de gauche à droite d'un POCIS, d'un holder et d'une cage.**

Après assemblage en laboratoire, les échantillonneurs sont montés sur des supports métalliques holder (Figure 19 c), et placés dans des cages protectrices. L'ensemble est immergé dans l'eau pour une durée variable allant de quelques jours dans les eaux suspectés d'être fortement contaminées ; jusqu'à un mois pour les milieux les plus dilués. A la fin de l'exposition les échantillonneurs sont rincés avec de l'eau ultrapure, transportés jusqu'au laboratoire par transporteur (réfrigéré) et congelés au maximum six mois jusqu'à analyse.

### 2.1.2 Lixiviats d'installation de stockage des déchets

Dans la dernière décennie, la croissance démographique, l'urbanisation et l'émergence de la société de consommation ont été accompagnées par une augmentation de la production de déchets municipaux. Les déchets des sites d'enfouissement, sous la forme de lixiviats, libèrent une grande diversité de composés organiques (Eggen et al., 2010). Ces mélanges complexes peuvent être introduits dans le sol et les eaux souterraines par diffusion au travers des membranes de protection géosynthétiques et présentent donc un risque pour les

écosystèmes aquatiques. De plus, les lixiviats de décharge sont connus pour représenter une source de perturbateurs endocriniens (Behnisch et al., 2001; Coors et al., 2003). Les réglementations nationales et internationales imposent qu'un certain nombre de contaminants soient recherchés dans les rejets de ces installations. C'est notamment le cas de l'arrêté du 31/01/08 relatif au registre et à la déclaration annuelle des émissions polluantes et des déchets (E-PRTR). Cependant, la complexité de ces matrices et le nombre restreint de molécules évaluées par des analyses chimiques ciblées peuvent donc représenter un défi quand il s'agit d'identifier des molécules responsables des activités biologiques.

C'est dans ce contexte que le projet **TOXLIX** a été réalisé dans le but (1) d'évaluer la toxicité des lixiviats d'installation de stockage des déchets non dangereux et (2) d'identifier les agents chimiques responsables. Ce projet financé par l'agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (ADEME) a été conduit par trois laboratoires : l'IRSTEA Antony, le LCABIE (Université de Pau) et l'UMR EPOC-LPTC (Université de Bordeaux). Les travaux de thèse se sont focalisés sur la réalisation de tests *in vitro* et l'application de l'approche EDA. Les tests *in vitro* ont pu être réalisés grâce à la collaboration de l'unité d'évaluation des risques écotoxicologiques (ECOT) de l'Institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS) et de la société TOXEM.

Dans le cadre du projet TOXLIX, neuf échantillons ponctuels ont été prélevés dans trois installations françaises de stockage des déchets non dangereux (ISDND) dans des flacons en polyéthylène haute densité de type Nalgène®. Au niveau du premier site, un lixiviat brut (Site1-LB) provenant de l'ensemble des casiers de l'installation a été prélevé, en amont du rejet du bassin d'aération. Un second échantillon a été prélevé dans le bassin d'aération (Site1-LA) au sein duquel une aération forcée est mise en œuvre. Le perméat (S1-LT) obtenu après les processus d'évapo-concentration et d'osmose inverse a également été prélevé au niveau du site 1. Au niveau du site 2, trois échantillons ont également été prélevés : un lixiviat brut (Site2-LB) prélevé au niveau de la station de relevage, un lixiviat (Site2-LA) issu du bassin d'aération (pas équipé d'aération forcé) et un échantillon récolté après les processus de traitement qui étaient constitués d'un bioréacteur membranaire suivi d'une filtration sur charbon actif. Finalement, deux lixiviats bruts ont été prélevés sur le site 3 : un provenant d'un casier en cours d'exploitation (Site3-LBTJ) et un issu d'un casier exploité entre 2009 et 2010. Un lixiviat prélevé au niveau du bassin d'aération recevant l'ensemble des lixiviats bruts du site 3 a également été prélevé. L'ensemble des caractéristiques des échantillons prélevés sont récapitulés Tableau 10.

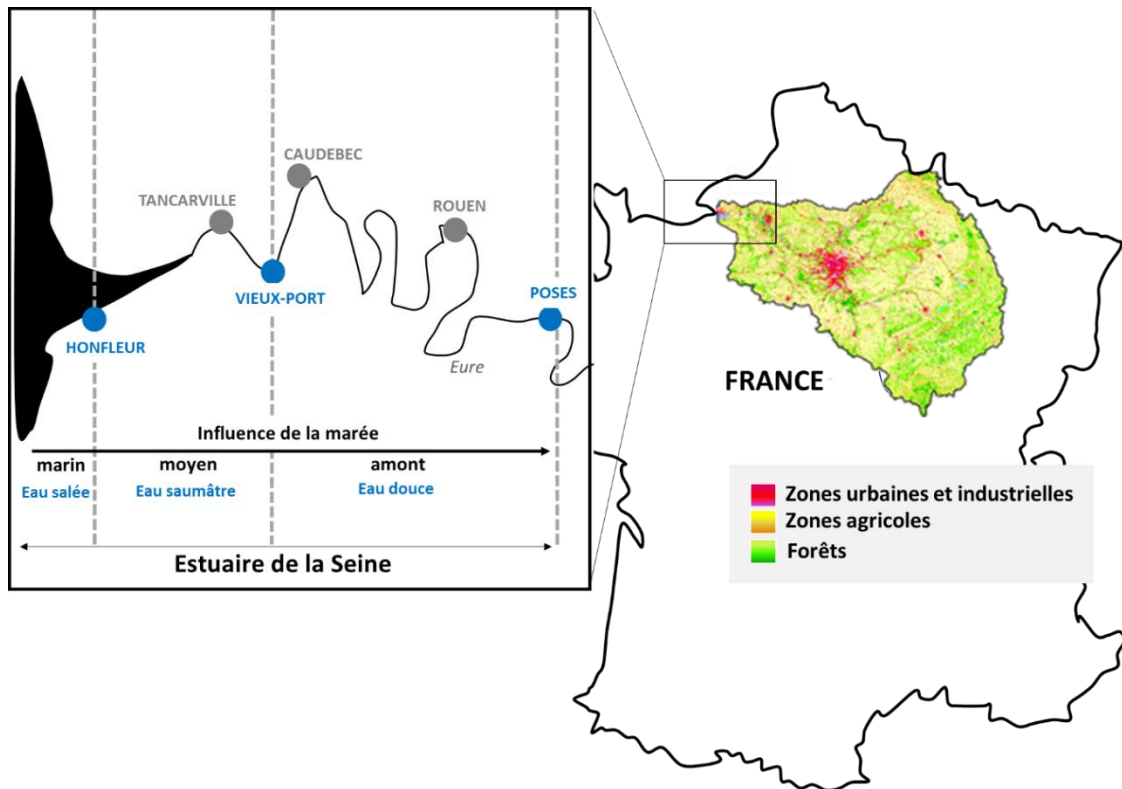
**Tableau 10 : Récapitulatif des caractéristiques et paramètres des différents échantillons prélevés.**

Échantillon	Caractéristiques	pH	Conductivité $\mu\text{S.cm}^{-1}$
Site1-LB	Lixiviat brut provenant de plusieurs casiers d'âges différents.	8,4	23697
Site1-LA	Lixiviat prélevé dans le bassin d'aération forcée recevant le lixiviat site 1-LB.	8,4	15017
Site1-LT	Perméat prélevé en sortie de traitement (évapo-concentration suivie d'une osmose inverse) du site1.	6,2	127
Site2-LB	Lixiviat brut prélevé au niveau de la station de relevage du site 2.	7,5	4260
Site2-LA	Lixiviat prélevé dans le bassin d'aération recevant le lixiviat site 2-LB.	7,9	7120
Site2-LT	Effluent de sortie de la station d'épuration (réacteur membranaire suivi d'une filtration sur charbon actif) du site 2.	7,0	6150
Site3-LBTJ	Lixiviat brut très jeune provenant d'un casier en cours d'exploitation.	7,5	17370
Site3-LBJ	Lixiviat brut jeune provenant d'un casier exploité entre 2009 et 2010.	7,8	27000
Site3-LA	Lixiviat prélevé dans le bassin d'aération recevant les lixiviats site 3-LBTJ et LBJ.	7,9	22600

### 2.1.3 Étude de l'estuaire de Seine

#### a. Description de l'estuaire et de ses problématiques

Le bassin versant de la Seine représente un territoire de 78 600 km<sup>2</sup>, soit 12% de la superficie nationale, plus d'un quart de la population française et 30 % de l'activité agricole du pays (Figure 20). De ce fait, ce vaste bassin versant est soumis à de fortes pressions anthropiques (urbaines, agricoles, industrielles). Ce territoire est occupé à 7,1 % par des zones urbaines comme notamment l'agglomération parisienne et à 66,5 % par des terres agricoles (Romero et al., 2016).



**Figure 20 : Le bassin versant de la Seine et son estuaire.**

L'estuaire de Seine est délimité par le barrage de Poses en amont et la baie de Seine en aval où la Seine se jette dans la Manche (Figure 20). Les 170 km qui le compose sont sous l'influence de la marée et peuvent être décomposés en trois sections :

- **L'estuaire amont ou fluvial** entre Poses et Vieux Port qui est composé d'eau douce mais soumis à la marée dynamique.
- **L'estuaire moyen** entre Vieux-Port et Honfleur qui est une zone de mélange des eaux douces et marines.
- **L'estuaire aval ou marin** entre Honfleur et la baie de Seine constitué exclusivement d'eau salée.

L'estuaire de Seine est un milieu complexe dont le fonctionnement est à la fois influencé par l'hydrologie de son bassin versant, mais également par les conditions dynamiques dues aux marées, et à l'activité anthropique. La qualité de l'estuaire de Seine subit différentes pressions qu'elles soient urbaines, industrielles et agricoles. Ainsi différents types d'apports en contaminants organiques peuvent être recensés : (1) les apports du bassin versant amont via la Seine, (2) les apports des bassins versants intra-estuariens (via les affluents et les nappes souterraines), (3) les rejets directs dans l'estuaire par les STEU, (4) les sources diffuses ou ponctuelles par ruissellement ou applications directes. La Figure 21 recense les principaux affluents et STEU qui se rejettent directement dans l'estuaire de Seine. Au niveau

du barrage de Poses, la Seine draine un bassin versant de 67 000 km<sup>2</sup> dont fait partie l'agglomération parisienne. En moyenne, le débit à Poses est d'environ 521 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>, ce qui en fait l'apport majoritaire d'eau douce. Bien que non négligeable, les apports par les affluents intra-estuariens sont nettement plus faibles (0,4 - 26,5 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>). Le régime hydrologique de la Seine est qualifié de « pluvial océanique » avec des débits maximaux en hiver (janvier à avril) et minimaux en été (août à octobre). Ainsi le temps de résidence des eaux varie entre 5 à 7 jours en période de forts débits et jusqu'à 17 à 18 jours en période d'étiage.

L'estuaire de Seine est également caractérisé par de fortes pressions urbaines de par la présence en amont de l'agglomération parisienne mais également en aval des agglomérations rouennaises et havraises. Ainsi en amont de l'estuaire, les eaux usées de l'agglomération parisienne sont actuellement traitées par 6 STEU pour un équivalent de 9 millions d'usagers. En outre, le long de l'estuaire de Seine, 7 STEU d'une capacité nominale supérieure à 10 000 équivalent habitants (EH) sont présentes pour traiter les eaux domestiques et industrielles

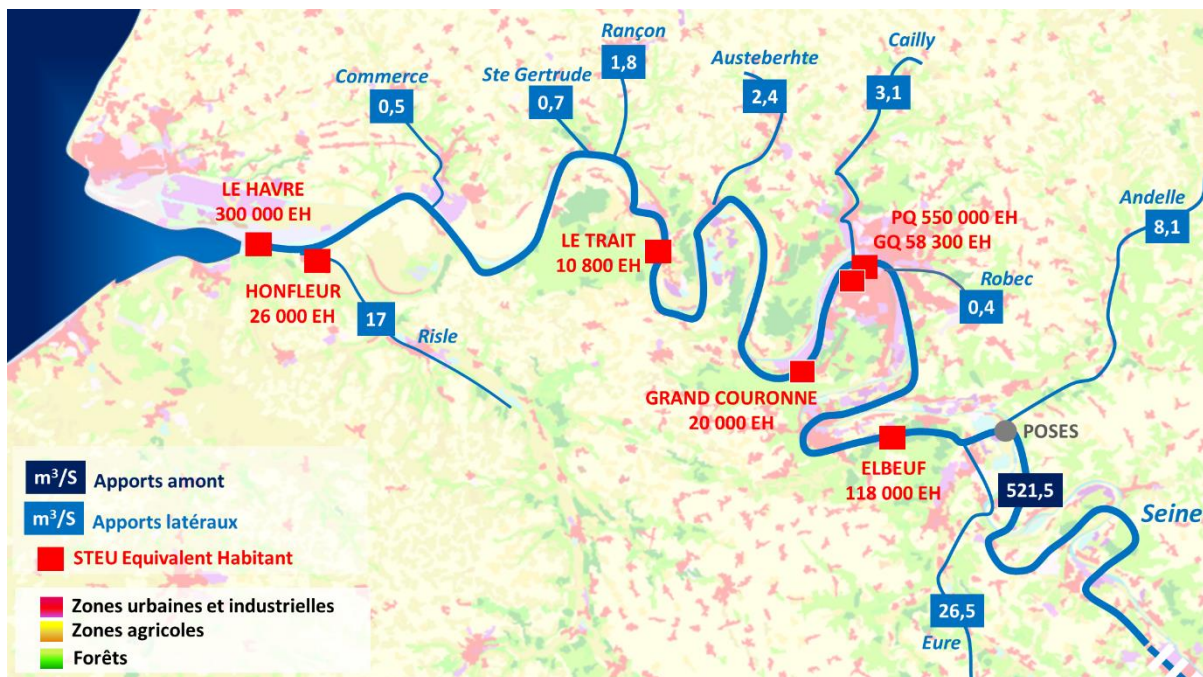


Figure 21 : Usages principaux du bassin versant de l'estuaire de Seine ; apport en eaux douces de la Seine et de ses affluents, et positionnement des principales STEU (>10 000 équivalent habitants). PQ : Petit Quevilly (Rouen) et GQ : Grand Quevilly (Rouen). Carte réalisée à partir des données de débits de Seine Aval, (2008) ; fond de carte : « Corine Land Cover » (<http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/clc/carte/metropole>) et données des STEU (<http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr/>).

Outres l'hydrodynamisme fluvial et les apports anthropiques, les eaux de l'estuaire de Seine sont également influencées par la marée dynamique. En effet, c'est un estuaire macrotidal avec une marée de type semi-diurne et des marnages allant de 3 à 7 m à Honfleur.

Un gradient de salinité est présent le long de l'estuaire, allant de polyhalin à limnique entre Honfleur et Caudebec (Figure 22). Ces délimitations traduisent une situation moyenne et à l'échelle d'une marée, la salinité varie fortement. Lors du flot (marée montante), les eaux marines remontent vers l'amont de l'estuaire alors que le jusant correspond à une marée descendante. Ces phénomènes fluctuent fortement à l'échelle saisonnière en fonction de l'hydrologie fluviale (crue / étiage) et de l'intensité de la marée (mortes eaux / vives eaux). Dans l'estuaire moyen, l'asymétrie de l'onde marée et la circulation résiduelle induite par la différence de densité de l'eau douce et eau salée est à l'origine de la formation d'une zone d'accumulation de particules en suspension. Ce phénomène est appelée bouchon vaseux ou zone de turbidité maximale (ZTM).

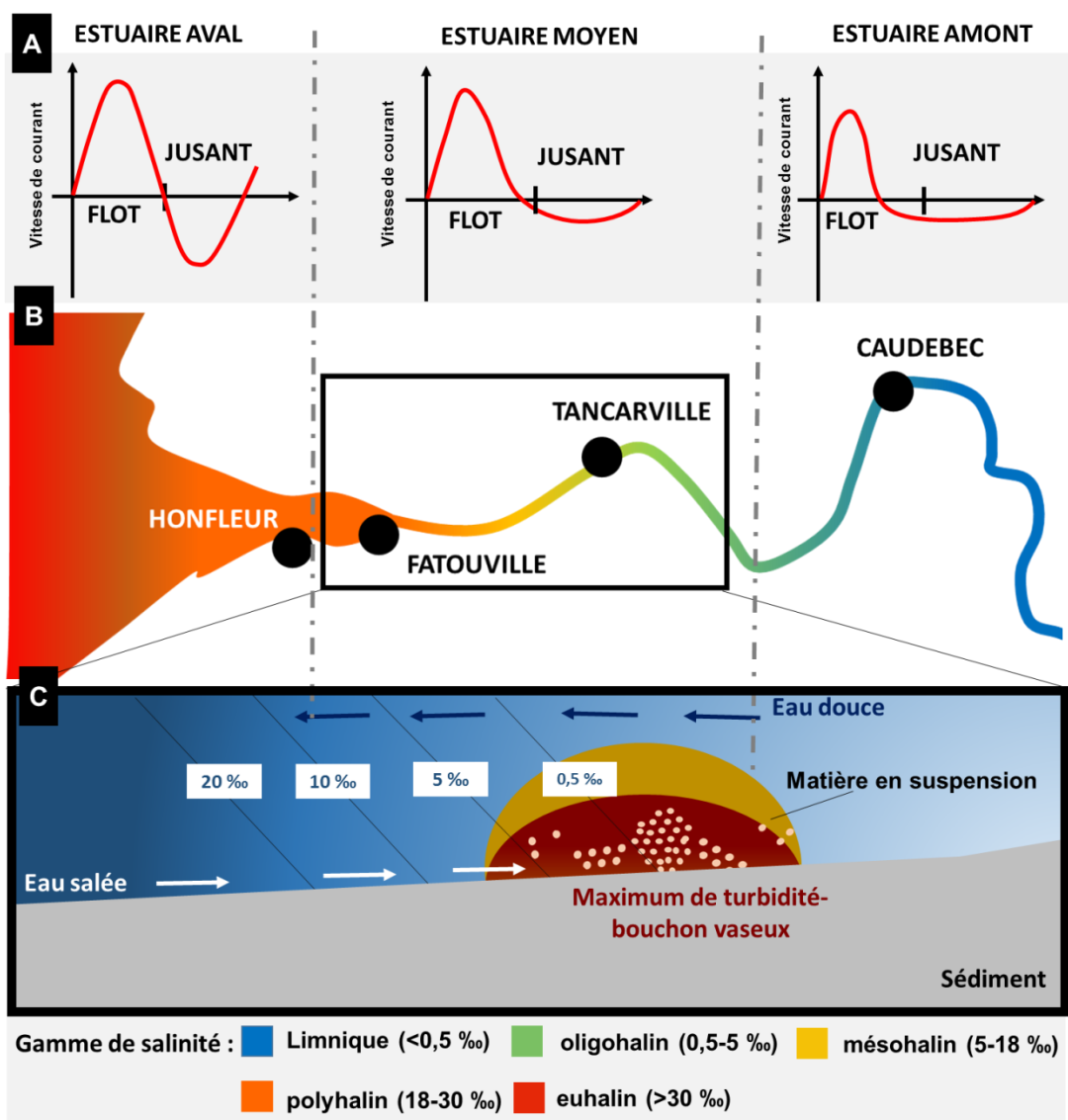


Figure 22 : Onde de marée (A) et gamme de salinité dans les différentes sections de l'estuaire. (C) formation de la zone maximale de turbidité (TMZ). (Brenon et Le Hir, 1999; Lemoine et Verney, 2015).



C'est dans ce contexte que le groupement d'intérêt Seine Aval (<http://www.seine-aval.fr/>) a été créé en 2003 pour coordonner le pilotage de projets visant à mieux comprendre le fonctionnement environnemental de l'estuaire de Seine. Dans les phases précédentes de Seine Aval (Seine Aval 2, Seine Aval 3 et Seine Aval 4) différentes études ont permis l'acquisition de données concernant le problème des polluants polaires (émergents et pesticides) en estuaire de Seine (Lachambre et Fisson, 2007, Togola, 2006, MEDSEINES4).

L'étude de la contamination de l'estuaire de Seine a été effectuée dans le cadre de deux projets financés par le groupement d'intérêt public Seine aval (Phase 5): **CRAPPSE** (Contamination et réactivité de pesticides et de pharmaceutiques dans l'estuaire de Seine) et **MOSAIC** (Dynamique de la matière organique dans le bouchon vaseux de l'estuaire de Seine en lien avec les nutriments et les contaminants organiques).

Le projet **CRAPPSE (2013-2017)** propose une approche pluridisciplinaire de l'étude de la contamination de la Seine ainsi que de son estuaire par les composés organiques polaires. Pour cela, ce projet étudie un large spectre de contaminants de polarité moyenne à élevée, en incluant des composés soit classés comme émergents, soit utilisés comme pesticides ou biocides. Ce projet a également pour objectifs de mieux appréhender les phénomènes de dégradation des molécules organiques et l'évolution de la toxicité associée. Ce projet s'articule ainsi en 3 axes : (1) Caractérisation des apports en contaminants polaires en estuaire de Seine et recherche des produits de dégradation. ; (2) Dégradation des contaminants à l'obscurité et photodégradation solaire ; (3) Caractérisation des effets toxiques des échantillons. Ce projet a rassemblé un consortium pluridisciplinaire associant plusieurs laboratoires : L'équipe de Physico-Toxico-Chimie de l'environnement (LPTC) de l'UMR 5803-EPOC (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux); l'unité « Laboratoire d'écotoxicologie » de l'Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA), l'unité d'évaluation des risques écotoxicologiques (ECOT) de l'Institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS) et la société TOXEM.

Le projet **MOSAIC (2013-2017)** visait à obtenir des informations sur la variabilité spatio-temporelle et la dynamique de la matière organique, des nutriments et des contaminants organiques (pharmaceutiques et hydrocarbures aromatiques polycycliques) le long de l'estuaire de Seine et ce sur des échelles de temps courts (cycles de marée) à saisonnières. Pour répondre à cet objectif un partenariat de 4 laboratoires a été créé et regroupe : l'équipe METIS (Milieu environnementaux, transferts et interactions dans les hydrosystèmes et les sols) de l'UMR 7619, l'UMR 5805 EPOC-LPTC, l'équipe ECOBIO (Ecosystèmes, biodiversité et évolution) de l'UMR 6553 et le laboratoire de géochimie des eaux (LGE) de l'UMR 7143.

## b. Description des différentes campagnes d'échantillonnage

Les différents sites suivis dans le cadre de ces deux projets sont présentés Figure 23. Au total, huit sites couvrant l'ensemble de l'estuaire aval ont été échantillonnés : les campagnes d'échantillonnage peuvent être subdivisées en fonction de différents objectifs qui sont résumés Figure 23.

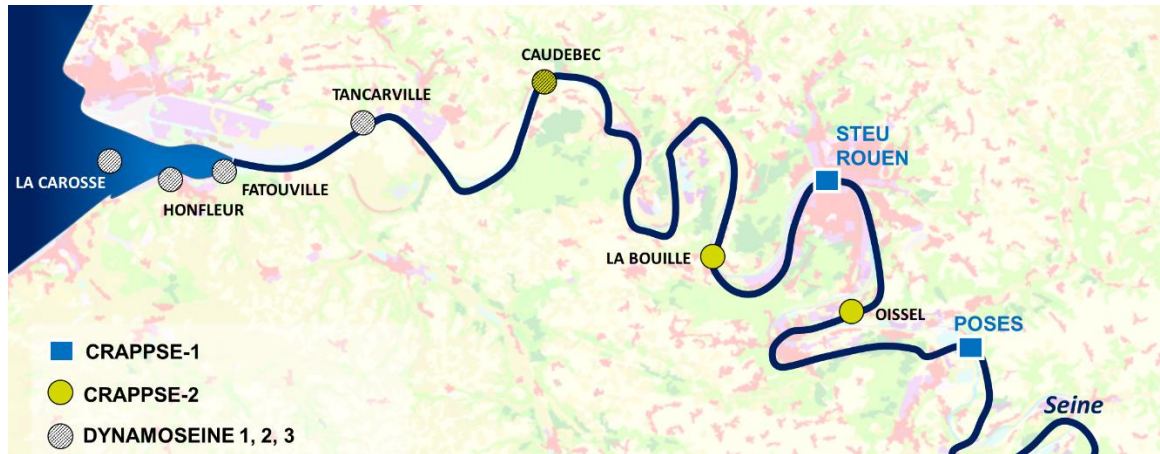


Figure 23 : L'estuaire de Seine : zone d'étude et campagnes d'échantillonnage.

### **Campagne CRAPPSE-1 : Evaluation des apports en contaminants émergents en estuaire de Seine** (Figure 23 ;■)

Deux points d'entrée ont été échantillonnés pendant 1 an : Tout d'abord le **barrage de Poses** caractérisant les apports amont (Paris). **Le rejet de la principale station de traitement des eaux usées (STEU)** de l'estuaire : le petit Quevilly qui possède une capacité nominale de 550 000 équivalent-habitants et un débit moyen de traitement de 85 000 m<sup>3</sup> par jour ([www.assainissement.developpementdurable.gouv.fr](http://www.assainissement.developpementdurable.gouv.fr)). Cette STEU est en service depuis 1997 et est équipée de traitements de type déphosphatation, dénitrification et boues activées.

Les deux sites ont été suivis tous les 2 mois pendant 1 an par le prélèvement d'échantillons ponctuels au niveau du barrage de Poses et d'échantillon moyenné 24h au niveau de l'effluent de STEU. Les différentes campagnes se sont échelonnées entre mai 2014 et mars 2015. Les échantillons récoltés pendant cette année de suivi ont permis d'évaluer les apports en composés polaires mais également de réaliser les tests *in vitro*. Dans le cas des bioessais, le principal challenge a été de concentrer suffisamment les masses d'eau et en particulier au niveau du barrage de Poses afin d'abaisser les limites de détection des différents bioessais. Pour ce faire, 5 L d'eau de sortie de STEU et 10 L prélevés au barrage de Poses ont été concentrés respectivement 2000 et 4000 fois pour chaque campagne d'échantillonnage. Pour compléter ce suivi, des échantillonneurs passifs de type POCIS ont été exposés pendant de 4 semaines, durant le mois de janvier 2015, dans l'effluent de la STEU du Petit Quevilly (Rouen). Le but était de comparer ce type d'échantillonnage au prélèvement

moyenné 24h quant à la biodétection des composés (tests *in vitro*). La même démarche a été réalisée au niveau du site de Poses où des échantillonneurs passifs ont été exposés pendant 4 semaines lors de 2 campagnes (janvier-février 2015 ; février-mars 2015). Le but a été ici de concentrer la contamination afin d'améliorer la sensibilité des tests *in vitro* qui demandent de grands facteurs de concentration. Le détail des coordonnées, sites, de prélèvement sont décrits Annexe 1.

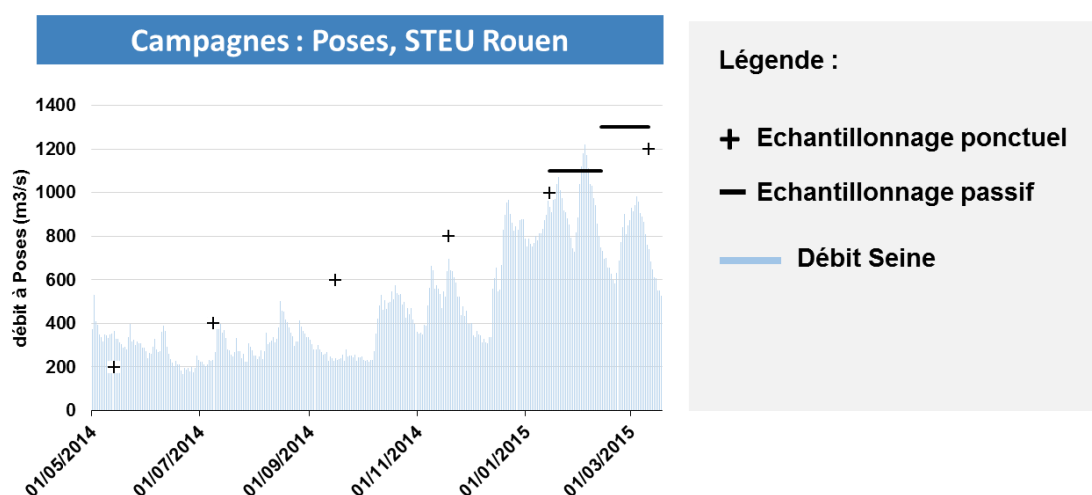
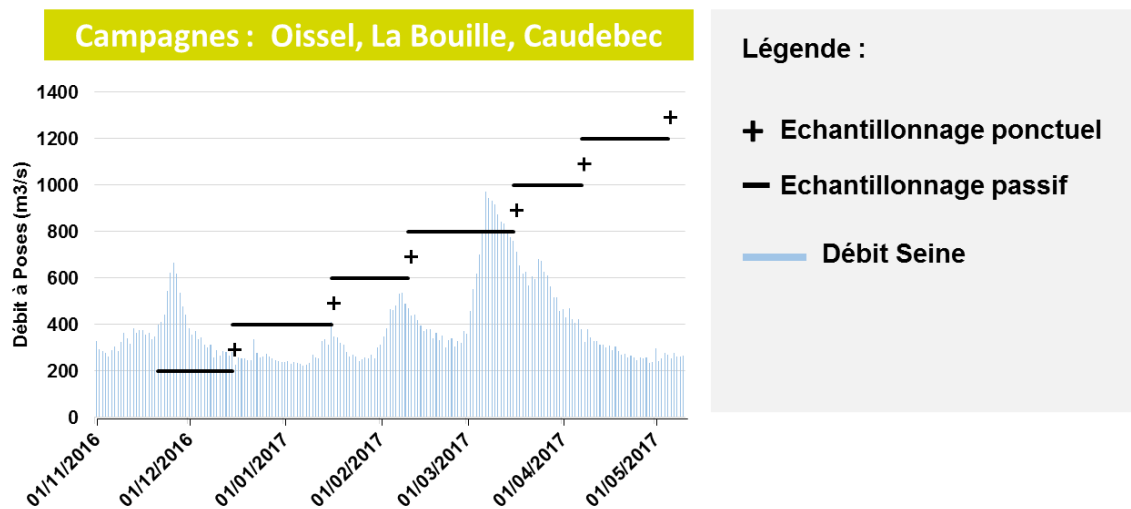


Figure 24 : Récapitulatif des différentes campagnes d'échantillonnage réalisées au niveau de Poses et de la sortie de la STEU de Rouen.

### **Campagne CRAPPSE-2 : Recherche de nouveaux produits de transformation identifiés en laboratoire et suivi de molécules dites « traceurs » (Figure 23 ; ●)**

Dans le but d'évaluer la présence de composés traceurs et de rechercher la présence des produits de transformation identifiés en laboratoire, une campagne d'échantillonnage de 6 mois a été initiée fin novembre 2016. Trois sites ont été choisis : **Oissel, La Bouille et Caudebec** (Figure 25). Pour pallier les faibles concentrations de ces milieux, des échantillonneurs passifs de type Polar Organic Chemical Sampler (POCIS) ont été exposés entre 22 et 34 jours, et des échantillonnages ponctuels ont été réalisés en parallèle. Les deux objectifs majeurs de cette phase ont été : (1) de réaliser une approche quantitative afin d'évaluer les concentrations de quelques composés traceurs dans ces milieux ; (2) d'utiliser les capacités de concentration des POCIS et la spectrométrie de masse haute résolution pour évaluer la présence des produits de transformation identifiés en laboratoire. Les différents sites ont été suivis pendant 6 mois avec une fréquence d'échantillonnage mensuel entre novembre 2016 et mai 2017. Le détail des coordonnées, sites, de prélèvement sont décrits Annexe 2.



**Figure 25 : Récapitulatif des différentes campagnes d'échantillonnage réalisées au niveau d'Oissel, La Bouille, Caudebec.**

**Campagnes DYNAMOSEINE : Évaluation de la variabilité spatio-temporelle de la contamination le long de l'estuaire de Seine (O ; Figure 23)**

Le principaux objectifs étaient (1) d'évaluer le devenir de molécules traceurs dans l'estuaire ; (2) d'évaluer la variabilité de la contamination au cours d'un cycle de marée. Pour cela, 4 sites situés dans l'estuaire moyen et marin ont été suivis lors de trois campagnes d'échantillonnage d'une semaine en avril-septembre 2015, et avril 2016 (Tableau 11). Ces campagnes ont été réalisées dans le cadre du projet MOSAIC sur le navire CNRS/INSU Côte de la Manche par les équipes partenaires. Les périodes, sites et conditions de débits à Vernon, lors des différentes campagnes ont été contextualisées Tableau 11.

**Tableau 11 : Récapitulatif des conditions d'échantillonnage dans le cadre du projet MOSAIC C : Caudebec, T : Tancarville, F : Fatouville, H : Honfleur, LC : La Carosse.**

	DYNAMOSEINE LEG 1	DYNAMOSEINE LEG 2	DYNAMOSEINE 2
Périodes	Avril 2015	Septembre 2015	Avril 2016
Gros prélèvements	C, T, F, H	C, T, F, H	R, C, T, F, LC
½ cycles de marée (dissous)	C, T, F, H	C, T, F, H	C, T, F, H, LC
Sédiment	F, T, H	F, T, H	R,F, T,LC
Coefficient de marée	37-44	82-117	75-85
Débit moyen à Vernon (m³/s)	454	223	603

De petits prélèvements d'eau (quelques millilitres) ont été effectués à trois temps des cycles de marée en subsurface, à mi-profondeur et au fond de la colonne d'eau. Ces échantillons ont été filtrés à 0,7 µm (Whatman GF/F) directement sur le bateau puis conservés à -20 °C. De gros volumes d'eau (environ 100 litres) ont également été prélevés à mi-fond à l'aide d'une pompe Spido (Ecc Pro 300), en ciblant le maximum de turbidité à Tancarville et

Fatouville, et la pleine mer à Honfleur et la Carosse. Enfin, des sédiments ont été prélevés à l'aide d'une benne shipeck. Le détail des coordonnées, sites, heures de prélèvement sont décrits Annexe 3.

## 2.2 Expériences *in vitro* en laboratoire

Dans le cadre du projet CRAPPSE, différentes études ont été simulées en laboratoire afin d'évaluer la persistance de contaminants organiques retrouvés en estuaire de Seine et d'identifier les produits de dégradation de molécules encore peu ou pas étudiées.

### 2.2.1 Irradiation solaire dans un réacteur photochimique

#### a. Descriptif de l'appareillage

Les réactions photochimiques induites par les rayonnements solaires dans le compartiment aquatique ont été simulées grâce à un réacteur photochimique : SUNTEST CPS (Atlas, Illinois, USA). Cet appareil est constitué d'une lampe à arc Xénon et de deux filtres permettant d'éliminer les rayonnements ultraviolets et infrarouges. Le spectre continu de 400 à 600 nm émis est comparable au spectre d'émission du rayonnement solaire naturel (Figure 26). La température de la chambre d'irradiation est maintenue à 25°C et l'intensité d'irradiation a été fixée à 250 W.m<sup>-2</sup>.

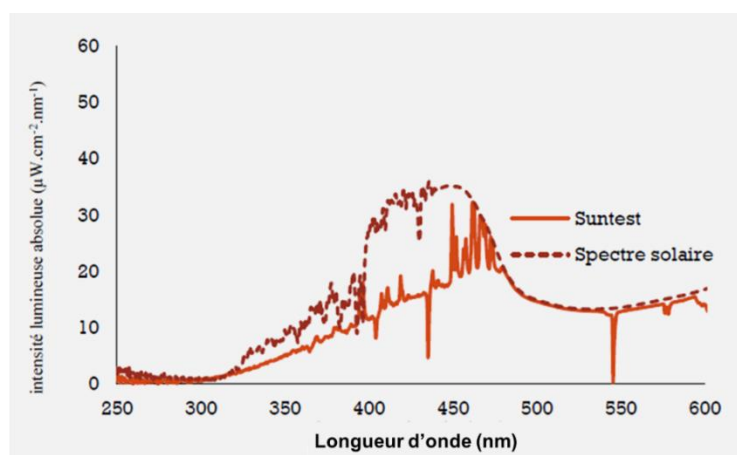


Figure 26 : Comparaison des spectres d'émission du simulateur solaire et du rayonnement solaire naturel en mai à Périgueux (Nassar, 2014).

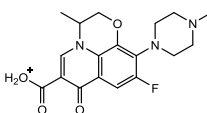
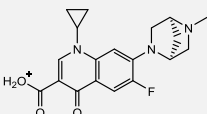
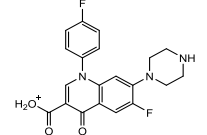
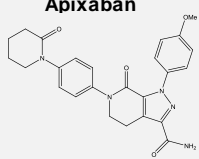
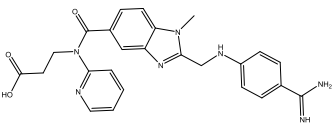
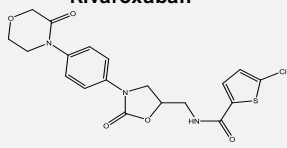
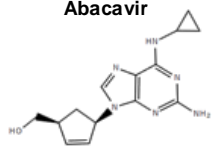
#### b. Irradiation d'échantillons naturels non dopés

Une expérimentation exploratoire a été conduite en irradiant artificiellement un effluent de la STEU de Rouen. Le but était d'évaluer de façon globale les molécules les plus réactives au rayonnement solaire. Pour cela un effluent de la STEU de Rouen a été irradié artificiellement pendant 24h. Différents échantillons ont été récoltés à différents temps d'irradiations : T<sub>0</sub>, T<sub>200 min</sub>, T<sub>400 min</sub> et T<sub>1440 min</sub> (24h).

### c. Irradiations d'échantillons artificiellement reconstitués pour l'identification de nouveaux produits de transformation

Ce volet est le résultat d'une approche complémentaire avec des études de réactivité qui ont été menées en parallèle par Montaha Yassine et Aurélien Trivella (UMR EPOC). Un travail d'identification des produits de transformation issus de la photodégradation solaire de 7 molécules a été mené dans le cadre de ces travaux.

**Tableau 12 : Récapitulatif des molécules mères étudiées dans les expériences sous irradiation solaire : identification des produits de transformation majoritaires.** \* dans cette étude, [1] (Nakata et al., 2005), [2] (Tamtam et al., 2007), [3] (Iglesias et al., 2014), [4] (Aminot et al., 2015), [5] (Funke et al., 2016), [6] (Vasquez et al., 2013), [7] (Zivanovic et al., 2006), [8] (Zgadaj et al., 2015), [9] (Hubicka et al., 2013), [10] (Calza et al., 2008), [11] (Hubicka et al., 2014), [12] (Sturini et al., 2012a), [13] (Sturini et al., 2015), [14] (Ge et al., 2015), [15] (Kusari et al., 2009), [16] (Prabhakaran et al., 2009), [17] (Kurmi et al., 2017). (U= usage).

Molécules étudiées	Classe	pKa	Occurrence (ng.L <sup>-1</sup> )	Etudes de transformation sous irradiation solaire simulée
<b>Ofloxacin</b> 	Antibiotiques fluoroquinolones U. humain	5,9 8,3	Poses : 5-8* Effluent Rouen : 115-300* Effluent STEU : 100-510 [1]	5 [6,7, 8,9, 10]
<b>Danofloxacin</b> 	Antibiotiques fluoroquinolones U. vétérinaire	6,4 9,0	Poses : <LQ* Effluent Rouen : <LQ* Eaux de surface : 30 [2]	4 [11, 12, 13, 14]
<b>Sarafloxacin</b> 	Antibiotiques fluoroquinolones U. vétérinaire	6,2 8,7	Poses : <LQ* Effluent Rouen : <LQ* Eaux de surface (rural) : 171,5 [3]	3 [14, 15, 16]
<b>Apixaban</b> 	NACO U. humain	0,8 15,0	Poses : 0,1-0,9* Effluent Rouen : 1-5 *	0
<b>Dabigatran</b> 	NACO U. humain	4,2 12,9	Poses : 15-34* Effluent Rouen : 145-510*	0
<b>Rivaroxaban</b> 	NACO U. humain	1,0 13,4	Poses : 0,7-1,3 * Effluent Rouen : 11-21 *	0
<b>Abacavir</b> 	Anti-rétroviraux U. humain	5,04 15,4	Poses : <LD-59 * Effluent Rouen : <LD-24 * Effluent STEU: 26-33 [4,5]	1 [17]

Au total, sept composés pharmaceutiques provenant de 3 classes thérapeutiques ont été sélectionnés sur différents critères : (1) présence dans l'environnement, (2) toxicité suspectée même à faibles concentrations, (3) molécules dont les données concernant leur photodégradation étaient encore trop rares (Tableau 12). L'identification des produits de transformation a été réalisée à partir d'échantillons d'eaux ultrapures ou minérales artificiellement enrichies en composés. Pour chaque molécule étudiée, trois types d'échantillons ont été récoltés et étudiés :

- Un échantillon non irradié (temps initial ou T0) représentant le témoin.
- Des échantillons irradiés à différents temps : des temps à faible et fort taux de conversion afin de pouvoir discriminer des produits de transformations primaires des secondaires.
- Un échantillon placé dans la chambre d'irradiation mais protégé par un papier aluminium : témoin obscurité. Cet échantillon subit les variations thermiques qu'engendre la chambre d'irradiation.

## 2.2.2 Étude de la dégradation des contaminants en microcosmes

Le bouchon vaseux ou zone maximale de turbidité est une zone estuarienne présentant un potentiel réactionnel particulier combinant accumulation de matières en suspension et population bactérienne importante. Le rôle accélérateur ou inhibiteur de ce milieu récepteur particulier dans la dégradation des composés présents en sortie de STEU de Rouen a été étudié. Deux incubations *in vitro* d'eaux estuariennes mélangées à l'effluent de STEU ont été réalisées. Le protocole d'incubation utilisé a déjà été appliqué avec succès lors de précédentes thèses (Aminot, 2013; Lanoux, 2013).

### a. Prélèvements des échantillons

Deux types d'eaux estuariennes ont été comparés : Seine et Garonne. En Seine, les concentrations MES varient entre 0.1 et 1 g.L<sup>-1</sup> (Lesourd et al., 2016). En Garonne estuarienne, la concentration en MES dépasse fréquemment 1 g.L<sup>-1</sup> dans les eaux de surface et peuvent atteindre 10 g.L<sup>-1</sup> dans le fond de la colonne d'eau (Etcheber et al., 2007). La quantité et la qualité de MES retrouvés en Seine et en Garonne sont différentes et vont influencer la pénétration de lumière, la composition de la matière organique et la présence et le type de microorganismes.

Environ 80 L de l'effluent de la STEU de Rouen ont été prélevés pour alimenter les différents aquariums. Un échantillon ponctuel a été prélevé manuellement en sortie de traitement dans des flacons de 25 L en polypropylène haute densité. Pour réaliser ces expériences, un prélèvement de 100 L de chaque bouchon vaseux a été nécessaire. Le bouchon vaseux de la Seine a été récolté le 12 Juillet 2015 au niveau du pont de Tancarville

(49°28'30.19"N ; 0°27'48.64"). Les échantillons ont été prélevés dans des bouteilles ambrées de 5 L préalablement calcinées. Le bouchon vaseux de la Garonne a été prélevé au niveau de Bègles, le 28 septembre 2015, à mi-jusant, durant un fort coefficient de marée.

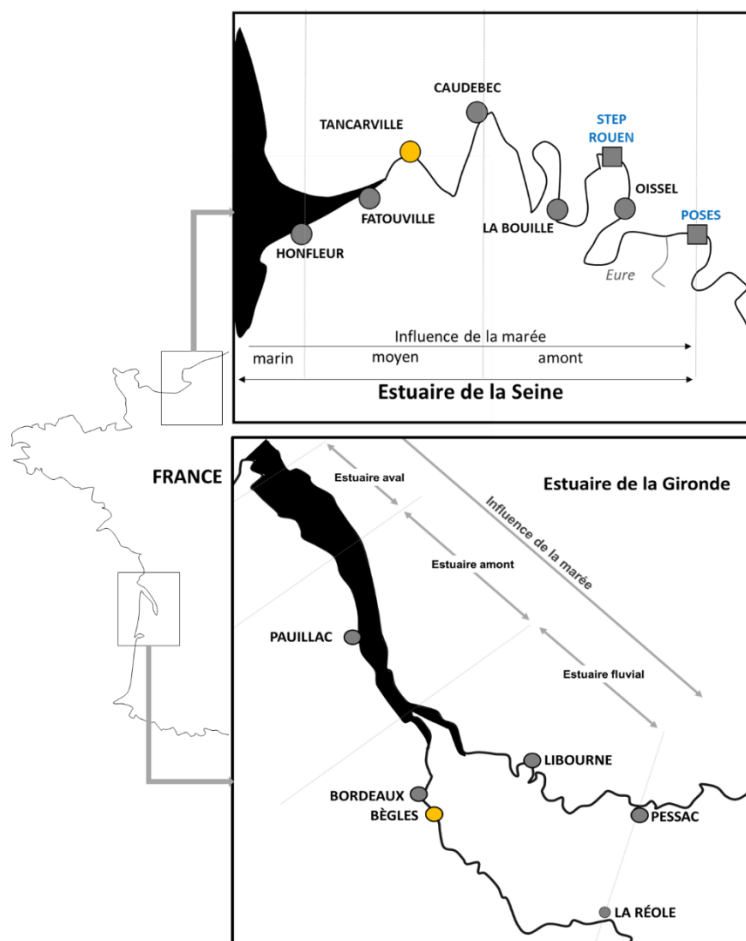
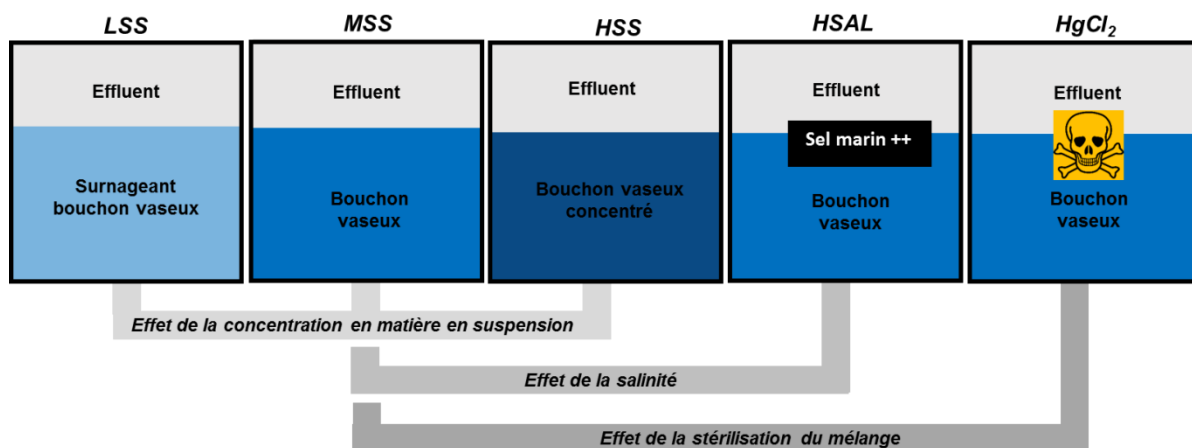


Figure 27 : Sites de prélèvement des eaux de bouchon vaseux (en jaune) prélevées en Seine et en Gironde.

### b. Préparation préliminaire et description des conditions expérimentales

Les eaux prélevées en Seine et en Garonne ont été dans un premier temps laissées à décanter quelques heures dans le but de récupérer un surnageant et un concentrât afin d'alimenter respectivement les conditions LLS et HSS (Figure 28). Les aquariums MSS, HSAL et HgCl<sub>2</sub> ont été préparés avec les concentrations originelles en matières en suspension (MES) des bouchons vaseux prélevés et sans phase de décantation. L'ajout de 100 mg.L<sup>-1</sup> de chlorure mercurique dans l'aquarium HgCl<sub>2</sub> a permis d'obtenir un contrôle stérile. Cette procédure de stérilisation a déjà été appliquée avec succès dans différents études (Yu et al., 2006). Dans la condition HSAL, du sel marin a été ajouté jusqu'à obtenir une salinité de 5‰.





**Figure 28** : Résumé des conditions expérimentales mises en place lors des expériences d'incubation en présence des bouchons vaseux de la Seine et de la Gironde.

### c. Dispositif et déroulement de l'expérimentation

L'étude de dégradation en présence de bouchon vaseux a été conduite dans des aquariums en verre de 25 L. L'oxygénation de l'eau est régulée par un bullage d'air en continu et une homogénéisation de la masse d'eau par un système de brassage. L'ensemble de l'expérimentation a été réalisée à l'obscurité et dans une pièce thermostatée à 20°C. Un suivi quotidien de la température (T°C), salinité (Sal), oxygène dissous et du pH, a été réalisé durant les 21 jours d'incubation sans aucun renouvellement d'eau. Des prélèvements d'eau (3 L) ont été effectués 10 min après le mélange initial (T<sub>0</sub>), et après 7, 14, 17 et 21 jours d'incubation, temps représentatifs des temps de résidence de l'eau dans l'estuaire à des périodes de haut et bas débits. Ces 50 échantillons ont ensuite été répartis en différentes filières analytiques : analyses chimiques ciblées (pharmaceutiques et pesticides) et bioessais *in vitro* (réalisés par INERIS et TOXEM). Pour compléter les données obtenues, des analyses de la matière organique dissoute (carbone organique dissous et mesures de fluorescence et absorbance UV) ont été conduites à tous les temps prélevés et pour chaque aquarium par Edith Parlanti (EPOC-LPTC).

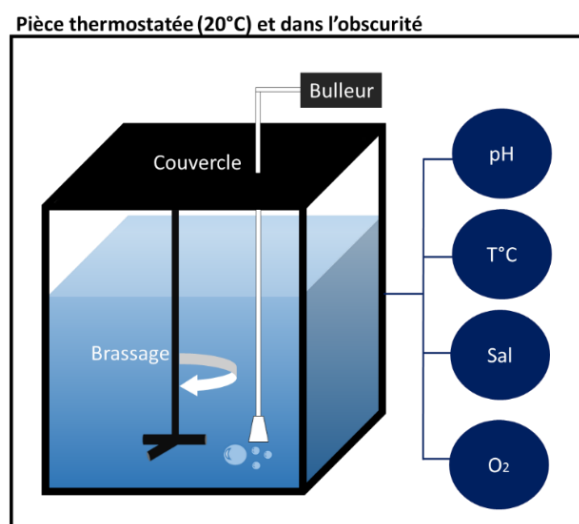


Figure 29 : Dispositif expérimental schématisé.

### 3. Stratégies de caractérisation des échantillons

En fonction de différentes questions posées au cours de ce travail, les échantillons prélevés ont subi en parallèle différents traitements (Figure 30) dans le but (1) de déterminer les concentrations de contaminants cibles (analyses chimiques ciblées) ; (2) d'identifier de façon qualitative la présence de molécules (analyses non ciblées) ; (3) d'évaluer la présence de molécules biologiquement actives (bioessais *in vitro*).

Les méthodes utilisées pour l'identification, la détection et la quantification des molécules organiques sont regroupés au sein de la même section (paragraphe 4) qui rend compte des techniques utilisées dans le cadre des approches ciblées et non ciblées. L'ensemble de la stratégie pour évaluer la présence des molécules actives (bioessais) est décrite dans le paragraphe 5.

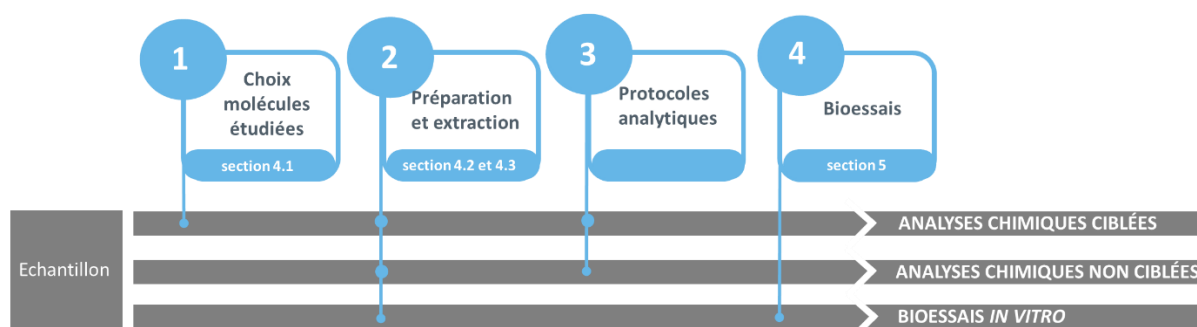


Figure 30 : Représentation schématique du traitement des échantillons en fonction du type d'analyses réalisées (chimiques ciblées et non ciblées, bioessais). Chaque partie sera abordée en détail dans les sections suivantes.

## 4. Détection, identification et quantification des contaminants organiques

### 4.1 Choix des molécules ciblées et vision d'ensemble des procédures d'analyses

Les études réalisées se sont focalisées sur la recherche de contaminants plutôt polaires en phase dissoute. Les composés ciblés ont été sélectionnés en raison de différents critères comme l'absence de données d'occurrence, des usages au niveau régional ou national, propriétés chimiques, données écotoxicologiques. Les données ont été notamment obtenues par le biais de bases de données externes telles que le portail substances chimiques INERIS (<http://www.ineris.fr/substances/fr/>) ou la base de données EMPODAT du réseau NORMAN (<http://www.normandata.eu/empodat/>). Les molécules ont également été sélectionnées à cause de leur présence dans différents hydrosystèmes européens (Fent et al., 2010; López-serna et al., 2012; Dévier et al., 2013; Belles et al., 2014b; Gonzalez-Rey et al., 2015; Aminot et al., 2016; Mailler et al., 2017; Neale et al., 2017) et différents exercices de priorisation (Götz et al., 2010; Dulio et Von der Ohe, 2013; Kuzmanovi et al., 2014; Malaj et al., 2014; Tsaboula et al., 2016; Tousova et al., 2017). Le choix s'est également orienté sur des molécules déjà intégrées à différentes listes de surveillance de l'ONEMA (Botta et Dulio, 2012), de l'AFFSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2008) ou encore aux listes de suspects de l'Union Européenne (Figure 31). Une première liste de 200 molécules a été établie incluant des molécules mères et certains produits de transformations associés. Un grand nombre des molécules ciblées fait partie des composés d'intérêts décrites au niveau européen comme prioritaires, d'intérêts émergents ou encore pertinentes à surveiller (Figure 31). Ces composés se découpent en quatre grandes classes : les composés pharmaceutiques (130), les pesticides-biocides (64) et les filtres UV (6).

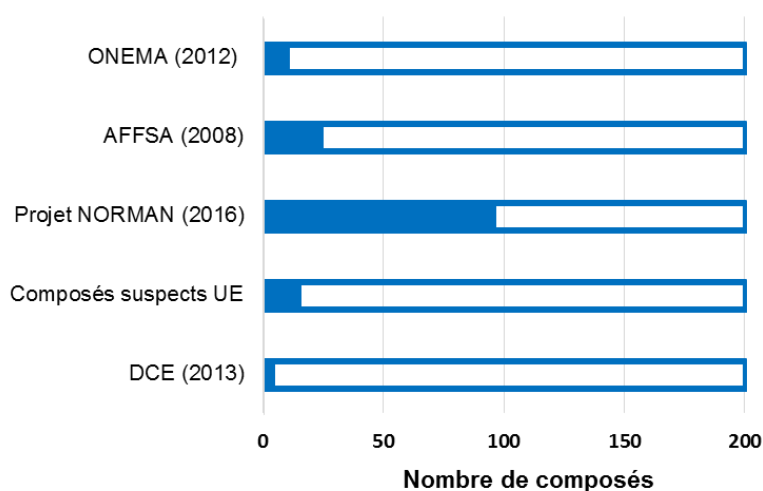


Figure 31 : Nombre des molécules qui ont été recherchées et qui sont incluses dans les listes de surveillance de directives, programmes français et européens.

Les composés pharmaceutiques sélectionnés incluent des molécules à usage médical et vétérinaire provenant de plus de 19 classes thérapeutiques différentes. Les 64 pesticides et biocides étudiés comprennent des fongicides, insecticides, et herbicides qui peuvent être répartis en fonction du type d'usage (agricole, biocides ou interdit). Les produits biocides (stricts) sont employés pour un usage urbain sous forme, par exemple, de désinfectant, de produits antiparasitaires ou de produits de revêtements (peinture anti-salissures). En raison du nombre important de molécules sélectionnées, différentes stratégies analytiques ont été utilisées. Au total, les 200 molécules sont divisées en 10 groupes correspondants aux 10 procédures analytiques employées (Tableau 13).

**Tableau 13 : Résumé des différentes filières analytiques utilisées en fonction des groupes de molécules ciblées.**

	Groupes (nombre de composés)	Méthode d'extraction	Séparation -détection	Quantification	Axes	Réf.
Pharmaceutiques	Groupe 1 (54)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1, 2	Aminot et al., (2015)
	Groupe 1-a (8)	Injection directe	LC-MS/MS	EI	2	-
	Groupe 2 (2)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1	Dévier et al., (2013)
	Groupe 3 (5)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1	Dévier et al., (2013)
	Groupe 4 (65)	SPE classique	LC-MS/MS	EE+EI	1	Capdeville (2001)
Pesticides / biocides	Groupe 5 (3)	Injection directe	LC-MS/MS	AD	1, 2	-
	Groupe 6 (56)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1, 2	Belles et., (2013)
	Groupe 6-a (9)	SPE en ligne	LC-MS/MS	EI	2	-
	Groupe 7 (2)	Injection directe	LC-MS/MS	EI	1, 2	-
	Groupe 8 (4)	SPME en ligne	GC-MS/MS	EI	1, 2	Le Coadou et al., (2016) ; Cruz (2015)
FUV	Groupe 9 (2)	SPE classique	LC-MS/MS	EE	1, 2	Aquaref (2008)
	Groupe 10 (6)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1	Aminot (2013)
	Non ciblée	SPE classique	bioessais <i>in vitro</i> + LC-QTOF	-	1,2,3	Creusot el al., (2013)

**SPE** : extraction sur phase solide ; **SPME**: microextraction sur phase solide ; **LC** : chromatographie en phase liquide ; **GC** : chromatographie en phase gazeuse ; **MS/MS** : spectrométrie de masse en tandem ; **QTOF** : quadripôle/temps de vol ; **EI** : étalonnage interne, **EE** : étalonnage externe, **AD** : ajouts dosés, **FUV**: filtres ultra-violets

L'ensemble de ces molécules a été recherché pour apporter une vision large des contaminants apportés en estuaire de Seine. Cette liste de 200 molécules a été utilisée dans l'axe 1 (apport en contaminants émergents en Seine, chapitre III) puis réduite lors de l'axe 2 (chapitre IV). L'axe 3 (chapitre V) se focalise plutôt sur des méthodes dites non ciblées ou dirigée par les effets. Du fait du nombre important d'eaux échantillonnées dans le cadre de l'étude des cycles de marée, une sélection des molécules les plus pertinentes a été réalisée

afin d'utiliser des méthodes dites « haut débit » (injection directes, spe en ligne). Ainsi, les groupes 1-a et 6-a correspondent respectivement aux 8 pharmaceutiques et 9 pesticides qui ont été sélectionnées pour cette étude. La liste complète des molécules suivies ainsi que leur étalon interne est référencée Annexe 4.

## **4.2 Préparation des échantillons**

### **4.2.1 Prétraitement analytique des échantillons**

Les eaux ont été filtrées au laboratoire sur des unités en polyéthylène (Nalgène®) pour l'ensemble de molécules analysées, exceptée pour les eaux destinés à l'analyse des filtres UV qui ont été filtrées sur des unités en verre. Afin de séparer la phase dissoute de la phase particulaire, le seuil de coupure des membranes filtrantes était de 0,7 µm (GF/F, Whatman ; Fontenay-sous-Bois, France). Pour les échantillons les plus chargés en matière en suspension, une filtration préalable sur filtre en fibre de verre GF/A (seuil de coupure 1,6 µm) a été réalisée. Après filtration, l'ensemble des échantillons a été conservé à -18°C dans des flacons adaptés (verre ou polyéthylène haute densité).

### **4.2.2 Extraction sur phase solide (SPE)**

L'extraction sur phase solide est une méthode de préparation de l'échantillon permettant de concentrer les molécules d'intérêt dans un échantillon complexe. Le principe repose sur l'adsorption sélective des composés recherchés sur une phase stationnaire.

#### **Extraction sur phase solide classique (hors ligne)**

Six protocoles ont été utilisés pour extraire et concentrer l'ensemble des molécules ciblées (Tableau 14). Deux types de phases adsorbantes ont été choisis lors de travaux antérieurs (Capdeville, 2011; Belles, 2012; Dévier et al., 2013; Aminot et al., 2015; Le Coadou et al., 2016). La phase OASIS® HLB (hydrophylic-Lipophilic-Balanced) est composée d'un copolymère de divinylbenzène et de N-vinyl-pyrrolidone qui est adaptée pour l'extraction sur la large gamme de log  $K_{ow}$ . Une phase alternative a été utilisée dans le cas des composés pharmaceutiques à usage courant : phase échangeuse de cations (OASIS® MCX : *Mixed Cation eXchange*). Ces cartouches sont constituées d'une phase OASIS® HLB à laquelle un groupement sulfonate est greffé. Elles sont particulièrement adaptées pour l'extraction de molécules basiques ionisées à pH acide.

**Tableau 14 : Récapitulatif des différentes méthodes d'extraction sur phase solide.**

Classes	Groupes	Volume (ajustement pH)	Type de cartouche	Conditionnement	Elution
Pharmaceutiques "usage courant"	1,2,3	200 ml (pH 2)	OASIS® MCX 3cc 60 mg	3 ml acétate d'éthyle 3 ml eau MQ pH2	3 ml acétate d'éthyle 3 ml acétate d'éthyle/ acétone (50/50 ; v/v) 3 ml méthanol / dichlorométhane (50/50 ; v/v) + 5% hydroxyde d'ammonium
Pharmaceutiques "usage spécifique"	4	200 ml (pH 4)	OASIS® HLB 6cc 200 mg	5 ml acétonitrile 5 ml eau MQ pH7	5 ml eau MQ pH7 / acétonitrile (40/60 ; v/v)
Pesticides (multi-résidus)	6	100 ml (pH 2)	OASIS® HLB 3cc 60 mg	5 ml méthanol 5 ml eau MQ pH2	3 ml méthanol
Pesticides (GLY / AMPA)	9	5 ml (pH 3)	OASIS® HLB 3cc 60 mg	1 ml méthanol 1 ml eau MQ+0,1 % acide formique	2* 700 µl eau MQ/ méthanol ( 30/700) + 2% NH4O4
Filtres UV	10	200 ml (pH 2)	OASIS® HLB 6cc 200 mg	5 ml méthanol 5 ml eau MQ pH2	5 ml méthanol / dichlorométhane (50/50 ; v/v) 5 ml méthanol / dichlorométhane (50/50 ; v/v)
Non ciblées (tests <i>in vitro</i> )	-	200-1000 ml	OASIS® HLB 6cc 200 mg	5 ml dichlorométhane 5 ml méthanol 5 ml eau MQ	5 ml méthanol 5 ml méthanol / dichlorométhane (50/50 ; v/v) 5 ml dichlorométhane

### Extraction sur phase solide en ligne

Des méthodes de SPE en ligne ont été appliquées pour l'analyse des composés appartenant au groupe analytique 6-b. L'extraction par SPE en ligne a été réalisée à l'aide d'une pompe quaternaire (Agilent série 1260) et un support multi-cartouches (Agilent série 1200) directement couplé au système d'analyse (LC-MS/MS). Des cartouches Be-online SPE PLEXA (2.1\*12.5 mm\_3/pk), dont la phase est constituée d'un polymère de styrène-divinylbenzène hydrophilique, ont été utilisées pour l'extraction des pesticides.

#### 4.2.3 Micro-extraction sur phase solide (SPME)

Cette méthode d'extraction est basée sur l'affinité des composés recherchés sur une fibre recouverte d'une phase adsorbante. La SPME a été utilisée spécifiquement pour l'analyse du fipronil et de ses métabolites et avait fait l'objet de développements et validations lors de travaux de thèse antérieurs (Cruz, 2016; Le Coadou et al., 2016). Les échantillons (9 ml) ont été extraits après ajout d'un étalon interne. Les composés dissous sont adsorbés sur une fibre de polydiméthylsiloxane et polydivinylbenzène pendant 30 minutes à 50°C. Les composés sont ensuite désorbés thermiquement pendant 10 minutes à 250°C au niveau de l'injecteur du système de chromatographie en phase gazeuse.

#### **4.2.4 Extraction des composés à partir des échantillonneurs passifs de type POCIS**

La procédure d'extraction a été précédemment décrite par Creusot et al., (2014) et Tapie et al., (2011). Après ouverture des échantillonneurs, la phase OASIS® HLB a été récupérée et transférée dans des cartouches en verre munies de frittés en téflon préalablement lavés au méthanol. Après séchage, les composés adsorbés sur la phase ont été élués par 10 ml de méthanol, 10 ml méthanol/dichlorométhane (50/50, v:v) et 10 ml de dichlorométhane. L'éluât a été ensuite évaporé successivement au RapidVap® (Bioblock, Fontenay-sous-Bois, France) et sous flux d'azote à une température maximale de 45°C. Chaque extrait a été repris dans un volume de 200 µl de méthanol pour les bioessais et les analyses chimiques.

#### **4.3 Extraction et fractionnement dans le cadre de l'approche EDA**

Dans le cadre de l'approche EDA, l'extraction des composés doit être la plus exhaustive possible afin d'extraire toutes les molécules actives de l'échantillon. Par conséquent, une phase stationnaire capable de balayer une large gamme de coefficients de partage octanol/eau ( $\log K_{ow}$ ) a été utilisée afin de retenir le maximum de composés. Le détail de la procédure de conditionnement et d'éluion est décrit Tableau 14 (classes : non ciblées). L'éluât est ensuite évaporé, sans arriver à sec, dans un système d'évaporation automatique sous vide (RapidVap®, Bioblock, Fontenay-sous-Bois, France). L'évaporation est terminée manuellement sous flux d'argon. Afin d'éviter la dégradation et la perte de composés durant chaque étape d'évaporation, les extraits sont chauffés à une température maximale de 45°C. Afin de séparer les molécules actives, 100 µl d'extrait (80/20 v/v ; eau/acétonitrile) ont été fractionnés en 40 hyperfractions par un système de chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) équipé d'un collecteur automatique (Agilent série 1260 Infinity) et d'un détecteur à barrettes de diodes (Agilent série 1200). La séparation est réalisée à 30°C avec un débit de 1 ml.min<sup>-1</sup> et un gradient d'éluion eau/acétonitrile (Tableau 15).

Cette méthode de fractionnement a notamment été développée et validée au cours de deux travaux de thèse au sein du laboratoire (Creusot, 2011; Gardia-Parège, 2015). Ainsi, Les étapes de préparation d'échantillon (filtration, extraction sur phase solide, congélation) et fractionnement ont préalablement subi des étapes de développement et de validation qui sont entièrement décrits dans les travaux de thèse de Caroline Gardia-Parège (chapitre 4, p 103-119).

**Tableau 15 : Conditions de fractionnement par chromatographie en phase liquide haute performance.**

Fractionnement EDA		Gradient
<b>Volume injecté</b>	100 µl	
<b>Colonne</b>	greffée C18 Waters Spherisorb® C18, 5 µM, 250*4.6 mm	
<b>Phase éluante</b>	A : Eau ultra-pure B : Acétonitrile	
<b>Débit</b>	1 ml/min	
<b>Temps d'acquisition</b>	38 min	

Au total, 40 fractions ont été collectées et évaporées à sec avec un évaporateur automatique EZ-2 Plus (Genevac®, Fisher Scientific, Illkrich, France) et sous flux d'azote à 45°C. Chaque fraction a été reprise dans du méthanol puis a été répartie pour les différentes analyses : 100 µl pour la caractérisation chimique et 150 µl destinés aux bioessais. Finalement, 50 µl de chaque fraction sont récoltés dans un même flacon afin de reconstituer l'extrait global, appelé « pool », afin d'évaluer les pertes d'activités dues au processus de fractionnement. Les fractions destinées aux tests biologiques, ont été, de nouveau, évaporées sous flux d'azote puis reprises dans un solvant organique toléré par les organismes : le diméthylsulfoxyde (DMSO). Lors de chaque étape, un suivi gravimétrique de chaque fraction a été effectué.

Une solution étalon est injectée avant chaque fractionnement pour vérifier la répétabilité de la procédure de séparation et les temps de rétention de 9 composés (Figure 32). Pour assurer l'absence de contamination par les méthodes d'extraction et de fractionnement, différents blancs ont été réalisés :

- Un blanc « machine » : il s'agit d'un mélange eau et acétonitrile (80/20 ; v /v) qui subit le processus de fractionnement, afin de vérifier l'absence de contamination par le fractionnement en HPLC.
- Un blanc dit « procédure » qui subit l'ensemble de la procédure allant de la phase d'extraction et le fractionnement par HPLC.
- Un blanc DMSO



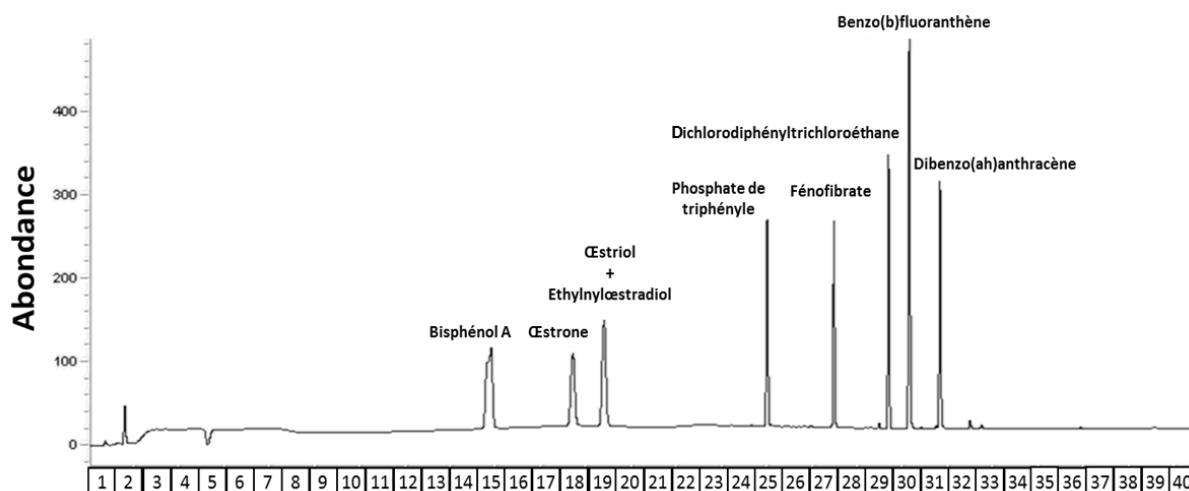


Figure 32 : Chromatogramme de référence pour le fractionnement en phase inverse.

#### 4.4 Approche ciblée

##### 4.4.1 Méthodes instrumentales et retraitement des données

La majorité des molécules étudiées ont été analysées par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Seuls le fipronil et ses métabolites (groupe 8) ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem. L'ensemble des données ont été retraités avec le logiciel *MassHunter Quantitative* (Agilent Technologies) et *MassLynx* (Waters). L'identification des composés dans les échantillons est validée grâce à différents critères qui doivent être identiques entre les échantillons et la solution étalon : (1) Temps de rétention, (2) rapport entre les transitions de quantification et de confirmation. Différents instruments analytiques ont été utilisés dans le cadre de ces travaux, l'ensemble des appareils utilisés est décrit dans le Tableau 16. Le détail des conditions de séparation et de détection est récapitulé dans l'Annexe 4 et sont décomposées par groupe analytique.

Tableau 16 : Récapitulatif des systèmes de séparation et de détection employés.

	Séparation	Détection	Groupe analytique
CL	Agilent Infinity 1290	Triple quadropole 6490 (Agilent)	1-a, 5, 6-a, 7, 10, 11
	Agilent Infinity 1290	Triple quadropole 6460(Agilent)	6, 9
	Agilent Rapid Resolution Liquid chromatography 1200	Triple quadropole 6410 (Agilent)	1, 4
	Acquity Ultra Performance liquid chromatography (Waters)	Acquity Quattro Premier Triple quadropole mass spectrometer (Waters)	2, 3
CG	Agilent 7890A	Triple quadropole 7000A (Agilent)	8

## 4.4.2 Méthodes de quantification

Lors de ce travail, différentes méthodes de quantification ont été appliquées pour les 200 molécules suivies (Tableau 13). Le principe de chacune de ces méthodes de quantification est décrit Figure 33.

**L'étalonnage externe** (Figure 33 a) est la méthode de quantification la plus simple. Elle est basée sur la relation de proportionnalité entre l'aire chromatographique et la concentration d'un composé. Ainsi, la droite d'étalonnage réalisée dans la gamme de concentration visée permet de convertir la réponse du détecteur en concentration. Cependant, cette méthode ne tient en compte ni des pertes potentielles de composés lors de la préparation des échantillons, ni de l'impact de la matrice sur la réponse de l'analyte.

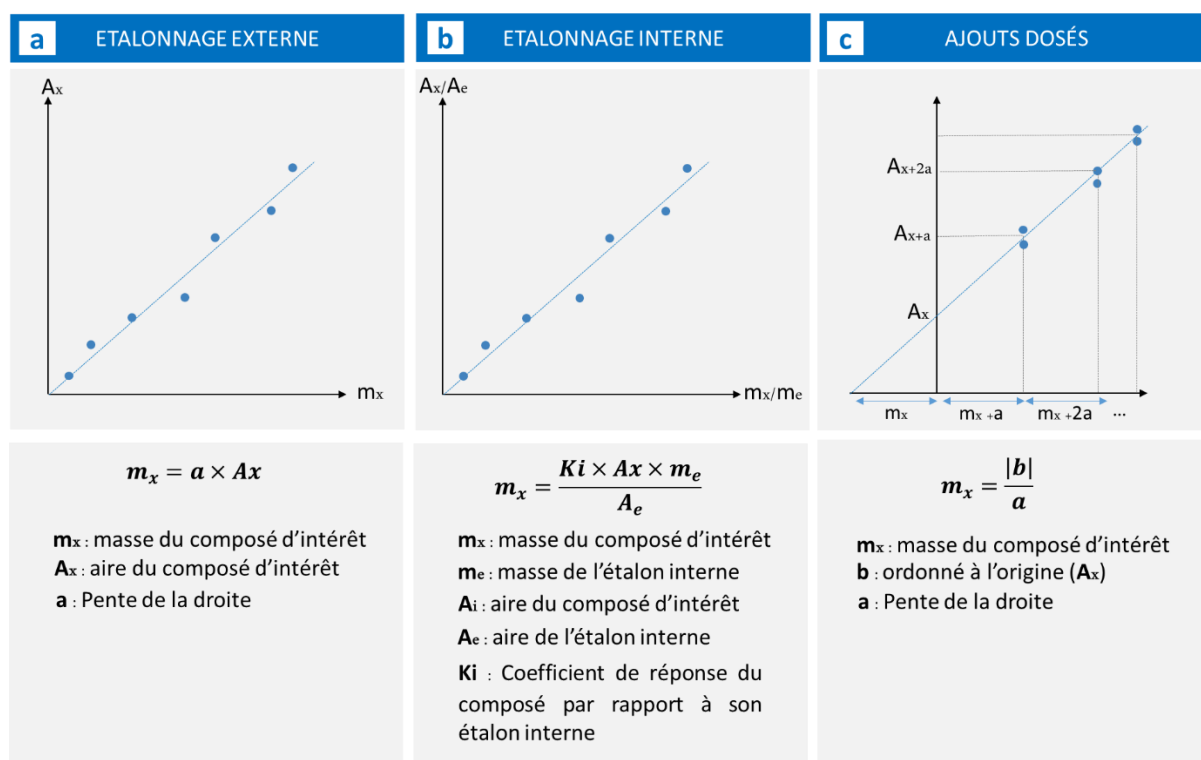


Figure 33 : Récapitulatif du principe des méthodes de quantification utilisées.

Le choix de la méthode de quantification majoritaire s'est porté sur **l'étalonnage interne**. Cette méthode permet de quantifier le composé d'intérêt grâce à l'ajout d'un traceur isotopiquement marqué et non présent dans l'environnement. L'étalon interne choisi doit également avoir des propriétés physico-chimiques proches de celles du composé à quantifier. L'injection d'une solution de référence contenant des quantités connues du composé et de l'étalon interne associé permet de calculer un coefficient de réponse ( $K_i$ ). Il est alors possible de doser le composé contenu dans l'échantillon en se basant sur la quantité d'étalon interne

ajoutée et le coefficient de réponse du composé par rapport à son analogue marqués (Figure 33 b).

**La méthode des ajouts dosés** repose sur l'analyse de l'échantillon seul dans un premier temps, puis avec des supplémentations connues en composés à doser. Les ajouts réalisés doivent être dans une gamme de concentrations voisines de celle initialement présente dans l'échantillon. Un droite décrivant l'évolution de l'aire en fonction de la masse de composé ajoutée dans l'échantillon permet de définir (Figure 33 c) l'ordonnée à l'origine qui est directement liée à la masse initiale en analyte. Cette méthode a été utilisée seulement pour les nouveaux anticoagulants (apixaban, rivaroxaban et dabigatran) en raison de l'absence d'étalon interne disponible.

#### 4.4.3 Qualité des analyses et synthèse des performances analytiques

##### d. Démarche globale

Afin d'assurer la qualité des démarches analytiques, différents niveaux de prévention et points de contrôle ont été appliqués. Avant toute manipulation, la verrerie utilisée est lavée au détergent, rincée à l'eau ultra pure et calcinée à 450°C. Toutes les matrices, étalons analytiques et étalons internes ont été contrôlés par gravimétrie.

A l'échelle de la phase d'analyse, les performances instrumentales (limite de détection et justesse de quantification ont été évaluées). Pour cela, une solution de référence de concentrations connues et proches des limites de détection ciblées est injectée. L'injection des solutions permet d'évaluer :

- le rapport signal sur bruit pour chaque molécule avec la méthode dite « peak to peak » qui prend la valeur de bruit maximale sur une plage de temps de 0,1 min. Le signal sur bruit permet de calculer les **limites de détection et de quantification instrumentales** (LDI et LQI) de chaque molécule.
- le **rendement de quantification instrumentale** pour chaque molécule. La quantité de composés est calculée en fonction de la méthode de quantification. Le rapport de la quantité calculée par rapport à la quantité réelle correspond au pourcentage de justesse de quantification.

Le suivi d'une carte de contrôle a permis de caractériser l'évolution du système analytique en renseignant pour chaque molécule et méthode analytique, le coefficient de réponse (en cas d'étalonnage interne), les aires des analytes et les limites de détections et de quantification. L'injection de blancs d'injection permet de suivre l'évolution de la contamination qui pourrait potentiellement être apportée par le système analytique.

A l'échelle de l'ensemble de la procédure, deux types de contrôles sont effectués pour chaque série d'analyse pour évaluer **les performances analytiques** et les contaminations :

- **La justesse de quantification de la procédure** : un échantillon de contrôle (eau minérale artificiellement enrichie en composés et étalons internes) et un blanc suivant l'ensemble de la procédure. L'eau minérale en bouteille de verre (Grand Source, Vittel) a été utilisée comme eau de référence dans les échantillons contrôles. En effet, cette matrice permet de simuler de potentiels effets matriciels résultant des fortes concentrations en minéraux.
- **Un blanc dit de procédure** qui permet d'évaluer l'apport potentiel en analytes lors de la procédure analytique.
- Les **limites de quantification de la procédure** (LDP et LQP) : Pour les analytes non détectés dans le blanc de manipulation, elles sont déterminées à partir de l'échantillon de contrôle.

**e. Synthèse des analyses réalisées et limites de quantification obtenues.**

Le Tableau 17 dresse la synthèse des analyses ciblées réalisées dans le cadre de ces travaux au niveau de l'estuaire de Seine et des expériences menées en laboratoire. L'ensemble des performances analytiques est décrit Annexe 5.

**Tableau 17 : Synthèse du nombre d'échantillons analysés et du nombre de molécules recherchées.**

	Site	Ponctuel / moy. 24h	POCIS	Nombre de molécules suivies	Groupe analytique	
<i>In-situ</i> Seine	<b>Caractérisation apports</b>	STEU Rouen	6	1	200	1-11
		Poses	6	2	200	1-11
	<b>Niveaux de contamination Estuaire amont</b>	Caudebec	6	6	25	1, 6, 3, 8
		La Bouille	6	6	25	1, 6, 3, 8
		Oissel	6	6	25	1, 6, 3, 8
	<b>Niveaux de contamination Estuaire aval</b>	Caudebec	3	-	110	1, 6
		Fatouville	3	-	110	1, 6
		Honfleur	3	-	110	1, 6
	<b>Impact cycle de marée</b>	Caudebec	21	-	17	1a, 6a
		Tancarville	27	-	17	1a, 6a
	Fatouville	27	-	17	1a, 6a	
	Honfleur	27	-	17	1a, 6a	
En laboratoire	<b>Incubation Seine</b>	Seine + Effluent	25	-	115	1, 2, 6, 8, 9
	<b>Incubation Garonne</b>	Garonne+ Effluent	25	-	115	1, 2, 6, 8, 9
	<b>Photodégradation</b>	Effluent Rouen	4	-	117	1, 2, 4, 5 6a, 8, 9

Une synthèse des limites de quantification (LQP) des 200 molécules recherchées dans les échantillons d'eau est présentée Figure 34. Le détail des LQP obtenues pour chaque protocole analytique est détaillé Annexe 5. Les analyses réalisées sont cohérentes avec des analyses ultra-traces : plus de 162 molécules possèdent des limites de quantification inférieures à 5

ng.L<sup>-1</sup>. Seulement 18 composés ont des limites de quantification comprise entre 10 et 100 ng.L<sup>-1</sup>.

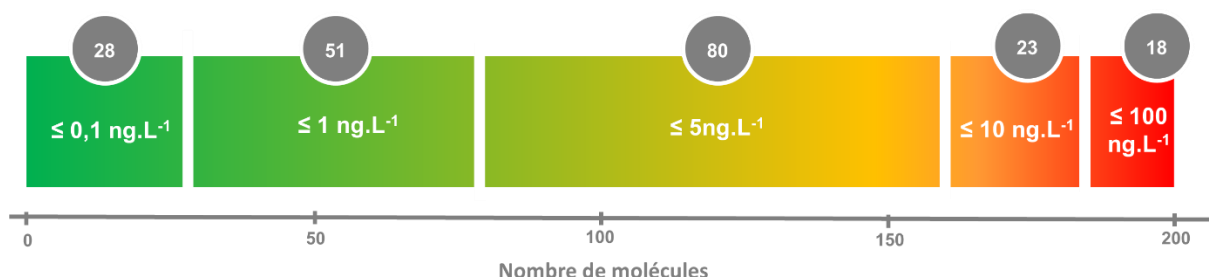


Figure 34 : Récapitulatif des limites de quantification (LQP) obtenues sur les échantillons d'eau. Les cercles gris indiquent le nombre des molécules concernées.

Dans le cadre de l'étude de la contamination de l'estuaire amont (Oissel, La Bouille, Caudebec), 20 molécules « traceurs » (pesticides et pharmaceutiques) ont été recherchées dans les échantillonneurs passifs. Les limites de quantification atteintes par POCIS (exprimées en ng.g<sup>-1</sup> de phase) peuvent être extrapolées en LQ en ng.L<sup>-1</sup> en utilisant la formule suivante :

$$LQ_{\text{extrapolée}} = \frac{LQ_{\text{POCIS}} \times m_{\text{phase}}}{R_s \times t}$$

Où  $LQ_{\text{extrapolée}}$  : limite de quantification extrapolée (ng.L<sup>-1</sup>) ;  $LQ_{\text{POCIS}}$  : limite de quantification avec le POCIS (ng.g<sup>-1</sup>) ;  $m_{\text{phase}}$  : masse de phase receptrice présente dans le POCIS (0,2 g),  $R_s$  : taux d'échantillonnage moyen (L.j<sup>-1</sup>) et  $t$  : temps d'exposition (jour).

Seul l'ibuprofène possède une limite de quantification supérieure à 1 ng.L<sup>-1</sup>. L'ensemble, des autres molécules recherchées, possède des LQ comprises entre 0,004 et 1 ng.L<sup>-1</sup>.

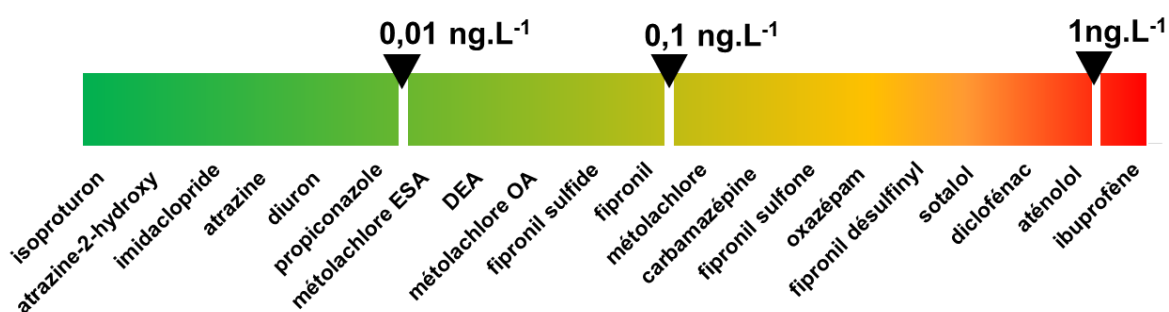


Figure 35 : Récapitulatif des limites de quantification (ng.L<sup>-1</sup>) extrapolées obtenues sur les échantillonneurs passifs.

L'étude de la dynamique de la contamination au cours des cycles de marée a été évaluée sur une liste réduite comprenant 8 médicaments et 8 pesticides « traceurs ». Au vu du nombre important d'échantillons, des méthodes en ligne ont été appliquées. Ainsi, les 17

molécules ont été analysées par injection directe ou SPE-en ligne-LC-MS/MS (protocoles 1a et 6a). Une synthèse des limites de quantification obtenues est présentée Figure 36.

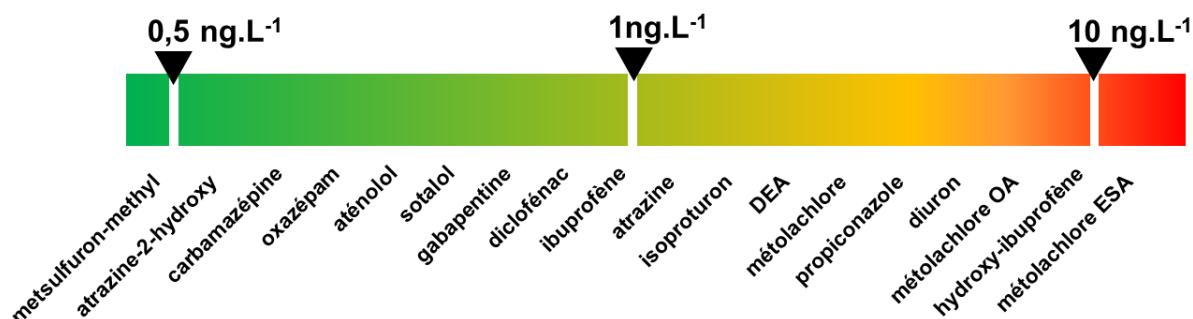


Figure 36 : Récapitulatif des limites de quantification obtenues sur les échantillons ponctuels récoltés durant les campagnes DYANOSEINE.

#### 4.5 Approche non ciblée par spectrométrie de masse haute résolution

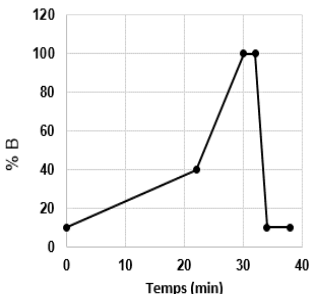
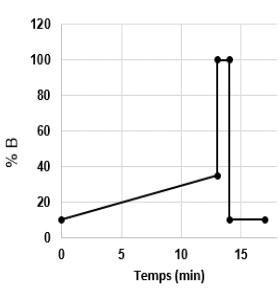
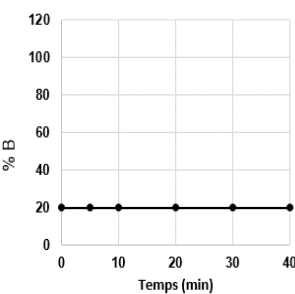
La spectrométrie de masse haute résolution a été employée pour :

- Identifier les produits de phototransformation générés dans les expériences d'irradiation simulées dans des matrices artificiellement reconstituées (chapitre V).
- Rechercher des produits de transformations préalablement identifiés dans des extraits environnementaux par des méthodes dites de recherche de suspects (chapitre V).
- Identifier les molécules biologiquement actives dans les extraits ou fractions dans le cadre de l'approche dirigée par les effets (chapitre V).

##### 4.5.1 Appareillage et méthodes analytiques

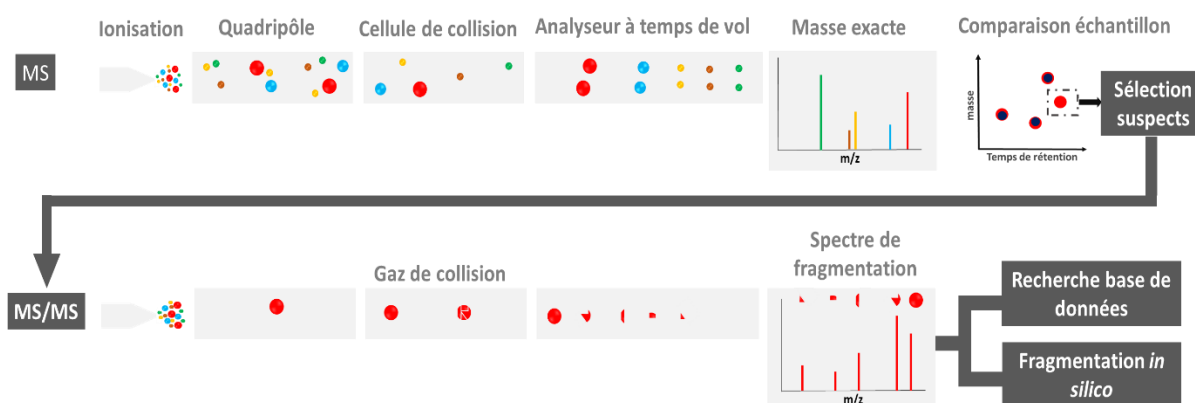
Les analyses ont été réalisées par chromatographie en phase liquide haute performance couplée à un Q-TOF (6450, Agilent technologies, Santa Clara, USA). Les molécules sont, dans un premier temps, séparées suivant différents protocoles chromatographiques, en fonction des matrices et des molécules étudiées. L'ensemble des paramètres est résumé Tableau 18. Après séparation, les molécules ont été ionisées par électro-nébulisation couplée à un gaz gainant (Agilent Jet Stream, ESI).

**Tableau 18 : Récapitulatif des méthodes chromatographiques appliquées en LC-QTOF.**

	Fractions / extraits + Photoproduits ABA	Photoproduits NACO(s)	Photoproduits FQs
<b>Volume injecté</b>	2 µl	5 µl	5 µl
<b>Colonne</b>	Kinetex® C <sub>18</sub> , 100 x 2,1 mm, 1,7 µm (Phenomenex)	Kinetex® C <sub>18</sub> , 100 x 2,1 mm, 1,7 µm (Phenomenex)	Nucleosil® C <sub>18</sub> Nautilus, 250 x 4.6 mm, 5 µm (Macherey-Nagel)
<b>Phase éluante</b>	A : Eau ultra-pure (± 0,1 % acide formique) B : Acétonitrile (± 0,1 % acide formique)	A : Eau ultra-pure (± 0,1 % acide formique) B : Acétonitrile (± 0,1 % acide formique)	A : Eau ultra-pure + 0,1 % acide formique B : Méthanol + 0,1 % acide formique
<b>Débit</b>	0,3 ml/min	0,5 ml/min	0,2 ml/min
<b>Gradient</b>			
<b>Temps d'acquisition</b>	38 min	17 min	40 min

L'ensemble des analyses a été effectué avec un spectromètre de masse hybride quadripôle/temps de vol (i.e. quadrupole/ time of flight, Q-TOF) qui permet d'allier sélectivité et résolution. L'utilisation du Q-TOF en temps qu'analyseur à temps de vol (mode MS) permet d'obtenir la masse exacte ( $\pm 5$  ppm) et la formule brute de chaque molécule présente (Figure 37). L'utilisation en tandem des deux analyseurs (mode MS/MS) permet de sélectionner et fragmenter les molécules d'intérêt afin d'obtenir leurs spectres de fragmentation et des informations sur leur structure. Ces deux modes d'acquisition ont été utilisés soit simultanément dans un mode données-dépendant (i.e. « auto-MS/MS »), ou en deux injections (d'abord MS puis MS/MS). Pour les échantillons les plus complexes (comme les fractions EDA), le mode données-dépendant a été utilisé de façon préférentielle en raison du nombre important d'information qu'il permet de récolter (sur une molécule en une seule acquisition).

Effectuant à la fois le mode MS et MS/MS, le temps de cycle doit être optimisé pour obtenir des données fiables pour l'identification mais également des informations sur le maximum d'ions détectés. Un cycle d'acquisition par ion trop important engendre une perte d'information sur les autres ions présents. Cette méthode nécessite donc d'effectuer un compromis entre la précision de la masse exacte de l'ion précurseur et celles des fragments. Le choix s'est basé sur les travaux antérieurs réalisés par Caroline Gardia-Parège (2014) et s'est porté sur l'acquisition de 1 à 3 spectres/seconde. Pour chaque cycle, 2 ions précurseurs les plus intenses sont sélectionnés pour la fragmentation.



**Figure 37 : Représentation simplifiée de l'analyse en Q-TOF.**

L'acquisition des spectres par le détecteur a été réalisée à une fréquence de 2 GHz sur une gamme de masse de 70 à 1700  $m/z$ . Les ions précurseurs ont été fragmentés à différentes énergies de collision allant de 10 à 40 eV. Afin de prévenir toute dérive en masse, un composé de référence a été infusé en continu durant l'acquisition (HP-921 = hexakis (1H, 1H, 3H-tétrafluoropropoxy)-phosphazine ;  $[M+H]^+$  921,009798  $m/z$  et  $[M+HCO_2]$  926,000725  $m/z$ ). Les paramètres de la source ont été développés lors des travaux de thèse de Gardia-Parège en 2015 et sont résumés Tableau 19.

**Tableau 19 : Paramètres de la source d'ionisation utilisés pour les analyses en QTOF.**

		Mode d'ionisation positif	Mode d'ionisation négatif
Température du gaz de solvation	(°C)	300	300
Débit du gaz de solvation	( $ml.min^{-1}$ )	8	8
Pression de nébulisation	(psi)	40	40
Température du gaz fourreau	(°C)	400	400
Débit du gaz fourreau	( $ml.min^{-1}$ )	11	11
Tension du capillaire	(V)	3000	3000
Tension du "Nozzle"	(V)	0	1500

#### 4.5.2 Assurance qualité des analyses non ciblées

Avant chaque analyse, différents niveaux de contrôle sont réalisés afin de contrôler l'exactitude de la mesure en masse, la résolution et les limites de détection. Tout d'abord, l'exactitude en masse est vérifiée par l'infusion de molécules de référence (calibrant) dont les masses exactes sont connues. Cet élément est directement dépendant de la calibration du TOF. Une solution étalon contenant 43 composés en ESI<sup>+</sup> et 11 composés en ESI<sup>-</sup> est injectée avant chaque analyse dans le but de vérifier les temps de rétention et les limites de détection instrumentale. Dans le cas de l'identification des produits de transformation (abacavir, ofloxacin, sarafloxacin, danofloxacin, dabigatran, rivaroxaban, apixaban) une deuxième solution contenant les étalons analytiques des molécules mères a été également injectée en début et fin de chaque analyse afin de vérifier la stabilité des performances (erreur en masse, limites de détection et temps de rétention).



### 4.5.3 Retraitement et stratégie d'identification

Après l'acquisition des données, une première phase de retraitement a été effectuée sur le logiciel *MassHunter Qualitative* (Agilent technologie). La démarche globale d'identification est décrite Figure 38.

Les caractéristiques moléculaires des ions possédant une intensité 10 fois supérieures au bruit de fond ont été recherchées et extraites par l'algorithme de la fonction MFE (*Feature by Molecular Extraction*). Avant le lancement de l'algorithme, différents paramètres comme l'état de charge maximum, la présence potentielle d'adduits, la formation de molécules protonées sont préalablement renseignées. Cette première phase permet d'obtenir les caractéristiques de base des ions présents comme masse et amas mono-isotopiques, intensité, état de charge.

À partir de ces informations, les formules brutes sont établies automatiquement en utilisant les atomes suivant : C, H, N, O, S, F, P, Cl, Br. Dans le cas de l'identification des produits de transformation dans des matrices simples, la liste des atomes utilisés a été ajustée en se basant sur la formule brute de la molécule mère. Seules les formules obtenant un score supérieures à 70% sont générées. Ce score compare la masse obtenue expérimentalement à celle calculée à partir de la formule générée. Afin de sélectionner les composés d'intérêt, c'est-à-dire qui ne sont pas présents dans les blancs protocoles et dans le cas des expériences d'irradiation solaire dans les temps avant irradiation ou témoin obscurité. Pour cela la liste des ions présents dans les blancs et les témoins sont comparés à celle des ions de l'échantillon d'intérêt grâce à l'utilisation du logiciel MassProfiler (Agilent Technologies). Cette étape est indispensable pour évaluer les ions pertinents à fragmenter qui sont présents uniquement dans l'échantillon d'intérêt. Dans le cas des expériences de photodégradation, l'échantillon irradié est également comparé au témoin obscurité et au temps initial afin de ne sélectionner que les photoproduits générés.

Après fragmentation des ions d'intérêt, les spectres de fragmentation ont été comparés à différentes bases de données spectrales : base de données interne au laboratoire, Metlin et MassBank (libre-service) et Forensic (privée). Si aucune correspondance n'est trouvée, des logiciels de fragmentation *in silico* sont utilisés afin d'obtenir des informations complémentaires sur la structure des composés et réduire le nombre de suspects, comme *MetFrag* (<https://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/>).

L'étape ultime de confirmation consiste à injecter dans les mêmes conditions, l'étalon analytique (s'il est commercialement disponible) et l'échantillon. L'identification est confirmée si le temps de rétention chromatographique, la masse exacte et le spectre de fragmentation correspondent.

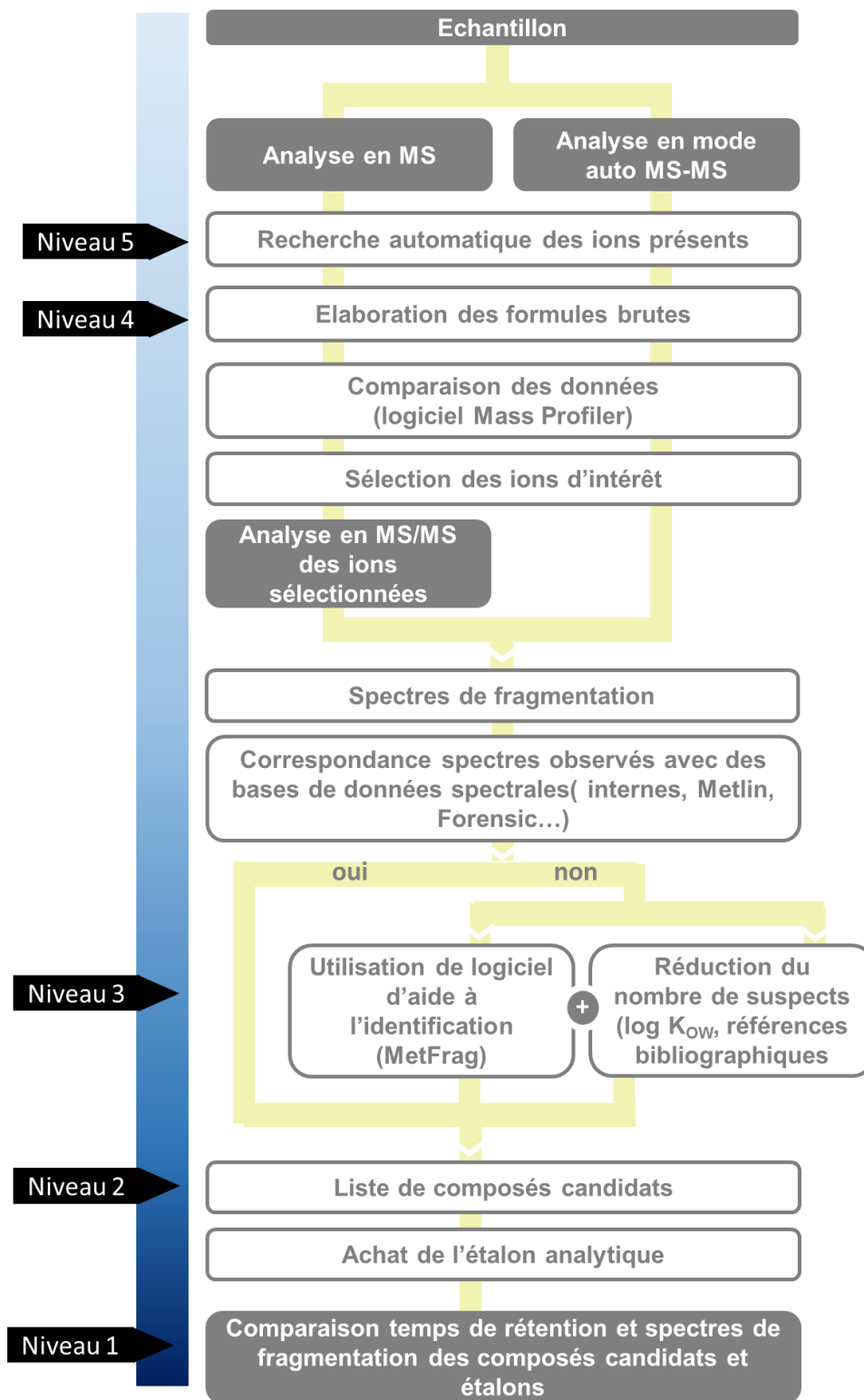


Figure 38 : Stratégie d'identification en LC-QTOF (Gardia-Parège, 2015) et échelle de niveau d'identification des composés (Schymanski et al., 2015).

## 5. Évaluation de la présence de molécules actives

### 5.1 Présence de composés œstrogéniques et de type dioxine-like

#### 5.1.1 Principe

Les activités biologiques ont été évaluées grâce à l'utilisation de bioessais *in vitro* basés sur l'induction d'un rapporteur suite à la fixation d'une molécule sur le récepteur. L'ensemble des tests cellulaires, basés sur l'expression de gènes rapporteurs ont été réalisés sous la direction de M. Selim Aït-Aïssa (INERIS-ECOT (60)) dans le cadre du projet TOXLIX. Deux lignées cellulaires ont été utilisées en particulier dans le cadre de ce projet. Dans le cadre du projet CRAPPSE, le nombre de bioessais *in vitro* a été étendu à d'autres types de perturbateurs endocriniens. Le Tableau 20 recense les différents bioessais utilisés dans le cadre de ces deux projets.

Les conditions de cultures des différentes lignées cellulaires ont été précédemment décrites par Balaguer et al., (1999), Louiz et al., (2008), Bellet et al., (2012) and Kinani et al., (2016). Les cellules humaines sont cultivées en routine à 37°C sous 5 % CO<sub>2</sub> dans du milieu nutritif complet DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) contenant du rouge de phénol, 5% de sérum fœtal de veau (SFV), 1% d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine) et des acides aminés non essentiels. Les cellules PLHC-1, dérivées d'un hépatome de vairon tropical (*Poeciliopsis lucida*), sont cultivées en routine à 30°C sous 5 % CO<sub>2</sub> dans du milieu nutritif complet E-MEM (Eagle's minimal essential medium) contenant 10 % de sérum fœtal de veau et 1% d'antibiotiques. Le milieu de routine des MELN et MDA-kb2 est remplacé 48h avant l'ensemencement par du milieu dépourvu de rouge neutre contenant 3 % de sérum préalablement décomplémenté et déstéroïdé afin d'éviter une activation des récepteurs hormonaux. Après incubation, les cellules sontensemencées dans des plaques blanches de 96 puits (CellStar®, Greiner Bio-one, D. Dutcher, Brumath, France) à une densité de 2X10<sup>4</sup> à 1X10<sup>5</sup> cellules par puit. Pour la lignée PLHC-1, les cellules sont déposées dans des plaques transparentes de 96 puits (plaque TPP®, D. Dutcher, Brumath, France).

**Tableau 20 : liste des différents bioessais réalisés lors de ces travaux : <sup>a</sup> bioessais effectués à l'INERIS dans le cadre du projet TOXLIX et <sup>b</sup> réalisés par l'INERIS dans le cadre du projet CRAPPSE. [1] : (Balaguer et al., 1999) ; [2] : (Wilson et al., 2002) ; [3] : (Kinani et al., 2016).**

Activité biologique	Lignée cellulaire	Source	Récepteur	Méthode	Unité en quantité d'équivalents-toxique relatifs à la substance de référence	Ref.
œstrogénique	MELN <sup>a,b</sup>	Cellules humaines du cancer du sein, MCF-7	ER $\alpha$ endogène	Dosage luciférase	Equivalents-œstradiol (E2-Eq)	[1]
androgénique et glucocorticoïde	MDA-kb2 <sup>b</sup>	Cellules humaines du cancer du sein, MDA-MB-453	AR < GR endogènes	Dosage luciférase	Equivalents-Dihydrotestostérone (DHT-Eq) ou -Dexaméthasone (Dex-Eq)	[2]
dioxin-like	PLHC-1 <sup>a,b</sup>	Cellules hépatiques cancéreuse de poissons ( <i>Poeciliopsis lucida</i> )	AhR endogène	Dosage de l'activité EROD (7-éthoxyrésorufine O-dééthylase)	Equivalent-TCDD (TCDD-Eq) ou Equivalents-BaP (BaP-Eq)	[3]

**AhR** : récepteur des hydrocarbures aromatiques, **AR** : récepteur des androgènes, **ER** : récepteur des œstrogènes, **GR** : récepteur des glucocorticoïdes, **TCDD** : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine.

### 5.1.2 Exposition des lignées et traitement des données

Les cellules ont été exposées pendant 4h ou 24h pour le test EROD (PLHC-1) et 16h pour les cellules humaines aux extraits organiques dilués 200 fois dans le milieu de culture (0,5 % v/v). Chaque plaque comprend un témoin cellulaire, un témoin solvant (0,5 %), un témoin positif (10 nM 17- $\beta$  E2, 1 nM Tcdd (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine), 0,3  $\mu$ M benzo(a)pyrène (B(a)P) et une gamme d'échantillons à tester. Après exposition, l'activité luciférase est mesurée par luminescence après ajout de 0.3 mM de luciférine. La mesure de l'activité EROD (éthoxyrésorufin-O-Dééthylase) est évaluée par un spectrofluorimètre après ajout de 2  $\mu$ M 7-éthoxyrésorufine, substrat de l'enzyme du cytochrome P450. Les résultats bruts sont exprimés sous forme de pourcentage de luminescence ou fluorescence par rapport au témoin positif.

Les courbes dose-réponses des échantillons ont été modélisées grâce à la macro Excel RegTox 7.5 ([http://www.normalesup.org/~vindimian/fr\\_index.html](http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html)) et les concentrations efficaces 20 % ont été calculées à partir des courbes modélisées.

Les teneurs en équivalents biologiques (BEQ-bio) ont été calculées à l'aide de la formule annotée Figure 39. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été respectivement déterminées à l'aide des CE5 et CE20 données par les composés de référence. Afin d'estimer la contribution des composés ciblés lors des analyses chimiques, les concentrations mesurées ont été converties en équivalent toxique TEQ-CHEM :

$$BEQ - CHIM (g - refEQ/L) = \sum Ci * BEFi$$

Avec  $C_i$  : concentration du composé en  $g.L^{-1}$  et  $BEF_i$  : facteur d'équivalence biologique du composé. La comparaison des BEQ-BIO et des BEQ-CHIM, couramment appelé « mass balance » ou équilibre des masses, permet d'évaluer le pourcentage d'activité biologique expliqué par la caractérisation chimique.

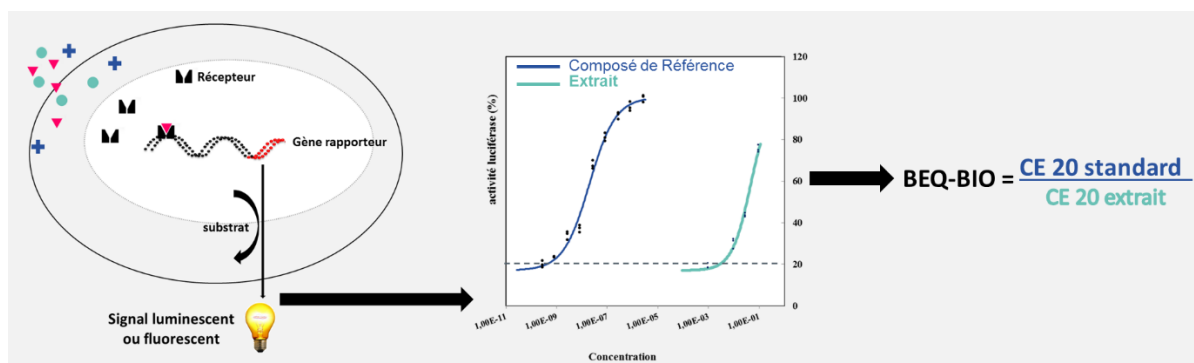


Figure 39 : Détermination équivalent biologique (CE 20 : Concentration efficace 20 %).

## 5.2 Présence de composés génotoxiques : SOS Chromotest

### 5.2.1 Principe

Ce test *in vitro* est basé sur les connaissances des systèmes de réparation SOS mis en place en cas de dommages génotoxiques chez la bactérie *E. Coli*. Le SOS Chromotest permet de déterminer la capacité d'une molécule ou d'un échantillon complexe à induire l'expression d'un des composants de l'opéron SOS dans la souche bactérienne génétiquement modifiée : *Escherichia Coli* PQ37 (EC-PQ37). Chez cette souche bactérienne, le système de réparation SOS est déclenché suite à une lésion de l'ADN. Deux gènes ont une importance majeure dans la régulation de sa réponse : Lex A code pour une protéine qui réprime la transcription du gène *sfiA* et Rec A. Si un défaut empêche l'avancement de la fourche de réplication, la protéine Rec A est activé et clive la protéine Lex A, ce qui induit la transcription des gènes de réparation SOS comme *sfiA*.

La souche bactérienne *E. Coli* PQ37 a été génétiquement modifiée de telle sorte que le gène Lac Z (responsable de la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase) est placé sous le contrôle du promoteur du gène *sfiA* (fusion *sfiA*: et LacZ). En présence d'un composé génotoxique, les gènes *sfiA* impliqués dans la réponse SOS sont induits pour réparer les dommages à l'ADN. Le niveau d'expression de ce gène peut être quantifié, par l'intermédiaire de la construction génétique *sfiA*::LacZ. En effet, étant donné que la région constitutive LacZ a été supprimée, la formation de la  $\beta$ -galactosidase est seulement dépendante de la réponse SOS et de l'activation de la protéase RecA. De plus, cette souche *E. Coli* PQ37 est dépourvue du système

de réparation par excision (BER, NER) et possède une enveloppe cellulaire plus perméable à un certain nombre de composés ce qui la rend plus sensible aux agents génotoxiques. En parallèle, la phosphatase alcaline est mesurée : cette enzyme constitutive n'est pas contrôlée par le système SOS et permet de tenir compte des effets cytotoxiques engendrés.

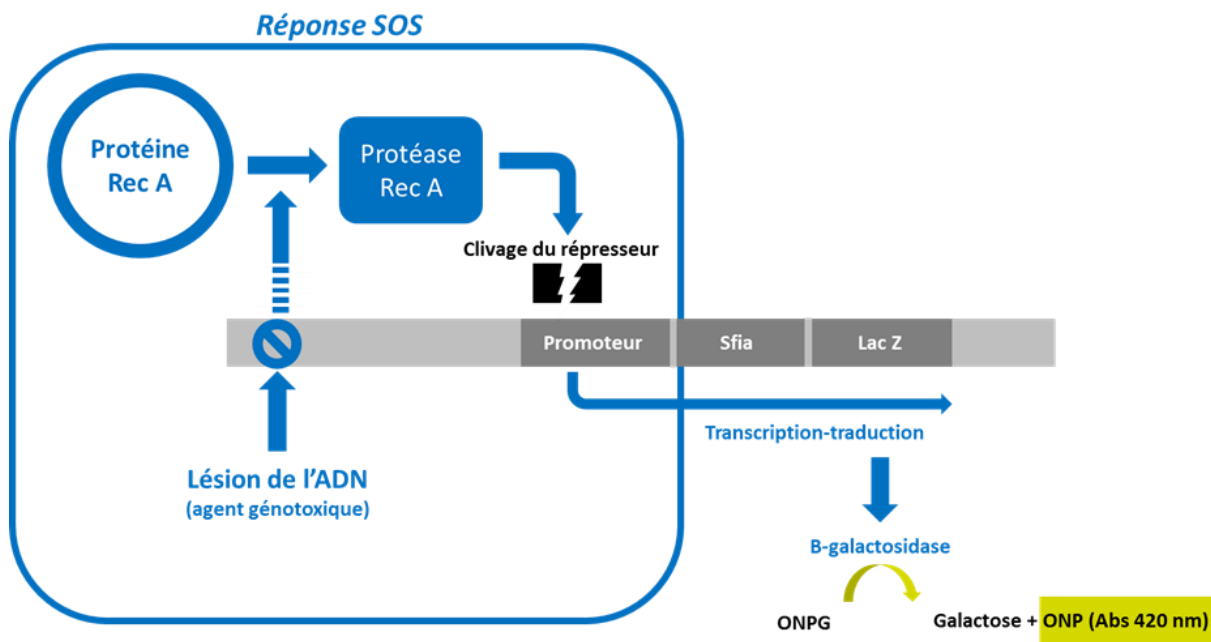


Figure 40 : Principe du SOS Chromotest (Quillardet and Hofnung, 1985).

## 5.2.2 Exposition et traitement des données

Ce test a été réalisé avec à la collaboration de Jérôme Couteau (TOXEM) dans le cadre des projets TOXLIX et CRAPPSE.

Les bactéries EC-PQ37 ont été exposées pendant 3h à différentes concentrations d'échantillon avec (+S9) ou sans (-S9) activation métabolique dans des microplaques 96 puits. La dose maximale de solvant (DMSO) utilisée dans le milieu réactionnel est de 5 %. Chaque plaque comprenait : un blanc DMSO (DMSO à 5 %) et un témoin positif sans S9 (4-nitroquinoline-N-oxide) pour évaluer la génotoxicité directe et un témoin positif avec S9 (benzo(a)pyrène) pour évaluer la présence de pro-génotoxiques. Suite à l'ajout d'ONPG (Orthonitrophényl-β-galactoside) et de PNPP (P-nitro-phenylphosphate), substrats des enzymes β-galactosidase et phosphatase alcaline ; l'absorbance a été mesurée à 405 nm afin de calculer le facteur d'induction SOS (Quillardet et Hofnung ,1985). Ce facteur est normalisé par rapport au blanc DMSO et est calculé de la manière suivante :

- Le potentiel génotoxique d'un échantillon ou témoin donné est exprimé dans un premier temps sous forme de rapport d'induction (IR) grâce à la formule suivante :

$$IR = \frac{DO_{405nm} \beta\text{galatosidase}}{DO_{405 nm} \text{Phosphatase alcaline}}$$

- Le rapport de ces deux enzymes permet d'évaluer le facteur d'induction (IF). Ce facteur est normalisé en fonction du blanc DMSO (IR(0)) de chaque plaque, afin d'homogénéiser les résultats et pallier les variabilités inter-plaques :

$$IF = \frac{IR \text{ échantillon}}{IR (0)}$$

Le critère utilisé est celui décrit par Legault et al., (1996) pour lequel un échantillon complexe est considéré comme génotoxique si le SIF est  $\geq 1,2$  en étant statistiquement différent du témoin négatif avec l'existence d'une relation dose-réponse.



## CHAPITRE III

# Apports en contaminants d'intérêt émergent en estuaire de Seine

### Résumé

*Ce chapitre s'intéresse à l'évaluation des apports en contaminants polaires au niveau de l'estuaire de Seine: L'objectif majeur a été de dresser un état des lieux de la présence d'une large gamme de contaminants polaires incluant des médicaments, des pesticides et des filtres UV afin de déterminer les molécules les plus préoccupantes. Afin d'apporter une vision complémentaire, le deuxième objectif a été d'évaluer la présence de molécules biologiquement actives grâce à l'utilisation de bioessais in vitro.*





# Chapitre III : Apports en contaminants émergents en estuaire de Seine

## Table des matières

1.	Apports en contaminants organiques en estuaire de Seine .....	122
1.1	Acquis antérieurs.....	122
1.2	Etats des lieux des niveaux de concentrations.....	123
1.2.1	Composés pharmaceutiques .....	123
1.2.2	Filtres UV .....	126
1.2.3	Apports en pesticides et biocides.....	127
1.3	Bilan global et comparaison à d'autres estuaires .....	132
1.3.1	Extrapolation des flux.....	132
1.3.2	Mise en évidence des molécules préoccupantes .....	134
2.	Apports de molécules biologiquement actives en estuaire de Seine .....	139
2.1	Composés génotoxiques .....	139
2.2	Perturbateurs endocriniens et dioxine-like.....	140
3.	Publications .....	147
3.1	Occurrence of polar pesticides in the Seine estuary (France).....	147
3.2	Pharmaceuticals in the Seine estuary: 15 years of survey (2002-2017) .....	167

# 1. Apports en contaminants organiques en estuaire de Seine

## 1.1 Acquis antérieurs

Le choix des deux sites étudiés s'est reposé sur des travaux antérieurs ciblant les composés pharmaceutiques (Togola, 2006; Togola et Budzinski, 2007b; Budzinski et al., 2012). Des travaux pionniers réalisés entre 2002 et 2007 ont permis d'obtenir les premières données permettant de qualifier la présence de 17 composés incluant des anti-inflammatoires non stéroïdiens, des hypolipémiants et des antidépresseurs. Afin de caractériser les apports majoritaires, 17 médicaments ont été recherchés à Poses (apports amont), au niveau de 9 affluents intra-estuariens et au niveau des effluents de 3 STEU (Rouen, Elbeuf et Tancarville). La comparaison des flux (Figure 41) de ces différents points d'entrée a permis de mettre en évidence un apport majoritaire provenant de l'amont de l'estuaire (94 % des flux mesurés). La contribution mineure des affluents intra-estuariens et des effluents de STEU s'explique notamment par leurs débits qui sont 10 à 20 000 fois inférieurs à ceux de la Seine. De nouvelles connaissances acquises sur une centaine de médicaments ont confirmé l'entrée majoritaire de composés pharmaceutiques au niveau de Poses (Budzinski et al., 2012). Un travail rétrospectif plus approfondi est discuté dans la publication « Pharmaceuticals in the Seine estuary: 15 years of survey (2002-2017) » (p167).

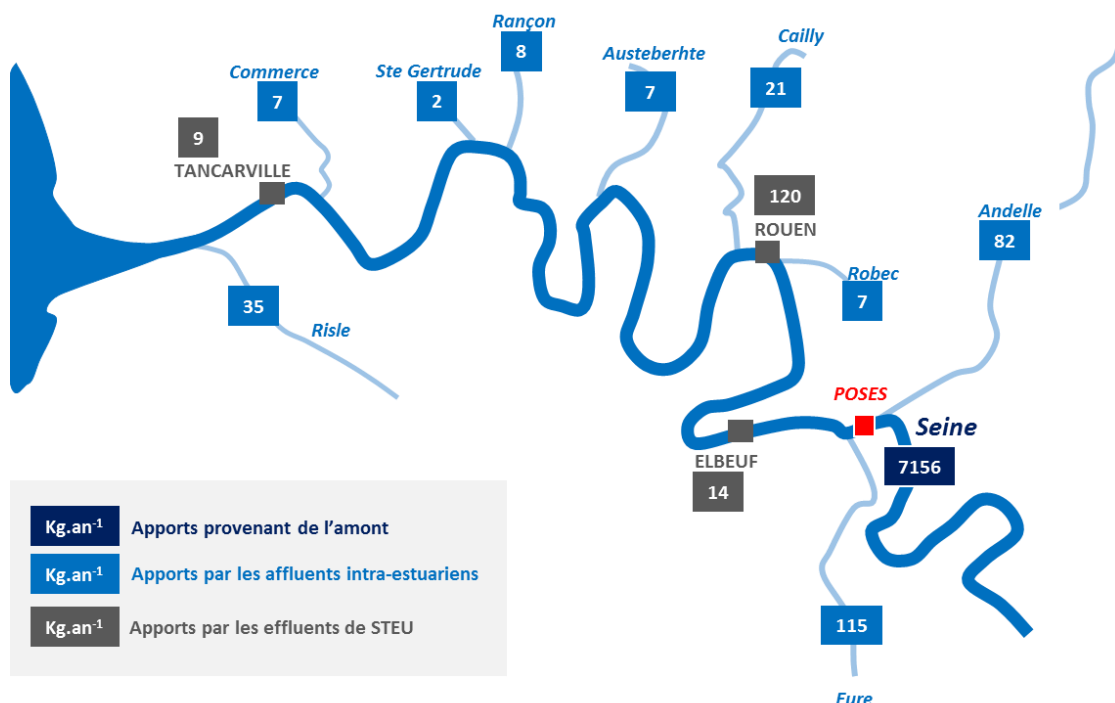


Figure 41 : Répartition des apports (flux en kg.an<sup>-1</sup>) en médicaments en estuaire de Seine réalisé à partir des données obtenues sur 17 composés à partir des données de Togola (2006).

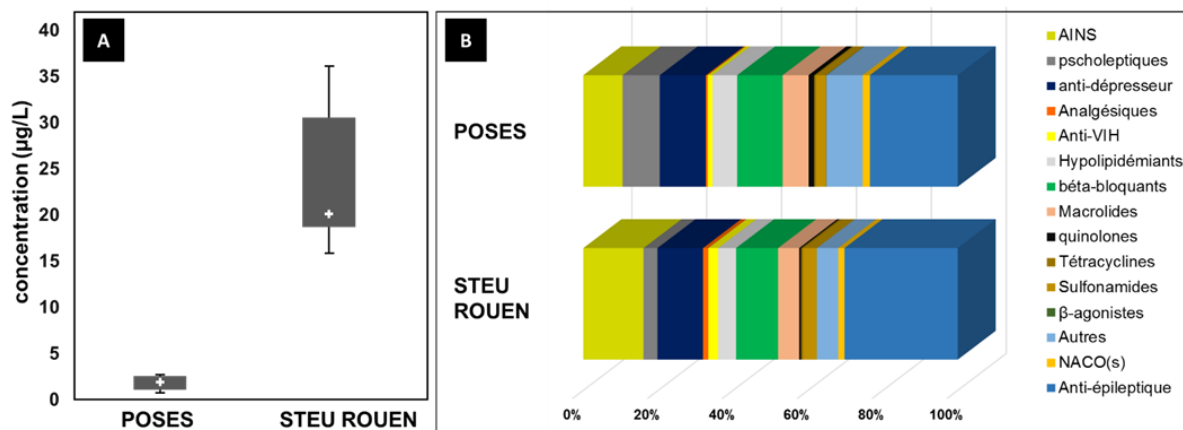
## **1.2 Etats des lieux des niveaux de concentrations**

### **1.2.1 Composés pharmaceutiques**

Dans le cadre de ce présent travail, les composés pharmaceutiques sélectionnés incluent des molécules à usage médical et vétérinaire provenant de plus de 19 classes thérapeutiques différentes, permettant ainsi de réaliser un criblage assez large.

Des concentrations cumulées en composés pharmaceutiques 10 à 20 fois supérieures ont été retrouvées en sortie de la STEU de Rouen par rapport à Poses (Figure 42 A). Au niveau de Poses les concentrations totales varient entre 0,8 à 2,8  $\mu\text{g.L}^{-1}$  contre 16 et 36  $\mu\text{g.L}^{-1}$  au niveau de l'effluent de la STEU de Rouen. Les profils de contamination moyens retrouvés au niveau de Poses et de l'effluent de la STEU de Rouen sont présentés Figure 42 B. Les deux matrices présentent des profils de contamination en composés pharmaceutiques similaires dominés par des antiépileptiques (23-32%) comme la gabapentine et la carbamazépine. La contamination est également marquée à environ 15% par des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme le diclofénac, l'ibuprofène et le kétoprofène. Les bêtabloquants, les antidépresseurs (10 %) font également parti des molécules les plus représentées. Répartis en plusieurs classes chimiques (quinolones, macrolides, tétracyclines, Sulfonamides), les antibiotiques ont été retrouvés en quantités importantes dans les deux matrices.

Pour aller plus loin, de nouveaux composés pharmaceutiques ont été recherchés : les nouveaux anticoagulants oraux (NACO) utilisés depuis 2008, tendent à devenir des molécules préoccupantes dans l'environnement. A l'heure actuelle, aucune donnée n'est disponible concernant la présence de ces 3 molécules (dabigatran, rivaroxaban et apixaban), dans l'environnement. Ne représentant que 2 % de la contamination globale en composés pharmaceutiques, ces molécules et en particulier le dabigatran, ont été retrouvées jusqu'à 510  $\text{ng.L}^{-1}$  en sortie de STEU et 30  $\text{ng.L}^{-1}$  au niveau du barrage de Poses.



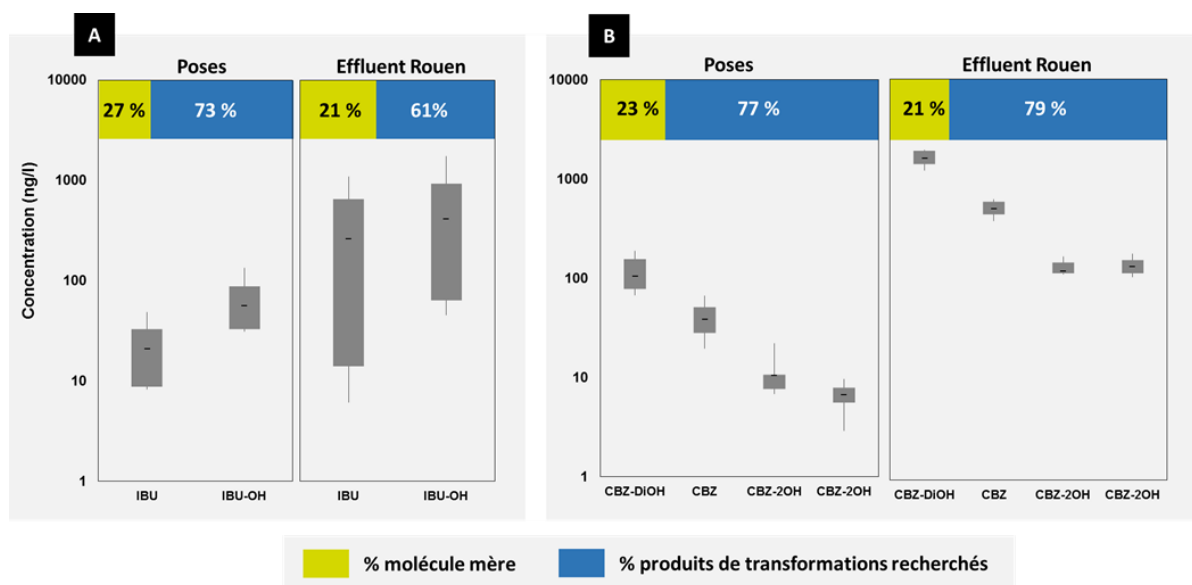
**Figure 42 : Concentrations moyennes cumulées (A) et empreintes de contamination moyennes (B) au niveau de Poses et de l'effluent de la STEU de Rouen réparties en fonction des différentes classes thérapeutiques recherchées.** Le graphique regroupe les résultats de 6 campagnes d'échantillonnage réalisées de mai 2014 à mars 2015.

Les données de quelques molécules « traceurs » ont été comparées aux résultats antérieurs obtenus en 2006 et en 2011. Globalement, pour le site de Poses les concentrations de ces molécules « traceurs » ont peu évolué. En revanche, au niveau de la sortie du petit Quevilly, certaines molécules ont des concentrations 10 fois supérieures aux campagnes précédentes. C'est notamment le cas de l'ibuprofène dans l'effluent de Rouen qui a présenté d'importantes variations de concentrations en fonction des campagnes allant de 13 à 1082 ng.L<sup>-1</sup>. L'ibuprofène fait parti des médicaments les plus consommés sur le sol français (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé, 2014). De fortes variabilités interjournalières des concentrations dans les effluents de STEU ont déjà été mises en évidence (Castiglioni et al., 2006; Petrie et al., 2014). Ce constat est le résultat d'une consommation discontinue qui rend les apports en station d'épuration variable d'un jour à l'autre. L'évolution des concentrations présentée Tableau 21, résulte de prélèvements moyennés 24h et qui ne prennent pas compte de cette variabilité inter-journalière.

**Tableau 21 : Evolution des concentrations de quelques molécules « traceurs » à Poses (A) et en sortie du petit Quevilly (B).** Les données représentent les concentrations moyennes en ng/l [min-max]. (Togola et Budzinski, 2007b; Budzinski et al., 2014).

ng/l	A. Poses			B. STEU Petit Quevilly (Rouen)		
	Togola (2006)	MEDSEINE (2011)	CRAPSSE (2015)	Togola (2006)	MEDSEINE (2011)	CRAPSSE (2015)
caféine	138 [nd-762]	202 [99-427]	300 [nd-486]	59[16-130]	33 [9-66]	64 [8-124]
carbamazépine	57 [26-104]	57 [26-104]	40 [20-67]	324[nd-858]	376 [178-539]	514 [386-632]
ibuprofène	151 [6-611]	33 [nd-67]	23 [8-48]	48 [nd-342]	30 [11-77]	386 [13-1082]
gemfibrozil	31 [5-86]	11 [3-115]	25 [3-116]	69 [9-164]	14 [2-34]	119 [21-436]
naproxène	110 [12-275]	42 [19-79]	24 [9-43]	146 [nd-267]	116 [57-188]	307 [29-712]
diclofénac	55 [7-116]	41 [12-102]	60 [nd-112]	470 [14-282]	852 [631-1156]	633 [464-744]
kétoprofène	110 [12-275]	43 [3-115]	18 [2-32]	71 [21-1136]	247 [154-409]	257 [100-443]

En plus de la grande diversité de médicaments retrouvés au niveau de Poses et de l'effluent de STEU, leurs produits de transformation sont également apportés en Seine. Pour illustrer ce propos, différents produits de transformation ont également été suivis. La Figure 43 présente les concentrations et le pourcentage molécule mère / produits de transformation à Poses et au niveau de l'effluent de la STEU de Rouen. Au final, des concentrations plus importantes de produits de transformation ont pu être mises en évidence au niveau des deux sites. De mai 2014 à mars 2015, les concentrations en hydroxy-ibuprofène étaient supérieures à celles de son produit parent : l'ibuprofène. De même, alors que la carbamazépine est retrouvée en moyenne à des concentrations de 40 ng.L<sup>-1</sup> à Poses, la trans-10,11 dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine a été retrouvée à des concentrations de 180 ng.L<sup>-1</sup>. Ce constat est similaire au niveau de l'effluent de Rouen. Les produits de transformation des composés pharmaceutiques sont retrouvés à des concentrations parfois supérieures à celles du composé parent. Cette observation a déjà été mise en évidence au niveau de différents effluents de STEU (Fatta-Kassinos et al., 2011; Aymerich et al., 2016; Martínez Bueno et al., 2016; Yin et al., 2017). Ce constat souligne l'importance de suivre également les produits de transformation dans l'environnement et d'implémenter les connaissances relatives à leurs effets sur les organismes.



**Figure 43 : Niveaux de concentration (n=6 campagnes) en (A) ibuprofène (IBU) et 2-hydroxy-ibuprofène (IBU-OH) et en (B) de carbamazépine (CBZ) et des certains produits de transformation : Trans-10,11 dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine (CBZ-DiOH) ; 2-hydroxy-carbamazépine (CBZ-2OH) et ; 3-hydroxy-carbamazépine (CBZ-3OH). Les résultats présentent les concentrations sous forme de box-plot et le pourcentage molécule mère / produits de transformation à Poses et au niveau de l'effluent de la STEU de Rouen. Le graphique regroupe les résultats de 6 campagnes d'échantillonnage réalisées de mai 2014 à mars 2015.**

Les molécules les plus abondantes (diclofénac, carbamazépine, ibuprofène et gabapentine) font également parti des molécules les plus retrouvées en moyenne dans les eaux de surface au niveau mondial (Hughes et al., 2013). Les concentrations moyennes retrouvées en estuaire de Seine ont été comparées à celles d'un autre estuaire français, l'estuaire de la Gironde, d'estuaires européens et de manière plus globale au niveau mondiale dans les eaux de surface Tableau 22. Les concentrations moyennes en carbamazépine, diclofénac, ibuprofène et gabapentine sont 4 à 6 fois supérieures à celles retrouvées dans la Garonne. L'estuaire de Seine possèdent des concentrations moyennes 2 à 20 fois inférieures aux moyennes mondiales qui avaient été recensées par Hughes et al., (2013).

**Tableau 22 : Comparaison des concentrations moyennes en médicaments retrouvées dans les rivières et estuaires aux niveaux : français, européen et mondial.**

Concentration ng.L <sup>-1</sup>	France		Europe		Monde
	Seine	Garonne <sup>a,b</sup>	rivières <sup>c,d</sup>	estuaires <sup>e,f</sup>	eaux de surface <sup>g</sup>
<b>Carbamazépine</b>	40.5	12	87	46	174
<b>Diclofénac</b>	56.8	8.6	53	24.65	136.5
<b>Ibuprofène</b>	23.4	5.5	25	15.75	503.8
<b>Gabapentine</b>	448.2	34,4	-	-	208.1

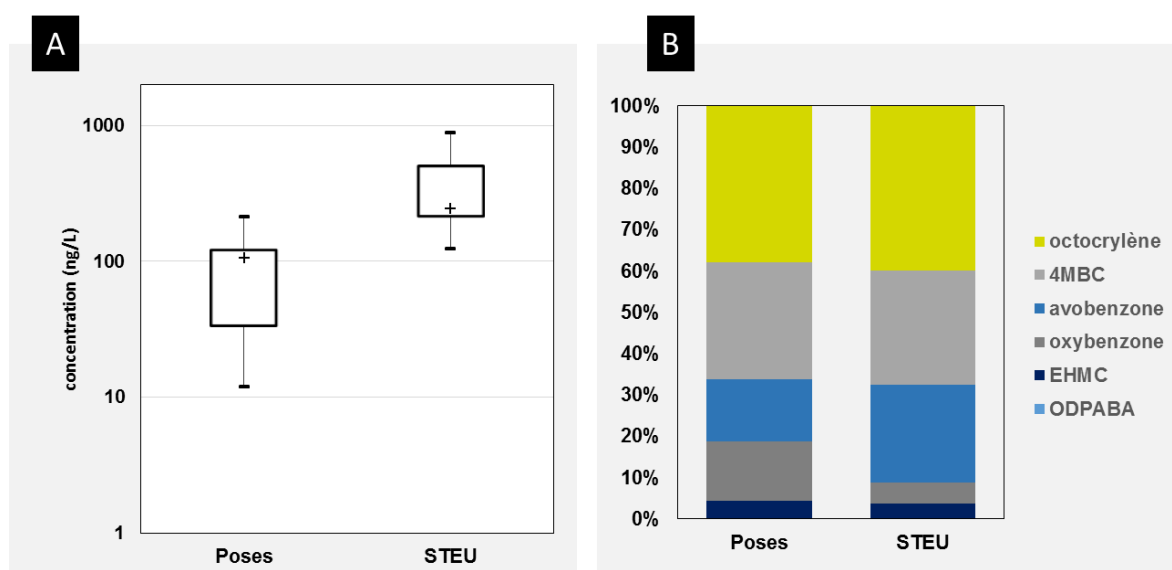
(a) Aminot et al., 2016 ; (b) Pedelucq (2016) ; (c) Loos et al., 2017 ; (d) Tousova et al., 2017 ; (e) Gonzalez-Rey.,2015 ; (f)Ter Laak et al., 2010 ; (g) Hughes et al., 2013

## 1.2.2 Filtres UV

Selon la directive européenne 76/768/EEC sur les cosmétiques, un filtre UV est défini comme «une substance qui, contenue dans les produits cosmétiques solaires, vise à filtrer certains rayons UV afin de protéger la peau de certains effets nocifs de ces rayons». Actuellement, 27 filtres UV sont autorisés en cosmétique dans l'Union Européenne, dont 26 molécules organiques. Ces composés sont employés dans la formulation de nombreux produits de soins corporels (peau, cheveux, baume à lèvres...). Ces molécules font partie des molécules dites à intérêt émergent du fait du manque de données concernant leur occurrence (Richardson et Kimura, 2016). Les composés tels que l'oxybenzone, le 4-MBC et l'EHMC ont la capacité à se bioaccumuler (Gago-Ferrero et al., 2015). En effet, des concentrations pouvant aller jusqu'à 112 ng.g<sup>-1</sup> de lipides ont été mesurées dans des gardons prélevés dans des lacs suisses (Balmer et al., 2005). Il en est de même pour l'octocrylène, qui a été quantifié à 782 ng.g<sup>-1</sup> dans des foies de dauphin. Par ailleurs, certains filtres UV comme l'octocrylène ou le 4-MBC sont suspectés d'être des perturbateurs endocriniens (Schlumpf et al., 2001; Fent et al., 2010). Dans ce contexte, 6 filtres UV organiques ont été recherchés à Poses et au niveau de l'effluent de la STEU de Rouen. Les résultats sont présentés Figure 44.

Les concentrations cumulées varient entre 12 et 200 ng.L<sup>-1</sup> à Poses et entre 124 et 883 ng.L<sup>-1</sup> en sortie de STEU. Ces concentrations sont donc assez variables. Généralement des

concentrations plus importantes ont été mises en évidence pendant les périodes estivales et en particulier pour l'octocrylène qui présente des concentrations plus élevées en été. Le profil de contamination est similaire dans les deux matrices (Figure 44 B), et sont dominé notamment par l'octocrylène avec des concentrations moyennes de 36 ng.L<sup>-1</sup> à Poses et de 105 ng.L<sup>-1</sup> dans l'effluent. Il est important de noter la présence de 4-MBC avec des concentrations allant de 9 à 63 ng.L<sup>-1</sup> à Poses et de 37 à 477 ng.L<sup>-1</sup> en sortie de STEU. Les niveaux retrouvés en sortie de STEU et au niveau de Poses sont cohérents avec différentes études (Tsui et al., 2014; Ramos et al., 2016).



**Figure 44 : Concentrations moyennes cumulées en filtres UV (A) et empreintes de contamination moyennes (B) au niveau de Poses et de l'effluent de la STEU de Rouen.** Le graphique regroupe les résultats de 6 campagnes d'échantillonnage réalisées de mai 2014 à mars 2015.

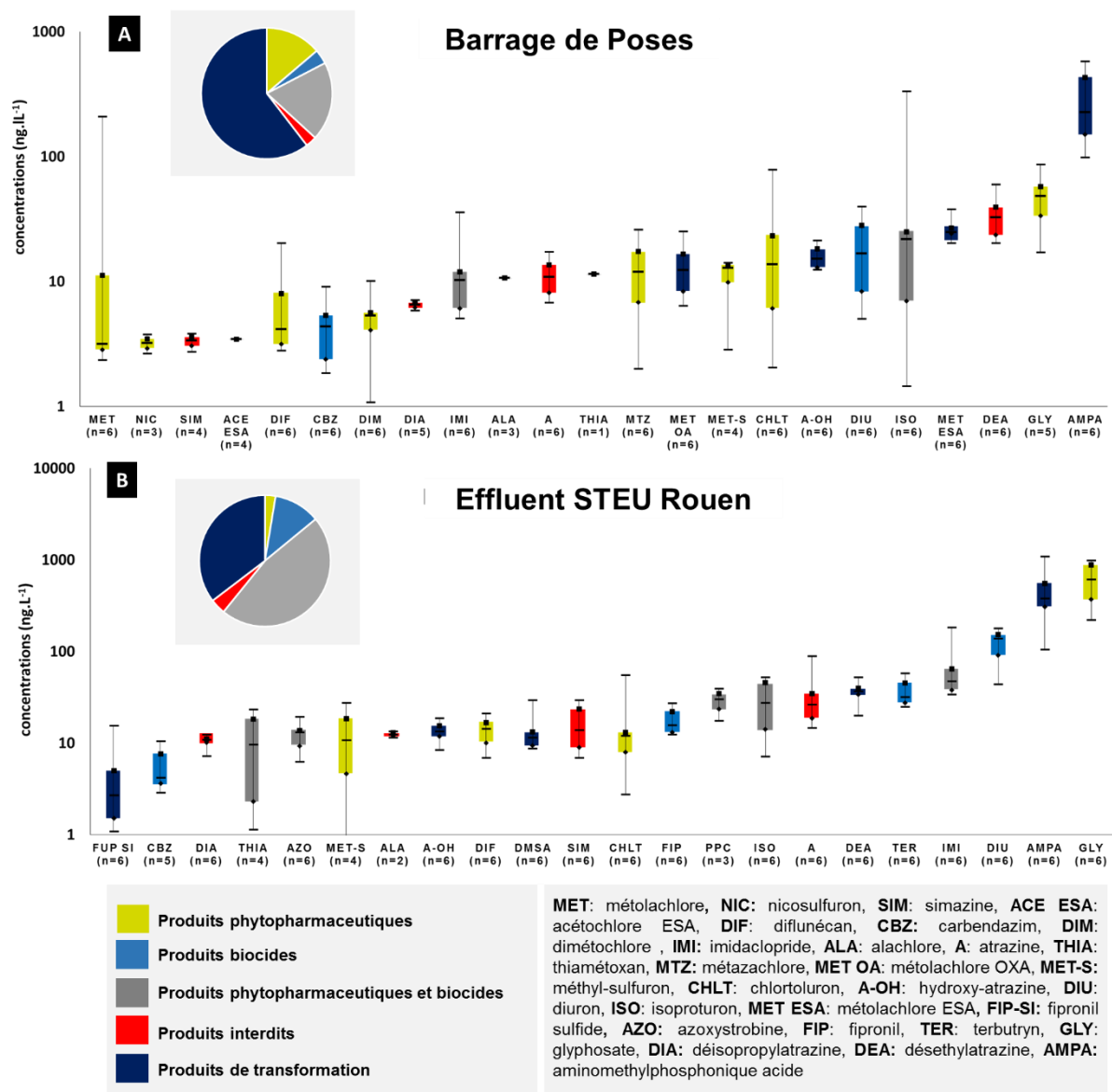
### 1.2.3 Apports en pesticides et biocides

Les produits phytosanitaires sont à ce jour utilisés en milieu agricole mais également pour des applications urbaines (particuliers, collectivités). Les produits biocides (stricts) sont employés pour un usage urbain sous forme, par exemple, de désinfectants, de produits antiparasitaires de produits de protection de matériaux ou de produits de revêtements (peinture anti-salissures). Les apports en pesticides en estuaire de Seine sont décrits dans le détail dans la publication « *Occurrence of polar pesticides in the Seine estuary (France)* » (p147).

La Figure 45 décrit les pesticides représentant plus de 95 % de la contamination de Poses (A) et de la sortie de la STEU de Rouen (B). Dans les deux matrices, le glyphosate et l'AMPA sont les composés majoritairement retrouvés avec des concentrations pouvant atteindre 1 µg.L<sup>-1</sup> dans l'effluent de Rouen. Ce résultat n'est pas surprenant car ces composés sont également les plus retrouvés à l'échelle du bassin de la Seine (Blanchoud et al., 2011). Le



glyphosate est en effet l'herbicide le plus utilisé dans le monde. Bien qu'autorisé pour un usage agricole, il est couramment utilisé par les particuliers. Les diagrammes de la Figure 45 présentent la répartition des pesticides retrouvés à Poses et au niveau de la STEU de Rouen en fonction des usages autorisés (agricole, biocides, mixte et interdit). Sur une année, des profils différents ont été mis en évidence au niveau de ces deux sites.



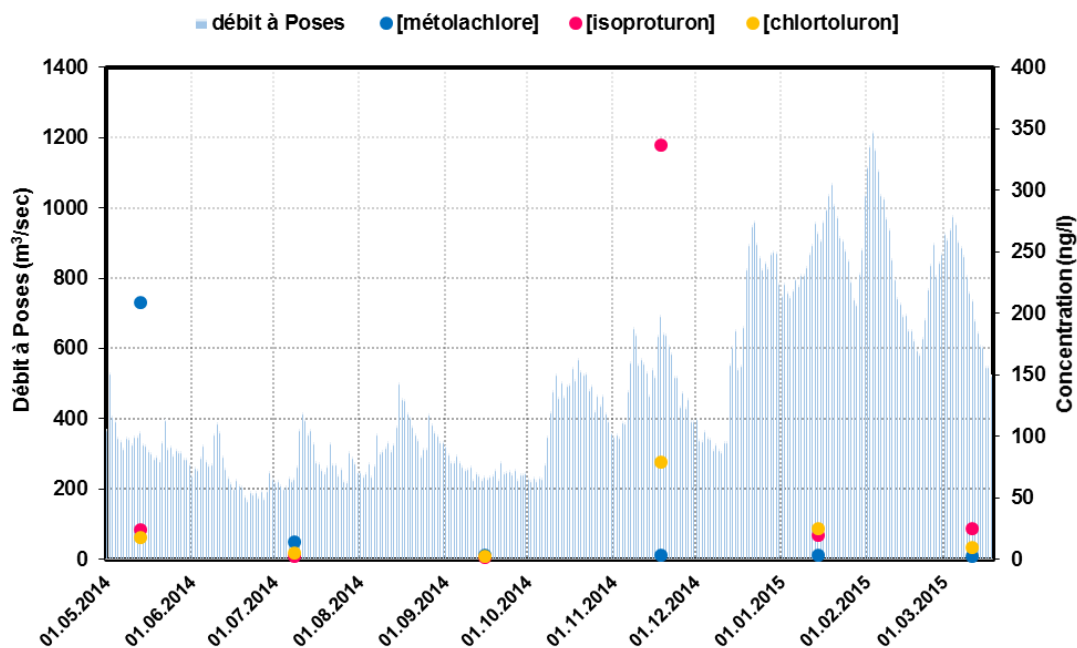
**Figure 45 : Pesticides majoritairement retrouvés au niveau de Poses (A) et de l'effluent de la STEU de Rouen. Les résultats expriment les concentrations moyennes obtenues entre mai 2014 et mars 2015.** Le diagramme dans les encadrée gris présente la répartition en fonction des usages, des pesticides retrouvés en moyenne à Poses et dans l'effluent de la STEU de Rouen Les couleurs de box plot renseignent sur les usages autorisés de ces pesticides dans la législation française. Le graphique regroupe les résultats de 6 campagnes d'échantillonnage réalisées de mai 2014 à mars 2015.

Au niveau l'effluent de la STEU (hors glyphosate et AMPA), des concentrations importantes en pesticides à usage biocide ont été retrouvées allant de 17 ng.L<sup>-1</sup> (fipronil) jusqu'à 122 ng.L<sup>-1</sup> en moyenne pour le diuron. On y retrouve principalement des molécules

connues pour être des traceurs de rejets urbains comme le diuron (DIU), l'imidaclopride (IMI), la terbutryne (TER) ou encore des composés employés à la fois en tant que biocides et phytopharmaceutiques tels que le propiconazole (PPC) ou l'azoxystrobine. Malgré leur interdiction d'utilisation, certains pesticides et leurs métabolites sont encore retrouvés au niveau de ces deux sites. C'est notamment le cas de l'atrazine qui a été interdite en 2001 mais qui a pu être quantifiée au niveau des deux sites à des concentrations moyennes de 35 ng.L<sup>-1</sup> en sortie de STEU et 11 ng.L<sup>-1</sup> à Poses. Sa présence témoigne d'anciens usages au niveau du bassin versant ou d'usages illégaux qui ont toujours lieu sur le territoire (Guibal et al., 2017). Les produits de dégradation de l'atrazine (2-hydroxy-atrazine et deséthyl-atrazine) font également partie des molécules les plus retrouvées avec des concentrations parfois plus importantes que la molécule d'origine.

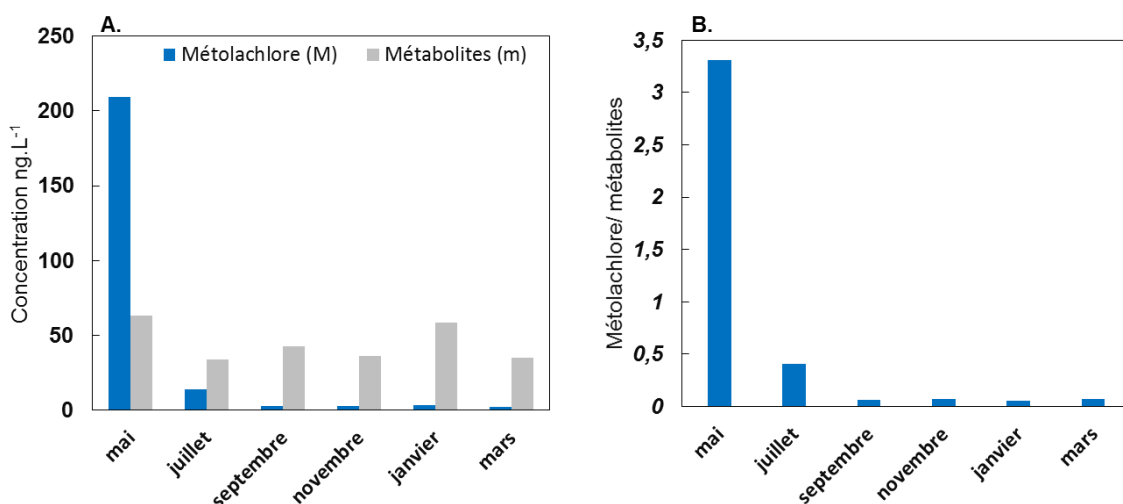
Le glyphosate et l'AMPA sont également les pesticides les plus retrouvés au niveau du point d'entrée de l'estuaire (Poses). Les molécules majoritairement retrouvées (glyphosate, AMPA, DEA, diuron et isoproturon) font partie des pesticides les plus quantifiés au niveau français (Ministère de l'Ecologie et du Développement durable et de l'Energie, 2013). Poses est marqué par la présence de pesticides utilisés en agriculture dans le bassin de la Seine comme notamment le métolachlore (MET). On retrouve également au niveau de Poses, des concentrations plus élevées de deux de ses métabolites : le métolachlore OA et ESA dont les concentrations peuvent atteindre 20 ng.L<sup>-1</sup> en moyenne. Les niveaux retrouvés en pesticides à usage agricole sont relativement élevés en comparaison à d'autres eaux estuariennes. En effet, les concentrations moyennes retrouvées en isoproturon sont 6 à 68 fois plus importantes que celles retrouvées au niveau de la Garonne (Cruz, 2015) et des estuaires de la mer Baltique (Orlikowska et al., 2015).

A Poses, les concentrations de certaines molécules ont montré une augmentation importante lors des périodes d'épandages, et indépendamment du débit de la Seine. En effet, un pic marqué des concentrations en métolachlore en mai 2014 (209 ng.L<sup>-1</sup>) et en isoproturon (336 ng/l) en novembre 2014 a été mis en évidence, reflétant l'utilisation saisonnière de ces composés (Figure 46). Le reste de l'année, hors période d'épandage les niveaux de concentrations de ces molécules n'excèdent pas 10 ng.L<sup>-1</sup>. La forte variation de concentrations en pesticides à usage agricole a déjà été mise en évidence au niveau de différents systèmes (Wittmer et al., 2010; Englert et al., 2015). La présence de métolachlore et de métazachlore (MTZ) peut notamment être reliée à leur utilisation dans la maïsiculture au niveau du bassin versant. Parmi les autres composés autorisés pour un usage agricole, on retrouve des herbicides tels que le chlortoluron (CHLT) et l'isoproturon (ISO) qui sont notamment utilisés pour les cultures de blé tendre et d'orge d'hiver. Ces résultats sont cohérents avec les données acquises sur l'amont de l'estuaire par le projet PIREN-Seine (Blanchoud et al., 2011).



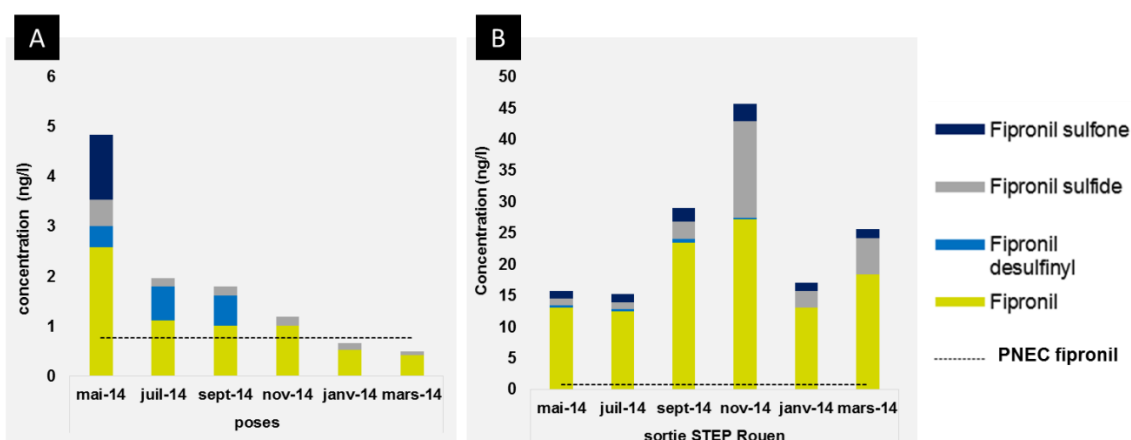
**Figure 46 : Concentrations en métolachlore, chlortoluron et isoproturon mesurées au niveau du barrage de Poses de mai 2014 à mars 2015.**

Cette tendance se confirme en analysant les concentrations de métolachlore et de ses métabolites sur l'année (Figure 47). Le métolachlore et ses métabolites ont été quantifiés pour tous les temps étudiés de mai 2014 à mars 2015. Le métolachlore ESA et le métolachlore OA sont uniquement produits par la dégradation du métolachlore. Ainsi, les périodes d'application du métolachlore peuvent être tracées grâce au calcul du rapport entre métolachlore et ses métabolites (Figure 47). La période de mai 2014 à juillet 2014 peut être identifiée comme une contamination récente du métolachlore. En effet, durant cette période le rapport métolachlore / métabolites atteint 3,3 et redescend tout le reste de l'année à 0,06. Le même constat a été fait à New York et dans l'estuaire de la Gironde (Phillips et al., 1999; Belles, 2012).



**Figure 47 : Concentration de métolachlore et ses métabolites (métolachlore OA et ESA) et rapport entre composé parent / métabolites de mai 2014 à mars 2015 au niveau du site de Poses.**

Bien que présents à l'état de traces ( $\text{ng.L}^{-1}$ ) dans le milieu, certains pesticides présentent un fort enjeu environnemental. En raison de sa PNEC très faible ( $0,8 \text{ ng.L}^{-1}$ ), le fipronil fait partie des molécules pertinentes à suivre dans les eaux de surfaces. Cet insecticide dont l'usage agricole a été suspendu depuis 2013 en Europe, reste autorisé en tant qu'antiparasitaire à usage vétérinaire. A Poses et au niveau de l'effluent de la STEU de Rouen, ces composés et quelques-uns de ses produits de transformation ont été suivis. Les concentrations retrouvées au niveau des deux sites sont présentées Figure 48. Dans les deux matrices, le fipronil a été détecté lors de toutes les campagnes à des concentrations variant de  $12,5$  à  $27,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  en sortie de STEU et de  $0,4$  à  $2,6 \mu\text{g.L}^{-1}$  à Poses. Bien que retrouvé à des niveaux faibles, le fipronil est retrouvé presque systématiquement au-dessus de sa PNEC (dépassement 4 fois sur 6). Certains produits de transformation du fipronil (le fipronil sulfide, sulfone et desulfinyl) ont également été retrouvés au niveau des deux sites mais à des concentrations inférieures à celles de la molécule mère.



**Figure 48 : Concentration en fipronil au niveau du barrage de Poses (A) de l'effluent de la STEU de Rouen (B).**

Les concentrations individuelles de certains pesticides ont été comparées à des rivières et estuaires français et européens. Les concentrations retrouvées au niveau de la Seine sont équivalentes à celles qui ont été retrouvées dans la littérature (Tableau 23). On peut toutefois noter, la présence en Seine d'isoproturon à des concentrations 3 à 37 fois supérieures à celles recensées dans les eaux de surfaces européennes.

**Tableau 23 : Comparaison des concentrations (ng.L<sup>-1</sup>) en pesticides dans la Seine à Poses (2014-2015) avec les données disponibles dans la littérature. \*cette étude, (a) Botta et al., (2009), (b) Tapie et al., (2011), (c) Cruz, (2016), (d) Touseva et al., (2017), (e) Caracciolo et al., (2012), (f) Orlikowska et al., (2015). [min – max]**

	France			Europe	
	Seine*	Rivières <sup>a,b</sup>	Estuaire <sup>c</sup>	Rivières <sup>d,e</sup>	Estuaires <sup>f</sup>
AMPA	98 -497	200 - 2 000	-	-	-
atrazine	7 -17	30	2.6	1 - 12	1 - 40
diuron	5 - 40	10	1 - 20	1 -150	2 - 13
fipronil	0,4 -2,6	-	-	0,2 - 4	-
glyphosate	17 - 87	100 - 1 000	-	-	-
imidaclopride	5 - 35	-	2 - 25	2-15	-
isoproturon	1 - 336	-	3 - 110	1 -25	1 - 9
métolachlore	2 - 200	-	1 - 8	-	-
terbutryne	2 - 7	-	0,2 - 2	1 - 11	8 - 10

### 1.3 Bilan global et comparaison à d'autres estuaires

#### 1.3.1 Extrapolation des flux

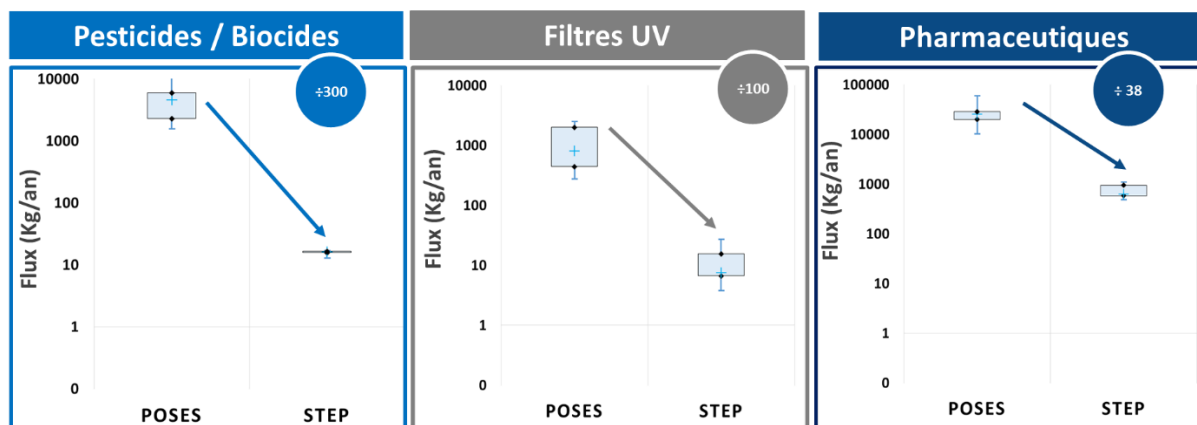
Pour évaluer les apports majoritaires, une approximation des flux en composés apportés dans l'estuaire a été calculée. Pour cela, les données de concentrations en contaminants ont été corrigées par le débit moyen de la Seine (SYNAPSE) pour Poses et par le débit de référence de la STEU (<http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr/>).

$$Flux = \sum_{i=1}^n Qi \times Ci \frac{Qi \times Ci}{\sum_{i=1}^n Qi} \times Qm$$

$Qi$  : Débit instantanée à Vernon (m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>)  
 $Ci$  : Concentration au moment du prélèvement  
 $Qm$  : Débit journalier moyen sur la période considérée (m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>)

La Figure 49 présente les flux extrapolés annuels en contaminants organiques au niveau du barrage de Poses et de la sortie de la STEU de Rouen, sur la période de mai 2014 à mars 2015 (n=6). On constate que le barrage de Poses apporte en moyenne 38 fois plus de composés pharmaceutiques, 100 fois plus de filtres UV et 300 fois plus de pesticides. Comme indiqué Figure 49, le flux de pesticides médian est de 13 ± 2 kg par an en sortie de la STEU de Rouen, et atteint 4640 ± 4139 kg.an<sup>-1</sup> au niveau du barrage de Poses. Ce résultat est plus contrasté pour les composés à usage strictement agricole qui ne sont pas ou peu retrouvés

en sortie de station de traitement. En ce qui concerne les composés pharmaceutiques,  $630 \pm 260 \text{ kg.an}^{-1}$  sont apportés à l'estuaire par la STEU contre  $25\,803 \pm 17\,190 \text{ kg.an}^{-1}$  pour le barrage de Poses. Ce résultat est conforme à données obtenues précédemment dans le projet antérieur (Budzinski et al., 2012).



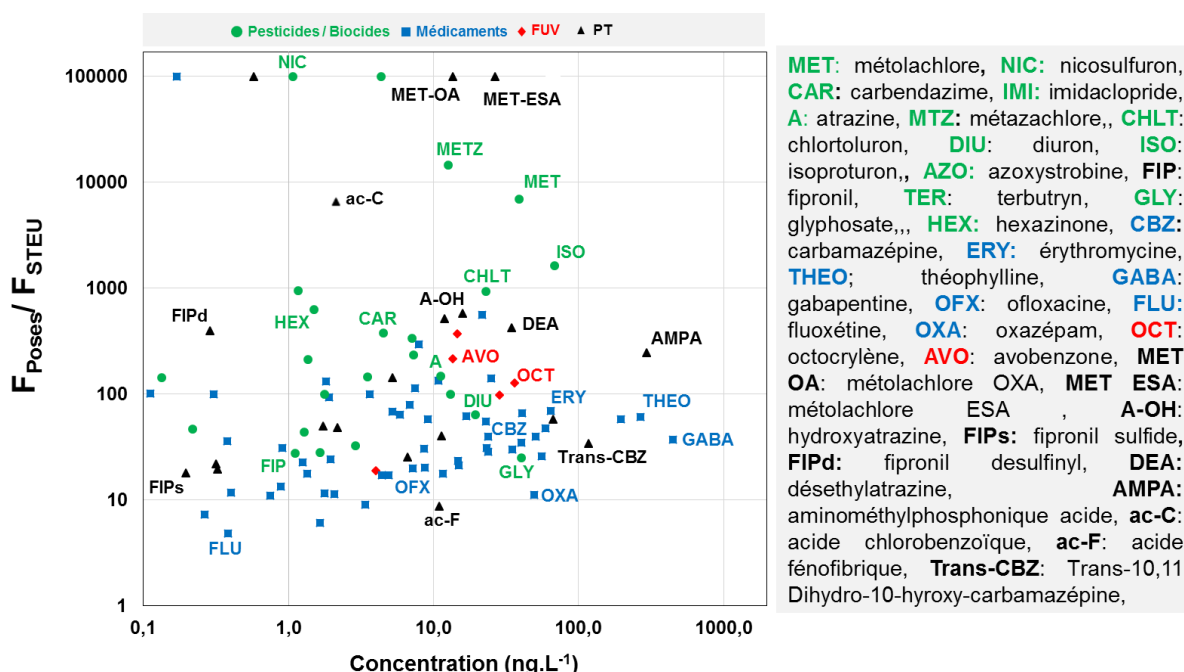
**Figure 49 : Flux annuel extrapolés (en  $\text{kg.an}^{-1}$ ) en pesticides, filtres UV et composés pharmaceutiques entrants dans l'estuaire de Seine par le barrage de Poses et par la sortie de la STEU de Rouen.** Le graphique regroupe les résultats de 6 campagnes d'échantillonnage réalisées de mai 2014 à mars 2015.

Il est possible à partir de ces données d'établir une empreinte des molécules présentes au niveau du barrage de Poses (apports majoritaires). Pour cela, le rapport des flux annuels entre Poses et la STEU a été établi pour chaque molécule quantifiée. La Figure 50 représente le rapport des flux à Poses et des flux provenant de la STEU ( $F_{\text{Poses}}/F_{\text{STEU}}$ ) en fonction des concentrations moyennes des composés au niveau du site de Poses. Plus le rapport est élevé, plus l'impact de la STEU sur les concentrations, est mineur. Au total, 104 molécules ont été retrouvées au niveau de ces sites. Bien que les flux soient majoritaires (rapport toujours supérieurs à 1) à Poses pour les 104 composés, le niveau de grandeur du rapport entre flux à Poses et flux de la STEU est très variable (4-100000) en fonction des molécules.

Le rapport  $F_{\text{Poses}}/F_{\text{STEU}}$  est compris entre 4-1000 pour 93 composés. Ce groupe de molécules correspond notamment à des molécules traceurs d'usages plutôt urbains comme les médicaments, les filtres UV et certains biocides comme le diuron, le fipronil. Ces molécules sont apportées, en partie, localement par les rejets de STEU mais en raison de forts débits de la Seine (en comparaison des débits de la STEU de Rouen) ils le sont surtout par l'amont de l'estuaire. Une étude a évalué la présence de 78 contaminants émergents (pharmaceutiques, hormones, pesticides et biocides) dans les rejets de 2 STEU parisiennes qui représentent, à elles seules, 70 % des volumes rejetés dans la Seine par l'agglomération (Mailler et al., 2017). Parmi les molécules les plus abondantes dans ces effluents, on en retrouve certaines caractéristiques de l'empreinte de Poses comme la gabapentine (GABA), l'AMPA (AMPA), l'ofloxacine (OFX), le glyphosate (GLY), le diuron (DIU), l'érythromycine (ERY). L'apport

important d'antibiotiques par les STEU de la Seine amont a déjà été démontré (Tamtam et al., 2007). Alors que certaines molécules comme la norfloxacine sont rapidement dissipées, d'autres molécules comme le sulfaméthoxazole atteignent le barrage de Poses avec des concentrations moyennes de 20 ng.L<sup>-1</sup> (Tamtam et al., 2007).

Un second groupe de 11 composés peut également être identifié comme apporté par l'amont. Il est caractérisé par des composés dont des flux à Poses sont 1000 fois supérieurs à ceux extrapolés à partir des concentrations de la STEU. On y retrouve des pesticides caractéristiques d'usages agricoles et certains de leurs produits de transformation comme le métolachlore (MET), l'isoproturon (ISO) et le métazachlore (METZ).



**Figure 50 : Empreinte globale des apports en contaminants en estuaire de Seine. Rapport des flux annuels à Poses sur les flux en sortie de STEU par rapport aux concentrations moyennes au niveau du Site de Poses sur la période de mai 2014 à mai 2015. Un rapport de 100000 a été attribué arbitrairement aux composés uniquement apportés par Poses.**

### 1.3.2 Mise en évidence des molécules préoccupantes

Les analyses réalisées lors de ce suivi ont impliqué pas moins de 10 filières analytiques afin d'évaluer la présence de plus de 200 molécules. Cependant, une telle démarche paraît difficilement applicable dans le cadre d'un suivi régulier des masses d'eau estuariennes. Ainsi, il apparaît indispensable d'identifier parmi l'ensemble des composés ciblés, les molécules les plus préoccupantes d'un point de vue environnemental. A cette fin, deux indicateurs ont été étudiés : le degré de dépassement de la PNEC et la fréquence de dépassement. Cette approche s'inspire des travaux réalisés lors de l'étude prospective 2012 sur les contaminants émergents (Von der Ohe et al., 2011; Botta et Dulio, 2012).

**Tableau 24 : Evaluation du risque potentiel des molécules quantifiées à Poses. Les PNECs sont issus de la littérature : [1] (Minguez et al., 2016), [2] (Tousova et al., 2017), [3] (Von der Ohe et al., 2011), [4] (Anses, 2017), [5] (INERIS, 2017) [6] (Besse et Garric, 2008), [7] (Dulio et al., 2013), [8] (Botta et Dulio, 2014), [9] (Directive 98/8/EC, 2015).**

Composés	Classes	PNEC (REF) ng.L <sup>-1</sup>	MEC 95 (ng.L <sup>-1</sup> )	MEC95/PNEC
carbetamide	pesticides	100000 [4]	2,6	2,59E-05
bisoprolol	pharmaceutiques	74300 [1]	12,6	1,69E-04
métoprolol	pharmaceutiques	64000 [2]	12,3	1,92E-04
métolachlore ESA	pesticides	100000 [8]	35,3	3,53E-04
abacavir	pharmaceutiques	57320 [1]	22,3	3,89E-04
dimétachlore	pesticides	6 580 [4]	5,6	8,48E-04
aténolol	pharmaceutiques	100000 [1]	90,4	9,04E-04
cétirizine	pharmaceutiques	21580 [1]	43,6	2,02E-03
métolachlore OA	pesticides	9110 [8]	23,2	2,55E-03
glyphosate	pesticides	24000 [3]	81,0	3,38E-03
triclocarban	pharmaceutiques	77 [7]	0,5	0,01
AMPA	pesticides	80000 [7]	561,9	0,01
gabapentine	pharmaceutiques	100000 [1]	742,7	0,01
naproxène	pharmaceutiques	1700 [2]	41,5	0,02
hydroxy-ibuprofène	pharmaceutiques	4460 [7]	120,0	0,03
atrazine	pesticides	600 [2]	16,4	0,03
terbutylazine	pesticides	60 [5]	1,8	0,03
oxazépam	pharmaceutiques	2460 [8]	78,9	0,03
propranolol	pharmaceutiques	410 [6]	13,7	0,03
sotalol	pharmaceutiques	1958 [2]	73,7	0,04
carbendazime	pesticides	150 [2]	8,8	0,06
bézafrate	pharmaceutiques	460 [2]	32,3	0,07
ofloxacin	pharmaceutiques	110 [7]	8,7	0,08
oxybenzone	filtres UV	345 [2]	31,0	0,09
sulfaméthoxazole	pharmaceutiques	600 [2]	72,3	0,12
azoxystrobine	pesticides	56 [2]	7,1	0,13
carbamazépine	pharmaceutiques	500 [2]	63,6	0,13
diflufenican	pesticides	51 [4]	8,0	0,16
diuron	pesticides	200 [2]	37,8	0,19
4-MBC	filtres UV	200 [7]	55,3	0,28
ketoprofène	pharmaceutiques	100 [8]	28,9	0,29
métolachlore	pesticides	70 [7]	25,3	0,36
clarithromycine	pharmaceutiques	60 [2]	22,1	0,37
érythromycine	pharmaceutiques	206 [6]	126,0	0,61
chlorotoluron	pesticides	100 [2]	65,5	0,65
isoproturon	pesticides	300 [2]	258,6	0,86
2-hydroxy-atrazine	pesticides	22 [3]	20,6	0,94
métazachlore	pesticides	19 [5]	24,1	1,27
DEA	pesticides	30 [7]	54,9	1,83
terbutryne	pesticides	2.4 [7]	5,0	2,07
diclofénac	pharmaceutiques	50 [5]	104,5	2,09
triclosan	pharmaceutiques	0.7 [8]	1,9	2,75
fipronil	pesticides	0.77 [4]	2,4	3,13
gemfibrozil	pharmaceutiques	22 [3]	89,8	4,08
ibuprofène	pharmaceutiques	10 [2]	44,6	4,46
imidaclopride	pesticides	4,5 [9]	30,0	6,67
octocrylène	filtres UV	13 [7]	109,1	8,39



Le niveau de concentration au niveau du barrage de Poses (apport majoritaire) de mai 2014 à mars 2015 a été représenté par le 95<sup>ème</sup> percentile des concentrations maximales (MEC95) relevées sur ces 6 campagnes dans le but de simuler une situation au pire des cas rencontrés. Le degré de dépassement est alors calculé comme le rapport entre la MEC95 et les valeurs de PNEC de chaque molécule considérée. Les PNEC utilisées dans cette étude dérivent de la littérature nationale et internationale et ont été déjà utilisées au cours d'exercices de priorisation (Tableau 24). Cependant, il est à noter que cette approche a été réalisée à titre exploratoire en se basant sur les plus petites valeurs de PNEC recensées dans la littérature (Besse et Garric, 2008; Von der Ohe et al., 2011; Dulio et al., 2013; Botta et Dulio, 2014; Minguez et al., 2016a; Anses, 2017; INERIS, 2017; Tousova et al., 2017). En effet, certaines valeurs ont été établies à partir de modèles QSAR et ne sont donc pas robustes. Il est possible d'apporter une dimension supplémentaire à cette approche en intégrant le nombre de dépassement de la PNEC sur les 6 points d'échantillonnage réalisés.

Sur les 200 molécules initialement recherchées, 47 molécules ont été considérées lors de cette approche en raison soit de l'absence de données de PNEC, soit d'une fréquence de détection insuffisante. Les résultats des 47 molécules étudiées sont présentés Tableau 24. Cette approche a permis de hiérarchiser les contaminants en différentes catégories :

- **Des molécules encore non préoccupantes (vert et jaune)** comprenant des composés au niveau de contamination inférieur aux PNECs (MEC95/PNEC inférieur à 0,1) Cette catégorie rassemble un total de 24 molécules incluant notamment des molécules retrouvées à de fortes concentrations telles que la gabapentine, le glyphosate et l'AMPA.
- **Des molécules à surveiller ou demandant plus de données (orange)** en raison d'une fréquence d'échantillonnage trop faible. En effet, comme vu précédemment, les pesticides à usage agricole sont associés à un pic de contamination qui peut être sous-estimé par l'échantillonnage ponctuel basse fréquence. Un total de 14 molécules se retrouve dans cette catégorie. On y trouve des pesticides utilisés pour un usage agricole dans le bassin versant de la Seine comme l'isoproturon, le métolachlore et le chlortoluron. Bien que le rapport MEC95/PNEC n'excède pas 1 pour l'isoproturon, la PNEC a tout de même été dépassée lors de sa période d'application (Figure 51). Des molécules telles que le sulfaméthoxazole, l'érythromycine et la clarithromycine, déjà classées comme pertinentes par des études prospectives (Botta et Dulio, 2012) sont également dans ce groupe.
- **Des molécules préoccupantes en estuaire de Seine (rouge)** au regard de leurs concentrations supérieures à leur PNEC. Cette catégorie regroupe 5 pesticides, 4 composés pharmaceutiques et 1 filtre UV. Le triclosan, l'imidaclopride, l'octocrylène, le fipronil et la terbutryne font partie des molécules les plus préoccupantes en raison du nombre de

dépassement de la PNEC (4-5 fois/ 6). Alors que l'atrazine n'est pas retrouvé dans cette catégorie, son produit de transformation (DEA) y est classé avec un taux de dépassement de 50 % (Figure 51).

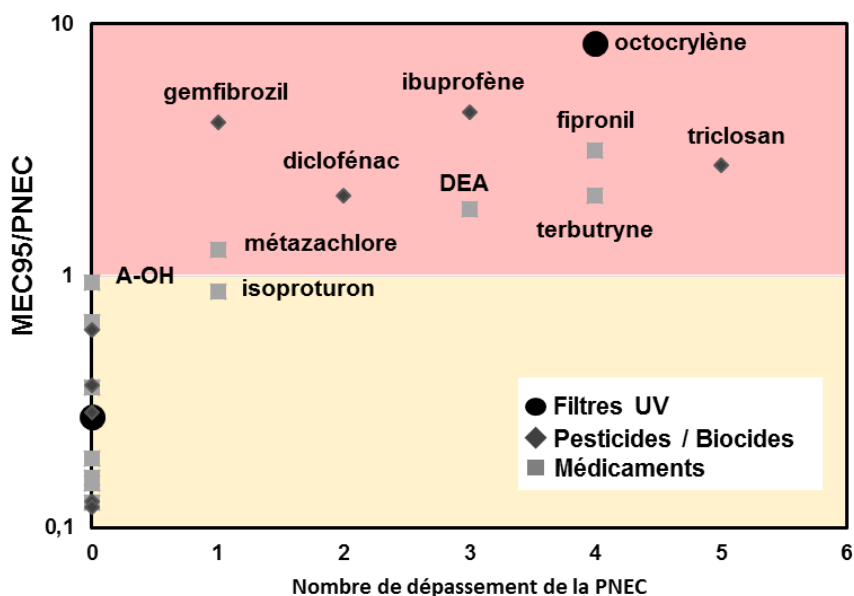


Figure 51 : Mise en évidence des composés problématiques apportés en Seine en fonction du risque (MEC95/PNEC) associé nombre de dépassement de la PNEC sur la base de 6 échantillonnages ponctuels.

Les niveaux de concentrations et les flux des molécules les plus préoccupantes apportées en Seine ont été comparés à deux autres estuaires européens : la Garonne et le Rhin. La Garonne possède un bassin versant qui est plus petit que celui de la Seine et un nombre d'habitant trois fois moins important (Tableau 25). Excepté pour l'ibuprofène, le kétoprofène, l'imidaclopride, et le métolachlore, les concentrations retrouvées à Poses (Seine) sont plus élevées que celle quantifiées au niveau de la Garonne (Aminot, 2013; Aminot et al., 2016; Cruz, 2016). A l'inverse, le Rhin possède un bassin versant, des débits fluviaux et un nombre d'habitant nettement supérieurs à l'estuaire de Seine. En effet, ce bassin versant est l'un des plus anthropisés d'Europe avec une population de 58 millions d'habitants. Alors que la population est près de 5 fois supérieures à celles du bassin versant de la Seine, les niveaux de concentrations des médicaments étudiés sont du même ordre de grandeur (Ter Laak et al., 2010). En effet, la clarithromycine, le diclofénac, l'ibuprofène et le sulfaméthoxazole y sont quantifiés à des concentrations équivalentes. Ce constat confirme la contamination importante de l'estuaire de Seine en composés pharmaceutiques qui se situe à un niveau équivalent. Cependant, le débit du Rhin est près de 4 fois supérieures à ceux enregistrées au niveau de l'estuaire de Seine. Les flux de médicaments transitant par jour sont le résultat les débits fluviaux importants du Rhin ( $2000 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ) et 10 fois supérieures à ceux mesurées en Seine. Le rapport du débit fluvial sur le nombre d'équivalent-habitant (assimilé ici au nombre d'habitant

des différents bassins versants) permet d'estimer la pression urbaine relative. Plus ce rapport est élevé plus la pression urbaine est importante sur le système considéré. Par conséquent, la Seine (indice de 0,026 L.s<sup>-1</sup>.hab<sup>-1</sup>) et le Rhin (indice de 0,037 L.s<sup>-1</sup>.hab<sup>-1</sup>) possèdent une pression urbaine qui est environ 4 fois supérieure à celle extrapolée pour la Garonne (indice de 0,14 L.s<sup>-1</sup>.hab<sup>-1</sup>). En conclusion, le niveau de concentration observée dans un hydrosystème résulte de l'importance d'effluents urbains (population sur le bassin versant) ainsi que du débit fluvial qui dilue la contamination.

**Tableau 25 : Comparaison des concentrations et flux en molécules préoccupantes avec deux estuaires européens [1] (Aminot et al., 2016), [2](Aminot, 2013), [3](Cruz, 2016) et [4] (Ter Laak et al., 2010). C<sub>moy</sub> : concentration moyenne ; F<sub>moy</sub> : flux moyen, M : médicament, P/B : pesticides/biocides, FUV : filtres UV.**

		<b>Poses (Seine)</b>		<b>Garonne<sup>1, 2,3</sup></b>		<b>Rhin<sup>4</sup></b>	
		79650 km <sup>2</sup>		56000 km <sup>2</sup>		197100 km <sup>2</sup>	
		12 millions d'habitant		4 millions d'habitant		58 millions d'habitant	
		450 m <sup>3</sup> .s <sup>-1</sup>		340 m <sup>3</sup> .s <sup>-1</sup>		2000 m <sup>3</sup> .s <sup>-1</sup>	
		<b>C<sub>moy</sub> ± ect</b>		<b>C<sub>moy</sub> ± ect</b>		<b>C<sub>moy</sub> ± ect</b>	
		<b>F<sub>moy</sub> ± ect</b>		<b>F<sub>moy</sub> ± ect</b>		<b>F<sub>moy</sub> ± ect</b>	
classe		ng.L <sup>-1</sup>	g.j <sup>-1</sup>	ng.L <sup>-1</sup>	g.j <sup>-1</sup>	ng.L <sup>-1</sup>	g.j <sup>-1</sup>
<b>4-MBC</b>	<b>FUV</b>	28,4 ± 18,7	1267 ± 1252	< LQ	< 0,4	-	-
<b>octocrylène</b>	<b>FUV</b>	54,3 ± 45,4	1139 ± 1418	75 ± 50	5590 ± 1660	-	-
<b>carbamazépine</b>	<b>M</b>	40,6 ± 17,6	1503 ± 376	12,0 ± 7,0	250 ± 110	122	16942
<b>clarithromycine</b>	<b>M</b>	13,4 ± 8,3	645 ± 324	-	-	15	2890
<b>diclofénac</b>	<b>M</b>	60,5 ± 32,6	2142 ± 1864	8,6 ± 6,1	400 ± 870	55	11238
<b>érythromycine</b>	<b>M</b>	64,1 ± 41,8	3447 ± 3535	-	-	-	-
<b>ibuprofène</b>	<b>M</b>	23,4 ± 16,9	1008 ± 973	5,5 ± 2,6	180 ± 90	26	4142
<b>ketoprofène</b>	<b>M</b>	17,8 ± 8,2	507 ± 332	27 ± 12	1100 ± 1400	-	-
<b>sulfaméthoxazole</b>	<b>M</b>	27,4 ± 31,5	1391 ± 604	-	-	32	5959
<b>triclosan</b>	<b>M</b>	1,3 ± 0,5	63 ± 53	-	-	-	-
<b>gemfibrozil</b>	<b>M</b>	25,2 ± 44,4	1427 ± 2607	0,9 ± 0,4	24 ± 17	-	-
<b>atrazine</b>	<b>P/B</b>	11,3 ± 4,1	437 ± 133	2,3 ± 0,1	29 ± 44	-	-
<b>chlorotoluron</b>	<b>P/B</b>	23,2 ± 28,6	1348 ± 1816	3,6 ± 4,9	110 ± 180	-	-
<b>diuron</b>	<b>P/B</b>	19,4 ± 13,9	664 ± 342	3,5 ± 1,2	96 ± 56	-	-
<b>imidaclopride</b>	<b>P/B</b>	13,3 ± 11,5	592 ± 415	19,9 ± 51,5	446 ± 967	-	-
<b>isoproturon</b>	<b>P/B</b>	68,4 ± 131,7	4050 ± 7969	1,1 ± 0,5	30 ± 17	-	-
<b>terbutryn</b>	<b>P/B</b>	3,0 ± 1,6	107 ± 43	0,4 ± 0,1	12 ± 17	-	-
<b>azoxystrobine</b>	<b>P/B</b>	3,7 ± 2,4	162 ± 130	0,6 ± 0,3	3 ± 7	-	-
<b>métolachlore</b>	<b>P/B</b>	9,1 ± 10,8	303 ± 298	120,6 ± 180,6	3254 ± 6065	-	-
<b>2-hydroxy-atrazine</b>	<b>P/B</b>	16,0 ± 3,6	669 ± 269	<LQ	-	-	-
<b>DEA</b>	<b>P/B</b>	34,6 ± 14,9	1313 ± 380	5,7 ± 1,0	151 ± 49	-	-
<b>métazachlor</b>	<b>P/B</b>	12,9 ± 8,7	614 ± 483	0,8 ± 0,5	22 ± 20	-	-
<b>diflufenican</b>	<b>P/B</b>	4,3 ± 2,5	182 ± 1113	1,4 ± 0,7	31 ± 31	-	-

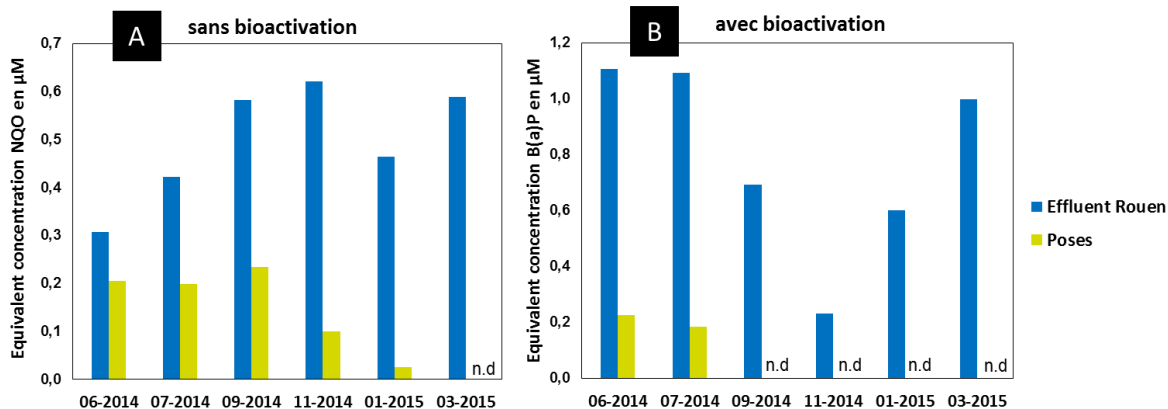
L'estuaire de Seine est fortement marqué par la présence de composés pharmaceutiques et de pesticides résultant de la forte pression anthropique de son bassin versant (urbain, agriculture). Parmi le panel de molécules apportées chaque jour en Seine, 10 présentent des niveaux préoccupants et dépassent les seuils écotoxicologiques de non effets.

## 2. Apports de molécules biologiquement actives en estuaire de Seine

L'utilisation de méthodes analytiques ciblées a permis de mettre en évidence la présence de molécules potentiellement préoccupantes d'un point de vue écotoxicologique. Cependant, cette approche est basée sur la considération d'un faible nombre de molécules ciblées. En ce sens, il ne prend pas en compte la complexité des mélanges environnementaux et la présence à la fois de contaminants connus mais également inconnus. En plus d'être présents en mélange, ces molécules peuvent subir des phénomènes de dégradation (hydrolyse, biodégradation, photodégradation) conduisant à la génération de produits de transformation qui sont encore trop peu pris en compte dans l'évaluation du risque. Dans ces conditions, seule une faible partie des composés est considérée comme présentant un risque pour les écosystèmes aquatiques et est intégrée aux programmes de surveillance. Afin de pallier ces limites, l'utilisation d'outils alternatifs basés sur la biodétection des molécules actives a déjà montré sa pertinence (Creusot et al., 2014). Ces bioessais *in vitro* permettent ainsi de détecter la présence de composés par leurs mécanismes d'action sans les cibler au préalable par une analyse chimique. Ainsi plusieurs bioessais *in vitro* ont été appliqués afin de mettre en évidence la présence de molécules biologiquement actives dans les différents extraits environnementaux en prenant compte de différents types d'effets (génomotoxique, dioxin-like, perturbation endocrinienne).

### 2.1 Composés génotoxiques

Dans le cadre de cette étude, la souche PQ37 d'*E. Coli*, a été exposée en triplicat à des extraits de sortie de STEU du barrage de Poses en présence et en l'absence d'une activation métabolique mammalienne (mix-S9). Parallèlement à ces analyses, des gammes de témoins positifs avec S9 (B[a]P) et sans S9 (NQO) ont été réalisées afin de déterminer des équivalents en molécules de référence pour chaque extrait de chacune des campagnes de prélèvements. Un test statistique (test de STUDENT) a ensuite été réalisé pour déterminer les différences significatives entre les facteurs d'induction du système SOS obtenus pour les extraits et les témoins négatifs (DMSO avec ou sans S9). Les valeurs significativement différentes au risque 0,05 ont été utilisées pour déterminer les équivalents en molécules de référence.



**Figure 52 : Génotoxicité des extraits des différentes campagnes de prélèvements en équivalents de molécules de références (A : B[a]P avec S9 ; B : NQO sans S9).**

Un potentiel de génotoxique direct (sans bioactivation) a été mis en évidence, de façon significative à la fois en sortie de STEU et au niveau du barrage de Poses (Figure 52). Cependant, ce potentiel est nettement plus important en sortie de STEU (d'un facteur de 1,5 à 6). Le potentiel progénotoxique (avec bioactivation) est très faible au niveau du barrage de Poses. En effet, sur 4 des 6 prélèvements réalisés aucun potentiel progénotoxique n'a été détecté. En sortie de STEU, le potentiel progénotoxique est plus important mais présente également une plus forte variabilité qui tend à mettre en évidence une variabilité saisonnière de la contamination ou de l'efficacité de la STEU.

Des études antérieures se sont déjà intéressées à caractériser le potentiel génotoxique au niveau de l'estuaire de Seine. Cependant, ces travaux se sont uniquement intéressés à la génotoxicité de sédiments ou de matières en suspension provenant de l'estuaire (Cachot et al., 2006; Vincent-Hubert et al., 2012). Ces études avaient notamment mis en évidence de niveaux non négligeables en HAP en lien avec une un potentiel génotoxique élevé (facteur d'induction SOS de 6) dans des sédiments prélevés à Oissel, La Bouille et Caudebec.

## **2.2 Perturbateurs endocriniens et dioxine-like**

Il est reconnu que les effluents de STEU urbaines constituent une source de contamination des milieux aquatiques par les composés chimiques de type perturbateur endocrinien (PE). Un des mécanismes initiaux de l'action des perturbateurs endocriniens consiste en leur capacité à se lier à certains récepteurs nucléaires. Ces récepteurs sont des facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes clés impliqués dans les réponses cellulaires aux hormones (Mnif et al., 2006). Une altération de l'activité de ces récepteurs peut donc conduire à un dysfonctionnement cellulaire ou tissulaire susceptible d'affecter des fonctions physiologiques essentielles régulées par le système endocrinien comme le développement ou la reproduction. La présence de deux grandes familles de polluants

toxiques, les perturbateurs endocriniens à activité hormono-mimétique et les composés dioxin-like, a été testée à l'aide de bioessais *in vitro*.

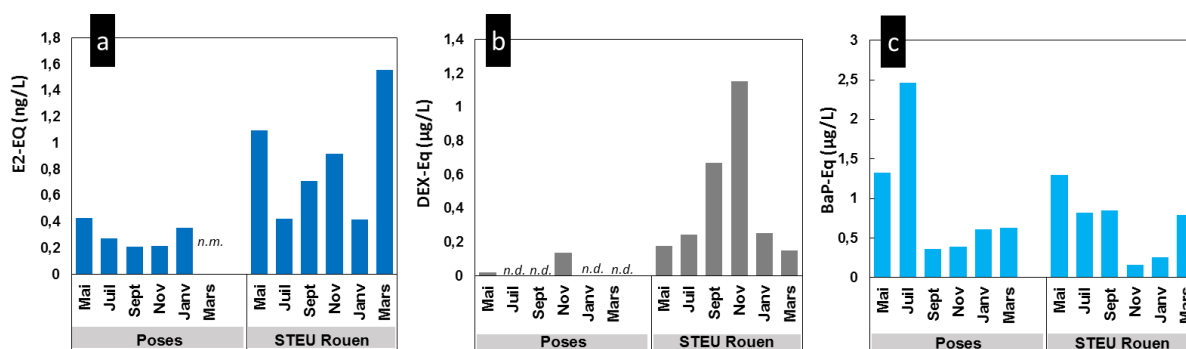
Les résultats ont mis en évidence des profils d'activités multiples sur les deux sites investigués. L'effluent de STEU est ici clairement identifié comme une source non négligeable et continue de composés hormonaux de type œstrogénique (Figure 53 A) avec des niveaux variant entre  $0,9 \pm 0,4$  ng E<sub>2</sub>-Eq.L<sup>-1</sup>. Ces niveaux sont globalement faibles en comparaison des activités retrouvées au niveau de divers effluents de STEU qui sont généralement compris entre 2 et 24 ng E<sub>2</sub>-Eq.L<sup>-1</sup> (Cargouët et al., 2004; Jugan et al., 2009; Bellet et al., 2012; Gardia-Parège, 2015). Les concentrations en œstradiol-équivalents (E<sub>2</sub>-Eq) mesurées dans l'eau de Seine à Poses (valeur moyenne de  $0,3 \pm 0,09$  ng E<sub>2</sub>-Eq.L<sup>-1</sup>) sont équivalentes ou supérieures à la norme de qualité environnementale préconisée pour l'œstradiol (0,4 ng.L<sup>-1</sup>) telle que définie dans le cadre de la directive européenne cadre sur l'Eau (Aït-Aïssa et Creusot, 2014). De plus, concernant l'activité œstrogénique *in vitro*, des valeurs guides au-delà desquelles il existerait un risque pour l'environnement aquatique ont été récemment proposées par différents auteurs. Selon les études, ces valeurs guides varient de 0,3 à 0,5 ng E<sub>2</sub>-Eq.L<sup>-1</sup> (Jarošová et al., 2014; Kunz et al., 2015; Van Der Osst et al., 2017a). Sur la base de ces valeurs, les concentrations en équivalent-biologique retrouvées dans l'eau de Seine à Poses conduiraient à un déclassement ce site du point de vue réglementaire.

La STEU d'Archères (l'amont de Poses, 6,5 millions équivalent-habitants) avait déjà été identifiée comme une source majeure de composés œstrogéniques en Seine (Cargouët et al., 2004; Gaspéri et al., 2010). Cargouët et al. (2004) avaient récolté des eaux de Seine prélevées 1 km en amont et 1 km en aval de la STEU d'Archères. Une augmentation de l'activité œstrogénique d'un facteur 6 (de 0,76 à 4,52 ng E<sub>2</sub>-Eq.L<sup>-1</sup>) avait alors été constatée entre l'amont et l'aval de la STEU. Une étude menée en 2002 avait mis en évidence la présence d'œstrogéno-mimétiques dans les eaux de Seine en amont de l'estuaire (Fenet et al., 2003). Les niveaux retrouvés (20-81 % de transactivation induits par les extraits d'eau) n'étaient qu'en faible partie expliqués par les concentrations en alkylphénols retrouvées au niveau de ces sites. La présence d'E2, EE2 et E1 avait également été étudiée au niveau de STEU d'eaux de surface proche de l'agglomération parisienne (Cargouët et al., 2004). Dans cette étude, ces composés expliquaient jusqu'à 50 % de l'activité mesurée dans les effluents mettant ainsi en évidence la présence de composés contributeurs inconnus ou du moins non recherchés (Cargouët et al., 2004).

L'effluent de STEU est également identifié comme un vecteur important de composés de type glucocorticoïde avec des activités pouvant aller jusqu'à 1,5 µg DEX-Eq.L<sup>-1</sup> (Figure 53 B). Toutefois, aucune activité (anti)androgénique significative n'est observée dans notre étude,

bien que les effluents de STEU urbaines soient parfois décrits comme une source en composés androgéniques, en particulier en stéroïdes androgènes d'origine humaine (Bellet et al., 2012). Cependant, ce résultat est à mettre en regard de la présence de fortes activités de type glucocorticoïde dans l'effluent. L'activité androgénique a été détectée à partir de la lignée MDA-kb2 qui co-détecte les androgènes et les glucocorticoïdes. En ce sens, la présence de trace de ligands androgéniques, potentiellement masquée par la présence de glucocorticoïdes, ne peut être écartée. L'utilisation d'un bioessai *in vitro* spécifique du récepteur des androgènes (AR) permettrait de conclure de manière plus définitive sur la présence/absence de ligands androgéniques dans ces échantillons.

En parallèle des activités œstrogéniques et androgéniques/glucocorticoïdes, la présence de ligands aux récepteurs AhR a également été recherchées au niveau des deux sites. Des activités ont été observées après 4 h d'exposition au niveau des deux sites et à tous les temps d'échantillonnage (Figure 53 C). L'absence d'activité mesurée après 24h d'exposition suggère la présence de composés actifs qui sont rapidement métabolisés tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou certains composés pharmaceutiques comme l'ibuprofène et le naproxène (Louiz et al., 2008; Thibaut et Porte, 2008; Kinani et al., 2010). Des activités de type HAP-like (Figure 53 C) sont systématiquement détectées dans l'effluent de STEU et/ou dans l'eau de Seine, à des niveaux assez similaires ce qui suggère des origines multiples pour ces composés (à la fois eaux usées et pollutions plus diffuses). En général, les concentrations en BaP-Eq reportées ici sont en accord avec celles obtenues au cours d'études antérieure sur ce même site (Budzinski et al., 2012).



**Figure 53 : Evolution des activités *in vitro* de type (A) œstrogénique (ER), (B) glucocorticoïde (GR) et (C) HAP-like (AhR) dans l'eau de Seine à Poses et l'effluent de STEU à Rouen au cours des 6 campagnes de mai 2014 à mars 2015. STEU de Rouen = prélèvement moyenné 24 h ; eau de Seine à Poses = prélèvement ponctuel. n.d. activité non détectée ; n.m. non mesurée (pas de donnée).**

Ces campagnes ont révélé des profils d'activités montrant la présence, dans l'effluent de STEU et dans l'eau de Seine, d'activités de type œstrogénique, glucocorticoïde et HAP-like. Une première étude avait été réalisée en 2011 afin d'évaluer la présence de perturbateurs endocriniens au niveau du barrage de Poses. Aucune activité de type œstrogénique,

androgénique ou glucocorticoïde n'avait pu être mis en évidence sur les campagnes réalisées à cette époque. Les extraits organiques avaient été préparés suivant un protocole identique et testés sur les mêmes lignées cellulaires (MELN et Mda-Kb2). Cependant, le volume extrait était seulement de 250 mL (facteur de concentration : 500) contre 10 L (facteur de concentration : 4000) dans cette étude. Comme cela a déjà été rapporté (Aït-Aïssa et Creusot, 2014; Brack et al., 2016), cette approche souligne l'importance de travailler avec des échantillons de large volume afin de baisser les limites de détection des bioessais.

Le prélèvement ponctuel présente néanmoins plusieurs limites : d'une part du point de vue de la représentativité de l'échantillon dans le temps puisqu'il reflète l'état de contamination à un moment fixe donné et ne prend pas en compte les variations dans le temps ; d'autre part du point de vue logistique, puisqu'il a nécessité le prélèvement et le transport au laboratoire de volumes relativement conséquents d'eau. L'utilisation d'échantillonneurs passifs semble être une alternative intéressante pour surveiller les activités *in vitro* dans l'eau grâce à leur pouvoir accumulateur (Tapie et al 2011, Creusot et al 2014). Ainsi, les mêmes bioessais *in vitro* ont été appliqués aux extraits POCIS qui avaient été déployés sur les sites de Poses et Rouen (janvier et février 2015).

Les résultats présentés Tableau 26 confirment les profils observés dans les échantillons d'eaux ponctuels. L'effluent de STEU est clairement source de composés à activité ER et AR/GR. Les niveaux d'équivalent œstrogène retrouvé au niveau du site de Poses sont relativement faibles en comparaison à ceux recensés dans l'étude menée par Creusot et al., (2013b) au niveau la rivière Réveillon (10 – 30 ng E2-Eq/ g de phase HLB). Ces activités sont également retrouvées sur le site de Poses, avec toutefois des activités AR/GR très faibles (détectées mais non quantifiées).

**Tableau 26 : Suivi des activités ER, GR/AR et AhR dans les extraits de POCIS déployés sur les sites de Poses et de Rouen. n.d. non détecté.**

	Activité ER	Activité AR/GR	Activité HAP-like (AhR - 4 h d'expo)	Activité dioxin-like (AhR - 24 h d'expo)
	ng E2-Eq/g HLB	ng DEX-Eq/g HLB	µg BaP-Eq/g HLB	ng TCDD-Eq/g HLB
<b>Blanc "laboratoire"</b>	n.d.	n.d.	0,6	n.d.
<b>Blanc "terrain"</b>	n.d.	n.d.	2,7	n.d.
<b>Poses, Campagne 1</b>	1,5	<LOQ	2,0	2,0
<b>Poses, Campagne 2</b>	2,2	<LOQ	0,8	1,0
<b>STEU Rouen</b>	34,8	9332	13,1	7,9

Concernant les activités HAP-like, les témoins d'extraction « laboratoire » et « terrain » se sont avérés positifs, possiblement à cause d'une contamination via l'air ambiant. L'échantillon de STEU reste cependant significativement plus contaminé. Enfin, nous avons



étendu le diagnostic à l'évaluation de l'activité dioxin-like. Ce bioessai consiste à exposer les cellules pendant 24 h afin de minimiser la contribution des HAP qui sont rapidement métabolisés par les cellules (quelques heures). Ce test a simplement permis de montrer la présence dans les échantillons de Poses et de Rouen de ligands du récepteur AhR à des niveaux supérieurs à ceux présents dans les blancs. Les niveaux mesurés en composés activateurs d'AhR restent cependant très faibles et sont majoritairement associés à des composés de type HAP. Les niveaux retrouvés en sortie de STEU sont cohérents avec ceux recensés en sortie de traitement secondaire. En effet, des niveaux de 5,8 ng-E2-Eq /g de phase, 1,3 µg-DHT-Eq /g de phase et 4 µg-B(a)P-Eq /g ont été rapportés sur des extraits POCIS préalablement installés en sortie d'un traitement secondaire dans une STEU française (Gardia-Parège, 2015).

- Parmi les 200 contaminants organiques polaires recherchés au niveau de deux points d'entrée (Poses et sortie de la STEU de Rouen), 104 et 123 ont été détectés au moins une fois respectivement à Poses et en sortie de STEU. Le bassin versant amont par l'intermédiaire de Poses est responsable de la majorité des apports. Le niveau de concentration observée dans cet hydrosystème résulte de l'importance des effluents urbains provenant de bassin versant, des usages spécifiques résultant par exemple de l'agriculture mais également du débit fluvial qui dilue la contamination. Une analyse du risque a été réalisée sur 48 molécules retrouvées au niveau du site de Poses : 10 molécules sont retrouvées à des niveaux préoccupants. Parmi les molécules recherchées, le métazachlore, la DEA, la terbutryne, diclofénac, le triclosan, le fipronil, gemfibrozil, l'ibuprofène, l'imidaclopride et la terbutryne font parti des molécules les plus préoccupantes.

- En parallèle, l'application d'une batterie de bioessais *in vitro* a permis de mettre en évidence la présence de composés génotoxiques, hormono-mimétiques et HAP-like, à des niveaux parfois préoccupants. En perspective, la recherche ciblée de composés connus pour agir sur ces récepteurs (œstrogènes, glucocorticoïdes, HAP) serait nécessaire afin d'évaluer leur contribution dans les activités retrouvées en Seine. De manière plus approfondies, des approches de type EDA (Effect-Directed Analysis) sur les échantillonneurs passifs pourraient permettre de caractériser les composés responsables des activités observées.



### 3. Publications

#### 3.1 Occurrence of polar pesticides in the Seine estuary (France)

Fuster L.<sup>1</sup>, Pardon P.<sup>1,2</sup>, Le Menach K.<sup>1,2</sup>, Dévier M.H.<sup>1</sup>, Mazellier P.<sup>1</sup>, Budzinski H.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> University of Bordeaux, EPOC UMR 5805 LPTC, Talence, France

<sup>2</sup> CNRS, EPOC UMR 5805 LPTC, Talence, France

E-mail contact: [helene.budzinski@u-bordeaux.fr](mailto:helene.budzinski@u-bordeaux.fr)

#### ABSTRACT

The watershed of the Seine is the most anthropized one of France with over 17 million of inhabitants, and 30 % of agricultural activity regrouped only in 12 % of national surface area. The aim of the present study is to evaluate (1) pesticides loaded into the estuarine Seine River, (2) concentration levels of selected pesticides in upper estuary and (3) benefit of POCIS in the context of risk assessment in estuarine media.

Concerning 63 targeted chemicals, 40 have been detected at least once while 31 pesticides were detected in 70% of samples (n=6). AMPA and glyphosate (GLY) were major compounds. Upstream catchment of the Seine River represents a major input of 9 tons.per year of pesticides including biocides, plant protection products but also some of their transformation products. Six pesticides comprising fipronil, terbutryn, DEA, metolachlor, imidacloprid, metazachlor were found above their predictive no effect concentration and represented compounds of environmental concern.

The assessment of concentration levels of contaminants in surface water represents one of major goal covered by Water framework directive (WFD). Results of deployment of Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) in the Seine estuary, indicated the occurrence of pesticides at trace levels (0.1 to 75 ng.L<sup>-1</sup>).The time-integrating nature of POCIS resulted in a better representativeness of risk engendered by pesticides. Moreover, use of passive sampler improve assessment of seasonal behaviour of pesticides. Seasonal trends of pesticides have been observed due to agricultural applications (isoproturon and metolachlor), river flow variations, residence time of water (imidacloprid, fipronil).

\*NB: Pour des raisons de lisibilité les références bibliographiques ont été placées en fin de manuscrit.

## 1. INTRODUCTION

Pesticides represent one of the most detected class of chemicals in aquatic environment (Hernández et al., 2015; Busch et al., 2016). More than 1300 active chemicals are listed in European Union pesticides database in 2016 (European Commission, 2016). Because of biocides and pesticides are designed to control the occurrence of unwanted organisms, they are very harmful (Orenzo et al., 2001; Mnif et al., 2011). The main sources of pesticides in aquatic environment are runoff from agriculture but also their application in various anthropogenic applications as public health, treatment of public and private structure, livestock and domestic animals or homes (Garcia et al., 2012). Because of wastewater treatment plants (WWTPs) are not designed to remove these micropollutants, a lot of pesticides can reach the aquatic ecosystems (Eggen et al., 2014; Luo et al., 2014). Recently, on 450 pesticides investigated in WWTP effluent in Spain, seventeen have been detected including parent compounds but also transformation products (TPs) (Rousis et al., 2017).

According to the statistical office of the European Union (UE), France is one of the country with highest use of pesticides in Europe (rank 10) and the major sellers of herbicides (Eurostat, 2014). The Seine estuary is a highly artificialized catchment in Europe, including agricultural runoff and important urban areas. Estuarine areas are also fragile zones that are sheltered habitats, nurseries and migratory passage for biota. While water contamination by pesticides has been widely reported in various surface water (Blanchoud et al., 2007; Cruzeiro et al., 2017; Munz et al., 2017), data about occurrence of agricultural and urban pesticides in estuaries are still sparse. Effectively, estuaries as the Seine one suffer a high impact of different anthropogenic activities (urbanization, agriculture, and livestock) from upstream watershed, input by intra-estuarine effluents of WWTP. In this context, information on actual levels of pesticides in surface water is fundamental to prioritized monitoring and reduction measure.

Nevertheless, pesticides monitoring in estuarine water can be very complex because of various inputs and persistence of chemicals, seasonality of uses; low and high variability of concentration levels (Cruzeiro et al., 2016). In this context, passive sampling can be used in order to give an integrative assessment of concentration levels and risk of pesticides (Dévier et al., 2011; Poulier et al., 2014; Vrana et al., 2016). Polar organic chemical integrative sampler (POCIS) have been already used to characterize the presence of polar pesticides in natural water (Tapie et al., 2011; Gonzalez-Rey et al., 2015).

In this context, the aims of the present study is to evaluate (1) concentration levels of various polar pesticides in the Seine estuary (2) pesticides loaded into the estuarine Seine

River, (3) concentration levels of selected pesticides in upper estuary and (4) benefit of POCIS in the context of risk assessment in estuarine media.

## **2. MATERIALS AND METHODS.**

### **2.1. Chemical and materials**

All solvents used were at least of HPLC grade, Ultra gradient HPLC quality and pesticide residue analysis grade, and were purchased from Scharlau (ICS, Gradignan, France), J.T. Baker (Atlantic Labo, Bruges, France) or Acros Organics (Fisher, Illkirch, France). Ultrapure water was homemade with a Milli-Q system (Millipore SA, St. Quentin les Yvelines, France) with resistivity of 1.2 at 25°C and total organic carbon < 2 ppb. All chemicals and labeled internal standards, with a high purity grade (>90%), were purchased from Sigma Aldrich, Toronto Research Chemical, CDN Isotopes, Cambridge Isotopes Laboratories, LGC Standard, Wellington Laboratories and Cluzeau Info Labo. Solid phase extraction (SPE) OASIS® HLB cartridges were purchased from Waters (Guyancourt, France) and glass SPE cartridges were provided by Supelco® (Saint Quentin Fallavier, France). Polyether sulfone (PES) membranes, OASIS® HLB bulk and POCIS stainless rings, used for POCIS, were respectively purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), Waters (Guyancourt, France) and Alaser (Talence, France).

### **2.2. Area of study: Seine estuary and sample collection**

The watershed of the Seine is the most anthropized one of France with over 17 million of inhabitants, and 30 % of agricultural activity regrouped only in 12 % of national surface area (Fig.1). Thereby, the Seine estuary received water from the most megalopolis of France: Paris. Seine catchment and its estuary are mostly composed of agricultural lands as industrial crops and cereals (Romero et al., 2016). It's a macrotidal estuary divided in three parts: fluvial (Poses to Caudebec), middle (Caudebec to Honfleur) and lower estuary (Honfleur to Manche sea) (Fig.1). The annual flow rates measured at the Poses dam can varied from 200 to 1000 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> (Romero et al., 2016).

In order to characterize major input to the Seine Estuary, two sites were chosen. Hydraulic dam of Poses was chosen to characterize upstream inputs to estuary by punctual sampling (fig.1). Effluent 24h composite samples were collected in the main estuary wastewater treatment plant (Émeuraude WWTP, Rouen: capacity of 0.7 million inhabitant equivalents) in order to evaluate direct inputs from WWTP into the estuary. Sites were sampled every two months during one year from May 2014 to March 2015. To characterize the occurrence of pesticides in the estuary, grab samplers and POCIS were also collected all along the estuary at Oissel, La Bouille and Caudebec, during six month from December 2016 to May 2017.

POCIS were prepared as previously described by (Tapie et al., 2011; Belles et al., 2014b). Pharmaceutical POCIS home-made devices were used. They contain 200 mg of Oasis® HLB sorbent enclosed between two PES membranes held together by stainless steel rings (hole diameters = 54 mm). Selected PRCs were spiked into the sorbent of POCIS prior to exposure at a nominal concentration of 14 µg g<sup>-1</sup>. To prepare spiked sorbent, each PRC compound was dissolved into 50 mL of DCM and sonicated during 15 min. This solution was added to 10 g of sorbent, and the solvent was eliminated by rotary evaporation. POCIS were assembled with this sorbent and reference cartridges were prepared with 200 mg of the same spiked sorbent in glass SPE tubes with polyethylene frits. These cartridges were stored at -18 °C and were eluted when the POCIS were extracted. POCIS were placed in triplicate in the water column and exposed during an average of 30 days. Water samples were filtered through glass fiber filter (pore size 0.7 µm, Whatman®) and stored in high density polyethylene (HDPE) bottles (Nalgene®) at -20°C until analysis.

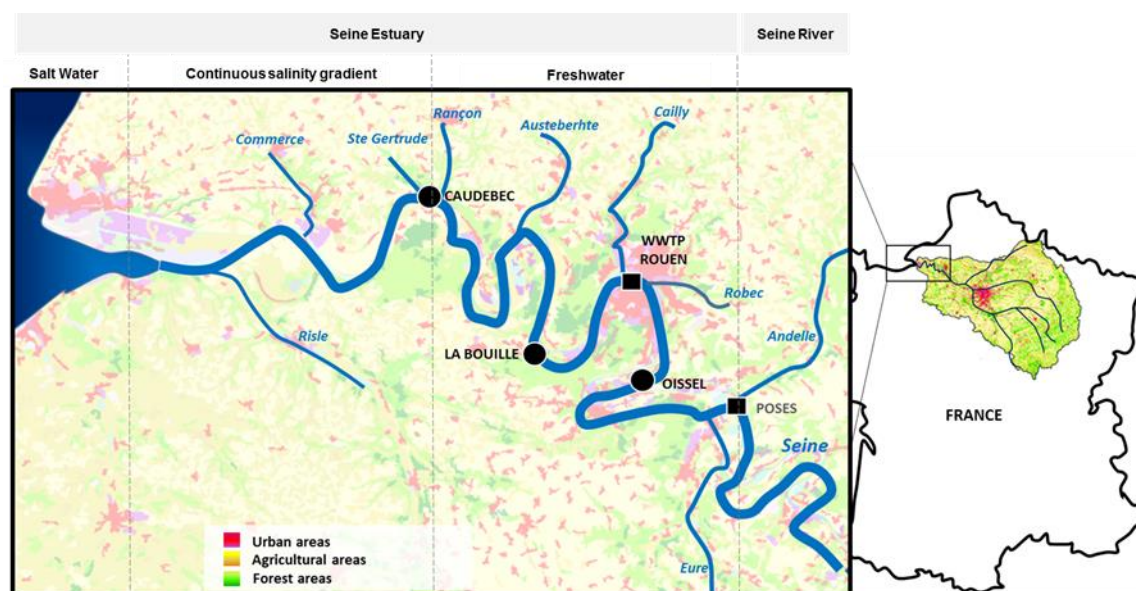


Fig.1: Sampling sites in the Seine estuary (France).

### 2.3. Chemicals analysis of dissolved phase

In this work, a total of 62 pesticides (Table S1) including herbicides, insecticides, fungicides and some transformation products (TPs) belonging to different chemical classes were studied. Selected compounds including agricultural (PP) and biocides uses (B) but also molecules prohibited (P) in France. Detail of chemicals, CAS number and uses were given in Table S1.

### **2.3.1. Chemical analyses of 56 pesticides**

Extraction was carried out according to Belles et al., (2014a). Briefly, water samples (100 mL) were extracted by solid phase extraction (SPE) using OASIS<sup>®</sup> HLB cartridge (60 mg, 3 mL), previously conditioned by 3 mL of MeOH and 3 mL of acidified ultra-pure water (pH 2). The cartridge was dried under vacuum and analytes eluted with 3 mL of MeOH. Analysis were performed on liquid chromatography-coupled to tandem mass spectrometry system (Infinity 1290, Agilent technologies, Santa Clara, USA) using C18 column (Penomenex, 2.1×150 mm, 1.7 µm). The acquisition was performed in positive electrospray ionization (ESI+) and multiple reaction monitoring (MRM) mode on a Triple Quad spectrometer (6460, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) as previously described

### **2.3.2. Chemical analysis of fipronil and its degradation products**

Analyses of fipronil and his degradation products in water samples were performed after solid phase micro-extraction on gas chromatography-coupled to tandem mass spectrometry system (SPME-GC-MS/MS) as previously described in (Le Coadou et al., 2016). After an extraction by immersion of a 65 µm polydimethylsiloxane/ divinylbenzene (PDMS/DVB) fiber, compounds were desorbed at 250 °C in pulsed splitless mode (25 psi, 1 min). Gas chromatographic separation was accomplished using a 7890 A system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) interfaced with a splitless injector for a HP 5 MS UI column (30 m x 0.5 mm x 0.25 µm film thickness, 5 % phenylmethylsiloxan). Helium (6.0) was uses as carrier gas at constant flow (1.1 ml.min<sup>-1</sup>). Detection was performed by using 7000 A GC MS triple quadrupole tandem mass spectrometer (Agilent technologies, Santa Clara, USA). The analyser was operated in MRM mode as previously describec Le Coadou et al., (2016).

### **2.3.3. Specific Analyses of glyphosate and AMPA**

Glyphosate and AMPA are both highly polar, therefore an offline derivatization step were realized with fluorenylmethylcarbonyl chloride (FMOC) before analyses. The method uses followed the recommendations of the project ISO 16308:2014 and as described in Fauvelle et al., (2015). Briefly, 5 mL of sample was transferred into 15 mL polypropylene tubes and spiked by internal standard (given in table S1). Then, 325 µL of 5 mM sodium borate and 200 µL 0.1M Na<sub>2</sub>EDTA were added and homogenized. Additions of 4.5 mL of acetonitrile and 600 µL of FMOC-Cl (50 mg.L<sup>-1</sup>) were realized. Mixture was left for 30 min in the dark at room temperature. Acetonitrile was evaporated under nitrogen flow evaporator. A liquid-liquid extractions were performed on derivatized sample with 3 X 1.5 mL ethylacetate. Ethylacetate was evaporated under nitrogen flow evaporator and 100 µL formic acid 5 % was added. Homogenized extract was loaded in OASIS<sup>®</sup> HLB cartridge (3 mL, 60 mg) previously conditioned by 1 mL methanol and 1 mL formic acid (0.1%). The cartridge was dried under



vacuum and analytes eluted with 3X 700  $\mu$ L of mixed methanol and ammonium hydroxide (2%). The final extract was evaporated under the stabilized volume at 0.5 mL. Analysis were performed on liquid chromatography-coupled to mass spectrometry system (Infinity 1290, Agilent technologies, Santa Clara, USA) using C18 column (Phenomenex, 2.1x150 mm, 1.7  $\mu$ m). The acquisition was performed in positive electrospray ionization and multiple reaction monitoring (MRM) mode on a Triple Quad spectrometer (6460, Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

#### 2.4. Chemical analysis of passive sampler

##### ***POCIS extraction and analyses***

Following the exposure, the POCIS were dismantled and Oasis® HLB sorbent was transferred into glass SPE tubes with polyethylene frits (adapted from Togola and Budzinski (2007) and Tapie et al., (2011)). The cartridges were disposed on a Visiprep SPE system and the sorbent was rapidly dried to remove water excess. Afterwards, another polyethylene frit was added on the top of the sorbent. The sorbent was dried for 30 min under vacuum, and cartridges were eluted with successive additions of: 10 mL of MeOH, 10 mL of MeOH and DCM mixture (50:50, v/v) and 10 mL of DCM. Internal standards were added into receiving vials for the quantification (diuron- $d_6$ , atrazine- $d_5$ , simazine- $d_{10}$  and terbutylazine- $d_5$ ). The extract was divided in two equal parts, and the first aliquot of 15 mL was evaporated under nitrogen flow and dissolved in 100  $\mu$ L of MeOH. An aliquot of the extract was evaporated dry and transferred into EA for fipronil and metabolites injections (1  $\mu$ L 7000C GC-MS/MS).

Time-weighted average concentration (TWAC) were estimated with assuming a linear accumulation of analytes and with application of Eq. 1:

$$C_{TWA} = \frac{Ms}{(Rs \times t)} \quad \text{Eq. 1.}$$

Where Ms is the mass of accumulated analyte (in grammes), t represent exposure time (in days) and Rs is the sampling rate constant (in L.day<sup>-1</sup>).

As described Performance Reference Compounds (PRC) approach derives from lipophilic passive samplers (Booij et al., 2002; Huckins et al., 2002), and were firstly applied in POCIS by Mazzella et al., (2010, 2007): reference compounds were introduced in the accumulative phase before sampler assembling and will run out of it throughout the sampling period, allowing to calculate the elimination rate of the PRC. It consider initial and final PRC concentrations ( $C_t$  and  $C_0$  in ng.g<sup>-1</sup>), also as the exposure time, assuming that PRC desorption and chemical accumulation are influenced by same parameters, to correct the theoretical Rs on the basis of differences between theoretical and *in-situ*  $k_e$  of the PRC (Eq. ).

$$R_{S_{in-situ}} = R_{S_{labo}} \times \frac{k_{e\ in-situ}}{k_{e\ labo}} \quad \text{Eq. 2.}$$

$R_s$  value used in this study were estimated from previous laboratory calibrations and field applications (Aminot, 2013; Belles et al., 2014b; Dufour, 2017).

## 2.5. QA/QC

Sample preparations were performed in a room dedicated to the processing of matrices of low contamination level (the ng/L level), with equipment (balance, pH meter, SPE tubing, glass tank) dedicated to ultra trace analysis and also dedicated glassware. Prior to use, all glassware was washed with detergent and carefully rinsed with Milli-Q water. The glassware was then calcinated at 450 °C overnight.

All additions of matrix and standard solutions were controlled by gravimetry. A blank sample (reagents and surrogate standards) and a control sample (blank sample spiked with model compounds) were performed for each batch of experiments in order to check the background contamination and the analytical performance. A standard solution (model and surrogate compounds) was also injected at least every 10 real samples to monitor any drift in the instrumental performance (sensitivity, contamination) and to assure the accuracy of the quantification. For the analysis of Fipronil and its TP a fiber blank was measured before each water sample by exposing the SPME fiber in an empty vial under the same conditions as the samples. The blank levels were not subtracted from the results of samples since they were variable.

The procedural LOQs were determined by analysis of spiked natural mineral water with various concentrations, at a signal to noise ratio of ten. For the analysis of Fipronil and its TP a fiber blank was measured before each water sample by exposing the SPME fiber in an empty vial under the same conditions as the samples. The LOD and LOQ for POCIS samplers are back-calculated based on the analytical protocol and on the sampling rate,  $R_s$  as described (Poulier et al., 2015).

Quantification was realized by 31 labelled internal standard (table S1), spiked in the sample prior extraction. Method's limit of detection (MLQ) ranged to 0.1 to 17 ng.L<sup>-1</sup> for multi-residues protocols. Analysis allows to detected fipronil and its transformation products with MLQ ranged from 0.1 to 0.6 ng.L<sup>-1</sup>.

## 2.6. Annual fluxes calculations

Daily loads of pesticides are calculated with the detected concentrations of compounds in each sample site, date, and volume of water passing site. Annual loads were extrapolated with the average daily loads and the number of day in year. Daily and annual debits (between

May 2014 to March 2015) in surface water (Seine) were obtained from the French minister of Ecology, Energy and Sustainable Development (<http://hydro.eaufrance.fr>). Fluxes were obtained applying the following formula:

$$Flux (kg.year^{-1}) = Q_m \times \left( \frac{\sum(Q_i \times C_i)}{Q_i} \times K \right)$$

Where K is a conversion factor to take account the desired period (in our case 365 days),  $C_i$  the instantaneous concentrations ( $Kg.L^{-1}$ ),  $Q_i$  the discharge ( $L.jour^{-1}$ ) of sampling day and  $Q_m$  ( $L.jour^{-1}$ ) the mean water flow for the period considered. ( May 2014 to March 2015).

## **2.7. Risk assessment**

A preventive risk assessment approach was realized in order to identify problematic pesticides loaded into the estuarine Seine River. In accordance with different authors, risk quotient (RQ) is calculated with measured environmental concentrations (MEC) of each pesticides. Risk quotient is defined as the ratio between MEC and individual predicted no effect concentration (PNEC) of each chemicals. All PNEC used in this study were obtained from the INERIS chemical portal (INERIS, 2017 ) and from Von der Ohe et al., (2011).

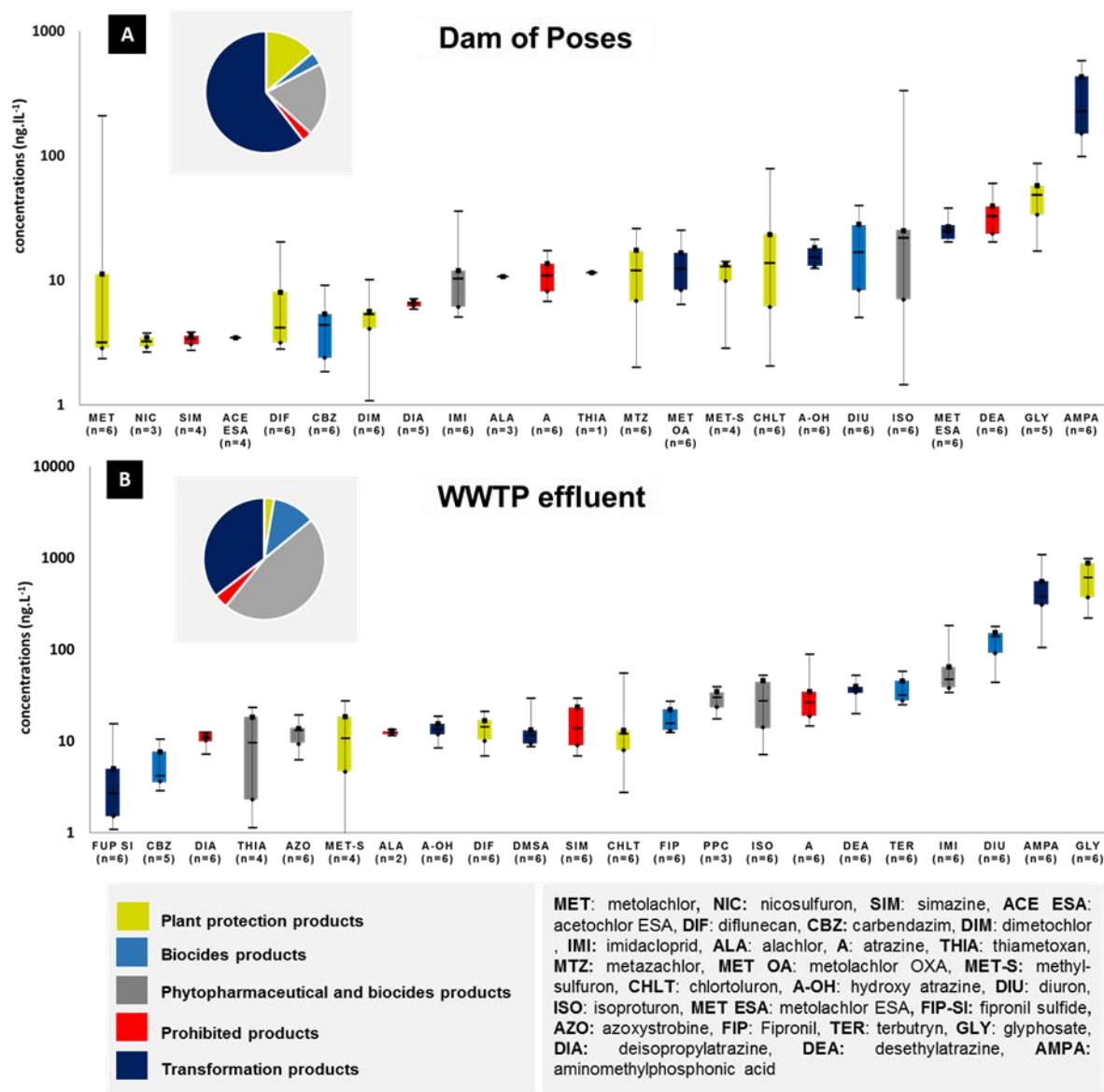
A final risk quotient ( $RQ_{tot}$ ) for the pesticide mixture was calculated by simply summing up measured environmental concentration (MEC)/PNEC ratios of all individual pesticide compounds (Silva and Cerejeira, 2015) .

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1. Inputs of pesticides to the Seine estuary**

#### **3.1.1. Occurrence in the Dam of Poses**

Concerning 63 targeted chemicals, 40 have been detected at least once while 31 pesticides were detected in 70% of samples ( $n=6$ ). AMPA and glyphosate (GLY) were major compounds with respectively average concentrations of  $294 \pm 199$  and  $49 \pm 26$   $ng.L^{-1}$  (fig.2). Contamination profiles of Poses were marked by agricultural pesticides as chlortoluron, metazachlor (MTZ), metolachlor (MET) and isoproturon (ISO) which are used in agricultural application in the Seine watershed. Substances as MET and iSO showed a seasonal concentration pattern, independent of river flow and following the application period. MET and ISO were detected at higher concentration levels respectively in May and November 2014. ISO and MET are intensively used for agricultural applications respectively for winter crops (in November) and maize-production (in May) in the watershed of Seine estuary. Seasonally inputs of some pesticides originated from agricultural land uses have been already reported in different works (Englert et al., 2015; McMahan et al., 2016; Wittmer et al., 2010).



**Fig.2: Box plot of concentration levels of the main pesticides quantified in the dam of Poses (grab samples) (A) and the Emeuraude WWTP effluent. Colors of box plot referred to authorized used of each compounds. MET: metolachlor, NIC: nicosulfuron, SIM: simazine, ACE ESA: acetochlor ESA, DIF: diflunecan, CBZ: carbendazim, DIM: dimetochlor, IMI: imidacloprid, ALA:alachlor**

In 2007, a study on the Marne River (upstream of the Seine estuary) have shown high concentration levels of agricultural pesticides such as isoproturon which is one of the most used chemicals for winter wheat production in the Seine catchment (Blanchoud et al., 2007). Despite usage restrictions and the banishment of different toxic compounds, some pesticides as atrazine still represent an issue in water pollution, with average concentrations ranging from 7 to 17 ng.L<sup>-1</sup>, in our study. In France, atrazine was prohibited since 2003, concentration levels could be explain by illegal use or release from soil (Guibal et al., 2017).

Urban pesticides (biocides) are consumed during all the year and they are continuously released into river by WWTP effluent, whereas agricultural pesticides are used only during

focus authorized period especially in agricultural area. Concentration levels of pesticides are higher than concentrations reported in the longest river of European Union: In the Danube River, atrazine, isoproturon and diuron were from 5 to 38 lower than concentrations in the Seine estuary.

### **3.1.2. Concentration levels in WWTP effluent**

GLY and its TP, AMPA were major compounds with respectively average concentrations of  $615 \pm 319$  and  $475 \pm 342$  ng.L<sup>-1</sup> (n=6) (fig.2). Highest means concentrations were also obtained for diuron (DIU), imidaclopride (IMI), terbutryn (TER), isoproturon (ISO) and fipronil (FIP) with concentration levels ranged from 10 to 100 ng.L<sup>-1</sup>. Occurrence of these pesticides have been widely reported at these levels in different works focused on WWTP effluent (Campo et al., 2013; Qi et al., 2015; Singer et al., 2010). High concentration levels of fipronil (FIP) and (FIP-SI) were quantified in WWTP effluent. Because of the use of fipronil in home and tick treatment of pets, wastewater effluents have been already identified as vectors of elevated concentrations of fipronil and its TPs in surface water (Mcmahen et al., 2016). The occurrence of atrazine (A) and its major TPs (DEA, A-OH) with high level have been recently reported in 90 WWTP effluents, suggesting recent uses despite a European prohibition (Arlos et al., 2014; Loos et al., 2013).

### **3.2. Risk assessment of pesticides load to the Seine estuary**

Annual pesticides inputs entering the estuary by Poses and WWTP effluent is given in Table 1. Although WWTP effluent showed high pesticides concentrations, they seemed to make a minor contribution of loads to the Seine estuary. Effectively, global inputs of Rouen WWTP effluent represented only 0.5 % of total pesticides loaded to the estuarine Seine River. This result is much more nuanced for agricultural pesticides. While the ratio between Poses and WWTP fluxes of prohibited molecules, biocides products were ranged from 52 to 124, ratio of agricultural pesticides were more than 10 times higher (ratio of 1305). Although annual WWTP inputs were relatively constant, an important variation of mass flow rate of Poses' inputs was measured ( $9378 \pm 4637$  kg.year<sup>-1</sup>). Extremes values were attributed to agricultural pesticides ( $2900 \pm 3703$  kg.year<sup>-1</sup>) as isoproturon and metolachlor. Seine catchment area by dam of Poses represents the major input of pesticides to the Seine estuary. High inputs by upstream is certainly the result of discharged of pesticides by the most important WWTP on the Seine River: "Archères" (6.5 million equivalent inhabitants) and agricultural run-off in the Seine catchment.

**Table 1: Annual inputs of pesticides (Kg.year<sup>-1</sup>) load to the Seine estuary by the dam of Poses and the WWTP effluent of Rouen. (n=6)**

Inputs (Kg.year <sup>-1</sup> ) n=6	Upstream (Poses)	Effluent WWTP	Ratio
<b>Phytopharmaceutical products (only)</b>	2900.2 ± 3703.5	2.2 ± 0.4	1305
<b>Biocides products (only)</b>	296.8 ± 146.8	5.7 ± 1.5	52
<b>Phytopharmaceutical and biocides products</b>	768.7 ± 383.1	22.3 ± 9.8	34
<b>Prohibited products</b>	234.3 ± 59.0	1.9 ± 1.0	124
<b>Transformation products</b>	5177.6 ± 1412.5	17.5 ± 10.2	295
<b>Total</b>	9377.6 ± 4637.3	49.6 ± 10.1	334

Because Poses represents a major input of pesticides to the Seine estuary, a risk assessment approach was realized in order to prioritize relevant pesticides for this estuary. The use of the 95th percentile allows a reasonable assessment without the danger of overestimating risk based on outlier data (Von der Ohe et al., 2011). Thus, risk assessment of eighteen pesticides (selection based on availability of PNEC data) were performed and are presented in Table 2. Six pesticides presented a risk quotient (RQ, see section 2.7) superior to 1: FIP, TER, DEA, MET, IMI, MTZ. Imidacloprid was the compound with the highest frequency of PNEC exceedance (6/6). Exceedance observed for metolachlor was only observed during the month of its application on crops. Although, MEC95th calculated for DIU, ISO, MET and TER were not exceed PNEC, these compound may represent a risk for estuary. DIU, ISO, TER, A and IMI have been already classified as potential candidate to WFD and which can posing significant long term risk in 4 Iberian rivers (Kuzmanovi et al., 2015) and in the Pinios River (Tsaboula et al., 2016). This risk assessment has been realized on a few set of grab water samples (n=6). As previously seen, input of pesticides were highly variables and dependent of both uses and hydrologic pattern.

**Table 2: Risk assessment (RQ) of eighteen pesticides load into the Seine estuary at Poses.**

Compounds	CAS number	MEC95 <sup>th</sup> ng.L <sup>-1</sup>	PNEC		MEC95 <sup>th</sup> /PNEC	
			ng.L <sup>-1</sup>	ref.	ratio	nb excedence
alachlor	15972-60-8	10.7	300	1	0.036	0/6
atrazine	1912-24-9	16.6	600	1	0.027	0/6
azoxystrobine	131860-33-8	6.9	56	1	0.123	0/6
carbendazime	10650-21-7	8.2	150	1	0.054	0/6
chlorotoluron	15545-48-9	65.5	100	1	0.655	0/6
DEA	1007-28-9	54.9	30	1	1.831	3/6
DIA	6190-65-4	7.0	3700	1	0.002	0/6
diuron	330-54-1	37.8	200	1	0.189	0/6
imidacloprid	138261-41-3	30.0	200	4	6.671	6/6
isoproturon	34123-59-6	258.6	300	1	0.862	0/6
metazachlor	67129-08-2	24.0	19	1	1.266	1/6
metolachlor	51218-45-2	160.2	70	1	2.289	1/6
simazine	122-34-9	3.8	1000	1	0.004	0/6
terbutryn	886-50-0	5.0	5	1	0.994	4/6
terbutylazine	5915-41-3	1.8	220	1	0.008	0/6
glyphosate	1071-83-6	81.0	24000	2	0.003	0/6
fipronil	120068-37-3	2.2	0.7	3	3.158	4/6
simazine	122-34-9	3.8	1000	2	0.004	0/6

PNEC used were originated from Von der Ohe et al., (2011) [1], the INERIS chemical portal (2017) [2], ANSES [3] and (Directive 98/8/EC, 2015) [4]

### 3.3. Concentration levels and seasonality of contamination in the Seine estuary

The aim of this section is to evaluate concentrations levels of all along the estuary at Oissel, La Bouille and Caudebec of 14 pesticides selected in order to represent urban (DIU, IMI, TER, PRO) agricole (MET, ISO) and prohibited uses (A) but also some transformation products (DEA, A-OH, MET ESA, metabolites of fipronil). This evaluation was realized during 6 month (from Decembre 2016 to May 2017) with grab samples but also POCIS.

#### 3.3.1. Concentration levels

Concentration levels of nine major pesticides are given Table 3. All 14 targeted pesticides were detected at all sites. Only three compounds showed median concentration levels up to 10 ng.L<sup>-1</sup> (ISO, MET ESA and DEA). Median concentration levels of imidacloprid, atrazine, DEA and ISO were 3 to 6 times higher than concentrations reported in the Arade river estuary (Gonzalez-Rey et al., 2015). When comparing geographical differences, the three sites exhibited similar concentrations. No significant variation has been highlighted between three sites whatever considered compound (non-parametric test, Kruskal-Wallis). This results trend to conclude of a minor impact of monitored pesticides by intra-estuarine inputs (local WWTP and local agricultural uses). High concentration levels of fipronil (0.41 to 3.46 ng.L<sup>-1</sup>) in the estuarine Seine River were quantified (Table 3). While data concerning occurrence of fipronil is still sparse in surface waters, some works have reported concentration levels 5 times lower in European surface waters (Michel et al., 2016; Tousova et al., 2017).

**Table 3: Concentrations (ng.L<sup>-1</sup>) measured at the three sampling points of the estuary from 21/11/2016 to 05/05/17 by grab sample and by POCIS.**

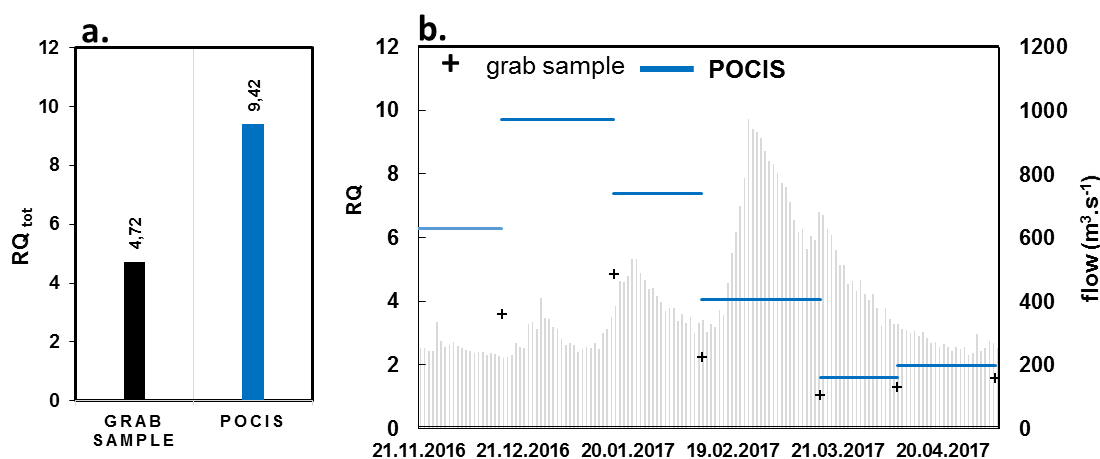
Concentrations (ng.L <sup>-1</sup> )	Oissel (kp 230)		La Bouille (kp 260)		Caudebec (kp 310)	
	Grab sample	POCIS	Grab sample	POCIS	Grab sample	POCIS
	n=6	n=3	n=6	n=6	n=6	n=5
	Mean ± std. dev.	Mean ± std. dev.	Mean ± std. dev.	Mean ± std. dev.	Mean ± std. dev.	Mean ± std. dev.
Atrazine	7.8 ± 1.8	8.7 ± 2.9	8.8 ± 1.9	10.1 ± 2.9	7.9 ± 1.4	8.1 ± 3.1
Hydroxy-atrazine	10.0 ± 1.7	12.3 ± 2.0	10.3 ± 1.0	14.3 ± 3.9	10.7 ± 2.2	7.1 ± 2.5
DEA	12.2 ± 4.0	7.1 ± 3.2	14.5 ± 3.9	7.3 ± 2.4	13.1 ± 3.3	6.7 ± 2.9
Diuron	4.6 ± 1.3	2.6 ± 0.5	4.8 ± 1.1	4.0 ± 1.6	5.4 ± 1.9	3.3 ± 1.3
Isoproturon	16.2 ± 14.0	75.6 ± 84.1	16.5 ± 16.0	63.1 ± 66.6	25.4 ± 34.1	31.6 ± 20.1
Metolachlor	4.9 ± 4.0	2.3 ± 0.5	4.8 ± 3.2	2.9 ± 0.8	5.9 ± 3.3	2.6 ± 1.3
Metolachlor ESA	29.9 ± 12.	14.9 ± 1.0	31.4 ± 16.8	19.5 ± 13.2	36.7 ± 20.0	9.7 ± 5.8
Metolachlor OA	1.9 ± 0.2	2.9 ± 0.9	1.1 ± 0.4	3.1 ± 1.0	1.1 ± 0.3	2.3 ± 0.8
Imidaclopride	6.2 ± 2.5	15.5 ± 4.5	6.5 ± 2.8	17.6 ± 6.8	7.3 ± 4.8	11.4 ± 5.1
Propiconazole	2.6 ± 0.9	2.3 ± 1.1	2.7 ± 0.7	2.9 ± 0.9	2.9 ± 0.8	2.7 ± 1.1
Fipronil	1.1 ± 0.6	1.9 ± 1.1	1.6 ± 1.0	3.4 ± 2.2	1.7 ± 1.1	2.0 ± 1.5
Fipronil desulfanyl	0.9 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.2
Fipronil sulfide	0.6 ± 0.5	0.4 ± 0.3	2.0 ± 1.9	1.3 ± 1.1	2.5 ± 2.1	0.7 ± 0.7
Fipronil sulfone	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.4	0.9 ± 0.7	0.4 ± 0.3	0.6 ± 0.4

Kp : kilometric point (the reference point, kp 0, is the Pont Marie in Paris)

The assessment of concentration levels of contaminants in surface water represents one of major goal covered by Water framework directive (WFD). WFD requires that water quality is monitored once a month (12 sampling / years) and compared to environmental quality

standards (EQS). Currently, grab sampling including often several limitations as inadequate sampling frequency and high limit of quantification. Thus, to improve the monitoring of pesticides, passive sampling were realized during six month. Globally, POCIS allowed to decreased quantification limits of eleven pesticides from fourteen monitored (details are given in table S1). Although, pesticide concentrations are generally similar between POCIS and grab samples, there were notable exception. POCIS estimates were 2 to 6 higher than measured instantaneous concentrations for isoproturon, imidacloprid and fipronil. This phenomenon has already be reported and discussed by Pouiller et al., (2014). POCIS concentration can be multiplied by a factor 2 because of environmental condition that can impact Rs calculation.

$RQ_{tot}$  calculated from six pesticides are given Fig. 3a.  $RQ_{tot}$  calculated from ponctual concentrations were 2 times lower than  $RQ_{tot}$  calculated with POCIS (Fig. 3a). An underestimate risk quotient can be occurred with grab sample. Except for FIP, the individual RQ ( $RQ = MEC/PNEC$ , see section 2.6) values calculated for parent compounds were low during all six month. A variation of  $RQ_{tot}$  between grab and passive samples was observed from November 2016 to May 2017 (fig. 3b). Although  $RQ_{tot}$  were similar, in grab and POCIS, from March to May, important diffrences were observed from November 2016 to March 2017. In accordance with previous works (Poulier et al., 2014; Z. Zhang et al., 2016), this result confirms the usefulness of POCIS for identifying and monitoring the occurrence and risk of polar organic contaminants as pesticides. Capacity of POCIS to smooth the concentration by integrating over the temporal variability provide a more representative value of exposure and thus of risk assessment (Togola and Budzinski, 2007a; Poulier et al., 2014).



**Fig. 3: Average (a) and monthly evolution (b) of risk quotient ( $RQ_{tot}$ ) caused by fipronil, atrazine, diuron, DEA, imidacloprid, isoproturon and métolachlore.**

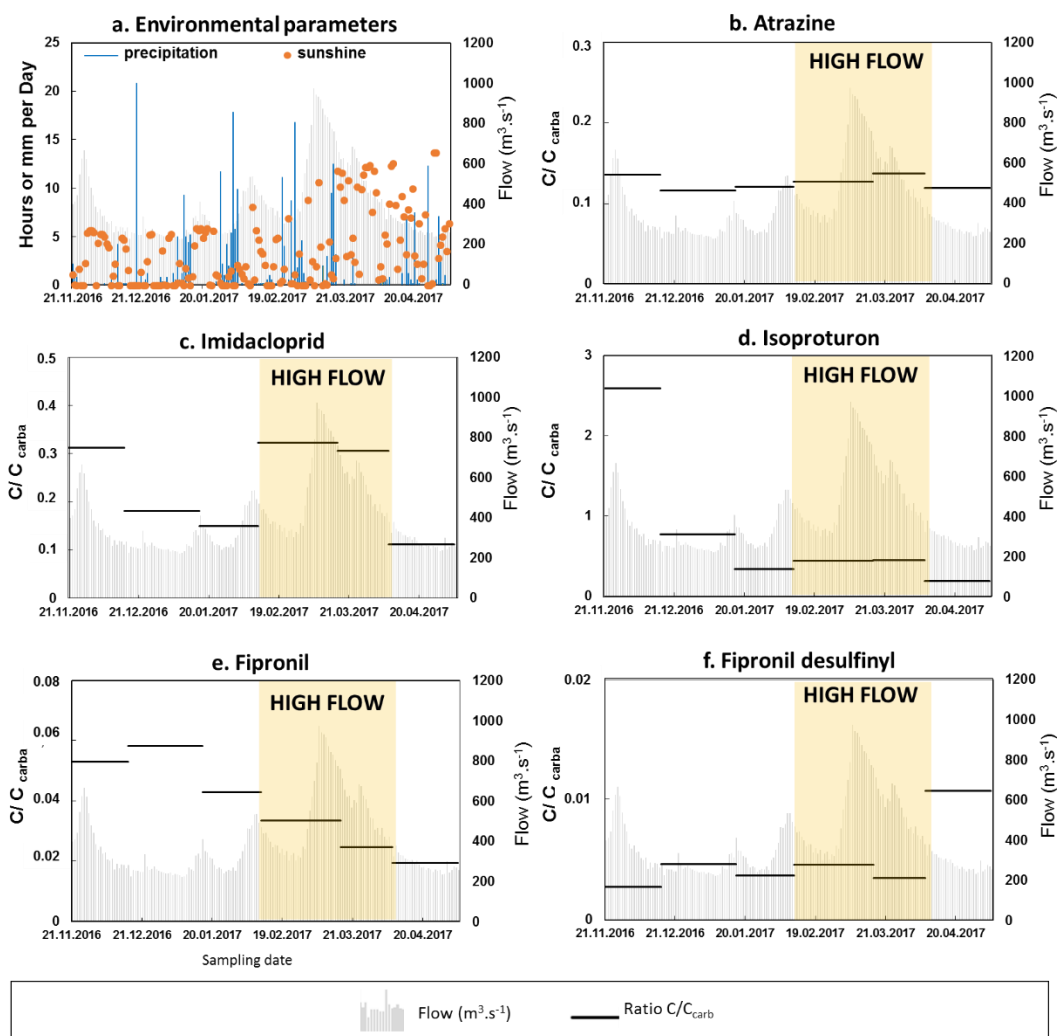


### **3.3.2. Seasonal variation**

This section focused on upper estuary and more particularly, in La Bouille (Fig. 4), where tidal variation are minor. In order to remain as independent as possible from dilutive effects caused by river discharged, concentrations were normalized by a persistent marker, carbamazepine. Because of carbamazepine is known to be continuously released by WWTP and to be persistent (Kunkel and Radke, 2012), it was chosen as reference. Behavior of pesticides was evaluated by normalization to this persistent marker. This approach has been already successfully applied in order to evaluate seasonal behavior of pharmaceuticals in the estuarine Garonne River and attenuation of pharmaceutical (Aminot et al., 2016). Thus, the carbamazepine normalized concentrations of 14 pesticides (parent and transformation products) were calculated from TWAC extrapolated using POCIS deployed in La Bouille. Overall, as result of various sources of pesticides in the environment, different behaviors (atrazine, diuron, imidaclopride, isoproturon and fipronil-tupes) can be discriminated and are summarized in Figure 4 (details of all pesticides are given in Figure S1).

Atrazine was the only pesticides which exhibited a relatively constant ratio over the monitoring period (6 month), demonstrating a persistent behavior similar to carbamazepine (fig.4 b). This result is not surprising because atrazine is known to be stable in environmental water (Jablonowski et al., 2011). A similar behavior was highlighted for 2 pesticides (imidaclopride, propiconazole): the normalized concentration of these compounds trend to be correlated to river flows (fig 4.c). Maximal ratio were observed when the river flow is low. As previously observed for pharmaceuticals (Aminot et al., 2016), this observation can be attributed to an increase of residence time during low flow periods.

Because of their respective agricultural application periods, the normalized concentrations of MET and ISO were higher during their applications respectively in May and November (fig.4 d). Impacts of leaching and runoff on seasonal behavior of isoproturon has been already reported during treatment period in the Brittany watershed (Piel et al., 2012). A particular behavior was observed for fipronil and its transformation products (Fig 4 e). The normalized concentrations of fipronil, fipronil sulfide and fipronil sulfone were maximal from November to February. By contrast, the ratio of fipronil desulfinyl increased during spring (April and May 2017) (Fig.4 f).



**Fig. 4: Temporal variations of (a) environmental parameter (river flows, precipitation levels, and hour of sunshine). Temporal variations of pesticides concentrations (C) in POCIS normalized by concentration of carbamazepine ( $C_{carb}$ ).**

A positive correlation ( $r^2$ : 0,89, given in fig. S2) between ratio fipronil desulfinyl / fipronil and hours of sunshine each month during sampling deployment. Effectively, previous study has shown the rapid photodegradation of fipronil in surface water and identified fipronil desulfinyl as the major photoproducts (Bobe et al., 1998). Seasonal trends of fipronil and fipronil desulfinyl have been already recorded between months with low or high sunshine exposure in the Elbe river (Michel et al., 2016).

## CONCLUSION

This study addresses the existing knowledge gap regarding concentrations of polar organic pesticides entering and occurring in the Seine estuary. Thus, the occurrence of 63 pesticides was evaluated for the first time in the Seine estuary. Mass flow rates calculations revealed that in total, 9 tons per year of the 40 most detected polar pesticides entered in the estuarine Seine River. Inputs of upstream (dam of Poses) represent the major input of pesticides into the

estuarine system. Seasonal inputs of pesticides have been observed due to local agricultural applications (metolachlor and isoproturon). Considering their respective PNEC and MEC, six pesticides can be consider as high environmental concern (DEA, imidacloprid, metazachlor, metolachlor, terbutryn and fipronil).

Results of deployment of POCIS samplers in the Seine estuary, indicate the occurrence of pesticides at trace levels (0.1 to 75 ng.L<sup>-1</sup>).The time-integrating nature of POCIS resulted in a better estimation of risk engendered by pesticides. Moreover, use of passive sampler improve assessment of seasonal behavior of pesticides. Thus, pesticides such as imidacloprid and fipronil showed a stream attenuation in summer conditions, attributed to longer residence times during low flow periods and sunshine exposure.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors also would to thank the multidisciplinary Seine Aval scientific program (CRAPPSE project), sponsored by the GIP Seine-Aval (<http://seine-aval.crihan.fr/web/>). This study has been carried out in the framework of the Investments for the future program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX 45).

## SUPPORTING INFORMATION

**Table S1: Pesticides monitored and limit of quantifications in water and POCIS.**

Compounds	abbreviation	CAS number	Targeted action	Uses in France	Internal standard	Limite of quantification (ng.L <sup>-1</sup> )	
						grab sample	POCIS
1(2,4 dichlorodiphenyl)urea	1,2,4 DCPU	5428-50-2	TP of diuron	TP	diuron d6	0,2	nr
1(3,4 dichlorodiphenyl)urea	1,3,4 DCPU	155 998	TP of diuron	TP	diuron d6	1,4	nr
Desmethyl diuron	1343 DCPMU	3567-62-2	TP of diuron	TP	diuron d6	3,4	nr
acetochlor		34256-82-1	Herbicide	P	alachlor d13	0,4	nr
acetochlor ethanesulfonic acid	ACE ESA	947601-84-5	TP of acetochlor	TP	alachlor d13	1,7	nr
acetochlor oxanilic acid		194992-44-4	TP of acetochlor	TP	alachlor d13	1,8	nr
alachlor	ALA	15972-60-8	Herbicide	P	alachlor d13	3,3	nr
amethryn		834-12-8	Herbicide	P	terbutylazine d5	0,1	nr
atrazine	A	1912-24-9	Herbicide	P	atrazine d5	0,7	0,01
hydroxy-atrazine	A-OH	2163-68-0	TP of atrazine	TP	atrazine 2 hydroxy d5	0,2	0,01
azoxystrobine	AZO	131860-33-8	Fungicide	B/PP	carbofuran d3	0,1	nr
bentazone		82657-04-3	Herbicide	PP	bentazone d7	17,0	nr
carbendazime	CBZ	10650-21-7	Fungicide	B	carbendazime d3	0,7	nr
carbetamide		16118-49-3	Herbicide	PP	carbetamide d5	0,1	nr
carbofuran		1563-66-2	Insecticide	P	Carbofuran d3	0,1	nr
chlorotoluron	CHLT	15545-48-9	Herbicide	PP	chlorotoluron d6	0,1	nr
chlorsulfuron		64902-72-3	Herbicide	P	diuron d6	1,9	nr
cyazazine		21725-46-2	Herbicide	P	hexazinone d6	0,1	nr
cyromazine		66215-27-8	Insecticide	B/PP	simazine d10	0,1	nr
Deisopropylatrazine	DIA	1007-28-9	TP of atrazine	TP	DIA d5	0,8	nr
Desethylatrazine	DEA	6190-65-4	TP of atrazine	TP	DIA d5	2,4	0,02
diflufenican	DIF	83164-33-4	Herbicide	PP	carbofuran d3	0,1	nr
dimetachlor	DIM	50563-36-5	Herbicide	PP	terbutryn D5	0,3	nr
diuron	DIU	330-54-1	Herbicide	B	diuron d6	0,3	0,001
Dimethylaminosulfanilide	DMSA	4710-17-2	TP of dichlofluanide	TP	carbofuran d3	0,1	nr
N,N-dimethyle-N'-p-tolylsulfamide	DMST	731-27-1	TP tolylfuanide	TP	carbofuran d3	0,1	nr
flazasulfuron		104040-78-0	Herbicide	PP	carbofuran d3	1,3	nr
fluzifop-p-butyl		79241-46-6	Herbicide	P	carbofuran d3	0,1	nr
flusilazole		85509-19-9	Fungicide	P	carbofuran d3	0,2	nr
hexazinone		51235-04-2	Herbicide	P	hexazinone d6	0,1	nr
hydroxy simazine		2599-11-3	TP of simazine	TP	atrazine d5	0,0	nr
imidacloprid	IMI	138261-41-3	Insectoid	B/PP	imidacloprid d4	0,2	0,01
irgarol®		28159-98-0	Herbicide	B	irgarol d9	0,0	nr
isoproturon	ISO	34123-59-6	Herbicide	B/PP	isoproturon D6	0,1	0,01
linuron		330-55-2	Herbicide	PP	linuron d6	0,4	nr
metazachlor	MTZ	67129-08-2	Herbicide	PP	terbutryn D5	0,1	nr
methiocarb		2032-65-7	Insecticide	PP	carbofuran d3	0,1	nr
metolachlor	MET	51218-45-2	Herbicide	PP	métolachlore d6	0,1	0,09
metolachlor ethanesulfonic acid	MET ESA	947601-85-6	TP of metolachlor	TP	carbofuran d3	4,5	0,01
metolachlor oxanilic acid	MET OA	152019-73-3	TP of metolachlor	TP	carbofuran d3	0,3	0,03
metoxuron	-	19937-59-8	Herbicide	P	metoxuron d6	0,0	nr
metsulfuron-methyl	MET-S	74223-64-6	Herbicide	PP	metsulfuron-methyl d3	0,2	nr
nicosulfuron	NIC	111991-09-4	Herbicide	PP	nicosulfuron d6	0,8	nr
promethryn		7287-19-6	Herbicide	P	promethryn d14	0,1	nr
propachlor		1918-1617	Herbicide	P	terbutylazine d5	0,2	nr
propazine		139-40-2	Herbicide	P	propazine D14	0,4	nr
propiconazole		60207-90-1	Fungicide	B/PP	carbofuran d3	0,6	0,02
prosulfuron		94125-34-5	Herbicide	PP	carbofuran d3	1,0	nr
pymethrozine		123312-89-0	Insecticide	PP	terbutylazine d5	0,1	nr
quizalofop-ethyl		100646-51-3	Herbicide	PP	quizalofop-ethyl d3	1,0	nr
quizalofop-p-terfuryl		200509-41-7	Herbicide	P	carbofuran d3	0,3	nr
simazine	SIM	122-34-9	Herbicide	P	simazine d10	1,5	nr
terbutryn	TER	886-50-0	Herbicide	B	terbutryn D5	0,0	nr
terbutylazine		5915-41-3	Herbicide	P	terbutylazine d5	0,2	nr
terbutylazine desethyl		30125-63-4	TP of terbutylazine	TP	erbutylazine desethyl d9	0,2	nr
thiamethoxan	THIA	153719-23-4	Insecticide	B/PP	thiamethoxan d3	0,4	nr
fipronil	FIP	120068-37-3	Insecticide	B	fipronil 15N 13C	0,09	0,1
fipronil desulfenil	FIP-D	205650-65-3	TP of fipronil	-	fipronil 15N 13C	0,0	0,3
fipronil sulfide	FIP-SI	120067-83-6	TP of fipronil	-	fipronil 15N 13C	0,1	0,0
fipronil sulfone		120068-36-2	TP of fipronil	-	fipronil 15N 13C	0,3	0,1
glyphosate	GLY	1071-83-6	Herbicide	B/PP	glyphosate 13C2 15N	1,7	nr
aminomethylphosphonic acid	AMPA	1066-51-9	TP of glyphosate	-	AMPA 13C 15N	33,2	nr

PP: Plant protection products, B: biocides, TP: prohibited products, TP: transformation products, nr: not realized

Figure S1. Temporal variations of pesticides concentrations (C) in POCIS normalized by concentration of carbamazepine ( $C_{carb}$ ).

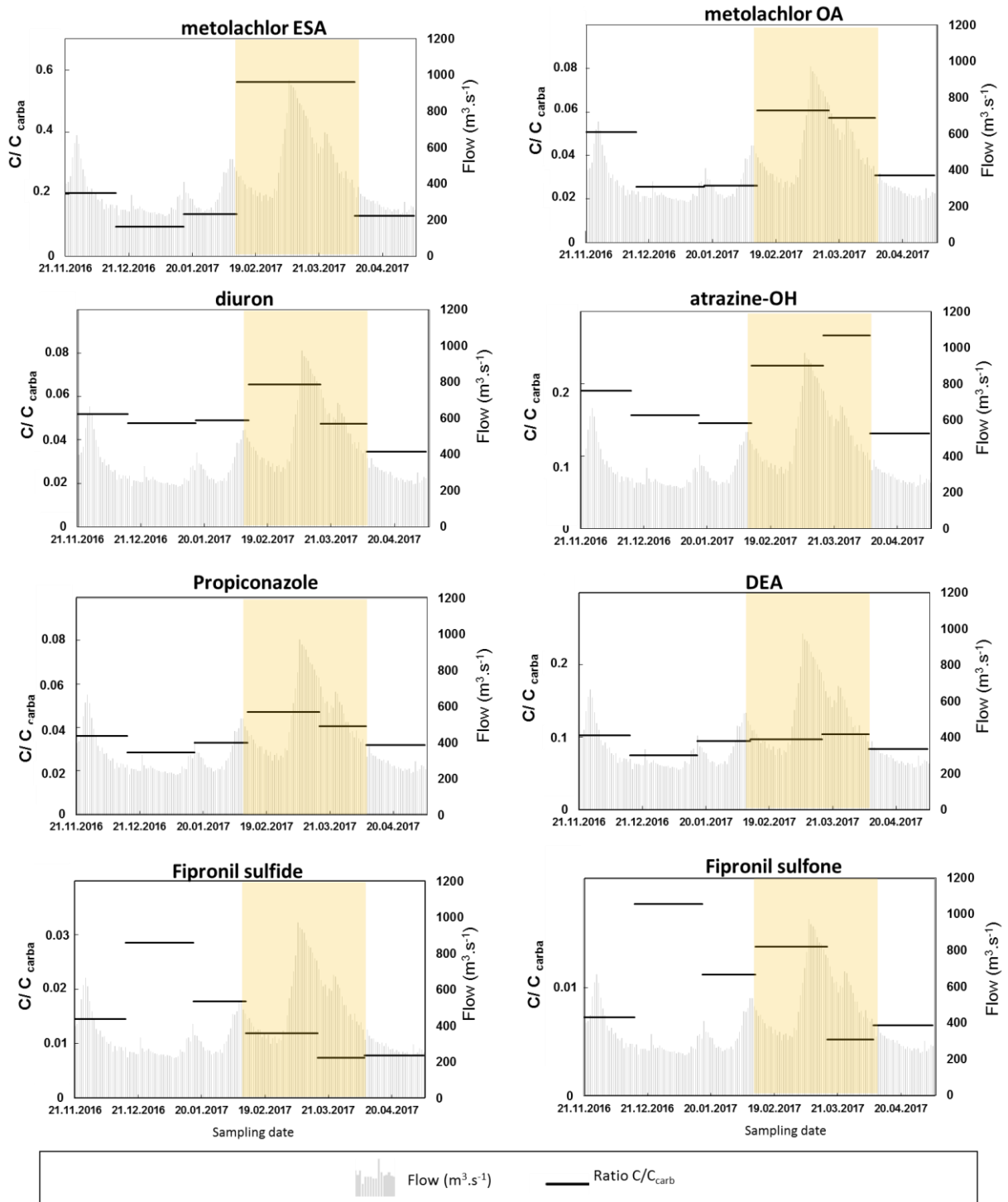
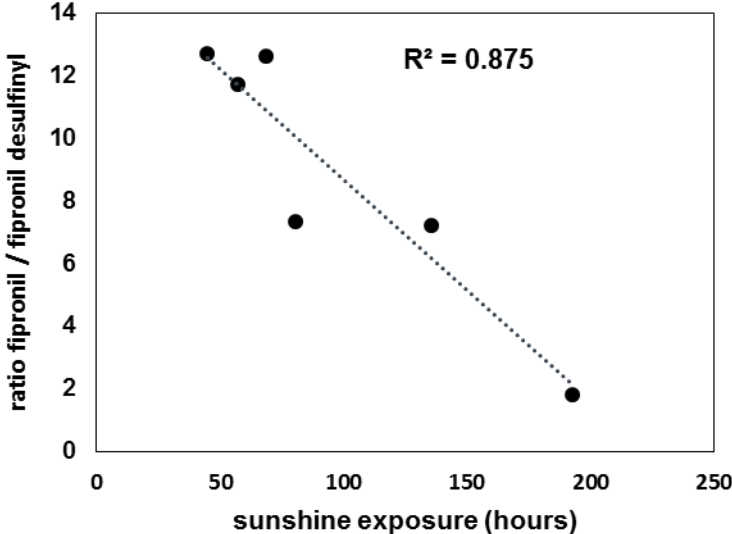


Figure S2: Correlation between ratio of fipronil/fipronil desulfinyl concentrations in POCIS and sunshine exposure during month of POCIS deployment.





### **3.2 Pharmaceuticals in the Seine estuary: 15 years of survey (2002-2017)**

Fuster L., Togola A., Lardy-Fontan S., Van Bui H., Pardon P., Le Menach K.,  
Dévier M.H., Mazellier P., Budzinski H.

University of Bordeaux, EPOC UMR 5805 LPTC, Talence, France

E-mail contact: [helene.budzinski@u-bordeaux.fr](mailto:helene.budzinski@u-bordeaux.fr)

#### **ABSTRACT**

---

Evolution of chemical analysis and monitoring programs allowed to collect more than 10 years of data concerning pharmaceutical contamination of the Seine estuary (France). The present study compiles and analyzes data set from 2002-2017 in order to evaluate (1) major input to the estuarine Seine River, (2) major pharmaceuticals load through dam of this estuary, (3) evolution of inputs since 15 years.

Initially restricted to 7 pharmaceuticals, new multi-residue protocols allow currently to assess concentration levels of 130 drugs. The level of environmental contamination of each detected compound is estimated from 1 ng.L<sup>-1</sup> to 150 ng.L<sup>-1</sup>. Analgesics, anti-inflammatories, beta-blockers and antibiotics showing highest concentrations. Upstream catchment of the Seine River via Poses represents the major input of various therapeutic class of pharmaceuticals: Approximately, 79 ± 63 kg of cumulative monitored pharmaceuticals were loading each day to the Seine estuary. Since 2002, whereas population grown, no significant trends, neither upwards or downwards of inputs has been highlighted for six selected pharmaceuticals (caffeine, carbamazepine, diclofenac, gemfibrozil, ibuprofen and ketoprofen). Application of non-target analysis using high resolution mass spectrometry (HRMS) and passive sampler extracts allowed to identify 24 pharmaceuticals not previously pre-selected.

\*NB: Pour des raisons de lisibilité les références bibliographiques ont été placées en fin de manuscrit.



## 1. INTRODUCTION

Pharmaceuticals represent one of the most detected classes of chemicals in aquatic environment (Hernández et al., 2015; Busch et al., 2016). As pharmaceuticals are intentionally designed to have biological activities, they may induce adverse effects even at low concentration levels (Keller and Coleman, 2011; Minguez et al., 2016). Approximately 3200 different substances are used as pharmaceutical ingredients, not only for humans but also through veterinary uses (Richardson and Kimura, 2016). Pharmaceuticals are released to the environment by different sources, mainly via wastewater treatment plant (WWTP), but also livestock effluents. Since WWTP are not initially designed to remove pharmaceuticals, parent compounds and their transformation products are released through WWTP effluent (Choubert et al., 2011; Petrie et al., 2014; Noguera-oviedo and Aga, 2016). The growing interest in pharmaceuticals, over the last 15 years, has resulted in numerous studies focused on wastewater (Verlicchi et al., 2012; Petrie et al., 2014), groundwater (Fram and Belitz, 2011; Achran et al., 2016), surface water (Togola and Budzinski, 2007b; Madureira et al., 2010; Aminot et al., 2016; Paíga et al., 2016; Ebele et al., 2017; Pereira et al., 2017), and sea water (Bayen et al., 2013; Nödler et al., 2014). Pharmaceutical contamination is global in surface water (Hughes et al., 2013). Thus, analgesics, antibiotics, anti-inflammatory drugs and beta-blockers represent the most frequently classes of pharmaceuticals detected in water (Despo Fatta-Kassinou et al., 2011). Estuarine contamination by pharmaceuticals has been reported by different studies focused on San Francisco Bay (Klosterhaus et al., 2013), Yangtze Estuary (Yang et al., 2011; Zhao et al., 2015, 2017), the Long Island Sound Estuary (Lara-Martín et al., 2014), the Pearl River Estuary (Liang et al., 2013) and recently in the estuarine Garonne River (Aminot et al., 2016).

Effectively, estuaries suffer a high impact of anthropogenic activities (urbanization, agriculture, and livestock) from upstream watershed, input by intra-estuarine tributaries and effluent of WWTP. These transition areas are also fragile zones that are sheltered habitats, nurseries and migratory passage for biota. The Seine estuary is one of the main estuaries on the European Northwest continental shelf and provides a good illustration of the effects of anthropogenic perturbations. The Seine catchment covers an area of approximately 79 000 km<sup>2</sup> that regroups more 12 millions of inhabitants (19 % of French population). Although the Seine has already been studied for chemical contamination by PAHs, PCBs (Cailleaud et al., 2007a, 2009), there was a serious lack of data concerning emerging contaminants such as pharmaceuticals. A first study was conducted by Togola and Budzinski (2006) that confirmed the occurrence of pharmaceuticals in the Seine estuary.

From 2002 to 2015, different studies were performed and offer a unique and large database that allows a thorough evaluation of contamination by pharmaceuticals in the Seine estuary.

The specific aim of this study was to reviewed pharmaceutical contaminations of the Seine estuary and to evaluated: (1) major inputs to the estuary, (2) contamination of estuarine surface water, and (3) evolution of pharmaceutical contamination since thirteen years.

## **2. MATERIALS AND METHODS.**

### **2.1. Area of study: Seine estuary**

The watershed of the Seine is the most anthropized of France with over 17 million of inhabitants, and 30 % of agricultural activity in only 12 % of national surface area. Thereby, the Seine estuary received water from the largest megalopolis of France: Paris. Subsequently, the Seine estuary suffers a high impact of anthropogenic activities (urbanization, agriculture, and livestock) from upstream watershed, intra-estuarine inputs from tributaries and wastewater treatment plant effluent (WWTP). The lower Seine River (from Paris to Poses) is strongly influenced by the Megacity of Paris which accommodates more than 12 million inhabitants (Romero et al., 2016). Urban effluents are treated by various wastewater treatment plants (totally 11.3 million equivalent inhabitants) and particularly by Seine Aval WWTP (Archères, 6.5 million equivalent inhabitants). Estuary and intra-estuarine basins include 6 % of the total catchment, 1 million inhabitants (Romero et al., 2016) and two important cities: Rouen and Le Havre (Fig.1). The estuary has a tidal penetration of 170 km, reaching the Poses dam, which represents the upper limit of tidal penetration. It's a macrotidal type divided in three parts: fluvial (Poses to Caudebec), middle (Caudebec to Honfleur) and lower estuary from Honfleur to Manche sea (Fig.1). The annual flow rates measured at the Poses dam can varied from 200 to 1000 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> (Romero et al., 2016).

### **2.2. Sample collection**

Data set collection is the result of different sampling campaigns realized from 2002 to 2015 that are described in fig.1. Firstly, surface water (sites 1, 4, 5) and WWTP effluent samples (sites W, X, Y) were collected, every two months from March 2002 to November 2003. Three water sampling campaigns were carried out in major tributaries (A to I) (see Table S1), surface water (sites 1-5) and WWTP effluent samples (sites W, X, Y) in April 2005, February and July 2006.

In 2011, estuarine water (sites 1-5) and WWTP effluents (W-Z) were studied during 6 months (Fig. 1). Effluent 24h composite samples were collected in four WWTPs (W-Z) and grab samples were collected all along the estuary at Poses (1), Elbeuf (2), La Bouille (3), Caudebec-en Caux (4) and Honfleur (5) (Fig. 1).

In order to characterize major inflow to the Seine estuary, two sites were chosen. The hydraulic dam of Poses was chosen to characterize upstream inputs by a large panel of pharmaceuticals to estuary by punctual samples. 24h composite samples were collected in the estuary's main WWTP effluent (Émeuraude) to evaluate direct inputs from WWTP to the medium. Sites were sampled every two months for one year (May 2014 to April 2015) by grab sample and also by Polar Organic Chemical Passive Sampler (POCIS).

Finally, La Bouille and Caudebec were sampled over 6 months (December 2016 to May 2017) by POCIS immersed for 30 days.

All water samples were filtered through glass fiber filter (pore size 0.7 µm, Whatman®) and stored in High density polyethylene (HDPE) bottles (Nalgene®) at -20°C. All POCIS used in this study were home-made and extracted as previously reported (Belles et al., 2014a)

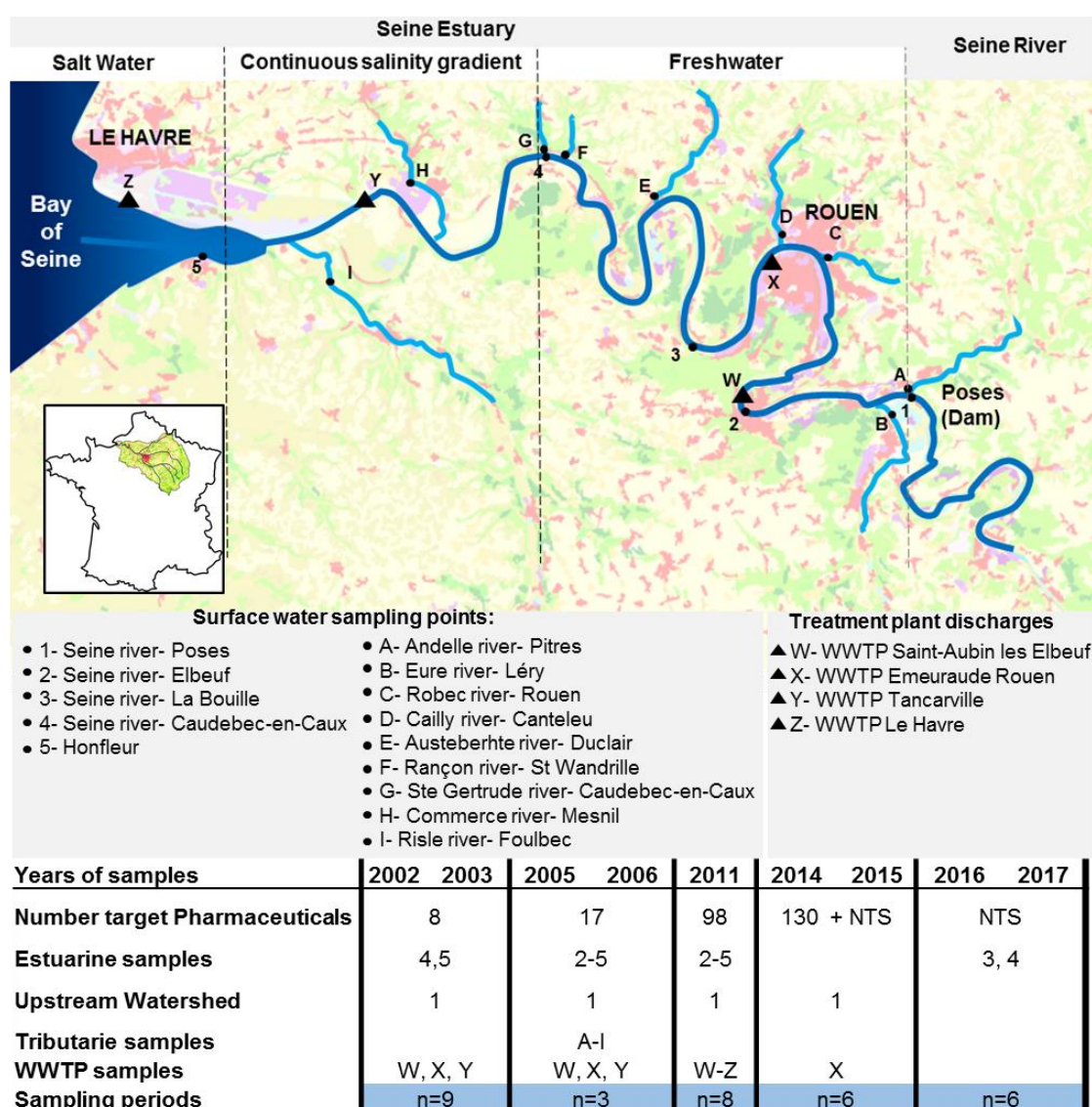


Figure 1: Water sampling sites in the Seine estuary (France). [NTS: non target analysis screening] (See also Table S1).

## 2.3. Chemicals analysis

### 2.3.1. Targeted analysis

The parent compounds and their transformation products selected constitute a small selection of all commercially pharmaceuticals that can occur in surface water. Compounds were selected based on occurrence in the environment, knowledge on uses and on transformation patterns, availability of standard and available analytical methods. Laboratory advances in chromatographic and detection techniques allow to raise (1) number of targeted compounds from 17 to 130, (2) analytical performance. Therefore, chemical analyses described in this study, resulting in different analytical processes (Table 1).

Historical data were compiled from publishing data (Togola and Budzinski, 2007b). Chemical analysis from 2006 to 2007 were performed as previously described by Togola and Budzinski (2006). Briefly, analyses were realized, after solid phase extraction, and derivatization for some of them by gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (MS). Although, GC is applicable and valuable to the accurate quantification of pharmaceutical, liquid chromatography (LC) was used since 2011 because providing shorter analyses time and non derivatization step. Since 2011, analyses were conducted by LC coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS), as previously described (Dévier et al., 2013; Aminot et al., 2015; Le Coadou et al., 2016). Details on materials and on the pharmaceuticals, chemicals, and analytical methods used are given in supplementary information's (Table S2).

**Table 1: Analytical procedures for the analysis of pharmaceuticals. Studied sites refers to sampling sites described in figure 1.**

Years	Studied sites	Number targeted pharmaceuticals	Analytical methods	Analytical group <sup>a</sup>	Ref.
2002-2006	1-5 ; A-I ; W-Y	17	offline SPE-GC-EI-MS	1	Togola and Budzinski, 2007
2011	1-5 ; W-Z	98	offline SPE-LC-ESI-MS/MS	2, 3	Aminot et al., 2015 Dévier et al., 2013
2014-2015	1 and X	130 + NTS	offline SPE-LC-ESI-MS/MS injection-LC-ESI-MS/MS extracts-LC-ESI-QTOF	direct POCIS 2, 3, 4, 5, 6	Aminot et al., 2015 Dévier et al., 2013 Le Caoudou et al., 2016
2016-2017	3, 4	NTS	POCIS extracts-LC-ESI-QTOF	-	Gardia-Parège (2015) Yassine et al., 2018

NTS : Non target screening  
analytical group<sup>a</sup>: refer to table S2

### 2.3.2. Non-targeted analysis

A non target screening was realized on POCIS extracts previously deployed in Emeuraude WWTP effluent (X, fig.1) in 2015, and POCIS extracts from La Bouille and Caudebec ( point 3 and 4, fig. 1) recolted beetween December 2016 to March 2017).

Analyses were carried out on an Agilent Infinity 1290 HPLC system coupled to an Agilent 6540 accurate mass quadrupole time-of-flight mass spectrometer (LC-QTOF-MS; Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Compounds were separated on an analytical C18 column (Kinetex Phenomenex®, 100 x 2.1 mm; 1.7 µm; Agilent Technologies, Les Ulis, France) kept at 40°C. For each extract, 2 µL were injected. Mobile phase was a mixture of ultra-pure water (A) and acetronitrile (B) both with 0.1 % of formic acid at a flow rate of 0.3 mL.min<sup>-1</sup>. The elution gradient program was the following: 90 % of A and 10 % of B and attained rapidly to 20 % B in 5 min, then increased to 37 % B until 27 min, augmented to 60 % B at 32 min, reached to 100 % B at 36 min and held at 100 % B for 2 min, before returning to the initial value at 43 min and kept until 48 min.

The samples were analyzed using positive mode electrospray ionization (ESI+) (Agilent Jet Stream source). The operating conditions for the ESI source were as follows: source temperature 300°C, gas flow rate 8 L.min<sup>-1</sup>, capillary voltage 3000 V, nebulizer gas pressure 40 PSI, sheath gas temperature 400°C, nozzle voltage 1500 V and fragmentor 110 V. The instrument was operated in 2 GHz. The data acquisitions were performed using (data-dependent) auto-MS/MS acquisition mode. This consists, in the same run, to perform a full HR-MS analysis and to select the most abundant precursor ions from a TOF mode scan and then fragmented in MS/MS mode (Q-TOF). Full-MS spectra were acquired with a scan range of 70–1700 m/z. The most abundant precursor ions were isolated in width of ~1.3 amu and fragmented with three fixed collision energies: 10, 20 and 40 eV. A constant flow of an Agilent TOF reference solution through the reference nebulizer allowed the system to continuously correct for any mass drift by using the reference mass ion HP-921 [hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)-phosphazine] at m/z 922.009798 [M+H]<sup>+</sup>. Before all injection, stability of mass accuracy was checked with an Agilent standard solution and the system was re-calibrated if values went above 0.2 ppm error. A standard solution containing 36 compounds was injected before the sample to check the retention time of compounds and the instrumental sensitivity.

The data were processed using the MassHunter Qualitative software (version B.05.00, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A compound screening was performed on the total ion chromatogram using the molecular feature extraction (MFE) which is an untargeted

feature finding algorithm of the software. Only peaks with intensity > 1500 counts were searched. The elemental formulae were generated using relative isotopic abundance of mass spectra profiles and precursor ion mass. The composition was defined by Generate Formulas function of the software. The calculation of most probable molecular formula included the common elements C, H, N, O, S, Cl, F, P, score higher than 50 % and an error margin of 5 ppm. Different ionization products were considered:  $[M+H]^+$  or  $[M+NH_4]^+$ . In order to isolate compounds of interest, the list of compounds detected in the water samples was compared to this of procedural blank using MassProfiler Agilent software. The characterization of compounds was performed on peak only present in water samples. Then, the most abundant candidates were manually examined in order to confirm the elemental formula given by algorithm and to search the molecular structure using MS/MS spectra. The fragmentation mass spectrum was compared to MS/MS spectra include in exhaustive spectral libraries namely Metlin, Forensics and MassBank. When no MS/MS spectra were reported, molecular formulas were searched in compound database specifically Chemspider and only the more referenced molecule having  $\log K_{ow}$  compatible to adsorption in POCIS was selected as candidate. Associated with this criterion, a research using Metfrag (CDK 1.3.9) which is an in silico fragmenter prediction software was used. Only proposal compounds with score higher to 0.7 and mass difference of 5 ppm were accepted.

In order to confirm the identity of the compound, reference standard was purchased, when it was available. The purchased molecule was analyzed in the same LC-QTOF-MS method that unknown compounds. The identity of the molecule was confirmed by retention time match ( $\pm 0.3$  min), accurate mass ( $\pm 5$  ppm), isotope pattern (score > 70%) and the fragmentation spectra (score > 80%).

#### **2.4. Quality and performances of analyses**

Sample preparations were performed in a room dedicated to the processing of matrices of low contamination level (the ng/L level), with equipment (balance, pH meter, SPE tubing, glass tank) dedicated to ultra trace analysis and also dedicated glassware. Prior to use, all glassware was washed with detergent and carefully rinsed with Milli-Q water. The glassware was then calcinated at 450 °C overnight.

All additions of matrix and standard solutions were controlled by gravimetry. A blank sample (reagents and surrogate standards) and a control sample (blank sample spiked with model compounds) were performed for each batch of experiments in order to check the background contamination and the analytical performance. A standard solution (model and surrogate compounds) was also injected at least every 10 real samples to monitor any drift in the instrumental performance (sensitivity, contamination) and to assure the accuracy of the

quantification. For the analysis of Fipronil and its TP a fiber blank was measured before each water sample by exposing the SPME fiber in an empty vial under the same conditions as the samples. The blank levels were not subtracted from the results of samples since they were variable.

The procedural LOQs were determined by analysis of spiked natural mineral water with various concentrations, at a signal to noise ratio of ten. For the analysis of Fipronil and its TP a fiber blank was measured before each water sample by exposing the SPME fiber in an empty vial under the same conditions as the samples (Table S2).

## 2.5. Annual fluxes calculations

Daily loads of pharmaceuticals are calculated with the detected concentrations of compounds in each sample site, date, and volume of water passing site. Annual loads were extrapolated with the average daily loads and the number of day in year. Daily and annual debits in surface water (Seine) were obtained from the French minister of Ecology, Energy and Sustainable Development (<http://hydro.eaufrance.fr>). Fluxes were obtained applying the following formula:

$$Flux (kg.year^{-1}) = Q_m \times \left( \frac{\sum(Q_i \times C_i)}{Q_i} \times K \right)$$

Where K is a conversion factor to take account the desired period (in our case 365 days),  $C_i$  the instantaneous concentrations ( $Kg.L^{-1}$ ),  $Q_i$  the discharge ( $L.jour^{-1}$ ) of sampling day and  $Q_m$  ( $L.jour^{-1}$ ) the mean water flow for the period considered.

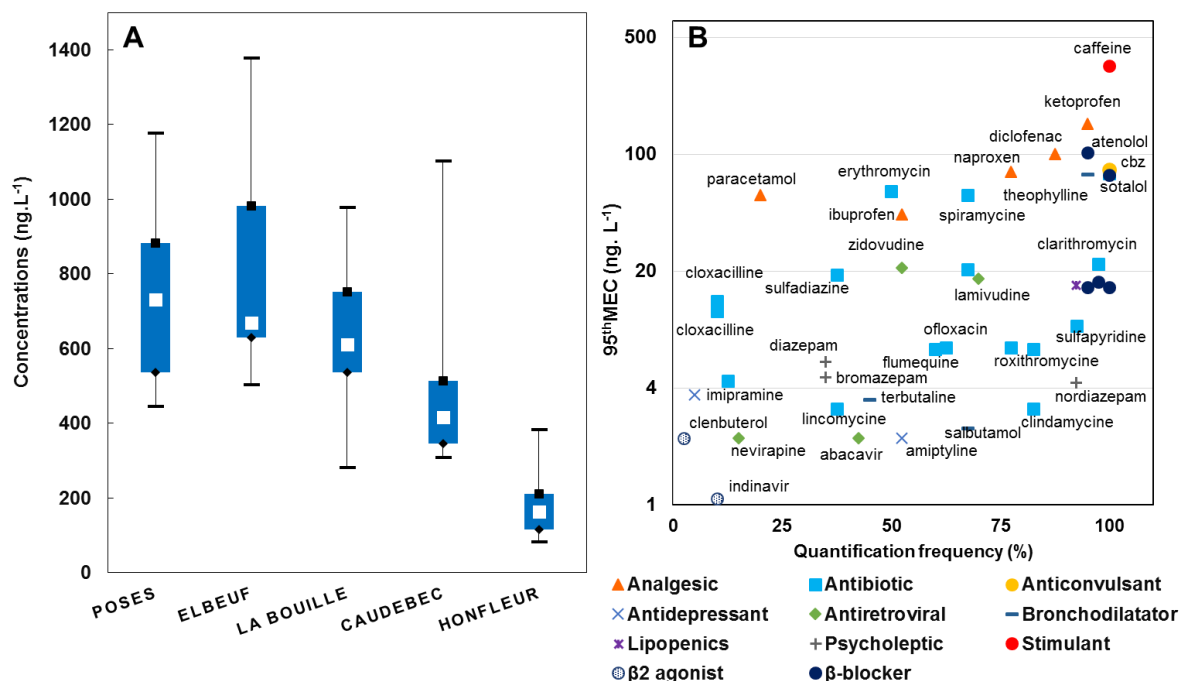
## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Levels of contamination in the estuarine Seine River

In order to evaluate concentration levels of a great variety of pharmaceuticals, this sections focused on the results obtained during 2011. Occurrence and contaminations levels of 98 pharmaceuticals were evaluated all along the estuary (from Poses to Honfleur, see fig.1).

Of the 98 monitored pharmaceuticals, 43 were detected at least once in estuarine sample from Poses to Honfleur. Total concentration levels of the 43 detected pharmaceuticals were summarized Figure 2 A. In dissolved phase,  $\sum pharmaceuticals\ concentration$  ranged between 83 to 1378  $ng.L^{-1}$  and showed a general upstream/downstream negative gradient, and Poses representing the most affected site (Figure 2 A). This result confirms previous finding performed by Togola and Budzinski (2007) for 7 pharmaceuticals and Tamtam et al. (2007) for 17 antibiotics compounds in the Seine River. Concentration levels decreased with increasing salinity as a result of dilution but also because of degradation process such as

biodegradation or photodegradation (Brownawell, 2007; Lara-martín et al., 2014). As observed in Fig. 2A, concentrations of pharmaceuticals are variable depending on seasons,.



**Figure 2: Box plot of the total concentration (ng.L<sup>-1</sup>) of pharmaceuticals (the 43 most abundant compounds) for each estuarine sampling point (n= 8 samples from March 2011 and November 2011) (A). MEC<sup>95th</sup> and quantification frequency of the 43 most abundant pharmaceuticals (all estuarine sampling point). Sampling were performed from March 2011 to November 2011 (n=8).**

The MEC<sup>95th</sup> of each detected compound is estimated from 1 (abacavir) to 150 ng.L<sup>-1</sup> (caffeine) (fig. 2 B). Analgesics, anti-inflammatories, beta-blockers and antibiotics showing highest concentrations. The 10 most abundant pharmaceuticals, with average concentrations above 30 ng.L<sup>-1</sup> were sotalol, diclofenac, sulfamethoxazole, theophylline, erythromycin, paracetamol, atenolol, carbamazepine, ketoprofen and caffeine. These compounds are part of the most frequently encountered pharmaceuticals in surface waters across 41 countries (Hughes et al., 2013). The median concentrations of these compounds, reported in the estuarine Garonne River (Aminot et al., 2016) are from 2 to 28 times lower than the median concentrations reported in this study. In the Rhine estuary (Ter Laak et al., 2010). Concentrations of clarithromycin, sulfamethoxazole, ibuprofen and diclofenac were similar to those presented in this work. However, the median concentrations of carbamazepine, roxitromycine and metoprolol are respectively 3, 7 and 8 times higher than levels quantified in the Seine River. Carbamazepine is one of the most studied pharmaceutical and is present at concentrations from 8 to 140 ng.L<sup>-1</sup> in dissolved estuarine water. This level is in closer agreement to different studies realized in other estuary such as Douro River estuary (Madureira et al., 2010), in San Francisco Bay (Klosterhaus et al., 2013), Arade estuary (Gonzalez-Rey et al., 2015). Antibiotic represents one of major therapeutic class detected in



the Seine estuary: concentration levels of sulfamethoxazole and ofloxacin are equivalent to previous work focused on occurrence and fate antibiotic in the Seine River (Tamtam et al., 2007). Special attention is required for certain substances included in the EU watchlist such as diclofenac. Proposed environmental quality standards (EQS) for diclofenac in surface water was set at  $0.1 \text{ ng.L}^{-1}$ . In the estuarine Seine River, diclofenac concentration levels ranged to  $1.5$  to  $104 \text{ ng.L}^{-1}$ , and exceeded EQS in all sites sampled.

### **3.2. Evaluation of the main pharmaceutical input to the Seine estuary**

The aim of this section is to evaluate major inputs of pharmaceuticals to the Seine estuary. Inputs of 17 pharmaceuticals from upstreams (Seine River, Poses) were compared with inputs from 9 intra-estuarine tributaries in 2006 (see fig. 1). In 2011, relative contribution of four intra-estuarine WWTPs to global pharmaceutical fluxes were compared to the contribution of upstream.

Average concentrations ( $n= 17$  pharmaceuticals) in Seine River and tributaries varied from  $92$  to  $953 \text{ ng.L}^{-1}$  from 2005 to 2006. Although some tributaries showed high pharmaceutical concentrations, they seemed to make a minor contribution of loads to the Seine estuary (Figure 3 A). Effectively, global inputs of the nine tributaries represented only 3 % of total pharmaceutical loaded to the estuarine Seine River (total input :  $262 \text{ kg. day}^{-1}$ ). Robec and Commerce Rivers presented high concentration levels of pharmaceuticals with  $362$ - $953 \text{ ng.L}^{-1}$  (fig.3 A). However, Eure, Andelle and Risle Rivers represented major tributaries inputs with respectively  $115$ ,  $61$ ,  $35 \text{ kg.day}^{-1}$  (fig.3 A). Tributaries are under influence of various human-induced factors according the surface of watershed and population density (Table S1). However, their water flows were from 10 to 100 times lower than the Seine River flow. As previously described in Garonne and Rhin, pharmaceutical contamination is related to the population inhabitant but also dilution rates of their inputs (Ter Laak et al., 2010; Aminot et al., 2016).

Input by four intra-estuarine WWTP were also evaluated for 98 pharmaceuticals (in 2011). Although, pharmaceutical contamination is higher in all WWTP effluents ( $425 \text{ kg.day}^{-1}$ ), the Seine River is responsible of principal inputs to estuary ( $8664 \text{ kg.day}^{-1}$ ). Effectively, WWTP inputs were 27 times lower than the upstream inputs (Figure 3 B). Émeuraude WWTP (Rouen) represented the most important pharmaceuticals fluxes from effluent with  $237 \text{ kg.year}^{-1}$ . The dilution rate of pharmaceutical inputs can be estimated as ratio of estuary flow to population (WWTP capacity of inhabitant). This ratio expressed the proportion of river flow par inhabitant available to dilute the contribution of urban effluent (Aminot et al., 2016). WWTPs presents along the Seine estuary have a ratio comprised between  $0.9$  and  $278 \text{ L.s}^{-1}.\text{inhab}^{-1}$ . The river flow per inhabitant available to dilute contribution of urban effluent is high in this estuary.

The relative contributions of pharmaceutical fluxes by intra-estuarine tributaries and WWTPs were minor compared to loads from Seine River. Like these relative contributions, the pharmaceutical fluxes into the Seine estuary was mainly derived from the Seine watershed. As described in earlier study (Togola and Budzinski, 2007b), input by Poses are certainly the result of discharged of pharmaceuticals by the most important WWTP on the Seine River: “Archères” (6.5 million equivalent inhabitants).

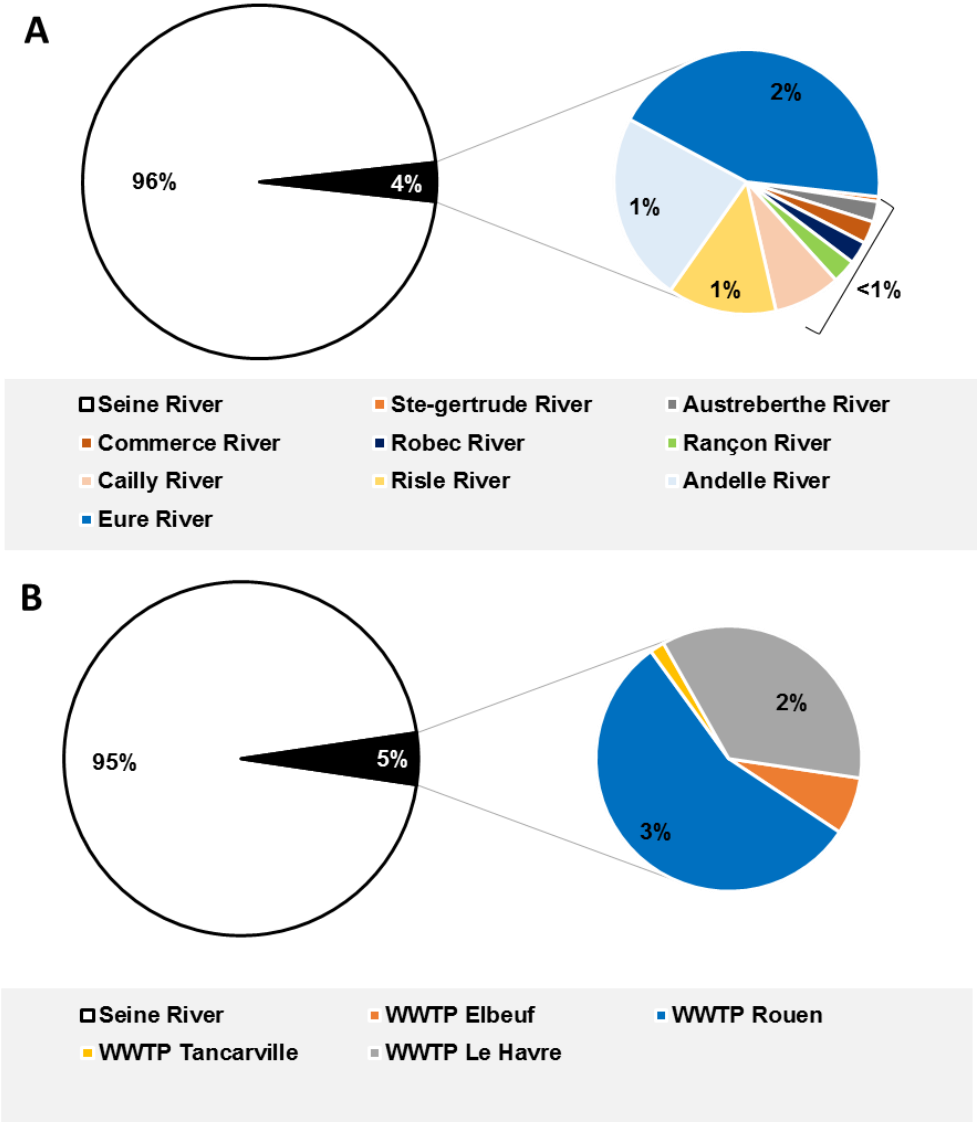
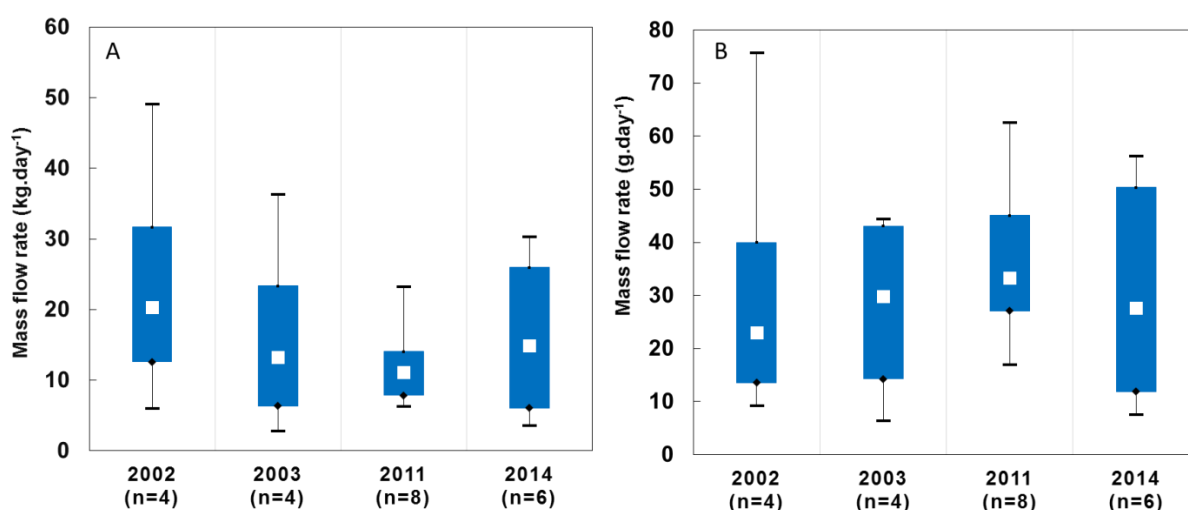


Figure 3:Pharmaceuticals fluxes contribution of tributaries (data from 2005 to 2006) (A) and of WWTPs (data from 2011) (B), and upstream (Poses River) inputs to the Seine estuary contamination by pharmaceuticals.

### 3.3. Evolution of input since 2002

The study realized by Togola and Budzinski (2007) was the first data report of occurrence of pharmaceuticals in France. Since 15 years, Poses was the most studied site in our laboratory. Six pharmaceuticals (caffeine, carbamazepine, diclofenac, gemfibrozil, ibuprofen and ketoprofen) were common to all sampling realized between 2002 to 2015. The specific aim of this section was to reviewed pharmaceutical contaminations of the Seine estuary since thirteen years.

Through historical data collected from 2002, the evolution of pharmaceutical inputs from Poses has been evaluated for 6 pharmaceuticals. Annual mass flow rates of pharmaceuticals in 2002, 2003, 2011 and 2014 were presented in Figure 4 A.



**Figure 4: Evolution of compounds mass flow rate at the dam of Poses (A) and in the Emeuraude WWTP effluent (Rouen) (B). Mass flow rates were calculated for 6 pharmaceuticals (caffeine, carbamazepine, diclofenac, gemfibrozil, ibuprofen and ketoprofen) from 2002 to 2014 and are expressed in kg.day<sup>-1</sup> at Poses and g.day<sup>-1</sup> from the WWTP effluent.**

Global inputs were generally highly variable:  $24 \pm 19$  kg.day<sup>-1</sup> in 2002,  $16 \pm 15$  kg.day<sup>-1</sup> in 2003,  $12 \pm 5$  kg.day<sup>-1</sup> in 2011 and  $16 \pm 19$  kg.day<sup>-1</sup> in 2014. No significant trends, neither upwards or downwards of inputs have been highlighted. Stability of median load were observed for all six individual pharmaceuticals because of high range of variability. Moreover, same trend was observed for input through Emeuraude WWTP (Figure 4 B) and average masse flow rate were  $32 \pm 27$  g.day<sup>-1</sup> in 2002,  $28 \pm 19$  g.day<sup>-1</sup> in 2003,  $36 \pm 13$  g.day<sup>-1</sup> in 2011 and  $31 \pm 22$  g.day<sup>-1</sup> in 2014. Between 2002 and 2015, the number of inhabitant in the Ile-de-France (Paris) increased from 11.18 to 12.03 million. Simultaneously, an annual grown of 2.1 % were observed at the same period. Because of the heavy population growth of the Ile-de France, stability of inputs involves a better pharmaceutical treatments or change in the pharmaceutical uses. WWTP upgrades prompted by European policies, including nitrification (fully implement

in 2007 at Archères) and denitrification process (Archères 2012). Difference in prescription practices may also contribute to this trend, however relating these values to local annual consumption data is difficult.

### **3.4. Pharmaceuticals majority load to the Seine estuary**

Because of the upstream represents the major input of pharmaceutical to the estuarine Seine river, its contamination was investigated for a larger number of pharmaceuticals (n=130) in order to evaluate actual compounds load to the Seine estuary (in 2014-2015). Analytical developments realized since 2002 in our laboratory, allowed to increase number of targeted molecules. Thus, the anticonvulsant gabapentin, and novels oral anticoagulants (NOACs) such as dabigatran, rivaroxaban, and apixaban were added to initial list of targeted pharmaceuticals. These three compounds are also increasingly used in Europe. In particular, these NOACs currently represent 30% of ingested anticoagulants in France with an increase of the consumption of a factor 10 between the second trimester 2012 and the third trimester 2013 (ANSM, 2012). Current knowledge was acquired in transformation patterns of pharmaceuticals (Dévier et al., 2011; Bletsou et al., 2015; Drewes and Letzel, 2016). As result, occurrence of some transformation products (TPs) in surface water have already been reported by our laboratory and international litterature (Jongh et al., 2012; López-serna et al., 2012; Bueno-Martínez et al., 2014; Aminot et al., 2016; Li et al., 2016). TPs can be more persistent and might exhibit higher adverse effects compared to parent compounds (Escher and Fenner, 2011; Yin et al., 2017). For this reason, initial pharmaceutical list was also implemented by some TPs of carbamazepine (10,11-dihydro carbamazepine, 2-hydroxy carbamazepine, 3-hydroxy carbamazepine, Trans 10,11 dihydro-10,11-dihydroxy carbamazepine) and ibuprofen (hydroxy-ibuprofen).

The concentration levels of major pharmaceuticals at Poses dam of the Seine estuary were presented in Table 2. As previously described, pharmaceuticals loaded to the Seine estuary include various therapeutic classes as analgesic, antibiotics, beta-blockers and antivirals. While caffeine, theophylline, paracetamol, diclofenac and sotalol were among the compounds with highest concentrations, new analytical protocols revealed important levels of new targeted compounds as gabapentin. Gabapentin was the majority compound quantified in the Poses sampling sites with concentration ranged to 144 to 777 ng.L<sup>-1</sup> (average: 448 ng.L<sup>-1</sup>). Despite patchy data available, high level concentrations (180 ng.L<sup>-1</sup>) of gabapentin have already been reported in wastewater effluent (Writer et al., 2013), in surface water (Wales et al., 2008) and in the Seine river near Paris megacity (Briedes et al., 2016). Concentrations of TPs can be detected at higher concentrations levels than parent compounds: Trans-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine and hydroxy-ibuprofen were quantified with 3 times higher

concentrations than their parent compounds (carbamazepine and ibuprofen). NOACs average concentrations of apixaban, rivaroxaban and dabigatran were respectively 0.3, 0.9 and 23.9 ng.L<sup>-1</sup>. Up to date, this study constitutes the first report of environmental occurrence of NOAC's since their use's authorization (ANSM, 2012a).

In order to give an estimation of pharmaceuticals load to the estuarine Seine River, average daily mass flow rates were calculated for each quantified compounds (Table 2). Approximately, 79 ± 63 kg of various pharmaceuticals were loaded each day to the Seine estuary. Average load of each pharmaceutical varied from 15 ± 19 g.j<sup>-1</sup> (apixaban) to 15190 ± 4302 g.j<sup>-1</sup> (gabapentin). In comparison to other estuarine pharmaceutical data, mass flow rates are higher than the estuarine Garonne River. The median flux varied from 2 to 50 factors than input measured at the dam of estuarine Garonne (catchment basin: 56 000 km<sup>2</sup>; 4 million of inhabitants). Although Garonne and Seine rivers have equivalent river flows, concentration levels of all pharmaceuticals are higher from 2 (ibuprofen) to 20 (gemfibrozil) factors (Aminot et al., 2016). By contrast, the median load of ibuprofen, diclofenac, carbamazepine and clarithromycin to the Rhine estuary (catchment basin: 197 100 km<sup>2</sup>; 58 million of inhabitants) were respectively 4, 6; 45, 66 times higher than mass flow rates to the Seine estuary (Ter Laak et al., 2010).

**Table 2: Summarize of average concentration levels and mass flow rates (ranked by increasing levels) of 53 pharmaceuticals quantified in Poses dam from May 2014 to March 2015 (n=6).**

Compounds	Concentration (ng.L <sup>-1</sup> )		Mass flow rate (g.j <sup>-1</sup> )		Compounds	Concentration (ng.L <sup>-1</sup> )		Mass flow rate (g.j <sup>-1</sup> )	
	mean	Std. dev.	mean	Std. dev.		mean	Std. dev.	mean	Std. dev.
Apixaban	0.3	0.3	15	19	Propranolol	11.7	1.8	516	264
Rivaroxaban	0.9	0.3	38	17	Metrodinazole	9.1	9.4	563	622
Primidone	1.6	2.7	38	60	Clarithromycine	14.9	6.2	645	324
Nordiazepam	1.3	1.2	39	33	Bezafibrate	16.8	10.3	675	332
Clopidogrel	1.3	0.6	48	17	Fenofibric acid	10.9	16.8	741	1132
Indinavir	1.8	3.2	50	98	Acebutolol	23.0	10.8	874	381
Lorazepam	2.1	3.4	55	99	Dabigatran	23.9	8.2	928	293
Trimethoprim	1.9	3.1	72	120	Ibuprofen	23.4	16.9	1008	973
Clofibric acid	2.3	2.6	75	86	Naproxen	23.9	12.9	1032	823
Pravastatine	4.4	5.0	108	137	Cetirizine	34.9	17.2	1253	280
Roxithromycine	1.8	4.4	114	279	Sulfamethoxazole	40.8	26.7	1391	604
Nevirapine	3.6	2.6	116	59	Gemfibrozil	25.1	44.4	1427	2916
Spiramycine	3.4	3.0	125	155	Carbamazepine	40.5	17.6	1503	376
Pipemidic acid	5.2	10.2	149	312	Atorvastatine	21.7	36.4	1505	2426
Sulfapyridine	4.9	1.8	202	90	Oxazepam	49.6	23.0	1819	398
Lamivudine	5.8	3.9	204	123	Diclofenac	56.8	30.5	2142	1864
Ritonavir	5.2	7.6	210	268	Sotalol	55.5	14.8	2254	840
Disopyramide	6.8	3.4	259	97	Atenolol	58.9	23.8	2468	1281
3-Hydroxy Carbamazepine	6.6	2.3	299	164	Hydroxy ibuprofen	66.9	41.6	2952	2603
Losartan	7.5	2.7	313	137	Erythromycine	64.1	41.8	3447	3535
Metoprolol	8.6	3.4	324	88	Paracetamol	69.5	58.8	4234	3997
4-chlorobenzoic acid	11.9	20.6	339	613	Trans 10,11 dihydro-10,11-dihydroxy carbamazepine	117.4	49.9	4693	1924
Ofloxacin	7.2	1.4	358	247	Caffeine	196.1	222.1	6635	7885
Bisoprolol	8.7	2.9	360	152	Theophylline	266.8	370.9	13060	22833
Zidovudine	10.9	9.2	371	430	Gabapentine	448.2	262.9	15190	4302
2-Hydroxy Carbamazepine	11.3	5.6	455	204					
Abacavir	7.9	8.9	488	561					
Ketoprofen	14.8	10.3	507	332					

### 3.5. New trends in analytical analysis

Although triple quadrupole analyses provide an important specific and sensitive quantifications, they imposed a pre-selection list of compounds limited generally to 50-150 molecules. In last decade, the evolution of liquid-chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) has provided new possibilities for the detection of organic compounds. Thus, this section explore the application of new analytical strategy in order to increase the number of identified pharmaceuticals in the Seine estuary. The interest of using POCIS coupled to HRMS in order to improve screening of organic compounds has recently been reported (Bueno-Martínez et al., 2014). Thus, rapid non target analyses were performed on POCIS extracts, previously immersed into Rouen WWTP effluent, Caudebec and La Bouille sampling point.

**Table 3: List of identified pharmaceuticals in POCIS exposed in the WWTP effluent and at the 3 estuarine sampling sites.**

Compound	Formula	CAS number	Identification level*	Sampling site	Therapeutic class
Amisulpride	C17H27N3O4S	71675-85-9	2	X, 3	antipsychotic
Articaine	C13H20N2O3S	23964-58-1	2	3, 4	local anesthetic
Atazanavir	C38H52N6O7	198904-31-3	2	3, 4	HIV antiviral
Celiprolol	C20H33N3O4	56980-93-9	2	X, 4	beta-blocker
Dénatonium	C21H29N2O	3334-33-6	2	X, 2, 3, 4	local anesthetic
Dextrorphan	C17H23NO	125-73-5	2	X	psychoactive drug
Diacétolol	C16H24N2O4	28197-69-5	2	X, 4	beta-blocker
EDDP	C20H23N	-	2	X	metabolite of Methadone
escitalorpm	C20H21FN2O	128196-01-0	1	X	antidepressants
Fexofenadine	C32H39NO4	83799-24-0	2	X	antihistamine
Irbesartan	C25H28N6O	138402-11-6	2	X, 2, 3, 4	angiotensin II receptor antagonist
Lamotrigine	C9H7Cl2N5	84057-84-1	2	X	anticonvulsant
Levométhadone	C21H27NO	125-58-6	2	X	opioid analgesic
Lidocaine	C14H22N2O	137-58-6	2	X, 2, 3, 4	sodium channel blocker
Mianserin	C18H20N2	24219-97-4	2	X	antidepressants
O-Desmethyltramadol	C15H23NO2	-	2	X	metabolite of tramadol
O-desmethylenlafaxine	C16H25NO2	93413-62-8	2	X	antidepressants
Propafenone	C21H27NO3	54063-53-5	2	X	antiarrhythmic agent
Sitagliptin	C16H15F6N5O	486460-32-6	2	X	anti-Diabetic
Tramadol	C16H25NO2	27203-92-5	2	X, 2, 3, 4	narcotic
Triapride	C15H24N2O4S	51012-32-9	2	X	neuroleptic agent
Tropium	C25H30NO3	10405-02-4	2	X, 3, 4	muscarinic antagonist
Venlafaxine	C17H27NO2	93413-69-5	1	X, 2, 3, 4	Antidepressant
Verapamil	C27H38N2O4	52-53-9	2	X	calcium channel blocker

\* : identification levels described by Schymanski et al., 2014, X: Rouen WWTP Effluent, 2: Elbeuf, 3: La Bouille, 4: Caudebec, (see fig.1)

Non target compounds were identified as previously described (section 2.3.2) and the level of identification corresponds to confidence level of identification previously described (Schymanski et al., 2014a). The list of identified pharmaceuticals are summarized in Table 3. Finally, 24 pharmaceuticals including various therapeutic classes and not preliminary targeted, were identified (level 2 and 1 of identification) in POCIS extracts. 5 compounds were detected in all POCIS extracts: denatonium, irbesartan, lidocaine, tramadol, and venlafaxine. This result is not surprising because venlafaxine and irbesartan are among the highest consumed drugs (Boix et al., 2015). Some human metabolites have also been identified as O-desmethyl-venlafaxine and O-desmethyl-tramadol which have already been detected in WWTP effluent

(Boix et al., 2015) and Dutch surface water (Jongh et al., 2012). Verapamil have already been reported in dutch surface water and may be considered as pharmaceutical of concern with predicted no effect concentration of 30 ng.L<sup>-1</sup> (Tousova et al., 2017).

#### **4. CONCLUSION**

This work allows a real assessment of concentration levels of a large scale of pharmaceuticals, including various therapeutic classes, in the Seine estuary. Evolution of analytical chemistry allowed to increase significantly the number of compounds targeted from 8 to 130 pharmaceuticals. HRMS has advanced fast over the recent years and makes such non target analyses possible.

Upstream catchment seriously impacts the concentration levels of pharmaceuticals in the Seine estuary. Effectively, the dam of Poses which received water from Paris represents the major input of pharmaceutical into the estuarine system. Intra-estuarine WWTP effluents and Seine tributaries load less than 10 % of pharmaceutical mass flow rates. Dam of Poses loads a large variety of parent compounds as “historic” pharmaceuticals (carbamazepine, diclofenac, sulfamethoxazole) but also pharmaceuticals of emerging concern as NOACs, gabapentine and transformation products. The range of input variations is very important and depending on river flows and compounds. Since 2002, no significant trends, neither upwards or downwards of inputs has been highlighted. To our knowledge, this work is the first one showing a long term monitoring of pharmaceuticals in an estuarine medium.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would to thank the multidisciplinary Seine Aval IV and V scientific programs: Medseine project (2011-2014) and CRAPPSE project (2014-2017), sponsored by the GIP Seine-Aval (<http://seine-aval.crihan.fr/web/>). This study has been carried out in the framework of the Investments for the future program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX 45).

## SUPPORTING INFORMATION

### *Solvents, reagents and materials*

Milli-Q grade water was prepared from an internal Milli-Q system using a Millipore System fitted with an EDS PAK filter and the natural mineral water used was Vittel in glass bottles (Grande Source, Nestlé).

All solvents used were at least of HPLC grade, Ultra gradient HPLC quality and pesticide residue analysis grade, and were purchased from Scharlau (ICS, Gradignan, France), J.T. Baker (Atlantic Labo, Bruges, France) or Acros Organics (Fisher, Illkirch, France). Reagent-grade hydrochloric acid (36.5-38%) was purchased from J.T. Baker (Atlantic Labo, Bruges, France). Reagent-grade ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH), trimethylamine (TEA), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt solution (Na<sub>2</sub>EDTA), formic acid (HCOOH) and ammonium acetate (NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

For solid-phase extraction, Oasis HLB (6mL, 200mg), Oasis MCX (3mL, 60mg) and Oasis HLB (3mL, 60mg) cartridges were purchased from Waters (Saint-Quentin Yvelines, France). Nitrogen 4.5 (99.995% purity) was used for extraction and Argon 5.0 (99.9990% purity), Helium 6.0 (99.99990% purity) and Nitrogen 5.0 (99.9990% purity) were used as collision gas in the collision cell of the Acquity Quattro Premier triple quadrupole (Waters, Milford, MA, USA), gas vector and collision gas in the collision cells of all the Agilent QQQ technologies respectively. They were all purchased from Linde (St Priest, France).

All chemicals and labeled internal standards, with a high purity grade (>90%), were purchased from Sigma Aldrich, Toronto Research Chemical, CDN Isotopes, Cambridge Isotopes Laboratories, LGC Standard, Wellington Laboratories and Cluzeau Info Labo.



**Table S1:** Characteristics of tributaries of the Seine estuary

Tributaries	Length	Surface	inhabitants	River flows
-	(km)	(km <sup>2</sup> )	-	(m <sup>3</sup> .s <sup>-1</sup> )
Eure	225	5935	595 192	21
Andelle	135	757	47 039	3.1
Robec	10	42	57 252	0.3
Cailly	42	246	84 728	1.7
Austreberthe	23	215	36 045	1.2
Rançon	7	120	19 467	1.1
Sainte-Gertrude	5	58	5 139	1.2
Commerce	18	176	40 312	0.1
Rilse	388	2317	114 037	6.4

**Table S2:** List of compounds analyses in 2011 and 2014, CAS number, and quantification limits (LOQs) and associated internal standards or quantification methods (SAM: standard addition method, ECM: external quantification method).

Group	Compounds	Analytical procedure	CAS	Internal Standard / Quantification method	LOQ (ng/L)
2	2-hydroxy-ibuprofen	Offline SPE LC/MS/MS	51146-55-5	hydroxy ibuprofene d6	30.7
	abacavir	Offline SPE LC/MS/MS	188062-50-2	abacavir d4	3.6
	4-chlorobenzoic acid	Offline SPE LC/MS/MS	74-11-3	diclofenac d4	23.6
	clofibrac acid	Offline SPE LC/MS/MS	882-09-7	clofibrac acid d4	2.7
	fenofibrac acid	Offline SPE LC/MS/MS	42017-89-0	fenofibrac acid d6	1.1
	acebutolol	Offline SPE LC/MS/MS	34381-68-5	propranolol d7	2.1
	alprazolam	Offline SPE LC/MS/MS	28981-97-7	diazepam d5	0.6
	amitriptyline	Offline SPE LC/MS/MS	549-18-8	amitriptyline d6	1.7
	atenolol	Offline SPE LC/MS/MS	29122-68-7	atenolol d7	1.7
	atorvastatine	Offline SPE LC/MS/MS	134523-03-8	atorvastatine d5	3.6
	bezafibrate	Offline SPE LC/MS/MS	41859-67-0	bezafibrate d6	0.8
	bisoprolol	Offline SPE LC/MS/MS	104344-23-2	propranolol d7	0.3
	bromazepam	Offline SPE LC/MS/MS	1812-30-2	bromazepam d4	4.8
	caffeine	Offline SPE LC/MS/MS	58-08-2	caffeine d9	2.9
	carbamazepine	Offline SPE LC/MS/MS	298-46-4	carbamazepine d10	0.5
	cetirizine	Offline SPE LC/MS/MS	83881-52-1	cetirizine d8	0.8
	clenbutérol	Offline SPE LC/MS/MS	21898-19-1	diazepam d5	0.8
	clonazepam	Offline SPE LC/MS/MS	120202-66-6	diazepam d5	1.5
	clopidogrel	Offline SPE LC/MS/MS	144457-28-3	diazepam d5	0.3
	diazepam	Offline SPE LC/MS/MS	439-14-5	diazepam d5	1.5
	diclofenac	Offline SPE LC/MS/MS	15307-79-6	diclofenac d4	3.3
	disopyramide	Offline SPE LC/MS/MS	3737 - 09-5	diazepam d5	0.1
	doxepine	Offline SPE LC/MS/MS	1229-29-4	amitriptyline d6	1.9
	fluoxetine	Offline SPE LC/MS/MS	56296-78-7	fluoxetine d5	0.8
	gabapentine	Offline SPE LC/MS/MS	60142-96-3	gabapentine d4	8.2
	gemfibrozil	Offline SPE LC/MS/MS	25812-30-0	gemfibrozil d6	1.1
	ibuprofen	Offline SPE LC/MS/MS	15687-27-1	ibuprofen d3	5.1
	imipramine	Offline SPE LC/MS/MS	113-52-0	imipramine d4	0.5
	indinavir	Offline SPE LC/MS/MS	180683-37-8	indinavir d6	0.5
	ketoprofen	Offline SPE LC/MS/MS	22071-15-4	ketoprofen d3	6.3
	lamivudine	Offline SPE LC/MS/MS	134678-17-4	lamivudine 15N 13C	3.9
	lorazepam	Offline SPE LC/MS/MS	846-49-1	diazepam d5	4.5
	losartan	Offline SPE LC/MS/MS	114798-26-4	diazepam d5	0.2
	meprobamate	Offline SPE LC/MS/MS	57-53-4	meprobamate d3	3.6
	metoprolol	Offline SPE LC/MS/MS	56392-17-7	propranolol d7	1.2
	naproxen	Offline SPE LC/MS/MS	22204-53-1	naproxen d3	1.5
	nelfinavir	Offline SPE LC/MS/MS	159989-65-8	indinavir d6	0.4
	nevirapine	Offline SPE LC/MS/MS	129618-40-2	nevirapine d3	1.5
	nordiazepam	Offline SPE LC/MS/MS	1088-11-5	nordiazepam d5	0.3
	omeprazole	Offline SPE LC/MS/MS	73590-58-6	diazepam d5	0.1
	oxazepam	Offline SPE LC/MS/MS	604-75-1	oxazepam d5	2.5
	paracetamol	Offline SPE LC/MS/MS	103-90-2	paracetamol d4	46.0
	pravastatine	Offline SPE LC/MS/MS	81131-70-6	pravastatine d3	4.4
	primidone	Offline SPE LC/MS/MS	125-33-7	primidone d5	6.2
	propranolol	Offline SPE LC/MS/MS	318-98-9	propranolol d7	3.0
	ranitidine	Offline SPE LC/MS/MS	66357-59-3	diazepam d5	2.9
	ritonavir	Offline SPE LC/MS/MS	155213-67-5	nevirapine d3	3.2
salbutamol	Offline SPE LC/MS/MS	18559-94-9	salbutamol d3	1.6	
saquinavir	Offline SPE LC/MS/MS	149845-06-7	indinavir d6	0.8	
sildenafil	Offline SPE LC/MS/MS	171599-83-0	sildenafil d3	1.6	
sotalol	Offline SPE LC/MS/MS	959-24-0	sotalol d7	4.5	
terbutaline	Offline SPE LC/MS/MS	23031-32-5	diazepam d5	1.9	
theophylline	Offline SPE LC/MS/MS	58-55-9	caffeine d9	7.4	
timolol	Offline SPE LC/MS/MS	26921-17-5	propranolol d7	0.3	
zidovudine	Offline SPE LC/MS/MS	30516-87-1	zidovudine d3	3.9	

Group	Compounds	Analytical procedure	CAS	Internal Standard / Quantification method	LOQ (ng/L)
3	5-fluorouracil	Offline SPE LC/MS/MS	51-21-8	fluorouracil-15N2	3,0
	fusidic acid	Offline SPE LC/MS/MS	751-94-0	ECM	4,0
	oxolinic acid	Offline SPE LC/MS/MS	14698-29-4	ofloxacin-d3	9,6
	pipemidic acid	Offline SPE LC/MS/MS	51940-44-4	ofloxacin-d3	10,0
	amoxicilline	Offline SPE LC/MS/MS	26787-78-0	amoxicilline-13C6	1,0
	ampicilline	Offline SPE LC/MS/MS	69-53-4	ampicilline-15N1	4,9
	azithromycine	Offline SPE LC/MS/MS	83905-01-5	clarithromycine-d3	2,0
	bacitracine	Offline SPE LC/MS/MS	1405-87-4	ECM	10,0
	cefalexine	Offline SPE LC/MS/MS	15686-71-2	penicilline G-d7	2,3
	cefotaxime	Offline SPE LC/MS/MS	63385-93-4	ampicilline-15N1	7,4
	cefpodoxime	Offline SPE LC/MS/MS	87239-81-4	ampicilline-15N1	6,5
	ceftiofur	Offline SPE LC/MS/MS	80370-57-6	ampicilline-15N1	14,3
	cefuraoxime	Offline SPE LC/MS/MS	55268-75-2	penicilline G-d7	15,9
	chloramphénicole	Offline SPE LC/MS/MS	56-75-7	chloramphénicol-d5	10,0
	chlortetracycline	Offline SPE LC/MS/MS	64-72-2	tétracycline-d6	6,0
	ciprofloxacin	Offline SPE LC/MS/MS	85721-33-1	ciprofloxacin 13C2-15N	38,4
	clarithromycine	Offline SPE LC/MS/MS	81103-11-9	clarithromycine-d3	1,3
	clindamycine	Offline SPE LC/MS/MS	21462-39-5	lincomycine-d3	1,1
	cloxacilline	Offline SPE LC/MS/MS	7081-44-9	penicilline G-d7	3,5
	cyclophosphamide	Offline SPE LC/MS/MS	50-18-0	cyclophosphamide d4	7,8
	danofloxacin	Offline SPE LC/MS/MS	112398-08-0	ofloxacin-d3	44,1
	daunorubicine	Offline SPE LC/MS/MS	23541-50-6	ECM	5,1
	dicloxacilline	Offline SPE LC/MS/MS	13412-64-1	penicilline G-d7	2,6
	docetaxel	Offline SPE LC/MS/MS	114977-28-5	ECM	3,4
	doxorubicine	Offline SPE LC/MS/MS	25316-40-9	ECM	10,5
	doxycycline	Offline SPE LC/MS/MS	10592-13-9	tétracycline-d6	9,1
	enrofloxacin	Offline SPE LC/MS/MS	93106-60-6	ofloxacin-d3	4,6
	epirubicine	Offline SPE LC/MS/MS	56390-09-1	ECM	18,5
	erythromycine	Offline SPE LC/MS/MS	114-07-8	erythromicine 13C2	2,4
	flumequine	Offline SPE LC/MS/MS	42835-25-6	flumequine 13C13	2,4
	gemcitabine	Offline SPE LC/MS/MS	122111-03-9	ECM	x
	ifosfamide	Offline SPE LC/MS/MS	3778-73-2	iosfamide d4	2,7
	josamycine	Offline SPE LC/MS/MS	16846-24-5	clarithromycine-d3	2,7
	lincomycine	Offline SPE LC/MS/MS	859-18-7	lincomycine-d3	4,1
	marbofloxacin	Offline SPE LC/MS/MS	115550-35-1	ofloxacin-d3	1,1
	methotrexate	Offline SPE LC/MS/MS	59-05-2	methotrexate d3	3,9
	metronidazole	Offline SPE LC/MS/MS	443-48-1	metronidazole d4	2,4
	monensine	Offline SPE LC/MS/MS	22373-78-0	ECM	2,6
	norfloxacin	Offline SPE LC/MS/MS	70458-96-7	norfloxacin-d5	4,1
	ofloxacin	Offline SPE LC/MS/MS	82419-36-1	ofloxacin-d3	2,3
	oxacilline	Offline SPE LC/MS/MS	7240-38-2	penicilline G-d7	3,9
	oxytétracycline	Offline SPE LC/MS/MS	6153-64-6	tétracycline-d6	18,7
	pénicilline G	Offline SPE LC/MS/MS	-	penicilline G-d7	5,3
	pénicilline V	Offline SPE LC/MS/MS	-	penicilline G-d7	4,7
	rifampicine	Offline SPE LC/MS/MS	13292-46-1	ECM	2,8
roxithromycine	Offline SPE LC/MS/MS	80214-83-1	clarithromycine-d3	8,5	
salinomycine	Offline SPE LC/MS/MS	55721-31-8	ECM	5,4	
sarrafloxacin	Offline SPE LC/MS/MS	91296-87-6	ofloxacin-d3	16,7	
spiramycine	Offline SPE LC/MS/MS	8025-81-8	clarithromycine-d3	0,9	
stavudine	Offline SPE LC/MS/MS	3056-17-5	ECM	5,3	
sulfadiazine	Offline SPE LC/MS/MS	68-35-9	sulfadiazine-13C6	2,1	
sulfadiméthoxine	Offline SPE LC/MS/MS	122-11-2	sulfadiméthoxine-d6	0,5	
sulfamerazine	Offline SPE LC/MS/MS	127-79-7	sulfaméthazine-13C6	1,6	
sulfaméthazine	Offline SPE LC/MS/MS	57-68-1	sulfaméthazine-13C6	1,1	
sulfaméthazole	Offline SPE LC/MS/MS	144-82-1	sulfaméthazine-13C6	2,3	
sulfaméthoxazole	Offline SPE LC/MS/MS	723-46-6	sulfaméthoxazole-13C6	1,5	
sulfanilamide	Offline SPE LC/MS/MS	63-74-1	sulfaméthazine-13C6	9,3	
sulfapyridine	Offline SPE LC/MS/MS	144-83-2	Sulfapyridine d4	1,1	
sulfathiazole	Offline SPE LC/MS/MS	72-14-0	sulfaméthazine-13C6	5,5	
tamoxifen	Offline SPE LC/MS/MS	10540-29-1	tamoxifen-d5	2,7	
tetracycline	Offline SPE LC/MS/MS	64-75-5	tétracycline-d6	8,3	
thiamphenicol	Offline SPE LC/MS/MS	15318-45-3	chloramphenicol-d5	10,0	
triméthoprime	Offline SPE LC/MS/MS	738-70-5	triméthoprime-13C3	3,7	
tylosine	Offline SPE LC/MS/MS	74610-55-2	clarithromycine-d3	16,7	
virginiamycine	Offline SPE LC/MS/MS	21411-53-0	ECM	24,1	

	Compounds	Analytical procedure	CAS	Internal Standard / Quantification method	LOQ (ng/L)
4	2-Hydroxy Carbamazepine	Offline SPE LC/MS/MS	68011-66-5	carbamazepine d10	2.9
	3-Hydroxy Carbamazepine	Offline SPE LC/MS/MS	68011-67-6	carbamazepine d10	2.2
	Trans 10,11-dihydro-10,11-dihydroxy carbamazepine	Offline SPE LC/MS/MS	58955-93-4	carbamazepine d10	4.7
5	asprine	Offline SPE LC/MS/MS	50-78-2	aspirine d4	5.0
	salicylic acid	Offline SPE LC/MS/MS	69-72-7	salicylic acid d6	10.0
6	Apixaban	Direct injection LC/MS/MS	503612-47-3	SAM	0.4
	Dabigatran	Direct injection LC/MS/MS	211915-06-9	SAM	2.0
	Rivaroxaban	Direct injection LC/MS/MS	366789-02-8	SAM	0.2

(SAM: standard addition method, ECM: external quantification method).





## CHAPITRE IV

### Vers une meilleure estimation de la contamination en zone estuarienne

#### Résumé

*Les études réalisées au niveau de l'estuaire de Seine ont permis de mettre en évidence une large gamme de contaminants organiques incluant des pesticides, des composés pharmaceutiques, des filtres UV et des molécules biologiquement actives. Cependant ces méthodes sont limitées aux molécules déjà connues et identifiées. Un point central de l'évaluation des molécules pertinentes réside dans l'identification de nouvelles molécules connues et inconnues dans les écosystèmes aquatiques. Ainsi l'identification de nouvelles molécules et de produits de transformation peut être abordée grâce à la spectrométrie de masse haute résolution par différentes approches : criblages non ciblés et suspects de matrices environnementales, études en laboratoire et approche dirigée par les effets. Ce chapitre s'intéresse à l'application de ces différentes approches visant à identifier de nouvelles molécules non initialement recherchées.*



# Chapitre IV : Vers une meilleure estimation de la contamination en zone estuarienne

## Table des matières

1.	Présence de composés traceurs de l'amont vers l'aval .....	192
1.1	Sélection des molécules ciblées .....	192
1.2	Niveaux de concentration des composés traceurs dans l'estuaire.....	193
1.2.1	Pesticides.....	193
1.2.2	Composés pharmaceutiques .....	194
1.3	Variabilité spatiale et temporelle : intérêt de l'échantillonnage passif .....	197
1.3.1	Variations spatiales en estuaire fluvial.....	197
1.3.2	Variations saisonnières du comportement des composés ciblés .....	200
1.4	Dynamique de la contamination en estuaire moyen .....	203
2.	Réactivité de contaminants apportés en Seine.....	209
2.1	Photodégradation d'un effluent de STEU .....	209
2.2	Devenir des contaminants en conditions environnementales variables .....	213
2.2.1	Evolution globale .....	215
2.2.2	Comportement type des contaminants et temps de demi-vie .....	218
2.2.3	Implication dans l'évaluation de molécules préoccupantes .....	222
3.	Publications .....	229
3.1	Suspended solids moderate the degradation and sorption of waste water-derived pharmaceuticals in estuarine waters (accepted in Science of Total Environment).....	229
3.2	Priorization of polar pesticides and pharmaceuticals with taking account into their persistence in dissolved phase: Case of the Seine estuary .....	255



## 1. Présence de composés traceurs de l'amont vers l'aval

### 1.1 Sélection des molécules ciblées

Le chapitre III a permis de mettre en évidence l'apport d'une grande diversité de contaminants en estuaire de Seine. La suite de l'étude se focalise plus particulièrement sur le devenir des contaminants polaires dans l'estuaire fluvial (Oissel, La Bouille et Caudebec) et dans l'estuaire aval (Caudebec-La Carosse). Différentes études ont déjà montré que le pourcentage de pesticides et médicaments recherchés porté par les particules était inférieur à 10 % (Togola, 2006; Aminot, 2013; Cruz, 2016). Par conséquent, les études menées en estuaire de Seine se sont principalement focalisées sur la phase dissoute.

Un premier état des lieux a été réalisé sur les échantillons prélevés lors des campagnes DYNAMOSEINE 1 et 2 réalisées en avril et septembre 2015. Cette étude préliminaire a permis de sélectionner les molécules majoritairement retrouvées. Pour des raisons pratiques et en raison du grand nombre d'échantillons, le glyphosate et l'AMPA n'ont pas été inclus dans ce suivi bien que soient les pesticides quantifiés aux plus fortes concentrations. Ainsi, l'analyse de 53 composés pharmaceutiques et 60 pesticides a été réalisée sur un panel d'échantillons, permettant d'identifier 22 molécules « traceurs ». Cette liste regroupe 8 composés pharmaceutiques (aténolol, sotalol, carbamazépine, gabapentine, oxazépam, diclofénac, ibuprofène et son métabolite le 2-hydroxy ibuprofène) et 14 pesticides (métolachlore, isoproturon, fipronil, diuron, imidaclopride, propiconazole, atrazine, fipronil sulfone, fipronil sulfide, fipronil désulfinyl, DEA, hydroxyatrazine, métolachlore OA et ESA).

Les molécules considérées représentent 50 à 80 % de l'abondance relative de l'ensemble des composés pharmaceutiques et pesticides recherchés sur les campagnes DYNAMOSEINE (n=6) (Figure 54). Les molécules sélectionnées sont également cohérentes avec la représentativité de différentes sources. Ainsi, les médicaments et certains pesticides (fipronil, diuron, imidaclopride, propiconazole) sont le reflet de traceurs d'usage urbain (vectorisés par les effluents de STEU). Les autres pesticides sont le reflet de traceurs d'usage agricole (métolachlore, isoproturon) et interdits (atrazine). Certains produits de transformation (fipronil sulfone, fipronil sulfide, fipronil desulfinyl, DEA, hydroxyatrazine, métolachlore OA et ESA) ont également été inclus afin de mettre en évidence de potentiels phénomènes de transformation.

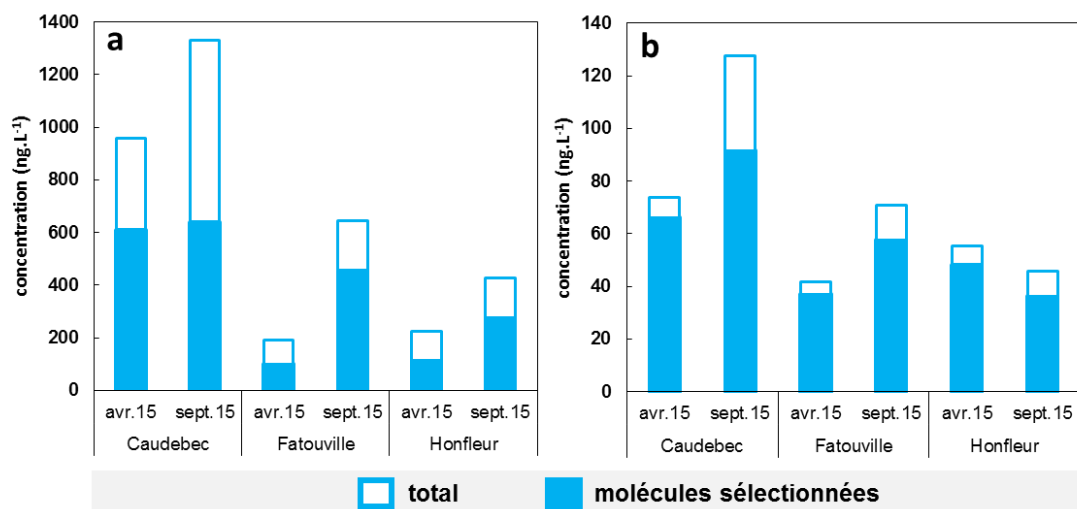


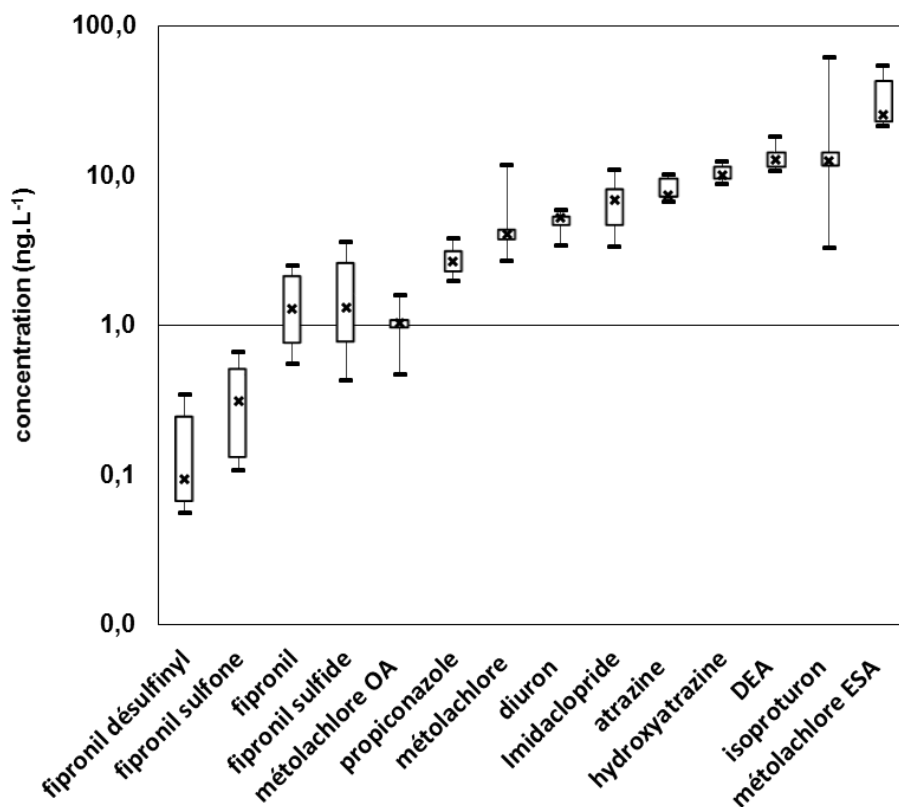
Figure 54 : Représentativité des molécules sélectionnées : (a) pharmaceutiques et (b) pesticides.

## 1.2 Niveaux de concentration des composés traceurs dans l'estuaire

Une première évaluation de l'état de contamination en composés traceurs a été réalisée sur les échantillons ponctuels récoltés pendant une période de 6 mois d'échantillonnage (décembre 2016 à mai 2017) au niveau d'Oissel, La Bouille et Caudebec.

### 1.2.1 Pesticides

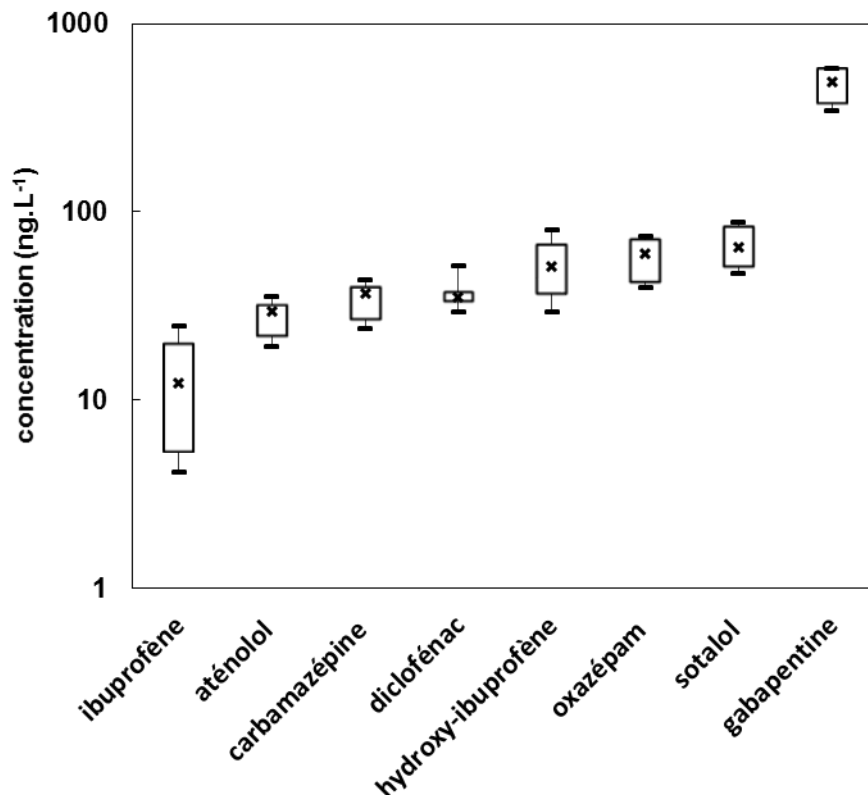
La présence dans l'estuaire de 14 pesticides a été évaluée au niveau des 3 sites (Oissel, La Bouille et Caudebec) et présentée Figure 55. Les 14 molécules ont été détectées et quantifiées au niveau des 3 sites lors des 6 campagnes réalisées. Les concentrations moyennes varient de  $0,2 \pm 0,2$  ng.L<sup>-1</sup> pour le fipronil désulfinyl à  $33 \pm 16$  ng.L<sup>-1</sup> pour le métolachlore ESA. Lors de ce suivi, 2 molécules possèdent des concentrations médianes inférieures à 1 ng.L<sup>-1</sup> (le fipronil désulfinyl et le fipronil sulfone), 9 molécules ont des concentrations comprises entre 1 et 10 ng.L<sup>-1</sup> et 3 molécules supérieures à 10 ng.L<sup>-1</sup> (la DEA, l'isoproturon et le métolachlore ESA). D'importantes variations des concentrations sont à noter pour les composés qui ne sont pas ou peu apportés par les effluents de STEU. C'est notamment le cas pour les pesticides à usage agricole comme l'isoproturon et le métolachlore dont les concentrations varient respectivement de 3 à 61 ng.L<sup>-1</sup> et de 3 à 11 ng.L<sup>-1</sup>.



**Figure 55 : Concentrations mesurées en pesticides recherchés dans les échantillons ponctuels récoltés au niveau d’Oissel, La Bouille et Caudebec, de décembre 2016 à mai 2017 (n=18).**

### 1.2.2 Composés pharmaceutiques

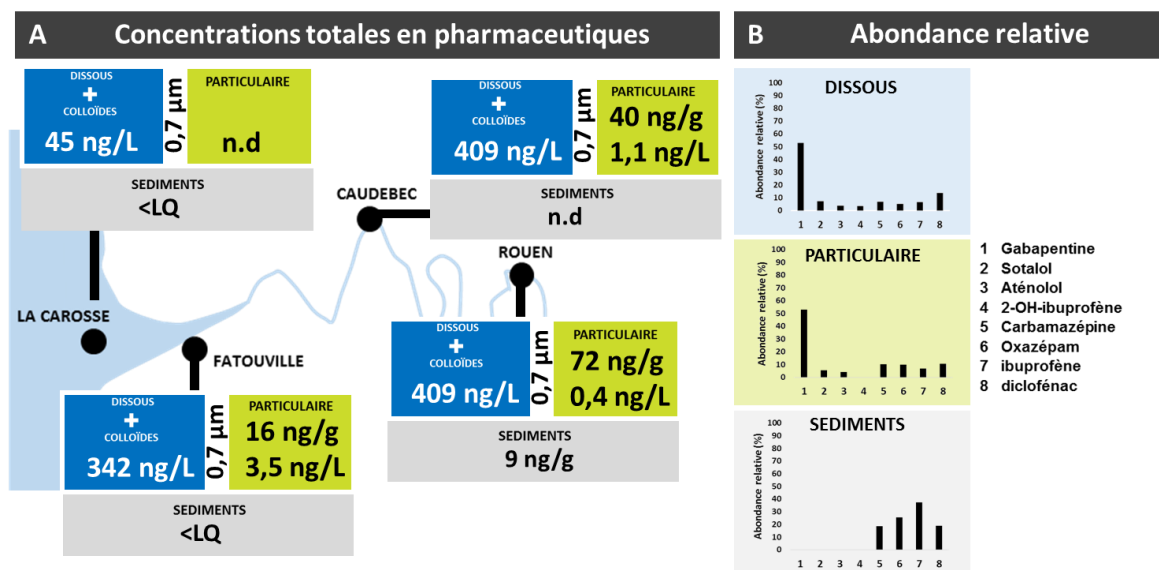
Lors de ce suivi de 6 mois par échantillonnage ponctuel, 8 médicaments ont également été recherchés. Les molécules ont été quantifiées à des concentrations médianes variant entre  $13 \pm 16$  (ibuprofène) à  $473 \pm 161$  ng.L<sup>-1</sup> (gabapentine) (Figure 56). Sur les 8 molécules recherchées 8 possèdent des concentrations médianes comprises entre 10 et 100 ng.L<sup>-1</sup>. Sur 8 les molécules recherchées, 7 médicaments possèdent des concentrations comprises entre 10 et 100 ng.L<sup>-1</sup>.



**Figure 56 : Concentrations moyennes des pesticides recherchés dans les échantillons ponctuels récoltés au niveau d’Oissel, La Bouille et Caudebec, de décembre 2016 à mai 2017 (n=18).**

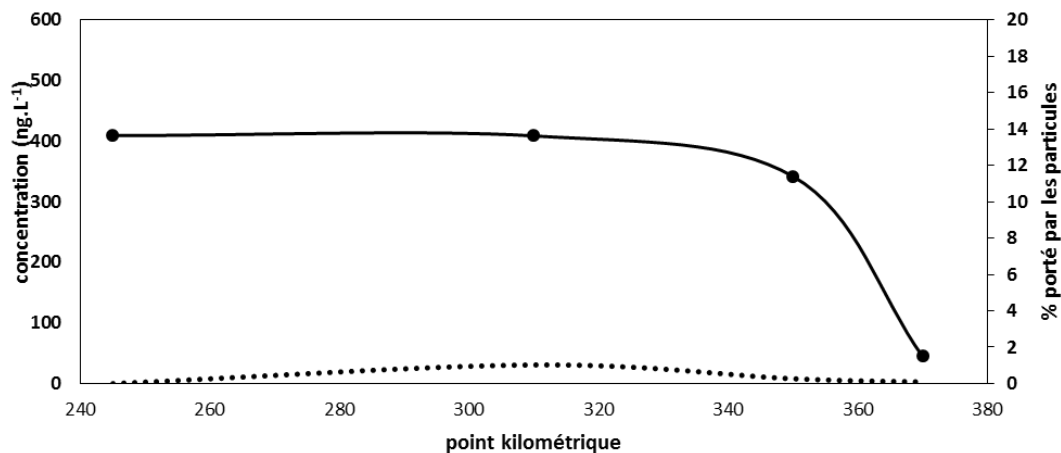
Une analyse plus poussée a été conduite sur les composés pharmaceutiques en ciblant différents compartiments : la fraction dissoute, la particulaire et le sédiment. La présence des composés pharmaceutiques est peu marquée dans le sédiment (Figure 57). Les composés les plus hydrophobes (carbamazépine, oxazépam, ibuprofène, diclofénac) ont été quantifiés seulement au niveau de Rouen avec une concentration totale de 9 ng.g<sup>-1</sup> (Figure 57 A). Dans l’ensemble des autres matrices étudiées, les concentrations individuelles des huit composés pharmaceutiques sont en dessous des limites de quantification. La somme des concentrations en phase dissoute diminue peu entre Rouen et Fatouville passant de 409 à 342 ng.L<sup>-1</sup> (Figure 57 A). Une diminution marquée des concentrations n’a été observé qu’au niveau du point marin : La Carosse. (45 ng.L<sup>-1</sup>). A l’exception du 2-hydroxy-ibuprofène, l’ensemble des composés ont été quantifiés dans la phase particulaire (Figure 57 B). Les concentrations individuelles (carbamazépine, ibuprofène et diclofénac) sont en accord avec les données qui avaient été obtenues dans le cadre du projet MEDSEINE (Togola, 2006; Togola et Budzinski, 2007). La gabapentine est le composé majoritaire et représente plus

50% de la concentration en phase dissoute mais également en phase particulaire. Elle est en revanche peu retrouvée dans les sédiments.



**Figure 57 : Synthèse des concentrations (A) et abondance relative (B) en pharmaceutiques recherchés dans le sédiment et dans les phases dissoute et particulaire.** (<LQ : inférieur à la limite de quantification, nd : non déterminé). Les résultats synthétisent les données obtenus durant la campagne d'avril 2016).

Les concentrations quantifiées au niveau de la colonne d'eau sont le reflet des composés présents en phase dissoute : moins de 1% de la contamination en pharmaceutiques est portée par les matières en suspension (Figure 58). Ce comportement est similaire quelles que soient les molécules considérées. Le pourcentage porté par les particules tend à augmenter au niveau de la zone maximale de turbidité (ZMT) pour quelques molécules (oxazépam et hydroxy-ibuprofène) mais n'excède pas 4 %. Ce résultat est cohérent avec différentes études menées dans différents environnements comme l'estuaire de la Gironde ou l'East River (New York).



**Figure 58 : Evolution de la concentration (trait plein) et du pourcentage porté par les particules (trait en pointillé) dans la colonne d'eau (dissous+ particulaire) de Rouen à La Carosse pour la somme de 8 composés pharmaceutiques**

### **1.3 Variabilité spatiale et temporelle : intérêt de l'échantillonnage passif**

#### **1.3.1 Variations spatiales en estuaire fluvial**

Les informations données par l'échantillonnage ponctuel ne reflètent qu'une image de la contamination à un instant donné. Afin d'apporter une vision complémentaire et plus intégrative, des échantillonneurs de type POCIS ont été utilisés. Deux composés n'ont pas pu être quantifiés en ng.L<sup>-1</sup> : (1) la gabapentine qui, bien que présente à de très fortes concentrations dans les échantillons ponctuels, ne s'accumule pas dans l'outil dans sa configuration pharmaceutique (Pédelucq, 2016) ; (2) l'hydroxy-ibuprofène en raison de l'absence de données fiables concernant son taux d'échantillonnage (molécules atteignant très rapidement la phase d'équilibre d'accumulation) (Aminot, 2013).

Afin de comparer les performances obtenues par échantillonnage ponctuel et par POCIS, les limites de quantification obtenues par les POCIS (ng/g) ont été extrapolées en ng.L<sup>-1</sup> selon la méthodologie présentée chapitre II (section 4.4.3 p106). L'utilisation des échantillonneurs passifs permet dans de nombreux cas d'abaisser les limites de quantification d'un grand nombre de composés (Tableau 27). Ceci peut représenter un point clé, notamment dans le cadre du suivi de composés actifs à très faibles concentrations comme c'est le cas du fipronil. Ce composé a été quantifié au-dessus de sa PNEC lors de tous les échantillonnages réalisés. L'utilisation des échantillonneurs passifs a permis d'abaisser les limites de détection du fipronil et de ses métabolites d'un facteur allant de 2 à 10 (Tableau 27). L'abaissement des LQ permet ainsi une meilleure représentativité des concentrations estimées vis-à-vis de la PNEC.

**Tableau 27 : Comparaison des limites de quantification « protocole » (ng.L<sup>-1</sup>) entre échantillons ponctuels et passif.**

	<b>Ponctuel</b>	<b>POCIS</b>
aténolol	0,6	0,4
atrazine	0,8	0,007
2-hydroxy-atrazine	0,9	0,001
carbamazépine	0,02	0,01
DEA	5,3	0,02
diclofénac	0,2	0,5
diuron	0,04	0,001
fipronil	0,09	0,05
fipronil desulfinyl	0,03	0,3
fipronil sulfide	0,14	0,03
fipronil sulfone	0,33	0,13
gabapentine	2,6	nd
hydroxy-ibuprofène	2,7	nd
ibuprofène	1,1	1,1
imidaclopride	1,1	0,001
isoproturon	0,1	0,002
métolachlore	0,01	0,1
métolachlore ESA	2,7	0,01
métolachlore OA	0,6	0,03
oxazépam	0,1	0,2
propiconazole	0,1	0,002
sotalol	1,5	0,3

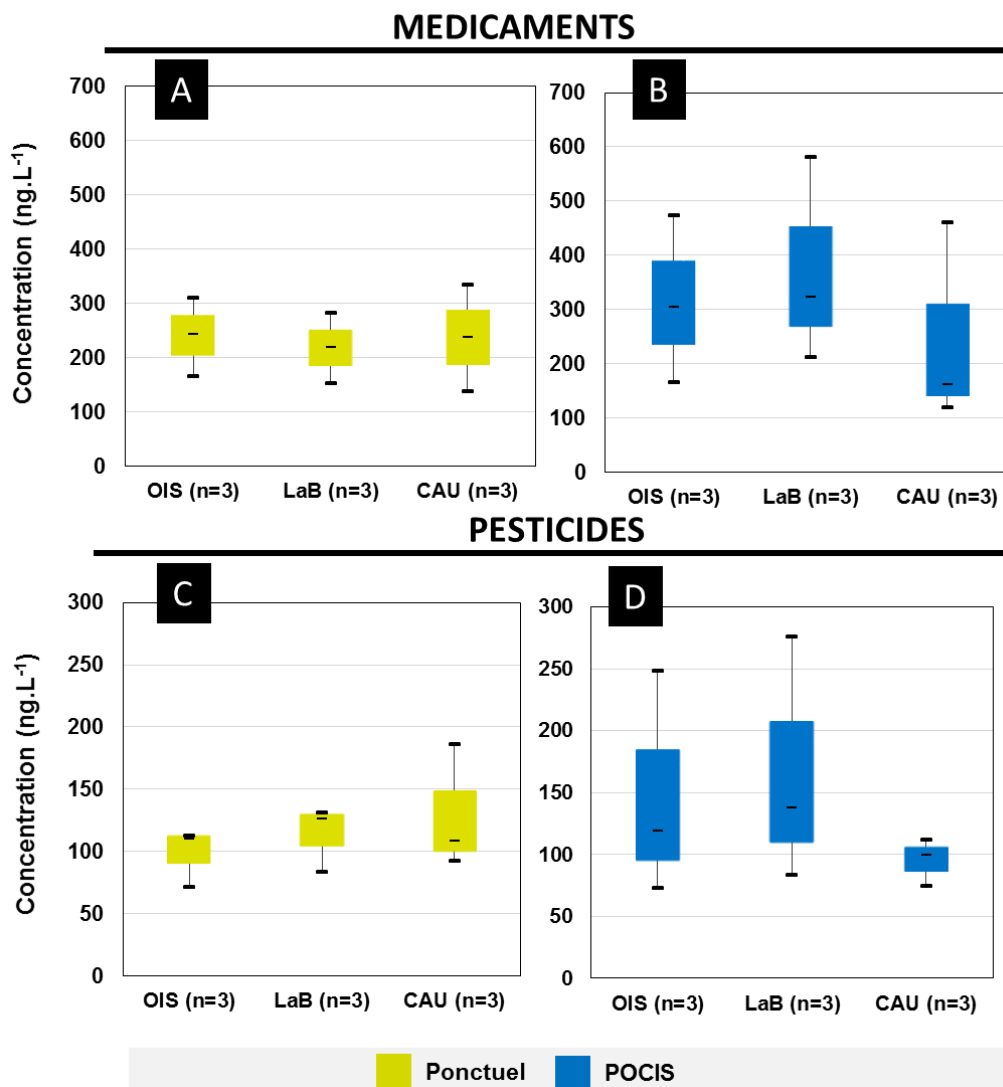
Les concentrations estimées par les échantillonneurs passifs sont du même ordre de grandeurs que celle évaluées par échantillonnage ponctuel (Tableau 28). Dans le cadre de ce travail, un PRC a été utilisé : la DIA d5 (déisoproyl-atrazine d5). Le taux d'échantillonnage et les coefficients de désorption utilisés sont dérivés de différentes expérimentations réalisées en laboratoire et en conditions estuariennes (Tableau 28). L'évolution moyenne des concentrations mesurées par échantillonnage ponctuel et POCIS, en pesticides et en pharmaceutiques, est présentée dans le Tableau 28. Il est à noter que des concentrations 3 à 4 fois plus importantes ont été constatées en utilisant les POCIS pour certaines molécules. Une estimation plus importante des concentrations en isoproturon par POCIS a notamment été constatée en décembre 2016. Ce résultat est cohérent avec l'intégration d'une contamination ponctuelle de la Seine, en isoproturon, résultant de son épandage pour les cultures de blé tendre à ces périodes. Effectivement sur le mois décembre les concentrations moyennées en isoproturon au niveau des 3 sites varient entre 64 et 188 ng.L<sup>-1</sup> (POCIS) contre 43 - 94 ng.L<sup>-1</sup> par échantillonnage ponctuel.

**Tableau 28 : Concentrations (ng.L<sup>-1</sup>) en composés pharmaceutiques et en pesticides dans l'estuaire de Seine. Les concentrations ont été évaluées par échantillonnage ponctuel et par POCIS sur les périodes de décembre 2016-mai 2017. [1](Aminot, 2013), [2] (Dufour, 2017), [3] (Belles, 2012).**

Composés					Oissel (kp 230)		La Bouille (kp 260)		Caudebec (kp 310)	
	Caféine C13				Ponctuel	POCIS	Ponctuel	POCIS	Ponctuel	POCIS
	Ke labo	Rs labo	Ku labo	Ref	n=6	n=3	n=6	n=6	n=6	n=5
aténolol	0,4	0,22	1,10	[1]	28,9 ± 11,8	24,3 ± 14,4	27,6 ± 9,1	24,3 ± 12,1	26,4 ± 9,7	12,1 ± 11,6
carbamazépine	0,4	0,107	0,54	[1]	35,9 ± 14,7	61,2 ± 16,4	34,3 ± 11,3	81,0 ± 28,9	32,8 ± 12,0	46,4 ± 34,1
diclofénac	0,4	0,1	0,50	[1]	35,3 ± 14,2	104,5 ± 49,7	37,7 ± 2,5	111,3 ± 56,3	38,1 ± 12,8	50,2 ± 41,5
gabapentine	0,4	0,11	0,55	[1]	505,1 ± 183,0	nd	478,0 ± 159,7	nd	437,9 ± 163,0	nd
ibuprofène	0,4	0,08	0,40	[1]	20,7 ± 22,3	46,0 ± 37,8	9,8 ± 9,9	49,9 ± 33,1	9,0 ± 14,2	<b>28,5 ± 30,7</b>
oxazépam	0,4	0,34	1,70	[1]	58,7 ± 23,8	36,4 ± 17,5	60,5 ± 21,9	47,3 ± 20,0	52,1 ± 21,2	25,1 ± 20,0
sotalol	0,4	0,25	1,25	[1]	68,8 ± 27,5	42,9 ± 24,6	72,6 ± 32,4	46,6 ± 25,5	57,9 ± 25,8	26,5 ± 25,0
atrazine	0,4	0,18	0,90	[1]	7,8 ± 1,8	8,7 ± 2,9	8,8 ± 1,9	10,1 ± 2,9	7,9 ± 1,4	8,1 ± 3,1
atrazine 2 hydroxy	0,4	0,14	0,70	[1]	10,0 ± 1,7	12,3 ± 2,0	10,3 ± 1,0	14,3 ± 3,9	10,7 ± 2,2	7,1 ± 2,5
DEA	0,4	0,08	0,40	[1]	12,2 ± 4,0	7,1 ± 3,2	14,5 ± 3,9	7,3 ± 2,4	13,1 ± 3,3	6,7 ± 2,9
diuron	0,4	0,21	1,05	[1]	4,6 ± 1,3	2,6 ± 0,5	4,8 ± 1,1	4,0 ± 1,6	5,4 ± 1,9	3,3 ± 1,3
fipronil	0,4	0,1	0,7	[2]	1,1 ± 0,6	1,9 ± 1,1	1,6 ± 1,0	3,4 ± 2,2	1,7 ± 1,1	2,0 ± 1,5
fipronil desulfinyl	0,4	0,0	0,1	[2]	0,9 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,2
fipronil sulfide	0,4	0,1	0,6	[2]	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,3	2,0 ± 1,9	1,3 ± 1,1	2,5 ± 2,1	0,7 ± 0,7
fipronil sulfone	0,4	0,1	0,5	[2]	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,9 ± 0,7	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,4
imidaclopride	0,4	0,08	0,40	[3]	6,2 ± 2,5	15,5 ± 4,5	6,5 ± 2,8	17,6 ± 6,8	7,3 ± 4,8	11,4 ± 5,1
isoproturon	0,4	0,10	0,50	[3]	16,2 ± 14,0	75,6 ± 84,1	16,5 ± 16,0	63,1 ± 66,6	25,4 ± 34,1	31,6 ± 20,1
métolachlore	0,4	0,24	1,20	[3]	4,9 ± 4,0	2,3 ± 0,5	4,8 ± 3,2	2,9 ± 0,8	5,9 ± 3,3	2,6 ± 1,3
métolachlore ESA	0,4	0,10	0,50	[3]	29,9 ± 12,	14,9 ± 1,0	31,4 ± 16,8	19,5 ± 13,2	36,7 ± 20,0	9,7 ± 5,8
métolachlore OA	0,4	0,08	0,40	[3]	1,9 ± 0,2	2,9 ± 0,9	1,1 ± 0,4	3,1 ± 1,0	1,1 ± 0,3	2,3 ± 0,8
propiconazole	0,4	0,36	1,80	[3]	2,6 ± 0,9	2,3 ± 1,1	2,7 ± 0,7	2,9 ± 0,9	2,9 ± 0,8	2,7 ± 1,1

La variabilité spatiale de la contamination entre Oissel et Caudebec a pu être évaluée sur la base de 3 campagnes et est présentée Figure 59. En effet, les concentrations totales en médicament et en pesticides (Figure 62 a et c). ne permettent pas de discriminer spatialement les sites d'Oissel, de la Bouille et de Caudebec. A l'inverse, une diminution significative des concentrations de l'amont vers l'aval a pu être constatée avec les données provenant des POCIS (Figure 59).



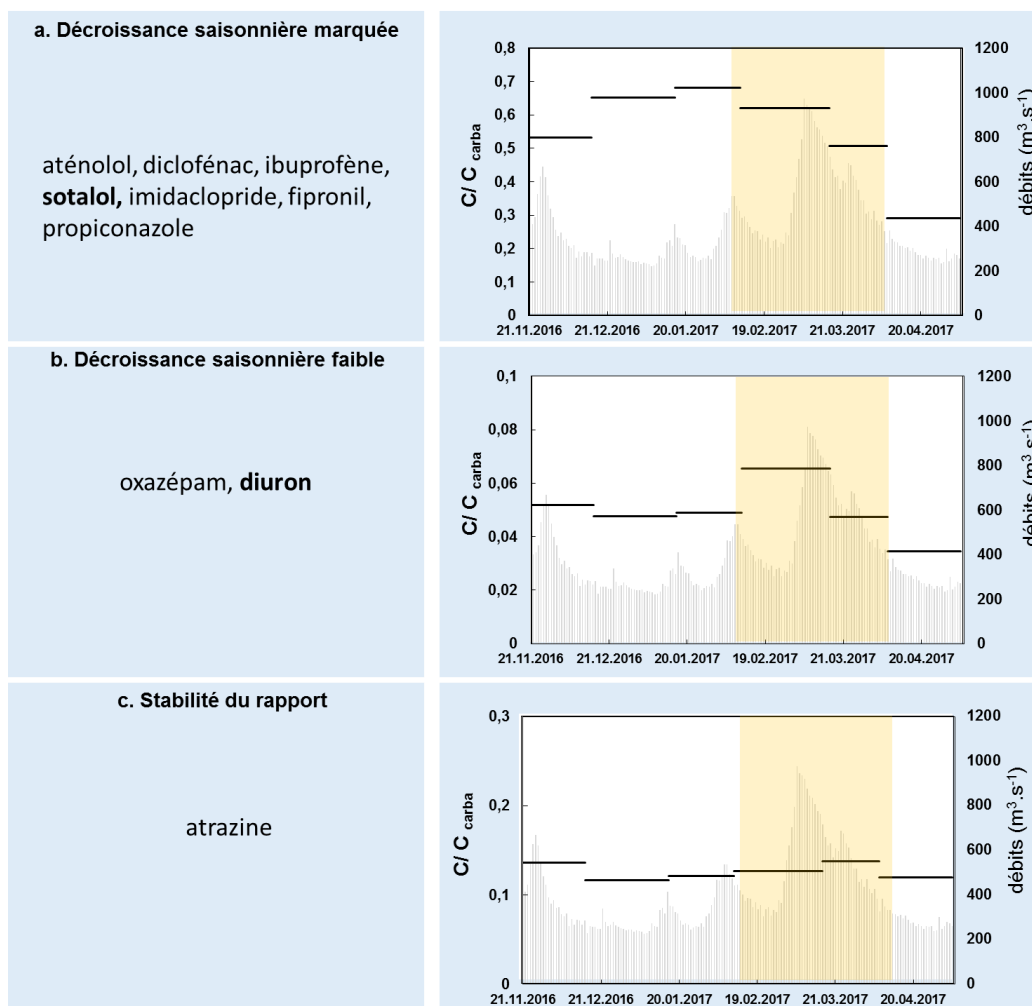


**Figure 59** : Concentrations en composés pharmaceutiques (A et B) et en pesticides (C et D) dans l'estuaire de Seine. Les concentrations ont été évaluées à partir des échantillonnages ponctuels (A et C) et POCIS (B et D) sur les périodes de décembre 2016, février 2017, avril 2017. OIS : oissel, LaB : La Bouille et CAU : Caudedec.

### 1.3.2 Variations saisonnières du comportement des composés ciblés

Dans l'optique de mettre en évidence le comportement saisonnier des molécules ciblées, l'utilisation des données recueillies grâce aux échantillonneurs passifs ont été utilisées pour apporter une vision plus intégrée de la variabilité. Cette approche a ainsi été réalisée sur le site de La Bouille qui est situé au niveau de l'estuaire moyen et qui ne subit par conséquent qu'une faible influence de la marée. Les concentrations mesurées dans les POCIS en pesticides et pharmaceutiques ont été normalisées par la concentration en carbamazépine. Cette approche est décrite dans le détail en ce qui concerne les pesticides dans la publication

« *Polar pesticides in the Seine estuary (France)* ». En effet, ce composé connu pour être persistant et apporté en continu par les STEU a permis de s'affranchir des effets de dilution engendrés par les débits fluviaux et la marée. Cette approche a notamment été appliquée dans différentes études afin d'évaluer l'atténuation de pharmaceutiques le long d'une rivière ou encore le devenir de pharmaceutiques dans la Garonne estuarienne (Kunkel et Radke, 2012; Aminot et al., 2016).



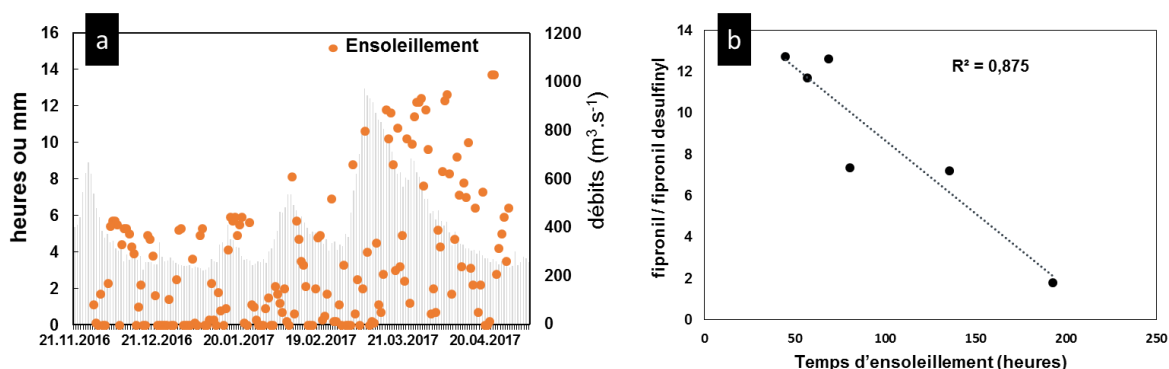
**Figure 60 : Classement des composés en fonction de la saisonnalité du rapport de concentration composés/ carbamazépine à La Bouille (trait noir) et débit extrapolé à Poses (histogramme).**

Dans un premier temps, cette approche a été réalisée seulement sur les composés parents. Par ailleurs, en raison de leur épandage massif lié à leur usage agricole, l'isoproturon et le métolachlore n'ont pas été inclus dans cette approche. L'atrazine, l'oxazépam et le diuron présentent pas ou peu de variation au cours des six mois étudiés

(Figure 60 b et c). A l'inverse, 7 molécules (aténolol, diclofénac, ibuprofène, sotalol, imidaclopride, fipronil, et propiconazole) présentent une atténuation saisonnière importante et en particulier en période de faibles débits.

Différentes études ont déjà attribué ce type de comportement à une augmentation du temps de transit des composés en période estivale (Benotti et Brownawell, 2007; Kunkel et Radke, 2012; Aminot et al., 2016). Togola et al., en 2006 avaient déjà mis en évidence une atténuation saisonnière de la caféine, de l'ibuprofène du naproxène en lien avec le temps de résidence des masses d'eau et du débit fluvial. Par ailleurs, des comportements similaires ont également été observés dans l'estuaire fluvial de la Gironde pour 13 composés pharmaceutiques (Aminot et al., 2016).

L'augmentation du temps de résidence ne semble pas être le seul paramètre impliqué dans cette atténuation saisonnière (Figure 61). Les périodes d'échantillonnage de mars à mai sont également caractérisées par une augmentation des durées d'ensoleillement (données provenant de <http://www.meteociel.fr/>). Sur la période des 6 mois d'échantillonnage passif, une corrélation négative ( $r^2=0,87$ ) a été mise en évidence entre le rapport du fipronil/fipronil-desulfinyl et d'ensoleillement (Figure 61 b). Le fipronil desulfinyl est connu pour être le photoproduit majoritaire du fipronil (Bobe et al., 1998). Ce constat tend à mettre en évidence l'implication d'un phénomène de photodégradation plus importante durant les mois de fort ensoleillement et de bas débits.



**Figure 61 : Ensoleillement et débit durant la période d'échantillonnage (a) et relation entre fipronil/fipronil-desulfinyl et ensoleillement (b).**

Des décroissances saisonnières durant les mois de fort ensoleillement ont récemment été mises en évidence au niveau de la rivière Elbe (Michel et al., 2016). La même tendance a été observée dans notre étude pour 6 composés : les fipronil sulfide et sulfone, le diclofénac, l'aténolol, l'oxazépam, et le sotalol (corrélation de Pearson, Tableau 29). En

effet, la photodegradation des composés pharmaceutiques et des pesticides est déjà reconnue pour être un processus majeur dans leur atténuation dans les eaux de surfaces (Andreozzi, 2003; Calisto et al., 2011; Fenner et al., 2013; Prasse et al., 2015; Baena-nogueras et al., 2017; Ebele et al., 2017).

**Tableau 29 : Corrélation de Pearson entre le rapport de concentration composés/ carbamazépine et les heures cumulés d'ensoleillement.**

	ensoleillement (h)
atrazine	0,1
hydroxy-atrazine	0,0
DEA	0,0
diuron	-0,6
imidaclopride	-0,2
propiconazole	0,0
<b>fipronil</b>	<b>-0,9</b>
fipronil desulfinyl	<b>0,8</b>
fipronil sulfide	<b>-0,8</b>
fipronil sulfone	-0,7
<b>diclofénac</b>	<b>-0,8</b>
ibuprofène	-0,6
<b>aténolol</b>	<b>-0,9</b>
<b>oxazépam</b>	<b>-0,9</b>
<b>sotalol</b>	<b>-0,9</b>

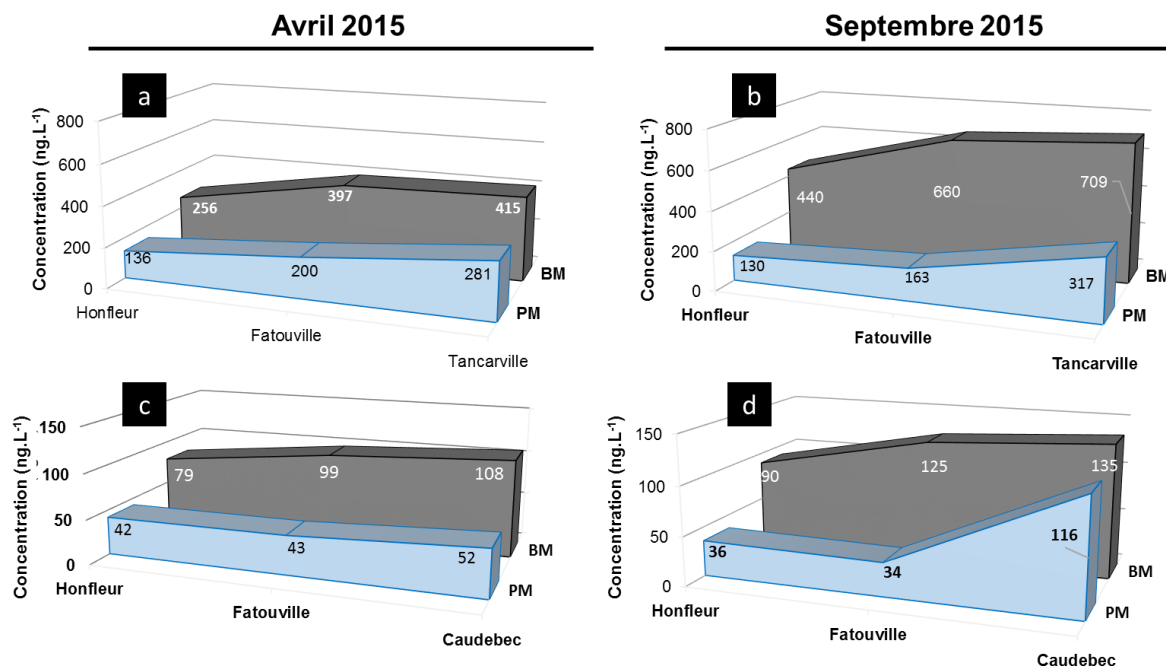
*Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification  $\alpha=0,05$*

#### **1.4 Dynamique de la contamination en estuaire moyen**

L'estuaire de Seine est caractérisé par l'apport saisonnier de molécules d'origine agricole, et de produits de transformation, ainsi que par des molécules qui peuvent être reliées à des usages anciens (atrazine) ou à une utilisation en milieu urbain. Cependant, l'estuaire de Seine est un environnement qui est influencé par son hydrodynamisme et notamment par les entrées salines. L'objectif de cette section a été d'évaluer l'impact de l'hydrodynamisme de la Seine sur la contamination en médicaments et en pesticides. Afin d'évaluer la dynamique de la contamination au niveau de l'estuaire aval, des prélèvements à basse mer, au jusant/flot et à pleine mer ont été réalisés en point fixe au niveau de différents sites (Tancarville, Fatouville, Honfleur) et à différentes saisons (avril et septembre 2015).

Une première comparaison permet de mettre en évidence d'importantes différences de concentrations entre les deux saisons à basse mer (en gris, Figure 62). Ainsi des concentrations 1,25 à 2 fois plus importantes ont été quantifiées en septembre 2015 au niveau du point le plus amont (Caudebec). Les concentrations totales en médicaments et en pesticides varient respectivement de 425 à 709 ng.L<sup>-1</sup> et de 108 à 135 ng.L<sup>-1</sup> entre avril et septembre 2015 en basse mer. La campagne réalisée en avril 2015 est caractérisée par un

débit fluvial important ( $423 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ) tandis que celle de septembre 2015 est caractérisée par un débit fluvial plus faible ( $222 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Les faibles concentrations retrouvées en avril 2015 peuvent donc être mises en lien avec une dilution relative au fort débit observé à cette période. Des tendances saisonnières liées au débit fluvial ont déjà été mises en évidence au niveau de l'estuaire de Yangtze, de la rivière Pearl et de l'estuaire de la Gironde (Yang et al., 2011; Liang et al., 2013; Aminot et al., 2016).

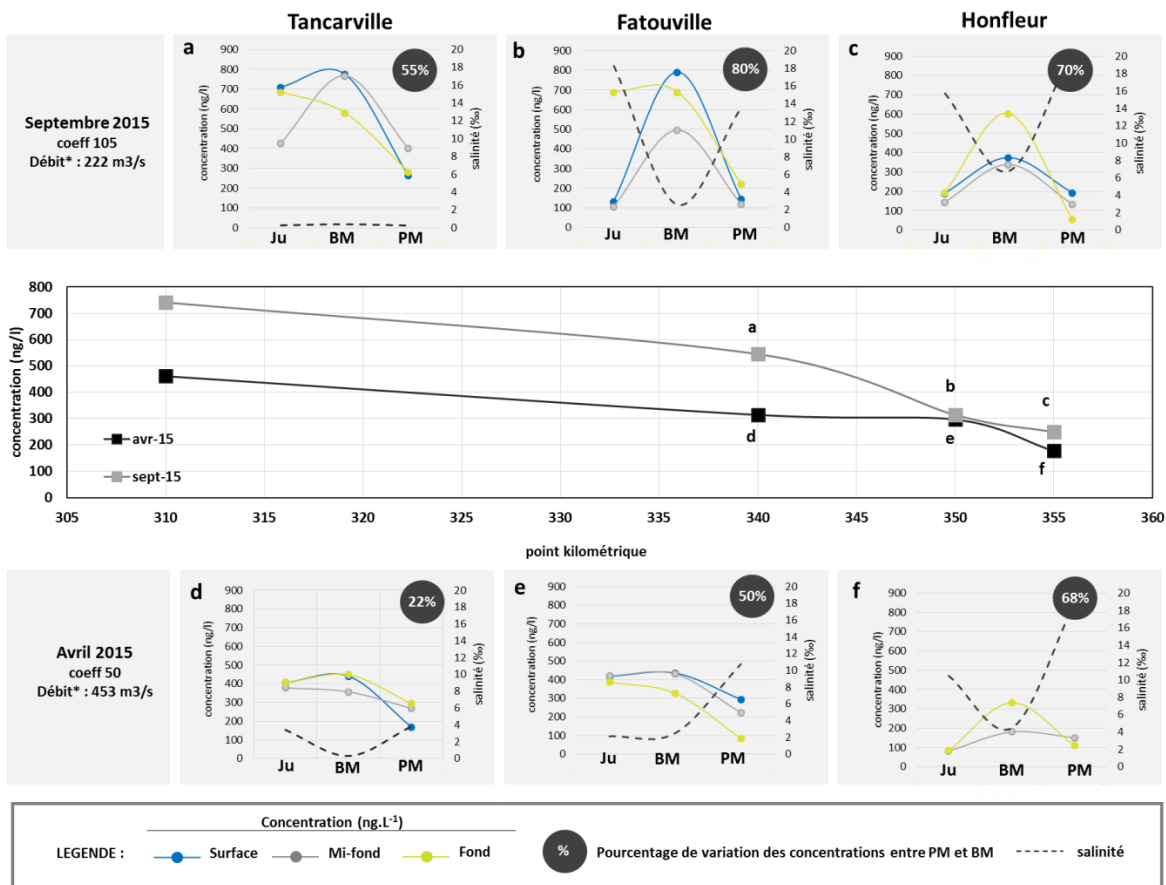


**Figure 62 : Comparaison des concentrations en composés pharmaceutiques (a et b) et en pesticides (c et d) lors de deux campagnes réalisées en avril et en septembre 2015 au niveau de Caudebec, Fatouville et Honfleur en basse mer (BM) et pleine mer (PM).**

La marée joue également un rôle important dans la dynamique de la contamination. A une échelle de temps plus réduite (cycle de marée), l'estuaire moyen subit de grandes variations en concentrations. En effet, d'importantes variations ont été constatées entre pleine et basse mer avec des concentrations totales en pharmaceutiques et en pesticides divisées par un facteur allant de 2 à 4 en pleine mer (en bleu, Figure 62).

Une synthèse détaillée des variations de concentrations observées concernant les composés pharmaceutiques est donnée Figure 63. Les variations de concentrations en médicaments oscillent de 22 à 80 % (Figure 63). Ainsi les concentrations maximales sont retrouvées à basse mer et diminuent conjointement avec l'augmentation de salinité. Ce phénomène semble être le résultat d'une dilution des eaux provenant de l'amont par les intrusions salines résultant de la marée. Au niveau du site d'Honfleur, une variation des

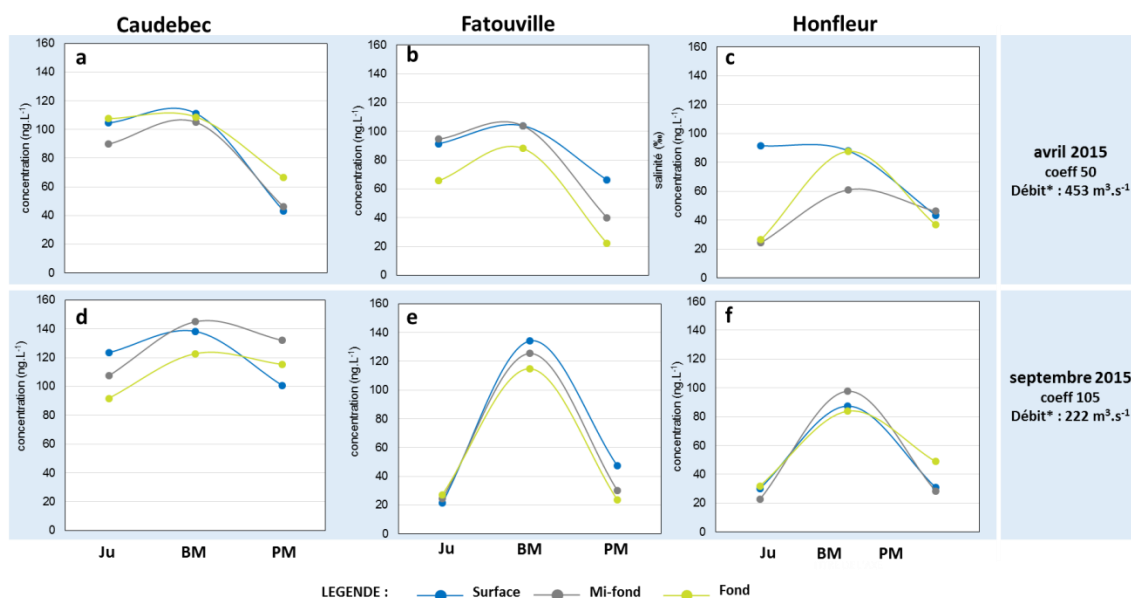
concentrations d'environ 70 % a été constatée entre pleine mer et basse mer que cela soit en avril ou septembre 2015 (Figure 63). Des dilutions dépendantes de la saison ont été observées au niveau du site de Fatouville. En effet, les concentrations varient de 50 % en avril 2015 contre 80 % en septembre 2015 passant de 700 à 150 ng.L<sup>-1</sup> entre basse et pleine mer. En remontant vers l'amont, une atténuation du facteur de dilution a été mise en évidence. Ainsi au niveau de Tancarville, les variations de concentration observées entre basse et pleine mer sont comprises entre 22 (avril 2015) et 55 % (septembre 2015). Ainsi, l'impact de la marée sur les concentrations est dépendant des conditions de débit du fleuve et du coefficient de la marée au niveau de Fatouville et dans une moindre mesure à Tancarville. En condition de faible débit (222 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>) et d'un fort coefficient de marée (105), le site de Fatouville a subi les plus fortes fluctuations de concentration (80% lors de septembre 2015 contre seulement 50% en avril 2015).



**Figure 63 : Evolution des concentrations (ng.L<sup>-1</sup>) moyenne (basse, pleine mer et jusant) en composés pharmaceutiques de l'amont vers l'aval : Dynamique de la contamination au cours d'un cycle de marée.** Le graphique central représente les concentrations moyennes en avril et septembre 2015 de Caudebec à Honfleur. Les graphiques a, b, c, d, e, f représentent les variations de concentrations au niveau de Tancarville (a,d), Fatouville (b,e) et Honfleur (c,f) au cours d'un même cycle de marée. Les échantillons ont été prélevés à basse mer (BM), jusant (Ju) et pleine mer (PM).

Afin d'évaluer l'évolution de la contamination le long de la colonne d'eau, les prélèvements ont été réalisés à 3 profondeurs (surface, mi-fond et fond). Des variations de concentrations ont été observées sur certains sites entre le fond et la surface, avec des écarts de 100 à 300 ng.L<sup>-1</sup> au niveau d'Honfleur et Fatouville en septembre 2015 (Figure 62). Cependant, aucune tendance concernant une stratification de la contamination entre surface et fond n'a pu clairement être mise en avant.

La même approche a été réalisée pour les 9 pesticides et les résultats obtenus lors des campagnes d'avril et de septembre 2015 sont présentés Figure 64. Les concentrations totales au niveau des 3 sites varient entre 20 et 111 ng.L<sup>-1</sup> en avril et entre 20 et 140 ng.L<sup>-1</sup> en septembre. Elles varient entre 47-50 % au niveau de Honfleur, entre 57 et 70 % à Fatouville et entre 43 et 52 % à Caudebec. Les plus grandes variations de concentrations sont observées au niveau du site de Fatouville en septembre avec des concentrations qui oscillent entre 20 et 140 ng.L<sup>-1</sup> en quelques heures.



**Figure 64 : Dynamique de la contamination en pesticides au cours d'un cycle de marée.** Les graphiques a, b, c, d, e, f représentent les variations de concentrations au niveau d'un site au cours d'un même cycle de marée. Les échantillons ont été prélevés à basse mer (BM), jusant (Ju) et pleine mer (PM).

D'importantes variations de concentrations en pharmaceutiques et pesticides ont été constatées lors de ces campagnes. La dynamique de la contamination en estuaire de Seine est donc le résultat des apports (STEU, agriculture) mais aussi de l'hydrodynamisme de l'estuaire. Le débit fluvial et la marée dynamique ont donc un réel impact sur les niveaux de concentration observés à l'échelle d'une saison et même d'une journée. Ces fortes variations

de concentrations observées au cours des cycles de marée en estuaire aval, posent une réelle question quant à l'évaluation du risque chimique en zone estuarienne. Du fait de la variation des concentrations, la représentativité d'échantillon ponctuel peut être remise en question. L'utilisation d'échantillonneurs passifs qui permettent d'intégrer la contamination au cours du temps semble tout à fait pertinente pour évaluer la contamination dans ces zones de balancement des marées (Belles, 2012).

Afin d'obtenir une vision plus globale de la dynamique de la contamination au cours de la marée, différents paramètres ont été croisés. Cette analyse a été réalisée sur la campagne de septembre 2015 au niveau du site de Fatouville (site ayant subi les plus fortes variations). Les données de salinité, de carbone organique dissous, et des données qualitatives caractérisant la matière organique dissoute (MOD) ont été comparées aux concentrations de chaque composé recherché, à l'aide d'un test de corrélation de Pearson (Tableau 30).

**Tableau 30 : Matrice de corrélation de Pearson des données recueillies à Fatouville en septembre 2015.**

Variables	COD_(mg/L)	Salinité	HIX	BIX	carbamazépine	oxazépam	aténolol	sotalol	gabapentine	diclofénac	hydroxy-ibuprofène	atrazine	hydroxyatrazine	DEA	diuron	isoproturon	métolachlore	métolachlore ESA	propiconazole
COD_(mg/L)	1	-0,5	0,5	-0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,4	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salinité	-0,5	1	-0,6	0,9	-0,9	-0,9	-0,6	-0,6	-0,9	-0,7	-0,6	-0,8	-0,9	-0,7	-0,8	-0,9	-0,9	-0,8	-0,7
HIX	0,5	-0,6	1	-0,6	0,5	0,6	0,5	0,4	0,4	0,2	0,2	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4	0,2
BIX	-0,5	0,9	-0,6	1	-0,9	-0,9	-0,7	-0,6	-0,8	-0,6	-0,5	-0,8	-0,9	-0,6	-0,8	-0,8	-0,9	-0,8	-0,7
carbamazépine	0,5	-0,9	0,5	-0,9	1	0,9	0,8	0,8	1,0	0,7	0,7	0,8	0,8	0,7	0,8	0,9	0,9	0,8	0,7
oxazépam	0,5	-0,9	0,6	-0,9	0,9	1	0,8	0,8	0,9	0,6	0,4	0,7	0,8	0,6	0,7	0,8	0,9	0,8	0,7
aténolol	0,3	-0,6	0,5	-0,7	0,8	0,8	1	0,9	0,8	0,5	0,2	0,6	0,6	0,7	0,6	0,7	0,7	0,8	0,5
sotalol	0,3	-0,6	0,4	-0,6	0,8	0,8	0,9	1	0,8	0,6	0,3	0,6	0,6	0,7	0,6	0,7	0,6	0,7	0,5
gabapentine	0,5	-0,9	0,4	-0,8	1,0	0,9	0,8	0,8	1	0,7	0,6	0,8	0,8	0,7	0,8	0,9	0,8	0,8	0,7
diclofénac	0,3	-0,7	0,2	-0,6	0,7	0,6	0,5	0,6	0,7	1	0,8	0,7	0,6	0,6	0,8	0,7	0,6	0,6	0,6
hydroxy-ibuprofène	0,4	-0,6	0,2	-0,5	0,7	0,4	0,2	0,3	0,6	0,8	1	0,6	0,5	0,4	0,8	0,6	0,5	0,5	0,6
atrazine	0,4	-0,8	0,3	-0,8	0,8	0,7	0,6	0,6	0,8	0,7	0,6	1	0,9	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	0,8
hydroxyatrazine	0,6	-0,9	0,4	-0,9	0,8	0,8	0,6	0,6	0,8	0,6	0,5	0,9	1	0,8	0,9	1,0	1,0	0,9	0,8
DEA	0,5	-0,7	0,3	-0,6	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7	0,6	0,4	0,8	0,8	1	0,8	0,9	0,8	0,9	0,8
diuron	0,5	-0,8	0,4	-0,8	0,8	0,7	0,6	0,6	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,8	1	0,9	0,8	0,8	0,8
isoproturon	0,5	-0,9	0,4	-0,8	0,9	0,8	0,7	0,7	0,9	0,7	0,6	0,9	1,0	0,9	0,9	1	0,9	1,0	0,8
métolachlore	0,5	-0,9	0,5	-0,9	0,9	0,9	0,7	0,6	0,8	0,6	0,5	0,9	1,0	0,8	0,8	0,9	1	0,9	0,7
métolachlore ESA	0,5	-0,8	0,4	-0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8	0,6	0,5	0,9	0,9	0,9	0,8	1,0	0,9	1	0,8
propiconazole	0,5	-0,7	0,2	-0,7	0,7	0,7	0,5	0,5	0,7	0,6	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification  $\alpha=0,05$

Globalement les variations de concentrations observées présentent un lien avec la salinité et la teneur en carbone organique. En effet, pour l'ensemble des composés étudiés, il existe une corrélation négative (corrélation de Pearson,  $p<0,05$ ) entre salinité et concentrations en contaminants. Comme il a déjà été observé dans différents estuaires, ce



résultat suggère une dilution de l'eau de mer durant les cycles tidaux (Steen et al., 2000; Yang et al., 2011; Aminot, 2013; Lara-Martín et al., 2014; Zhao et al., 2015; Cruz, 2016). Le carbone organique dissous (COD) est connu pour jouer un rôle central dans les écosystèmes aquatiques en tant que ressource trophique mais également en tant que ligands (Hansen et al., 2016). Conformément à différentes études, les teneurs en COD tendent à être négativement corrélées à la salinité. De plus, les fortes variations en pharmaceutiques et pesticides observées sont associées à d'importantes variations du carbone organique dissous (COD). Concernant les composés pharmaceutiques, la même anti-corrélation entre concentration et COD a été observée dans des études antérieures réalisées dans l'estuaire Yangtze en Chine (Yan et al., 2013; Zhao et al., 2015).

Par ailleurs, les variations de concentrations en contaminants le long de l'estuaire sont également liées à la qualité de la matière organique dissoute (MOD) qui joue un rôle clé dans les processus biogéochimiques des contaminants organiques (Carlson et al., 2007). Le lien avec deux paramètres a été exploré : l'indice d'humification (HIX) et l'indice d'activité biologique (BIX). Alors que le HIX reflète l'aromaticité et la maturité de la MOD (Ohno, 2002), le BIX permet d'estimer la production autochtone de MOD (Huguet et al., 2009). Ces indices ont été calculés à partir de données de spectroscopie de fluorescence réalisées dans le cadre du projet MOSAIC (Huguet et al., 2017; Parot, 2017). Ainsi, les concentrations en composés ciblés diminuent linéairement avec le BIX, indicateur de production biologique de MOD. L'augmentation de la proportion de MOD autochtone comparativement à la MOD terrigène est donc corrélée à la diminution de la teneur en contaminants dans l'estuaire. Alors qu'une corrélation significative n'a pas pu être établie entre le HIX et les concentrations de tous les contaminants ciblés, le BIX est corrélé négativement avec l'ensemble des contaminants (Tableau 30). Ainsi, la diminution de la quantité de contaminants organiques est associée à une augmentation de la production autochtone de MOD.

## 2. Réactivité de contaminants apportés en Seine

### 2.1 Photodégradation d'un effluent de STEU

La photodégradation fait partie des processus majeurs participant à l'atténuation des micropolluants dans les eaux de surface. De nombreuses études se focalisent sur une famille de composés dans des expériences simplifiées réalisées sur des échantillons artificiellement enrichies. Ces approches permettent d'obtenir des données sur les cinétiques de photodégradation directes et indirectes des composés ciblés. Cependant, la composition des matrices environnementales sont autant de paramètres pouvant affecter ces mécanismes complexes. Ainsi, l'objectif de cette partie a été d'évaluer la stabilité de divers contaminants polaires et l'évolution des activités biologiques, au sein d'un échantillon naturel et complexe. Pour cela, un effluent de la STEU de Rouen a été irradié sous un rayonnement solaire artificiel. L'expérience a donné lieu à 4 prélèvements :  $T_0$ ,  $T_{200 \text{ min}}$ ,  $T_{400 \text{ min}}$  et  $T_{1440 \text{ min}}$  (24h).

Différents bioessais *in vitro* ont également été réalisés afin d'évaluer l'évolution des molécules actives. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 31. Aucune activité œstrogénique n'a pu être mise en évidence avant et après irradiation. Une activité AR/GR a été détectée dans l'effluent initial ( $T_{\text{initial}}$ ). L'irradiation de l'effluent durant 24h a eu pour effet de diminuer de façon significative cette activité, témoignant ainsi de la dégradation des molécules capables d'interagir avec les récepteurs aux androgènes (Tableau 31). Un constat similaire peut être fait, en ce qui concerne les molécules génotoxiques et progénotoxiques. L'évaluation de la génotoxicité à l'aide du SOS-Chromotest après une irradiation de 24h n'a mis en évidence aucun potentiel génotoxique et cela que ce soit avec ou sans activation métabolique (S9).

**Tableau 31 : Activités biologiques de l'effluent de la STEU de Rouen avant ( $t_{\text{initial}}$ ) et après 24h d'irradiation solaire ( $t_{24h \text{ irradié}}$ ).**

Mécanismes ciblées	Matériel biologique	Activation métabolique	$t_{\text{initial}}$	$t_{24h \text{ irradié}}$
Récepteur ER	lignée cellulaire MELN		-	-
Récepteur AR/GR	lignée cellulaire MDA-Kb2		+	-
Génotoxicité	E.Coli PQ37	sans S9	+	-
		avec S9	+	-

Concernant la caractérisation chimique, il est possible de réaliser une échelle de persistance en prenant en compte le pourcentage dégradé au bout de 24h d'irradiation solaire (Tableau 32). Sur l'ensemble des molécules quantifiées, 13 ont subi une diminution faibles ,des concentrations, inférieure à 20 %. Des cinétiques de phototransformation plutôt lentes ont déjà été mises en évidence pour les benzodiazépines (Calisto et al., 2011), la carbamazépine (Matamoros et al., 2009) et le diuron (Giacomazzi et Cochet, 2004).

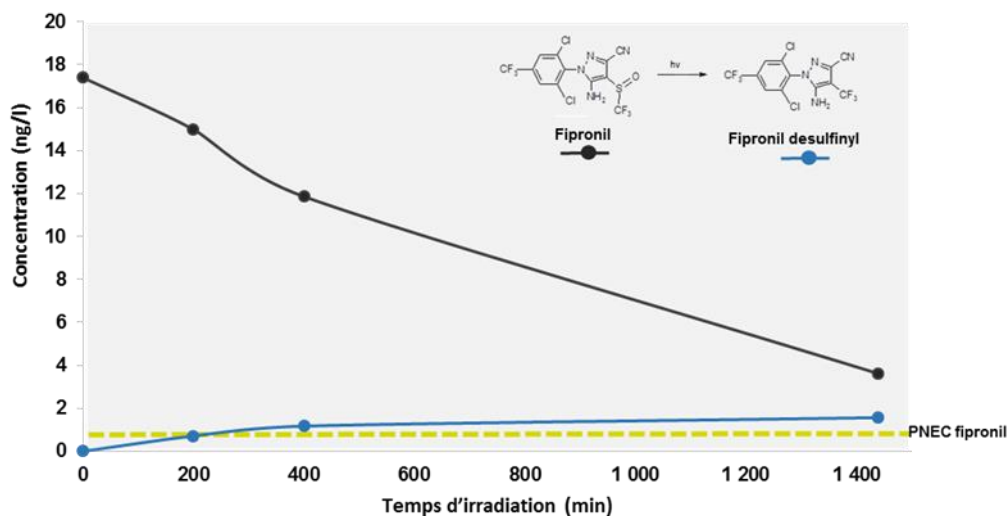
Sur l'ensemble des molécules détectées, 13 d'entres elles, dont une grande majorité de composés pharmaceutiques, ont subi une diminution des concentrations supérieures à 80 % . La photodégradation de certains antibiotiques comme la roxithromycine, l'érythromycine et la ciprofloxacine a déjà été étudiée dans une étude antérieure. Globalement les auteurs ont mis en évidence des cinétiques rapides de ces composés en eaux de surface (Batchu et al., 2014). La diminution rapide des concentrations communes à l'ensemble des fluoroquinolones étudiées a également déjà été mis en avant, et est fortement dépendante du pH et de la présence de MOD (Andreozzi, 2003; Sturini et al., 2012a).

Les résultats montrent que le pourcentage de dégradation varie de façon importante au sein même d'une même famille de composés. A titre d'exemple, au sein de la famille des bêta-bloquants, alors que l'aténolol et le bisoprolol sont relativement stables sur 24h, le sotalol, le timolol et le propranolol, ont subi une décroissance rapide. Il n'est donc pas possible de faire de généralité sur le comportement photochimique des micropolluants sur la base des familles thérapeutiques. Pour une meilleure compréhension du devenir environnemental des micropolluants organiques, des études complémentaires menées en laboratoire pourraient permettre de mieux comprendre la photodégradation des composés en milieu complexe.

**Tableau 32 : Persistance des molécules dans l'effluent de Rouen après 24h d'irradiation simulée. M : médicaments, P/B : pesticides/biocides.**

<b>Molécules</b>	<b>Classe</b>	<b>Concentration initiale (ng.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pourcentage dégradé au bout de 24 h</b>
fluoxétine	M	17	100
norfloxaine	M	72	100
ciprofloxacine	M	449	100
ranitidine	M	119	92
roxithromycine	M	48	92
azithromycine	M	101	91
triclosan	P/B	10	89
ofloxacine	M	174	88
apixaban	M	10	86
sildenafil	M	11	83
ritonavir	M	131	82
érythromycine	M	347	82
clarithromycine	M	181	82
fipronil	P/B	17	79
timolol	M	12	73
sotalol	M	1762	72
imidaclopride	P/B	120	67
propranolol	M	698	66
clindamycine	M	25	63
rivaroxaban	M	25	60
propiconazole	M	33	57
clopidogrel	M	25	55
acébutolol	M	114	41
isoproturon	P/B	48	39
paracétamol	M	1045	35
salbutamol	M	16	28
bisoprolol	M	281	23
gabapentine	M	1943	17
atrazine	P/B	9	16
métoprolol	M	179	11
dabigatran	M	427	8
névirapine	M	20	4
bézafigrate	M	57	2
carbamazépine	M	449	0
nordiazépan	M	28	0
aténolol	M	741	0
cétirizine	M	517	0
diuron	P/B	130	0
névirapine	M	18	0
oxazépan	M	2135	0

Bien qu'en partie bien éliminés certains contaminants peuvent s'avérer problématiques car ils occasionnent la formation de produits de transformation. Ainsi, la photodégradation du fipronil a permis de montrer que la diminution de sa concentration s'accompagne de la formation du fipronil desulfinyl (perte du radical sulfinyle) (Figure 65). En effet, le fipronil desulfinyl possède une concentration inférieure à la limite de quantification (LQ = 0,32 ng.L<sup>-1</sup>) au temps initial T0. Lors de l'irradiation solaire simulée, sa concentration augmente de 0,71 ng.L<sup>-1</sup> à 200 minutes jusqu'à 1,57 ng.L<sup>-1</sup> après 24h. Différentes équipes avaient déjà observé ce phénomène (Bobe et al., 1998; Raveton et al., 2006). La toxicité du fipronil désulfinyl (concentration létale 50 % (CL50) = 150 ± 21 µg.L<sup>-1</sup>) est plus faible à celle de la molécule mère (CL50= 64 ± 22 µg.L<sup>-1</sup>) (Schlenk et al., 2001). Des études ont néanmoins montré que le produit de dégradation semble plus stable face à la photodégradation (t1/2 = 120-134 h contre 10-125 h pour le fipronil) (Ngim et al., 2000).



**Figure 65 : Photodégradation du fipronil dans l'effluent de la STEU de Rouen**

La photodégradation est une des voies majeure d'atténuation dans l'environnement. Ces processus sont molécule-dépendants et nécessitent donc une évaluation au cas par cas. L'utilisation de bioessais *in vitro* a permis de mettre en évidence une élimination des molécules actives en dessous des limites de détection des bioessais.

## **2.2 Devenir des contaminants en conditions environnementales variables**

L'évaluation du risque environnemental dans le compartiment dissous est complexe à interpréter en raison des variabilités spatiales, temporelles et des paramètres physico-chimiques du milieu considéré. Ainsi l'absence de données sur la persistance des composés organiques dans ces zones dynamiques et très variables peut représenter un réel frein à l'évaluation du risque environnemental. Le bouchon vaseux, ou zone maximale de turbidité, est une zone estuarienne présentant un potentiel réactionnel particulier combinant accumulation de matières en suspension et populations bactériennes importantes. Différentes expériences en laboratoire ont été menées dans un réacteur simplifié à partir d'eaux estuariennes et d'effluents urbains.

Une première expérimentation menée durant les travaux de thèse de Yann Aminot (2014) a permis de caractériser la dégradation *in vitro* de 45 médicaments. Les résultats obtenus sont discutés dans la publication 3 (paragraphe 2.3, p 229) : « *Suspended solids moderate the degradation and sorption of waste water-derived pharmaceuticals in estuarine waters (accepted in Science of Total Environment)*. En résumé, cette étude a permis de mettre en évidence, que sur les 45 médicaments recherchés, seuls 8 à 14 ont un comportement conservatif. Par ailleurs, les dégradations observées ont été attribuées plutôt à des processus biotiques qui sont accélérés par des concentrations croissantes en MES. L'équilibre entre la phase dissoute et particulaire a également été étudié. L'affinité des médicaments pour les particules est diminuée lorsque la concentration en MES augmente. Même si une tendance à l'augmentation des proportions portées par les particules a été observée au cours des 28 jours d'incubation, l'adsorption reste pour les médicaments un processus d'atténuation négligeable.

Suite à ces travaux, cette approche a été étendue à une plus large gamme de composés tels que des pharmaceutiques et des pesticides mais également en associant des bioessais *in vitro*. Différentes études ont déjà montré que le pourcentage de pesticides et pharmaceutiques recherchés porté par les particules était inférieur à 10 % (Togola, 2006; Aminot, 2013; Cruz, 2016). Face à ce constat, les analyses réalisées se sont focalisés uniquement sur la phase dissoute. Deux expériences ont été réalisées au cours de ces travaux afin d'évaluer la persistance des composés organiques ciblés dans les eaux estuariennes de la Seine et de la Garonne. Ainsi, cette section est dédiée à la comparaison de ces deux expériences. L'étude de l'évolution des pesticides et des médicaments dans le bouchon vaseux de la Seine a été plus approfondie dans le cadre de ces travaux. L'ensemble

des raisonnements et les résultats obtenus sont décrits de façon détaillé dans l'article 4 (paragraphe 2.4, p 255) intitulé : « *Priorization of polar pesticides and pharmaceuticals with taking account into their persistence in dissolved phase: Case of the Seine estuary* ».

Dans les deux expériences (Seine et Garonne) différentes conditions ont été étudiées afin de mettre en évidence (1) l'impact de concentrations croissantes en MES avec les conditions LSS (faible concentration en MES), MSS (concentrations intermédiaires en MES) et HSS (fortes concentration en MES), (2) l'impact de la salinité avec la condition HSAL (salinité 5 ‰). La condition HgCl<sub>2</sub> représente un témoin abiotique (détails chapitre II, p.95).

Les principaux paramètres physico-chimiques sont récapitulés Tableau 33. Alors que le pH, conductivité et la température sont du même ordre de grandeur dans les deux expériences réalisées, il est à noter que les concentrations en matières en suspension (MES) dans les eaux estuariennes de la Garonne sont 2 à 3 fois supérieures à celles mesurées en Seine. Par ailleurs, au cours de ces expériences, une évolution non significative de ces différents paramètres a été mise en évidence. Les aquariums HSS sont caractérisés par une forte concentration en MES (0,8 pour la Seine et 2,6 g.L<sup>-1</sup> pour la Garonne) et HSAL par des salinités plus élevées (conductivité 8000-9000 µS.m<sup>-1</sup>).

**Tableau 33 : Récapitulatif des paramètres physico-chimiques majeurs lors des incubations Seine et Garonne.** LSS : témoin sans bouchon vaseux, MSS : bouchon vaseux, HSS : bouchon vaseux concentré, HSAL : impact salinité, HgCl<sub>2</sub> : témoin abiotique.

		Seine				
		LSS	MSS	HSS	HSAL	HgCl <sub>2</sub>
température	(°C)	20,5 ± 0,8	20,5 ± 0,8	20,6 ± 0,8	20,4 ± 0,8	x
pH	-	8,3 ± 0,6	8,4 ± 0,2	8,4 ± 0,2	8,4 ± 0,2	x
conductivité	(µS.m <sup>-1</sup> )	1388 ± 41	1440 ± 24	1419 ± 44	8329 ± 94	x
[MES]	(g.L <sup>-1</sup> )	0,08 ± 0,01	0,38 ± 0,12	0,8 ± 0,09	0,35 ± 0,13	0,40 ± 0,03

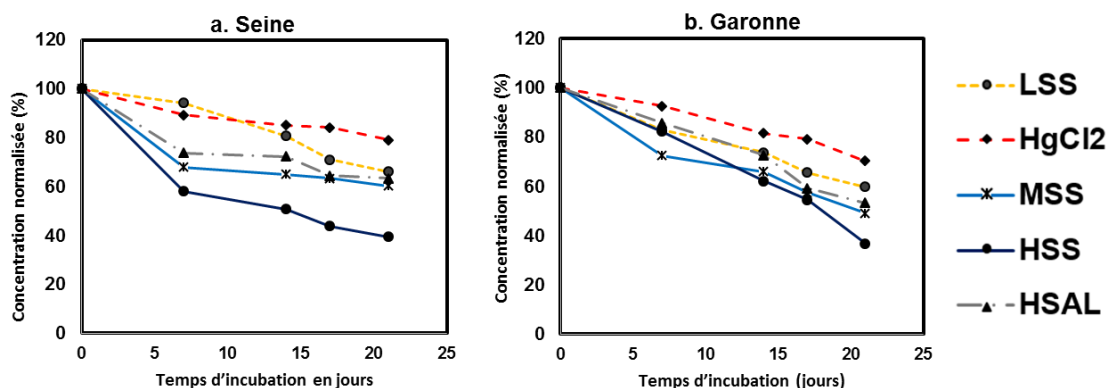
  

		Garonne				
		LSS	MSS	HSS	HSAL	HgCl <sub>2</sub>
température	(°C)	19,7 ± 0,9	19,8 ± 0,9	19,8 ± 0,9	19,7 ± 0,9	x
pH	-	8,5 ± 0,1	8,3 ± 0,1	8,3 ± 0,2	8,3 ± 0,1	x
conductivité	(µS.m <sup>-1</sup> )	496 ± 5	485	487 ± 4	9147 ± 89	x
[MES]	(g.L <sup>-1</sup> )	0,08 ± 0,01	1,19 ± 0,12	2,64 ± 0,21	0,98 ± 0,04	1,7 ± 0,05

## 2.2.1 Evolution globale

### a. Concentrations des contaminants

L'évolution globale des pesticides et des pharmaceutiques en phase dissoute dans l'ensemble des conditions étudiées en Seine est présentée Figure 66. Les concentrations totales ont été normalisées par celle de la carbamazépine pour atténuer les effets d'évaporation d'eau et sont exprimées en pourcentage par rapport à T0. Pour l'ensemble des conditions, il a été observé à une diminution des concentrations en contaminants allant de 30 à 63 %. Des différences ont été observées en fonction des conditions expérimentales. A concentration en MES équivalente, l'empoisonnement de l'aquarium avec du chlorure mercurique ( $\text{HgCl}_2$ , témoin abiotique) a pour effet de ralentir et diminuer la disparition des composés en phase dissoute (Figure 66 a).



**Figure 66 : Effet de la concentration en matières en suspension (LSS, MSS, HSS), de l'empoisonnement au chlorure mercurique ( $\text{HgCl}_2$ ) et de la salinité (HSAL) sur l'évolution des concentrations globales des pesticides et des composés pharmaceutiques dans les eaux estuariennes de la Seine (a) et de la Garonne. Les données représentent la concentration en composé normalisée par celle de la carbamazépine et exprimée en pourcentage du T0.**

En effet, une diminution des concentrations de 51 % a été observée dans la condition standard (MSS) contre seulement 30 % dans la condition empoisonnée au chlorure mercurique. La méthode de stérilisation par chlorure mercurique a déjà été appliquée avec succès dans différentes études (Fitzhugh et al., 2003). Ce résultat suggère l'implication d'une part biotique dans les phénomènes de dégradation de certains composés. Les matières en suspension sont connues pour jouer un rôle crucial dans les processus géochimiques et la réactivité des contaminants. Un effet de la concentration en matières en suspension sur le taux d'abattement a ainsi été mis en évidence (Figure 66 a). En effet, plus la charge particulaire augmente, plus la diminution des concentrations est importante au bout de 21 jours passant de 40 % à 63 % dans les conditions les plus turbides.

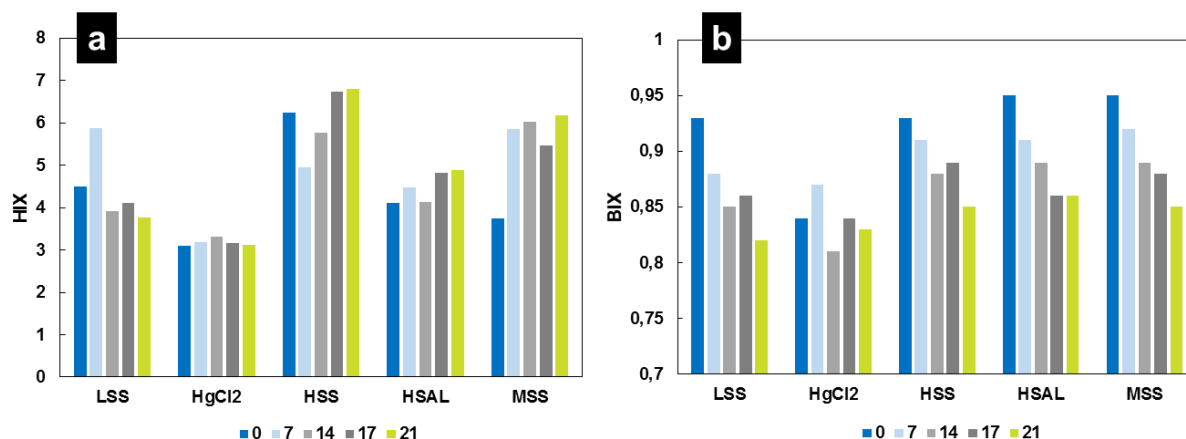


En revanche, l'effet de la salinité (HSAL) sur la diminution des concentrations totales n'a pas été observé (Figure 66a). Le niveau d'abattement le plus élevé a été mis en évidence dans l'aquarium présentant les fortes concentrations en matières en suspension, condition la plus proche du bouchon vaseux de la Seine. Par ailleurs, les mêmes constats ont été obtenus dans le cas d'un mélange de l'effluent avec les eaux estuariennes de la Garonne (Figure 66 b).

Dans le cadre de l'incubation en présence des eaux estuariennes de la Seine, une analyse plus poussée a été réalisée dans le but de caractériser l'évolution de la matière organique dissoute. Le lien avec deux paramètres ont été explorés : l'indice d'humification (HIX) et l'indice d'activité biologique (BIX). Pour rappel le HIX reflète l'aromaticité et la maturité de la MOD (Ohno, 2002), et le BIX permet d'estimer la production autochtone de MOD (Huguet et al., 2009). Ces indices ont été calculés à partir de données de spectroscopie de fluorescence réalisées par l'équipe d'Edith Parlanti (Huguet et al., 2017; Parot, 2017). Les résultats sont présentés Figure 67. Alors que les plus faibles valeurs de HIX (Figure 67 a) sont retrouvées dans l'aquarium abiotique ( $\text{HgCl}_2$ ), les valeurs les plus intenses ont été mises en évidence dans les aquariums contenant le plus de particules (MSS et HSS). Au cours des 21 jours d'incubation, une tendance à l'augmentation du HIX a été constatée dans l'ensemble des aquariums biotiques. Seule la condition stérile ( $\text{HgCl}_2$ ) possède un HIX stable tout le long de l'expérience. Cette augmentation du HIX traduit une augmentation du degré d'humification de la matière organique. Dans l'environnement, des hautes valeurs de HIX en zones estuariennes en comparaison de zones côtières ou de lac ont été déjà été associées à des processus de dégradation dans ces zones de transition (Singh et al., 2017).

Par ailleurs, ces résultats sont à mettre en lien avec l'indice d'activité biologique (BIX) qui est présenté Figure 67 b. Le BIX reflète le rapport entre matière organique fraîche sur matière organique de type humique (Huguet et al., 2009). Alors que le BIX reste relativement stable dans la condition abiotique, une diminution du rapport a été mise en évidence dans l'ensemble des conditions biotiques traduisant une augmentation de la production biologique. Une étude récente a évalué l'évolution des propriétés optiques de la matière organiques au sein de différentes matrices (lixiviats de sol, de plante et d'algues) incubées en laboratoire pour simuler des processus de biodégradation (Hansen et al., 2016). Ainsi dans cette étude, alors que le BIX présentait une stabilité dans l'ensemble des contrôles abiotiques, une diminution de cet indice a été observée dans l'ensemble des conditions biotiques. Par conséquent, la diminution observée a été attribuée à une biodégradation de la MOD au cours de l'incubation. Dans notre étude, la diminution du BIX observée dans les conditions non

stérilisées semble donc être le résultat d'une biodégradation de la MOD au cours du temps se traduisant par des changements de propriétés optiques.



**Figure 67 : (a) Evolution de l'indice humification (HIX) et (b) de l'indice d'activité biologique (BIX) mesurés à 0, 7, 14, 17 et 21 jours d'incubation dans les eaux estuariennes de la Seine**

#### b. Evolution des activités biologiques

Alors que de nombreuses études évaluent l'évolution des activités biologiques lors des processus de traitement des eaux, peu de travaux s'intéressent à l'évolution des activités biologiques lors des processus d'atténuation naturel (Gou et al., 2014; Jia et al., 2016). Ainsi, en parallèle des analyses chimiques ciblées, différents bioessais *in vitro* ont été réalisés dans le but de caractériser l'évolution des activités biologiques lors des phénomènes de dégradation. Les résultats sont présentés Tableau 34.

Aucune activité œstrogénique n'a été détectée dans l'ensemble des conditions et temps étudiés dans l'incubation en présence des eaux estuariennes de la Seine. À l'inverse, la présence de molécules capables d'interagir avec les récepteurs aux AR/GR a été mise en évidence. Au bout de 21 jours d'incubation, aucune activité n'a été observée, témoignant de la dégradation des molécules actives ciblées à des concentrations inférieures aux limites de détection des tests (Tableau 34 a).

Au vu des résultats, il semble que les molécules organiques à l'origine du potentiel génotoxique direct se dégradent facilement quelles que soient les conditions testées. En effet, aucun potentiel génotoxique direct n'a été détecté après 21 jours de dégradation potentielle. Au contraire, les molécules organiques responsables du potentiel progénotoxique semblent être plus stables, dans la mesure où, chaque potentiel progénotoxique mesuré à T0 a également été mesuré après 21 jours. Cette expérimentation montre que les molécules organiques génotoxiques directes sont moins stables et donc plus facilement dégradables

que les molécules organiques progénotoxiques. Les mêmes constats peuvent être faits dans les eaux estuariennes de la Garonne (Tableau 34 b) : au bout de 21 jours d'incubation, aucune activité biologique (ER, AR/GR) n'a été mise en évidence.

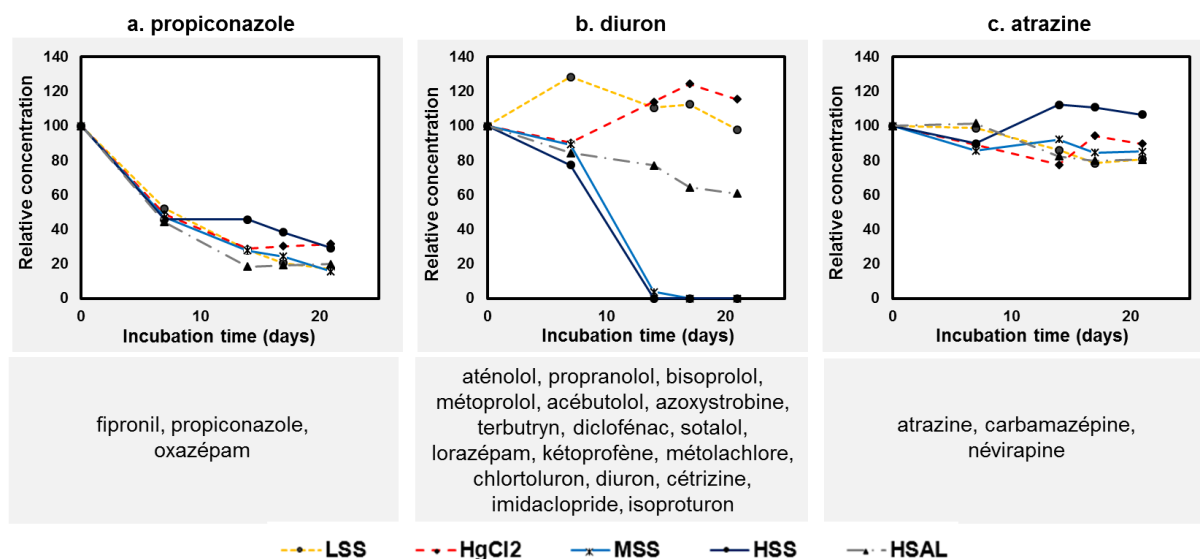
**Tableau 34 : Récapitulatif des activités biologiques observées lors des expériences d'incubation en présence du bouchon vaseux de la Seine (a) et de la Garonne (b).** + : échantillon actif ; - : échantillon inactif.

		Activité ER	Activité AR	Génotoxicité		
				-S9	+ S9	
<b>A</b>	Sans bouchon vaseux	$t_{initial}$	-	+	+	+
		$t_{21}$	-	-	-	+
Contrôle stérile	$t_{initial}$	-	+	+	-	
	$t_{21}$	-	-	-	-	
Bouchon vaseux	$t_{initial}$	-	+	+	-	
	$t_{21}$	-	-	-	-	
Bouchon vaseux concentré	$t_{initial}$	-	+	+	+	
	$t_{21}$	-	-	-	+	
Bouchon vaseux, salinité +	$t_{initial}$	-	+	+	+	
	$t_{21}$	-	-	-	+	
<b>B</b>	Sans bouchon vaseux	$t_{initial}$	+	+	+	+
		$t_{21}$	-	-	-	-
Contrôle stérile	$t_{initial}$	+	+	-	-	
	$t_{21}$	-	-	-	-	
Bouchon vaseux	$t_{initial}$	+	+	+	-	
	$t_{21}$	-	-	-	-	
Bouchon vaseux concentré	$t_{initial}$	+	+	+	+	
	$t_{21}$	-	-	-	-	
Bouchon vaseux, salinité +	$t_{initial}$	+	+	+	+	
	$t_{21}$	-	-	-	+	

## 2.2.2 Comportement type des contaminants et temps de demi-vie

Ces résultats globaux ne sont pas représentatifs de la diversité de réactivité des contaminants dans ces expériences d'incubation. Les courbes de dégradation des différents composés recherchés et détectés ont été construites pour chaque aquarium à partir de la méthodologie appliquée par Aminot et al., 2018. Ainsi, les concentrations de chaque molécule ont été normalisées par celle de la carbamazépine pour atténuer les effets d'évaporation d'eau et sont exprimées en pourcentage du T0. Il est possible à partir de ces courbes de distinguer 3 types de comportement qui sont présentés Figure 68.

- **Type propiconazole (A):** les concentrations dans l'ensemble des conditions décroissent selon la même cinétique. De ce fait, la diminution des concentrations peut être attribuée à des processus plutôt abiotiques.
- **Type Diuron (B):** L'évolution des concentrations est dépendante de la présence de matières en suspension et de la salinité. Ce type représente la majorité des composés recherchés. En raison de la relative stabilité des concentrations dans le témoin abiotique (HgCl<sub>2</sub>), la diminution des concentrations semble être le résultat d'une dégradation biotique.
- **Type atrazine (C):** les concentrations en composés restent stables dans les 5 conditions sur l'ensemble de la durée d'incubation (>80% du T<sub>0</sub>).



**Figure 68 : Comportements types des molécules détectées dans les incubations *in vitro* en Seine.** Les données représentent la concentration en composé normalisé par celle de la carbamazépine et exprimées en pourcentage du T<sub>0</sub>

Afin de déterminer les temps de demi-vie des molécules, la méthodologie utilisée par Aminot et al., 2016 a été appliquée. Les cinétiques de réaction n'étant pas linéaire, un modèle exponentiel simple a été appliqué pour calculer les temps de demi-vie. Cette méthodologie se base sur les travaux réalisés par différentes équipes. (Benotti et Brownawell, 2009; Yamamoto et al., 2009) :

- Si au bout de 21 jours, la concentration normalisée est inférieure à 50 %, la cinétique est évaluée par une fonction affine ( $y=50\%$ ) à partir des 2 points encadrant les 50 % de dégradation.

- Si au bout de 21 jours, la concentration normalisée est supérieure à 50 %, une tendance est extrapolée à partir des points 17 et 21 jours par une fonction affine. Le  $t_{1/2}$  étant l'intersection avec la droite  $y=50\%$

Les temps de demi-vie de chaque molécule quantifiée sont résumés Tableau 35. Les temps de demi-vie sont du même ordre de grandeur entre les deux eaux estuariennes et les mêmes comportements ont été retrouvés pour l'ensemble des molécules étudiées. Concernant les composés pharmaceutiques, des temps de demi-vie, équivalents aux données déjà recensées dans la publication 3 (Aminot et al., 2018), ont été calculés. Dans les incubations Seine et Garonne, 15 et 17 molécules sont considérées comme stables ( $C_{\text{finale}} > 80\%$  de  $C_{\text{initiale}}$  sur la durée de l'expérience). Pour 9 molécules, la stabilité des concentrations n'est observée que dans le témoin abiotique pour les deux incubations (métoprolol, sotalol, kétoprofène, naproxène, métolachlore, diclofénac, ibuprofène, chlortoluron, terbutryne) (Tableau 35). La persistance du kétoprofène, naproxène, diclofénac et de l'ibuprofène en conditions stériles avaient déjà été mis en évidence dans une étude simulant une interface eau/sédiment (Koumaki et al., 2017). Ce constat tend à mettre en évidence des phénomènes de dégradation biotique pour ces composés.

L'accélération des cinétiques pourraient être attribuée à une augmentation des concentrations en MES qui sont connues pour porter une importante charge bactérienne (Turner et Millward, 2002). Dans le cas où les cinétiques de diminution des concentrations sont similaires dans les conditions biotiques et abiotiques (oxazépam, propiconazole, terbutryne, fipronil), la biodégradation ne semble pas être le processus d'atténuation majoritaire. Alors que 7 molécules (cétirizine, lorazépam, propranolol, sotalol, diuron, imidaclopride) ont un comportement commun dans les eaux de la Seine et de la Garonne, 6 molécules (chlortoluron, aténolol, bisoprolol, métoprolol, naproxène, diclofénac) ont un comportement qui diffère selon les bouchons vaseux. Par ailleurs, à concentrations de MES équivalentes (comparaison des conditions MSS et HSAL), des augmentations de temps de demi-vie ont pu être observées avec l'augmentation de la salinité pour certaines molécules comme le diuron, le métolachlore, la cétirizine.

Ces constats tendent à mettre en évidence des différences de dégradation entre des gammes de salinités (0,5 ‰ et 5 ‰) et entre les deux bouchons vaseux de la Seine et de la Garonne. En effet, il est maintenant reconnu que l'activité bactérienne diminue dans le gradient de salinité estuarien (Kaartokallio et al., 2016). La structure microbienne des deux

bouchons vaseux pourraient influencer de façon différentielle la dégradation des composés (Goñi-Urriza et al., 2007). La qualité de la matière organique dissoute joue un rôle prédominant dans les populations bactériennes et de leurs activités. En effet, une étude menée au niveau de trois estuaires européens a démontré que la qualité différentielle de la matière organique dissoute avait un réel impact sur les biomasses bactériennes (Kaartokallio et al., 2016). Ainsi, les résultats relatifs à la qualité de la matière organique dissoute dans l'expérience menée avec les eaux de la Garonne devraient à terme apporter de nouveaux éléments de discussion. Par ailleurs, une étude plus approfondie sur la composition initiale et sur l'évolution de la diversité microbienne serait nécessaire afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans ces différences de cinétiques.

**Tableau 35 : Temps de demi-vie (jours) et indice de persistance calculés à partir des incubations Seine et Garonne.**

	Seine					INDICE	Garonne					INDICE
	LSS	HgCl2	MSS	HSAL	HSS		LSS	HgCl2	MSS	HSAL	HSS	
aténolol	11.8	14.9	7.4	12.0	10.8	24	14.2	16.2	3.9	4.9	3.5	17
bisoprolol	17.5	23.2	7.7	16.4	10.3	36	11.0	17.0	4.8	6.3	4.5	17
carbamazépine	stable	stable	stable	stable	stable	100	stable	stable	stable	stable	stable	100
cetirizine	stable	stable	45.7	stable	22.2	88	stable	stable	stable	stable	19.2	88
lorazépam	stable	stable	16.7	20.3	16.0	68	stable	stable	20.9	stable	16.2	70
metoprolol	7.6	stable	9.3	14.6	11.7	36	21.2	stable	4.9	9.6	4.3	33
névirapine	stable	-	stable	stable	stable	100	stable	-	stable	stable	stable	100
oxazépam	22.9	23.7	23.6	23.1	23.7	60	stable	stable	stable	stable	21.6	92
propranolol	15.2	25.0	5.1	14.3	7.7	32	15.9	20.7	5.1	6.6	3.9	17
sotalol	33.5	stable	19.5	21.8	14.2	64	21.9	stable	15.0	13.4	6.7	44
kétoprofène	20.6	stable	24.4	17.5	22.5	60	21.8	stable	17.6	24.4	19.0	60
naproxène	20.5	stable	18.0	13.0	18.1	48	54.5	stable	8.0	4.9	3.9	40
diclofénac	21.9	stable	13.8	22.8	16.7	52	stable	stable	stable	37.3	16.1	84
ibuprofène	stable	stable	20.4	stable	16.4	76	24.6	stable	26.7	28.3	31.1	76
atrazine	stable	stable	stable	stable	stable	100	stable	stable	stable	stable	stable	100
azoxystrobine	16.4	22.1	13.6	19.4	5.5	32	15.6	24.6	16.8	17.9	15.4	44
chlorotoluron	24.1	stable	9.9	3.5	10.77	40.2	17.6	stable	30.4	stable	17.8	56
diuron	stable	stable	9.5	32.2	10.21	64	stable	stable	29.9	stable	22.2	72
imidaclopride	stable	stable	stable	25.84	22.58	84	stable	stable	21.1	stable	22.6	84
isoproturon	stable	stable	16.1	19.82	21.96	68	stable	stable	37.8	stable	22.2	88
métolachlore	23.4	stable	25.0	46.0	20.8	68	20.2	stable	25.9	27.1	25.7	64
propiconazole	7.3	6.81	6.5	6.3	6.6	4.8	10.7	20.4	11.1	6.9	6.6	16
terbutryne	6.6	10.20	5.9	5.1	4.3	8.6	14.5	stable	11.7	16.0	11.6	44
fipronil	18.3	15.78	15.4	15.3	17.0	40	12.7	12.0	6.1	5.3	7.6	9

### 2.2.3 Implication dans l'évaluation de molécules préoccupantes

Actuellement, la persistance des composés dans le cadre d'évaluation du risque environnemental est encore peu prise en compte. Certaines études se basent, tout de même, sur des données de stabilité extrapolées à partir de données générées *in silico* (Götz et al., 2010). Ces modèles ont été créés et sont tout à fait adaptés aux milieux faiblement dynamiques, mais restent peu intégratifs de la variabilité en zone estuarienne. L'utilisation des temps de demi-vie et des indices de persistance à partir de données simulées en laboratoire pourraient permettre une évaluation plus intégrée du risque environnemental dans ces zones de transition (Amiard and Amiard-triquet, 2015).

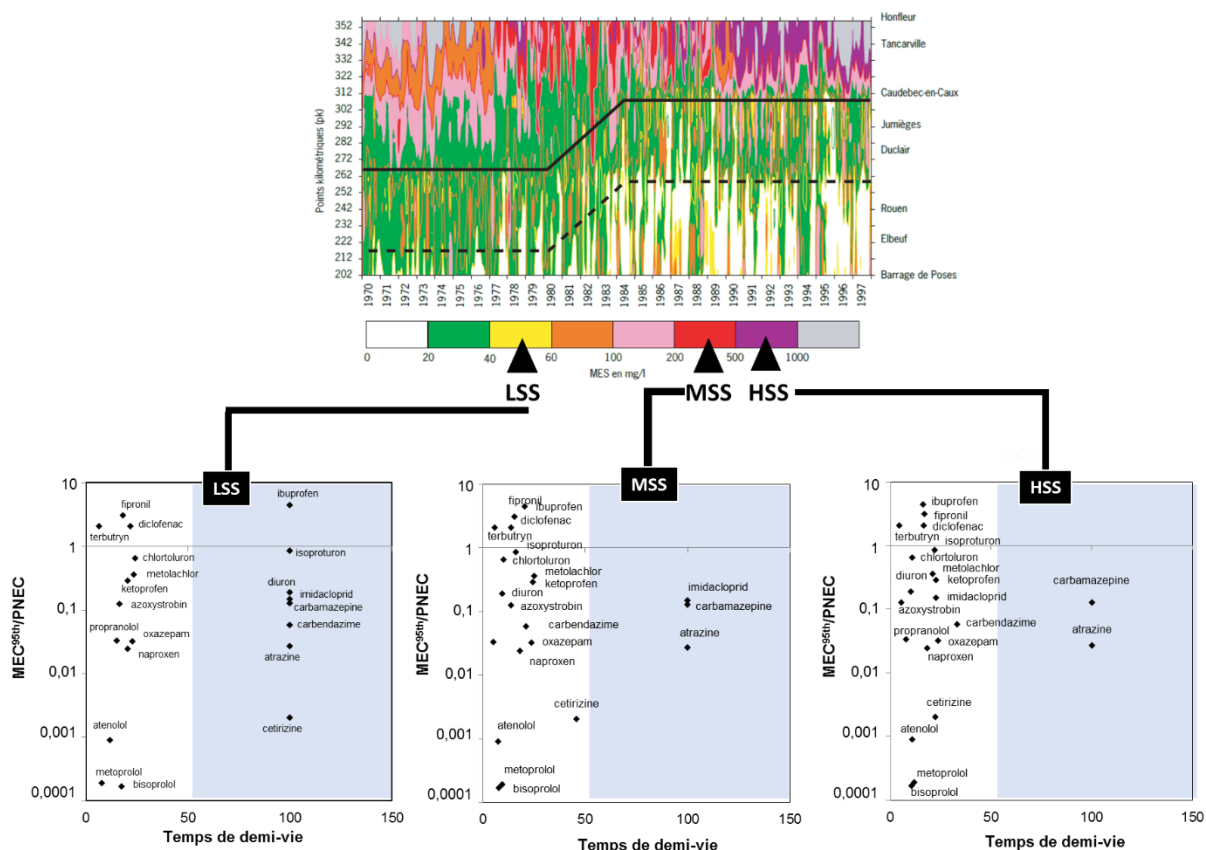
Il est possible d'établir une échelle de stabilité empirique en se basant sur l'ensemble des temps de demi-vie calculés. Pour cela une note est attribuée pour chaque molécule et pour chaque condition suivant le barème suivant, si le temps de demi-vie est :

- < 7 jours..... 1
- > 7 jours et < 14 jours..... 20
- > 14 jours et < 21 jours..... 40
- > 21 jours et < 28 jours..... 60
- >28 jours..... 80
- Concentrations stables..... 100

La note moyenne obtenue pour l'ensemble des conditions environnementales permet d'extrapoler un indice de persistance en phase dissoute.

Le diagramme présenté, Figure 69, combine ces informations en s'inspirant des travaux réalisés lors d'une l'étude prospective de 2012 sur les contaminants émergents (Botta et Dulio, 2012). Le niveau de concentration au niveau du barrage de Poses (apport majoritaire) de mai 2014 à mars 2015 a été représenté par le 95<sup>ème</sup> percentile des concentrations maximales (MEC95<sup>th</sup>), relevées sur les 6 campagnes conduites dans le cadre de ce travail, dans le but de simuler une situation au pire des cas, en vertu du principe de précaution. Pour attribuer un niveau de risque, les MEC95<sup>th</sup> ont été comparées aux PNEC trouvées dans la littérature pour chaque molécule (Besse et Garric, 2008; Botta et Dulio, 2012; Minguéz et al., 2016b). La Figure 69 illustre ainsi les différences dans l'évaluation du risque en prenant en compte la persistance en fonction des concentrations en particules.

Ainsi le long du gradient estuarien, des différences de persistance sont attendues. La variabilité spatiale des concentrations en MES va influencer sur le devenir des molécules dans l'estuaire. En zone turbide (Tancarville, Honfleur) une diminution de la persistance des contaminants de type diuron peut être extrapolée.



**Figure 69 : Evaluation du risque dans différentes conditions de turbidité. Le graphique supérieur provient de Dupont et al., (2009). LSS : MES en faibles concentrations, MSS : MES en concentrations intermédiaires, HSS : MES en hautes concentrations.**

La combinaison des données d'occurrence, de toxicité et de persistance moyenne permet ainsi d'identifier différentes catégories de molécules classées selon le niveau de préoccupation associé (Figure 70) :

- **Des molécules encore non préoccupantes** (catégorie de niveau 3, 5 molécules) : comprenant des composés présents à des niveaux de contamination inférieurs à leur PNEC ( $MEC_{95}/PNEC$  inférieur à 0,1) associés à une persistance en phase dissoute faible (indice de persistance inférieur à 50). Cette catégorie rassemble



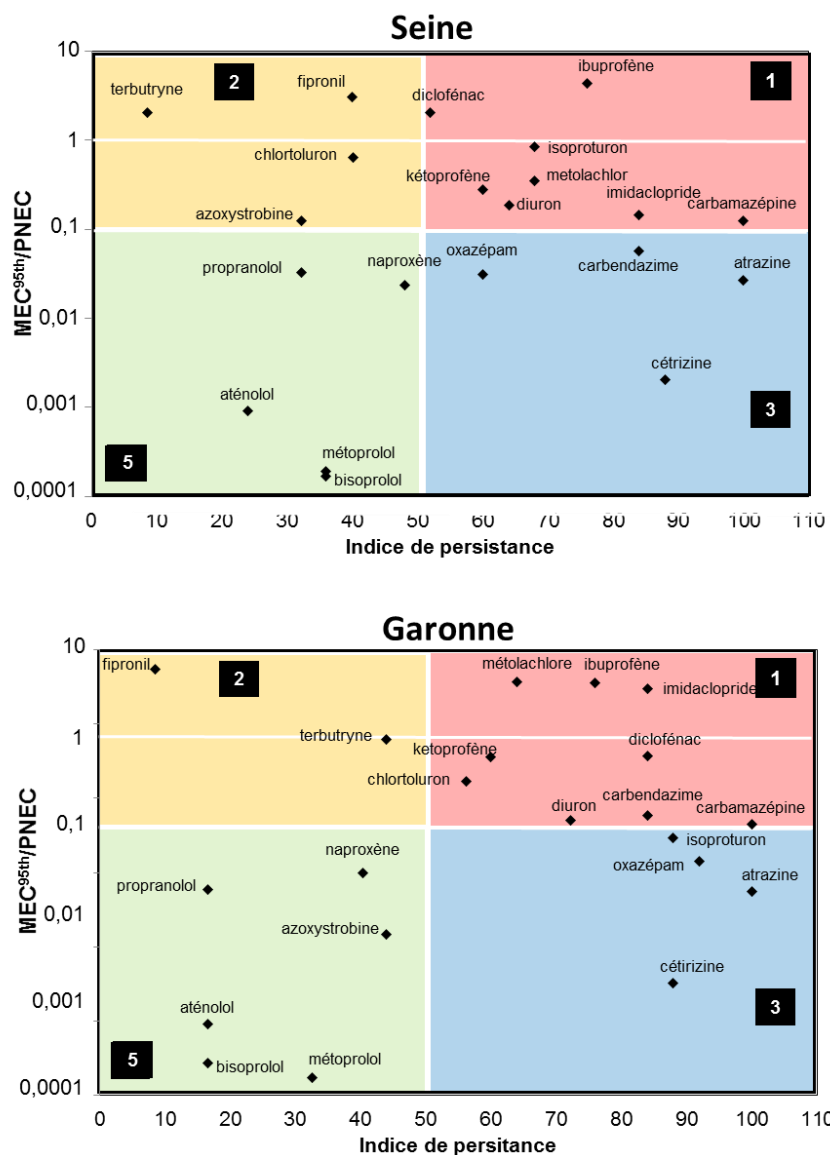
l'ensemble des bêtabloquants et certains pesticides comme le glyphosate et l'azoxystrobine.

- **Des molécules déjà préoccupantes en estuaire de Seine** (catégorie de niveau 1 et 2 : 12 molécules) : au regard de leur persistance et leurs concentrations supérieures à leur PNEC. Cette catégorie regroupe des pesticides retrouvés en Seine à des concentrations importantes comme l'isoproturon et le diuron mais aussi certains composés pharmaceutiques comme le diclofénac et l'ibuprofène. Parmi ces molécules, certaines sont d'ores et déjà prises en compte dans le cadre de la DCE (diuron et isoproturon) et d'autres ont été ajoutées à liste de surveillance parallèle « Watch list » comme c'est le cas du diclofénac.

- **Des molécules à surveiller en raison** (catégories de niveau 3 : 4 molécules) :

- De leur persistance en phase dissoute (indice supérieur à 50) : ces molécules pourraient devenir préoccupantes si leur niveau de concentration tend à augmenter (exemple : carbendazime, oxazépam, métolachlore)
- Du nombre de dépassement de la PNEC. Cette catégorie regroupe deux molécules : le fipronil et la terbutryne.

La même approche a été conduite avec les données de concentrations au niveau de Bordeaux (Garonne) issues de précédents travaux de thèse (Aminot, 2013; Cruz, 2015) et les données de persistance issues de l'expérience avec les eaux de la Garonne. Comme présenté Figure 70, 11 molécules sont classées dans les catégories 1 et 2. Au vue de leur présence et de leur persistance respective, ces 11 molécules pourraient être pertinentes à surveiller en estuaire de la Gironde. Malgré la similitude des molécules préoccupantes mises en évidence en Seine et en Garonne, des différences importantes sont à noter pour l'isoproturon, le chlortoluron. Ce constat met en avant des usages différents entre les deux bassins versants mais aussi des différences de persistance. En effet, l'isoproturon est classé en catégorie 1 dans la Seine alors qu'il est classé en catégorie 3 dans l'estuaire de la Gironde. Alors que le bassin versant de la Seine regroupe une grande densité de cultures céréalières, le territoire de la Garonne possède la plus basse densité d'exploitation céréalières au niveau national (Chambre d'agriculture aquitaine, 2017). Dans le cas du chlorotoluron les différences de catégories s'expliquent par sa persistance dans les eaux estuariennes de la Garonne. La démarche appliquée dans ces travaux, semble être un outil intéressant afin d'identifier les molécules au sein de zones estuariennes.



**Figure 70: Mise en évidence des composés problématiques en Seine et en Garonne en fonction du risque (MEC95/PNEC) associé mais également de leur niveau de persistance en Seine et en Gironde.** Les encadrés noirs correspondent au numéro de la catégorie. Les MEC95 proviennent des données récotées à Poses lors cette étude et des travaux en Garonne de Aminot (2013) et Cruz (2015).

Deux produits de transformation du diuron ont été également suivis durant les 21 jours d'incubation. L'évolution des concentrations dans les différents aquariums issus de l'expérience des eaux de Seine est présentée Figure 71.

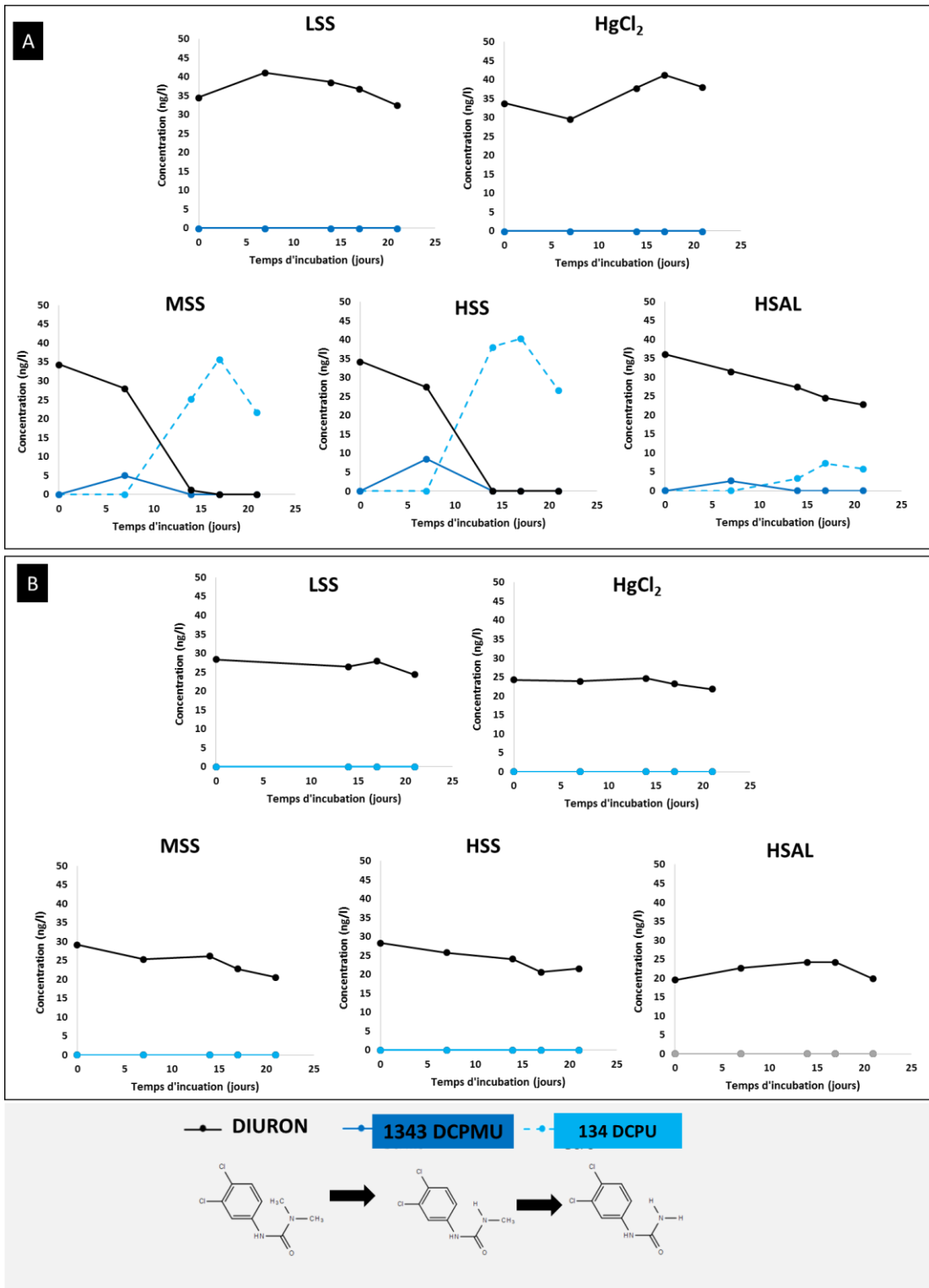


Figure 71 : Evolution des concentrations en diuron et en ses produits de transformation dans les différentes conditions expérimentales de l'expérience dans les eaux de Seine (A) et dans les eaux de la Garonne (B).

Dans les aquariums avec de faibles concentrations en matières en suspension, et stérilisé, les concentrations en diuron sont stables durant les 21 jours d'incubation et aucun produit de transformation n'est détecté. En revanche, dans l'ensemble des aquariums avec de fortes concentrations en matières en suspension, une diminution marquée des concentrations a été observée. A la plus faible salinité (0,5‰), une disparition totale du diuron est observée en moins de 15 jours. Dans l'aquarium artificiellement salé (5‰), une diminution plus lente des concentrations de diuron a été mise en évidence. La diminution des concentrations de diuron est accompagnée par la détection et l'augmentation de 2 produits de transformation issus de la dégradation microbienne : le dichlorophénylméthyl-urée (1343 DCPMU) et en particulier le dichlorophényl-urée 134 DCPU issus de la déméthylation de la fonction amine. Bien qu'une diminution des concentrations en diuron a bien été observée pour les conditions MSS et HSS, aucun produit de transformation n'a pu être mis en évidence, dans le cas de l'incubation avec les eaux estuarienne de la Garonne traduisant une absence de biodégradation Figure 71.

Le potentiel toxique de ces produits de transformation a déjà été évalué individuellement et en mélange par Escher et al., (2009). Bien que les produits de transformation soient individuellement moins toxiques que le diuron, leur non prise en compte dans l'évaluation du risque environnemental engendre une sous-estimation de ce dernier de 70 %. Cet aspect soulève le besoin de prendre en considération la formation de produits de transformation dans l'évaluation du risque.

L'étude de l'estuaire de Seine a mise en évidence une importante dynamique de la contamination au niveau de l'estuaire aval qui est soumis à des cycles tidaux. Ces phénomènes sont particulièrement marqués en période estivale en raison des faibles débits fluviaux et de l'augmentation des temps de résidence. Pour ces raisons, l'utilisation d'échantillons ponctuels basses fréquences pour caractériser la contamination en zone estuarienne peut réellement être remise en question. L'utilisation d'échantillonneurs passifs semble tout à fait adaptée à la caractérisation de la phase dissoute dans ces milieux dynamiques. Grâce à l'utilisation de POCIS, des décroissances saisonnières de certains contaminants ont été mises en évidence au niveau du site de La Bouille. Le temps de résidence et l'ensoleillement semblent être impliqués dans les décroissances observées. En effet, l'augmentation du temps de résidence des masses d'eau en période de bas débit favorise la dégradation des composés étudiés.

La conduite d'expérimentation en laboratoire pour mimer les processus de photodégradation ou la dégradation dans des eaux estuariennes (bouchon vaseux) a permise de mettre en évidence des comportements variés des contaminants étudiés et la formation de certains produits de transformation.

- ✓ Le comportement photochimique des molécules est diversifié et nécessite des études plus approfondies afin d'évaluer l'impact des éléments dissous (MOD, ions..) sur les cinétiques de dégradation.
- ✓ La persistance en phase dissoute des composés en système estuarien est régie par les concentrations de matières en suspension, la salinité, et la présence de micro-organismes. En ce sens, la zone de turbidité maximale possède un rôle épurateur en accélérant les cinétiques de dégradation. L'échelle simplifiée de persistance peut s'avérer être un outil intéressant afin de mettre en évidence des molécules problématiques dans les systèmes dynamiques estuariens. Par ailleurs, l'évaluation du risque environnemental doit prendre en compte la persistance des composés parents de manière adaptée au milieu d'étude mais également la formation de produits de transformation.
- ✓ La complexité des mécanismes mise en jeu dans ces zones de transition nécessite d'acquérir des nouvelles données concernant la composition des eaux estuariennes (MOD, population bactérienne).
- ✓ L'utilisation de bioessais *in vitro* pour étudier l'évolution de ces mélanges de manière globale, sans liste préétablie, représente une approche prometteuse. Dans cette optique, l'utilisation de méthodes non sélectives comme la spectrométrie de masse haute résolution pourraient représenter une approche complémentaire afin de qualifier l'évolution de ces mélanges complexes

Publications

**2.3 Suspended solids moderate the degradation and sorption of waste water-derived pharmaceuticals in estuarine waters (accepted in Science of Total Environment).**

Yann AMINOT<sup>1</sup>, Laura FUSTER<sup>1</sup>, Patrick PARDON<sup>1</sup>, Karyn LE MENACH<sup>1</sup>, Hélène BUDZINSKI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Bordeaux, EPOC, UMR 5805, LPTC, 351 Cours de la Libération, F-33400 Talence, France.

Tel: +33 540006998. Fax: +33 540002267. Email: h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr

\* corresponding author.

---

**Abstract**

This study focuses on the fate of pharmaceuticals discharged into an estuarine environment, particularly into the Turbidity Maximum Zone (TMZ). Batch experiments were set up to investigate the factors regulating the degradation of 53 selected pharmaceuticals. Treated effluents from Bordeaux city (France) were mixed with water from the estuarine Garonne River during 4 weeks under 6 characterized conditions in order to assess the influence of suspended particulates, sterilization, untreated wastewater input and dilution on the degradation kinetics. Of the 53 pharmaceuticals monitored, 43 were quantified at the initial time. Only 7 exhibited a persistent behavior (e.g. carbamazepine, meprobamate) while biotic degradation was shown to be the main attenuation process for 38 molecules (e.g. abacavir, ibuprofen highly degradable). Degradation was significantly enhanced by increasing concentrations of suspended solids. A persistence index based on the half-lives of the compounds has been calculated for each of the 43 pharmaceuticals to provide a practical estimate of their relative stability. The stability of pharmaceuticals in estuarine environments is likely to be highly variable and attenuated primarily by changes in suspended solid concentration.



# Suspended solids moderate the degradation and sorption of waste water-derived pharmaceuticals in estuarine waters



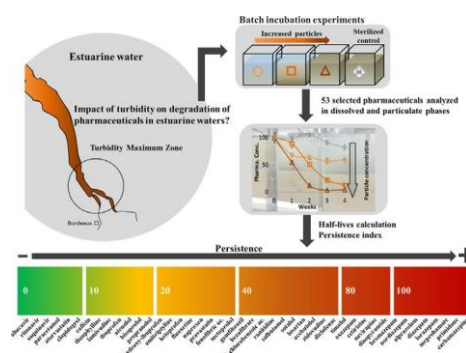
Yann Aminot, Laura Fuster, Patrick Pardon, Karyn Le Menach, Hélène Budzinski

Université de Bordeaux, EPOC, UMR 5805, LPTC, 351 Cours de la Libération, F-33400 Talence, France

## HIGHLIGHTS

- Wastewater derived pharmaceuticals were incubated in estuarine waters.
- Dissolved and particulate concentrations were monitored over 4 weeks.
- Only 7/43 pharmaceuticals were persistent.
- Degradation rates were enhanced by increasing particle concentrations.
- Limited degradation in sterilized conditions

## GRAPHICAL ABSTRACT



## article info

### Article history:

Received 18 June 2017

Received in revised form 15 August 2017

Accepted 15 August 2017 Available online xxx

xxxx

Editor: D. Barcelo

### Keywords:

Pharmaceuticals

Degradation

Persistence

Wastewater

Estuarine waters

Adsorption

Corresponding author.

E-mail address: [h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr) (H. Budzinski).

## 1. Introduction

Since pharmaceuticals were identified as contaminants of emerging concern (Daughton and Ternes, 1999), their occurrence in urban and natural aquatic systems has been increasingly studied. Multi-residue

Corresponding author.

E-mail address: [h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr) (H. Budzinski).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.162>

0048-9697/  2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Abstract

This study focuses on the fate of pharmaceuticals discharged into an estuarine environment, particularly into the Turbidity Maximum Zone (TMZ). Batch experiments were set up to investigate the factors regulating the degradation of 53 selected pharmaceuticals. Treated effluents from Bordeaux city (France) were mixed with water from the estuarine Garonne River during 4 weeks under 6 characterized conditions in order to assess the influence of suspended particulates, sterilization, untreated wastewater input and dilution on the degradation kinetics. Of the 53 pharmaceuticals monitored, 43 were quantified at the initial time. Only 7 exhibited a persistent behavior (e.g. carbamazepine, meprobamate) while biotic degradation was shown to be the main attenuation process for 38 molecules (e.g. abacavir, ibuprofen highly degradable). Degradation was significantly enhanced by increasing concentrations of suspended solids. A persistence index based on the half-lives of the compounds has been calculated for each of the 43 pharmaceuticals to provide a practical estimate of their relative stability. The stability of pharmaceuticals in estuarine environments is likely to be highly variable and attenuated primarily by changes in suspended solid concentration.

  2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

screenings have confirmed their presence in wastewater (López-Serna et al., 2010; Rosal et al., 2010), surface water (Baker and Kasprzyk-Hordern, 2013; Silva et al., 2011), seawater (Benotti and Brownawell, 2007; Vidal-Dorsch et al., 2012) and groundwater (Hass et al., 2012; Vulliet and Cren-Oliv e, 2011).

After discharge into a water body, concentrations of pharmaceuticals in the dissolved phase are governed by physical processes such as dilution, diffusion and transport as well as by chemical (abiotic) or

biochemical (biotic) processes. While the physical processes are likely to be similar between all contaminants, physico-chemical and biochemical processes will differ according to molecular structures (Fatta-Kassinos et al., 2011). In environmental waters, physico-chemical processes relate mainly to photodegradation and sorption. Photodegradation is well documented, with many studies for each carbamazepine, diclofenac, sulfamethoxazole and propranolol (Challis et al., 2014; Trawinski and Skibinski, 2017). Concerning sorption to suspended solids (SS) and sediments, pharmaceuticals have received less attention owing to their perceived hydrophilic nature. However, historical records of pharmaceutical contamination have been recently detected in an urban impacted estuary (Lara-Martín et al., 2015) and some authors have reported significant partitioning to sediment of compounds such as psychotropics and  $\beta$ -blockers (Aminot et al., 2015; Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011; Burke et al., 2013).

To date, most of the studies on pharmaceutical biodegradation focus on their fate through wastewater treatment and during biological secondary treatment (Lahti and Oikari, 2011; Pomiès et al., 2013). However, despite their continuous input to surface waters through treated urban effluents and/or combined sewers overflows (Verlicchi et al., 2012), little is known of the parameters governing the fate of pharmaceuticals after discharge. Biodegradation can be investigated through in-stream studies (Aymerich et al., 2016; Kunkel and Radke, 2011; Writer et al., 2013) and laboratory experiments (Baena-Nogueras et al., 2017; Benotti and Brownawell, 2009; Brad-ley et al., 2007; Grenni et al., 2013; Yamamoto et al., 2009). Even if laboratory experiments do not strictly represent natural aquatic systems (Kunkel and Radke, 2011) they can provide important information concerning the factors governing in-stream attenuation. Previous studies (Bradley et al., 2007; Radke and Maier, 2014) have evaluated the ability of river sediments to biodegrade pharmaceuticals. Other incubation experiments (Benotti and Brownawell, 2009) have revealed important differences in the biodegradation rates of studied compounds e.g. a paracetamol half-life of b1 day compared to a half-life of carbamazepine which is N100 days. The authors also observed that in coastal waters kinetics of degradation were faster under eutrophic conditions.

In this context, and as numerous cities like Bordeaux in France, are located along estuaries subject to tidal cycles, there is a real need to investigate the fate of pharmaceuticals in such environments (Zhao et al., 2015). Previous research evidenced a removal of some compounds within the Garonne estuary, with an increase of the attenuation rates in low flow summer periods (Aminot et al., 2016). Water dynamics in tidal estuaries are complex and a zone of high turbidity, known as the Turbidity Maximum Zone (TMZ), is generally observed at the freshwater/seawater interface. In this area, the number of freely suspended bacteria and their growth rate are small compared to those living on the particles (Plummer et al., 1987; Servais and Garnier, 2006), so the particles of the TMZ are expected to play a key role on the biochemical processes governing the water quality, in particular the organic contaminant concentration (Abril et al., 1999; Lanoux et al., 2013).

Up to now, the transport and reactivity of emerging contaminants in estuarine environments are poorly understood, yet it closely relates to their effects in such coastal ecosystems. In particular, it re-mains unclear if the estuarine TMZ acts as a passive vector of contaminants from land to sea or as an active incubator, and, if so, whether sorption or biodegradation is the dominant transformation process. This study, therefore, aims to fill in an important gap in our knowledge by identifying in which way selected pharmaceuticals and estuarine particles characteristic of the TMZ interact. Laboratory batch experiments simulating mixing conditions of the discharge of wastewater into a turbid estuary were performed to assess the influence of suspended solid concentration, type of effluent and dilution on a selection of 53 pharmaceuticals present in waste water from the city of Bordeaux.

## 2. Experimental methods

### 2.1. Estuarine river water and waste water characteristics

River water (approx. 100 L) was collected in 20 L HDPE (High Density PolyEthylene) flasks from the estuarine Garonne River adjacent to the city of Bègles (coordinates 44°47'58.31"N; 0°31'37.99"W). This hydrosystem is a macrotidal estuary characterized by a tidal cycle de-pendent TMZ (Lanoux et al., 2013). Water was sampled at mid-ebb to ensure the highest SS concentration. Three 20 L flasks were subject to magnetic stirring to prevent particle settlement while two others were left unagitated for three days at room temperature in the dark. This treatment provided samples from the same water body under three different suspended solid conditions: unagitated flask supernatants, stirred waters and unagitated flask concentrates from the settled particles at respectively low ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$ ), intermediate ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) and high ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) SS concentration. Water salinity was representative of TMZ particularity (0.5‰) (Lanoux et al., 2013).

A few hours before the start of the experiment, large volume waste-water grab samples (approx. 80 L effluent and 20 L influent) were collected in 20 L HDPE flasks from one of the two major waste water treatment plants (WWTP) of the Bordeaux urban area in October 2012 (Clos de Hilde WWTP). This WWTP served 264,600 inhabitants (estimate of Lyonnaise des Eaux, manager). The WWTP is equipped with biofilters as a secondary treatment.

### 2.2. Chemicals and selection of 53 pharmaceuticals

Fifty-three commonly used pharmaceuticals were chosen using multistep selection based upon sales statistics, occurrence and fate in aquatic environment. Selected pharmaceuticals belong to various therapeutic classes and physicochemical properties and were quantified in the studied wastewater effluent in preliminary studies. Details on pharmaceuticals and chemicals used are given elsewhere and in Table 1 (Aminot et al., 2015). Mercury (II) chloride (99%) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

### 2.3. Incubation experiment set-up

Incubation experiments were adapted from previous works on the characterization of organic matter degradation in TMZ (Lanoux, 2013). Cubic 30 L glass aquariums were filled with river water and waste-water under the 6 following conditions (Fig. 1): low SS (LSS) 12.5 L effluent, 12.5 L river water supernatant; intermediate SS (MSS) 12.5 L effluent, 12.5 L stirred river water; high SS (HSS) 12.5 L effluent, 12.5 L river water concentrate; untreated wastewater (Unt) 12.5 L influent, 12.5 L stirred river water; sterilized condition (HgCl<sub>2</sub>) 12.5 L effluent, 12.5 L stirred river water, mercury (II) chloride at  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ; higher dilution (10xD) 2.5 L effluent, 22.5 L stirred river water. Continuous mixing was performed by homemade glass rotors mounted on overhead stirrers while air was bubbled in through immersed frits at an approximate  $1 \text{ L min}^{-1}$  rate. The 6 experimental de-vices remained in an air-conditioned room (room temperature varied between 18 and 22.5 °C) in the dark.

The ambient pharmaceutical concentrations in wastewater effluent samples mixed with estuarine water were sufficient that additional spiking was not required (no introduction of carrying solvent). The dilution rates were chosen as a compromise of environmental relevant levels and to ensure the detection of the analytes on their whole degradation kinetics. Tenfold wastewater dilution (10xD) is comparable to an effluent discharge into a small river. To compensate for this higher dilution, 7 selected compounds (abacavir, carbamazepine, fenofibric acid, ibuprofen, naproxen, paracetamol, sotalol) were spiked into this aquarium to achieve a target concentration of  $500 \text{ ng L}^{-1}$  (Fig. 1). Poisoning with mercury (II) chloride has already been used efficiently for soil sterilization prior to PAH analysis (Wang et al., 2011),



Table 1

Selected physicochemical properties of the studied pharmaceuticals, CAS number, associated internal standard. The partitioning coefficient log Kow, log D pH 2 and log D pH 8 were calculated using Chemaxon log D predictor tool (<https://disco.chemaxon.com/apps/demos/logd>).

Analyte	Therapeutic classes	CAS n°	Molecular weight (g/mol)	log Kow	log D pH 2	log D pH 8	pKa <sup>a</sup>	Associated internal standard	Ionisation mode
Abacavir	Antiretroviral	136470-78-5	286.33	0.39	-1.58	0.38	15.41/5.77	Abacavir d4	ESI pos
Indinavir	Antiretroviral	150378-17-9	613.79	2.81	-1.56	2.79	13.19/7.37	Indinavir d6	ESI pos
Lamivudine	Antiretroviral	134678-17-4	229.26	-1.1	-1.1	-1.1	14.29	Lamivudine 15 N2-13C	ESI pos
Nelfinavir	Antiretroviral	159989-64-7	567.78	4.72	1.46	4.52	9.32/8.18	Nevirapine d3	ESI pos
Nevirapine	Antiretroviral	129618-40-2	266.30	2.49	0.11	2.49	10.37/5.06	Nevirapine d3	ESI pos
Ritonavir	Antiretroviral	155213-67-5	720.94	5.22	4.49	5.22	13.68/2.84	Nevirapine d3	ESI pos
Saquinavir	Antiretroviral	127779-20-8	670.84	2.58	-0.36	2.56	5.11/8.31	Nevirapine d3	ESI pos
Zidovudine	Antiretroviral	30516-87-1	267.24	-0.3	-0.41	-0.42	9.96	Zidovudine d3	ESI neg
Bromazepam	Psycholeptic	1812-30-2	316.15	2.54	1.85	2.54	12.24/2.68	Bromazepam d4	ESI pos
Nordiazepam	Psycholeptic	1088-11-5	270.71	1.32	2.31	3.21	–	Nordiazepam d5	ESI pos
Alprazolam	Psycholeptic	28981-97-7	308.77	2.37	-0.79	3.02	18.3/5.08	Diazepam d5	ESI pos
Diazepam	Psycholeptic	439-14-5	284.74	3.08	2.11	3.08	2.92	Diazepam d5	ESI pos
Oxazepam	Psycholeptic	35295-88-6	286.71	2.92	2.92	2.92	10.61/-1.5	Oxazepam d5	ESI pos
Lorazepam	Psycholeptic	846-49-1	321.16	3.53	3.53	3.53	10.61/-2.2	Diazepam d5	ESI pos
Clonazepam	Psycholeptic	106955-87-7	315.71	3.15	2.92	3.15	11.89/1.86	Diazepam d5	ESI pos
Meprobamate	Psycholeptic	57-53-4	218.25	0.93	0.93	0.93	15.17	Meprobamate d3	ESI pos
Ketoprofen	Analgesic	172964-50-0	254.28	3.61	3.61	0.18	3.88/-7.5	Ketoprofen d3	ESI neg
Naproxen	Analgesic	23981-80-8	230.26	2.99	2.98	-0.36	4.19/-4.8	Naproxen d3	ESI neg
Diclofenac	Analgesic	15307-86-5	296.15	4.26	4.25	0.85	4/-2.1	Diclofenac d4	ESI neg
Ibuprofen	Analgesic	58560-75-1	206.28	3.84	3.84	0.85	4.85	Ibuprofen d3	ESI neg
2-hydroxy-ibuprofen	Analgesic	51146-55-5	222.28	2.37	2.37	-0.77	–	OH ibuprofen d6	ESI neg
Paracetamol	Analgesic	2248282	151.16	0.91	0.91	0.89	9.46/	Paracetamol d4	ESI pos
Gemfibrozil	Lipopenics	25812-30-0	250.33	4.39	4.39	1.14	4.42/-4.8	Gemfibrozil d6	ESI neg
Bezafibrate	Lipopenics	41859-67-0	361.82	3.99	3.98	0.55	3.83/-0.84	Bezafibrate d6	ESI pos
4-chlorobenzoic acid	Lipopenics	74-11-3	156.57	2.23	2.23	-1.15	–	Diclofenac d4	ESI neg
Fenofibric acid	Lipopenics	42017-89-0	318.75	4.36	4.33	0.85	-4.9	Fenofibric acid d6	ESI neg
Clofibrac acid	Lipopenics	882-09-7	214.65	2.9	2.88	-0.6	0	Clofibrac acid d4	ESI neg
Pravastatin	Lipopenics	81093-37-0	424.53	1.65	1.64	-1.69	4.21/	Pravastatin d3	ESI neg
Atorvastatin	Lipopenics	134523-00-5	558.64	5.39	5.39	2.09	4.33/-2.7	Atorvastatin d5	ESI neg
Atenolol	β-blocker	60966-51-0	266.34	0.43	-2.82	-1.24	14.8/9.67	Atenolol d7	ESI pos
Bisoprolol	β-blocker	66722-44-9	325.443	2.2	-1.05	0.53	14.09/9.67	Propranolol d7	ESI pos
Metoprolol	β-blocker	37350-58-6	267.36	1.76	-1.48	0.09	14.09/9.67	Propranolol d7	ESI pos
Propranolol	β-blocker	13013-17-7	259.34	2.58	-0.66	0.92	14.09/9.67	Propranolol d7	ESI pos
Sotalol	β-blocker	27948-47-6	272.36	-0.4	-3.19	-1.56	10.07/9.43	Sotalol d7	ESI pos
Timolol	β-blocker	131628-37-0	316.42	1.34	-1.91	-0.42	14.08/9.76	Propranolol d7	ESI pos
Acebutolol	β-blocker	37517-30-9	336.43	1.53	-1.71	-0.03	13.91/9.57	Propranolol d7	ESI pos
Imipramine	Antidepressant	50-49-7	280.41	4.28	0.77	3.06	9.2	Amitriptyline d6	ESI pos
Doxepin	Antidepressant	1668-19-5	279.38	3.84	0.34	2.08	9.76	Amitriptyline d6	ESI pos
Amitriptyline	Antidepressant	50-48-6	277.40	4.81	1.31	3.05	9.76	Amitriptyline d6	ESI pos
Fluoxetine	Antidepressant	57226-07-0	309.33	4.17	0.93	2.38	9.8	Fluoxetine d5	ESI pos
Primidone	Anticonvulsant	125-33-7	218.25	1.12	1.12	1.12	11.5/	Primidone d5	ESI pos
Carbamazepine	Anticonvulsant	298-46-4	236.27	2.77	2.77	2.77	15.96	Carbamazepine d10	ESI pos
Cetirizine	Antihistaminic	83881-51-0	388.89	0.86	-0.24	0.4	3.6/7.79	Cetirizine d8	ESI pos
Ranitidine	Antihistaminic	66357-35-5	314.40	0.98	-3.6	0.78	8.08	Diazepam d5	ESI pos
Clenbuterol	β2 agonist	37148-27-9	277.19	2.33	-1	0.71	14.06/9.63	Diazepam d5	ESI pos
Caffeine	Stimulant	71701-02-5	194.19	-0.55	-0.55	-0.55	–	Caffeine D9	ESI pos
Theophylline	Bronchodilatator	58-55-9	180.16	-0.77	-0.77	-1.11	7.82	Caffeine d9	ESI pos
Sildenafil	PDE-5-inhibitor	139755-83-2	474.58	1.35	-1.51	0.92	7.27/5.97	Sildenafil d3	ESI pos
Losartan	Antihypertensive	114798-26-4	422.91	5.08	2.95	2.81	7.4/4.12	Diazepam d5	ESI pos
Salbutamol	Bronchodilatator	18559-94-9	239.31	0.34	-2.36	-0.77	10.12/9.4	Diazepam d5	ESI pos
Clopidogrel	Antiplatelet agent	113665-84-2	321.82	4.03	1.05	4.03	5.14	Diazepam d5	ESI pos
Terbutaline	Bronchodilatator	46719-29-3	225.28	0.44	-1.89	-0.19	8.86/9.76	Diazepam d5	ESI pos
Disopyramide	Antiarrhythmics	3737-09-5	339.47	3.47	-0.73	1.08	16.19/10.42	Diazepam d5	ESI pos

<sup>a</sup> pKa values were summarized by Shalaeva et al., 2007; Takayanagi et al., 2015; Barbic et al., 2007; Escher et al., 2010; Verlicchi et al., 2012.

pharmaceuticals analysis (Yu et al., 2006) and nutrient analysis (Fitzhugh et al., 2003; Wolf et al., 1989) as well as for nutrient analysis of marine waters (Kattner, 1999). Regarding waste waters, it was observed that complete inhibition of microbiological growth was achieved when preserved with 40 mg L<sup>-1</sup> of mercuric chloride, provided that total organic carbon (TOC) was below 20 mg L<sup>-1</sup> (Krawczyk, 1975). With average levels of TOC in the effluent of 21.5 mg L<sup>-1</sup> (Lanoux, 2013) and of 5.7 mg L<sup>-1</sup> (Abril et al., 2002) in the estuarine waters, the chosen HgCl<sub>2</sub> level of 100 mg L<sup>-1</sup> is adequate.

#### 2.4. Sampling and analysis

Sampling was performed 10 min after water mixing (T0) and after 7, 14, 21 and 28 days in parallel with conductivity, pH, dissolved O<sub>2</sub> (percentage) and water temperature measurements (note that the

sterilized condition was not monitored to prevent probe damage and cross-contamination). The first sampling time was set at 7 days as preliminary experiments have shown no strong concentration decrease for the majority of the 53 targeted pharmaceuticals before 7 days. Water samples were filtered through glass microfiber filters, GF/F (0.7 μm) (Whatman, supplied by Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France), 4 filters were kept for particle analysis and samples were stored at -20 °C.

Water samples were extracted in triplicate by Solid Phase Extraction (SPE) and filters of suspended solids by focused microwave assisted extraction (MAE). Analysis was performed by LC-MS/MS. Protocol details and performance can be found in a previous work (Aminot et al., 2015). Briefly, accurate quantification was ensured by the use of 32 labeled internal standards (given in Table 1), spiked in the samples prior to extraction. One processed spiked sample and one procedural blank sample were included in each batch of 12 samples (18 control

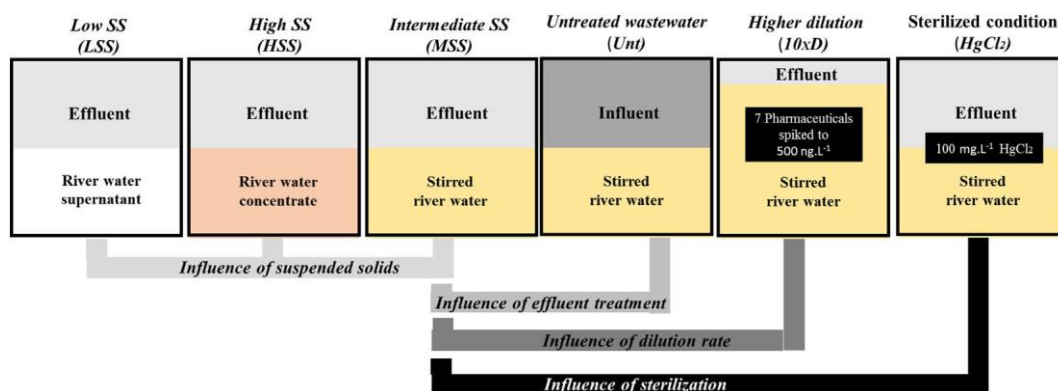


Fig. 1. Experimental setup.

points for waters and 6 for particles). The LC-MS/MS injections were conducted in one batch, with instrumental calibrants injected every 20 injections and instrumental blanks in between triplicates. Procedural and instrumental blanks revealed no contamination during sample preparation and analysis. By using numerous internal standards compensating for potential preparation losses and matrix effect, the procedural recoveries were in an acceptable range of 80–120% for 47 (SPE) and 45 (MAE) of the studied compounds (the compounds with lower recoveries were 4-chlorobenzoic acid, ranitidine, losartan, salbutamol, terbutaline for SPE and MAE, plus indinavir for SPE, and lamivudine, caffeine and disopyramide for MAE). Limits of detection did not exceed  $1 \text{ ng L}^{-1}$  for 40 compounds ( $6 \text{ ng L}^{-1}$  for the 13 remaining).

### 2.5. Physico-chemical parameters

The evolution of conductivity, salinity, pH and dissolved oxygen during the 4-week incubation is presented in Fig. S1. Initial conductivity was around  $1200 \mu\text{S cm}^{-1}$  in conditions LSS, MSS, HSS and Unt (50:50 dilution rate) and reached  $1300 \mu\text{S cm}^{-1}$  in condition 10xD due to the higher brackish water content. In the 5 monitored conditions, conductivity showed a progressive 5 to 10% increase every week. This increase was attributed to a slight evaporation of the water in the air-conditioned laboratory. This was also reflected with persistent contaminants like carbamazepine, as detailed further in 3.2. pH values ranged between 7.8 and 8.8 with similar tendencies among the experimental conditions: an initial 2-week decrease followed by a 2-week increase, probably in association with the assumed evaporation. Rapid ammonia oxidation can be accountable for the initial pH decrease. Except after water mixing (T0), dissolved oxygen was close to 100%, indicating that the air-bubbling was adequate to maintain aerobic conditions. SS initial concentrations and relative changes during the experiment are available in Table S1, S2 and Fig. S2. Tested SS concentrations varied between conditions by a factor of 50 from  $0.08$  to  $4 \text{ g L}^{-1}$  which are environmentally relevant levels in estuarine waters. After an initial decrease related to the observable sedimentation, this parameter followed the global increase trend attributed to evaporation.

### 2.6. Data analysis

#### 2.6.1. Normalization of pharmaceutical concentrations

The slight evaporation over the 4 weeks of incubation caused a concentration increase. Considering carbamazepine's high stability (Benotti and Brownawell, 2009; Chenxi et al., 2008; Kunkel and Radke, 2012) and its good analytical robustness (Aminot et al., 2015), other analytes were normalized to carbamazepine concentration in each treatment and sampling time (with carbamazepine concentration set constant at 100%). The concentrations of carbamazepine with no adjustment are given in Fig. S3.

#### 2.6.2. Half-lives and persistence indices

Half-lives were extrapolated from the experimental data (Table 2) by linear regression (detailed in supporting information "half-life calculation"). The application of a finer model would have required additional sampling points in the vicinity of the lag phase and more complex mathematical tools (Chong, 2009), outside the scope of this study. Analytes showing a concentration higher than 80% of the initial concentration after 4 weeks were considered as stable. Concerning compounds undetected after 1 week, calculation gives a 3.5 days half-life but the actual half-life can be somewhat shorter.

In order to give a practical relative comparison of the compound degradabilities (including abiotic), a persistence index based on the compound half-lives was calculated. It consists of grading each pharmaceutical in each treatment where it was quantified. Marks depend on half-life values: b7 days = 0; from 7 to 14 days = 20; from 14 to 21 days = 40; from 21 to 28 days = 60; N28 days = 80; not calculable because of stable concentrations = 100. The average mark gives the persistence index (Table 2).

## 3. Results and discussion

Concentrations are given as total, i.e. the sum of SS- and dissolved-phase concentrations (measured separately). Of the 53 monitored analytes, 43 were quantified after initial water mixing (T0) in at least one treatment and 26 in the 6 treatments (Table S3).

### 3.1. Behavior of the pharmaceuticals

#### 3.1.1. Impact of sterilization

To evaluate if mercury (II) chloride poisoning affected the analytes, initial concentrations in the sterilized condition were compared to the average concentrations in conditions LSS, MSS and HSS which are similar in terms of effluent type and dilution. Agreement between these conditions, plotted in Fig. S4, indicates that out of the 40 molecules quantified above their limit of quantification (equal to 3.3 times the limit of detection) in conditions LSS, MSS and HSS, 26 were considered unaffected by HgCl<sub>2</sub>, while 8 were partially affected ( $\text{CHgCl}_2$  b  $0.8 \cdot \text{CLSS, MSS, HSS}$  for lamivudine, ritonavir, alprazolam, 4-chlorobenzoic acid, primidone, theophylline, losartan, disopyramide) and 6 were highly affected ( $\text{CHgCl}_2$  b  $0.2 \cdot \text{CLSS, MSS, HSS}$  for abacavir, bromazepam, atorvastatin, ranitidine, salbutamol). Appropriate responses for the internal standards (abacavir d4, bromazepam d4, atorvastatin d5, primidone d5) preclude any analytical artefacts. These losses were rapid for some compounds (e.g. abacavir) with the analytes not being detected a few minutes after water mixing at T0. This sterilization method has previously been applied without significantly altering the organic matter of soils (Fitzhugh et al., 2003; Wolf et al., 1989). However, a 2–36% loss of PAH has already been observed following mud sterilization

Table 2

Calculated half-lives (conditions sorted by increasing SS) and persistence indices. Average values  $\pm$  uncertainties ( $n = 3$ ). Calculations are given in supplementary information. NC: not calculable as undetected.

Analyte	Half-lives (day)						Persistence index
	LSS	MSS	Unt	10xD	HSS	HgCl <sub>2</sub>	
Abacavir	3.6 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 0.5	NC	0
Ritonavir	3.8 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 1	3.9 $\pm$ 0.4	3.7 $\pm$ 0.5	3.7 $\pm$ 1.1	5.7 $\pm$ 0.9	0
Saquinavir	NC	NC	4.1 $\pm$ 0.5	NC	3.5 $\pm$ 0.2	5 $\pm$ 0.8	0
Paracetamol	NC	NC	3.5 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.6	NC	NC	0
Atorvastatin	NC	3.5 $\pm$ 2.5	3.6 $\pm$ 3	NC	NC	NC	0
Clopidogrel	4.5 $\pm$ 1.2	5.5 $\pm$ 1.3	4.1 $\pm$ 0.4	4 $\pm$ 1	4.9 $\pm$ 1.2	4.5 $\pm$ 1.2	0
Caffeine	4.5 $\pm$ 0.7	3.8 $\pm$ 1.5	3.5 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.9	5 $\pm$ 0.7	39 $\pm$ 22	13
Theophylline	5.6 $\pm$ 1.1	5.2 $\pm$ 3.8	3.6 $\pm$ 0.1	4 $\pm$ 0.6	3.6 $\pm$ 2	31 $\pm$ 24	13
Lamivudine	3.5 $\pm$ 0.1	4.8 $\pm$ 0.5	5.2 $\pm$ 0.7	3.5 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 0.5	Stable	17
Ibuprofen	6.5 $\pm$ 1	4.3 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 0.3	3.6 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.5	Stable	17
Atenolol	5.6 $\pm$ 1	7.2 $\pm$ 1.3	5 $\pm$ 0.7	3.8 $\pm$ 0.8	3.7 $\pm$ 0.6	41 $\pm$ 37	17
Bisoprolol	13 $\pm$ 3	6.7 $\pm$ 1.2	4.7 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 1.3	4.9 $\pm$ 0.6	47 $\pm$ 57	17
Propranolol	6.9 $\pm$ 1.2	7.6 $\pm$ 1.6	5.2 $\pm$ 0.5	6.2 $\pm$ 1.3	4.9 $\pm$ 0.6	56 $\pm$ 139	17
Hydroxy-ibuprofen	9.5 $\pm$ 0.3	6.2 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 0.2	5.1 $\pm$ 1.4	4.9 $\pm$ 0.4	Stable	20
Amitriptyline	4 $\pm$ 0.9	6.3 $\pm$ 2.1	Steady at 55%	NC	10.4 $\pm$ 2.6	3.9 $\pm$ 0.6	20
Ketoprofen	8.1 $\pm$ 0.4	6.1 $\pm$ 0.9	9.4 $\pm$ 1.4	6.8 $\pm$ 2.6	6.1 $\pm$ 0.5	Stable	23
Fluoxetine	3.6 $\pm$ 0.4	6.3 $\pm$ 1	8.1 $\pm$ 4.8	NC	Stable	5.7 $\pm$ 1	24
Naproxen	16 $\pm$ 1	7.9 $\pm$ 0.7	5.4 $\pm$ 0.7	3.6 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 0.2	Stable	27
Pravastatin	19 $\pm$ 4	7.7 $\pm$ 1.4	3.5 $\pm$ 0.3	3.5 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.3	Stable	27
Fenofibric ac.	10 $\pm$ 0	8.7 $\pm$ 0.4	14 $\pm$ 1	5.5 $\pm$ 0.8	5 $\pm$ 0.6	Stable	30
Metoprolol	24 $\pm$ 47	7.6 $\pm$ 1.6	5.5 $\pm$ 0.9	7.4 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.4	Stable	33
Gemfibrozil	19 $\pm$ 3	13 $\pm$ 2	18 $\pm$ 3	11 $\pm$ 4	10 $\pm$ 1	Stable	40
Bezafibrate	22 $\pm$ 3	14 $\pm$ 2	8.7 $\pm$ 1.3	11 $\pm$ 2	9.2 $\pm$ 0.8	Stable	40
4-chlorobenzoic ac.	17 $\pm$ 13	9.8 $\pm$ 0.9	NC	NC	3.5 $\pm$ 0.3	Stable	40
Ranitidine	Stable	12 $\pm$ 14	13 $\pm$ 5	NC	8.4 $\pm$ 4.9	NC	40
Salbutamol	33 $\pm$ 35	8.9 $\pm$ 2.2	NC	NC	8.5 $\pm$ 3.5	NC	40
Sotalol	Steady at 60%	14.2 $\pm$ 3.1	12.9 $\pm$ 9.6	10 $\pm$ 2	4.9 $\pm$ 0.6	Stable	43
Losartan	28 $\pm$ 7	17 $\pm$ 2	19 $\pm$ 5	10 $\pm$ 2	8.7 $\pm$ 0.8	Stable	47
Acebutolol	Stable	18 $\pm$ 6	19 $\pm$ 7	26 $\pm$ 22	11 $\pm$ 3	NC	52
Zidovudine	49 $\pm$ 223	24 $\pm$ 10	14 $\pm$ 5	NC	8.2 $\pm$ 1.9	46 $\pm$ 137	56
Diclofenac	Stable	23 $\pm$ 2	14.6 $\pm$ 4.5	11.2 $\pm$ 2.2	8.9 $\pm$ 0.3	Stable	57
Oxazepam	96 $\pm$ 38	97 $\pm$ 46	165 $\pm$ 228	72 $\pm$ 36	58 $\pm$ 23	65 $\pm$ 30	80
Timolol	Stable	30 $\pm$ 22	43 $\pm$ 45	NC	15 $\pm$ 13	Stable	80
Cetirizine	Stable	Stable	Stable	37.1 $\pm$ 14.6	30 $\pm$ 18	Stable	93
Nevirapine	Stable	Stable	Stable	Stable	30 $\pm$ 22	Stable	96
Disopyramide	Stable	Stable	Stable	Stable	41 $\pm$ 167	Stable	97
Bromazepam	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	100
Nordiazepam	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	100
Alprazolam	Stable	Stable	NC	NC	NC	NC	100
Diazepam	NC	NC	Stable	Stable	NC	Stable	100
Lorazepam	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	100
Meprobamate	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	100
Primidone	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	100
Carbamazepine	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	100
Indinavir	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Nelfinavir	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Clonazepam	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Clofibrac ac.	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Imipramine	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Doxepine	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Clenbuterol	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Sildenafil	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Terbutaline	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

(Wang et al., 2011). HgCl<sub>2</sub> has also been shown to be capable of rapidly degrading the booster biocide Irgarol 1051 at environmental pH by hydrolysis of the cyclopropylamine group (Liu et al., 1999). Hydrolysis of abacavir, with a similar functional group, could account for its disappearance, although further investigations are required to evaluate the mechanism.

Focusing only on the 26 unaffected analytes, the condition HgCl<sub>2</sub> can be considered as an abiotic batch control experiment. Steady concentrations were observed for 13 pharmaceuticals (lamivudine, ketoprofen, naproxen, ibuprofen, hydroxy-ibuprofen, gemfibrozil, bezafibrate, 4-chlorobenzoic acid, fenofibric acid, pravastatin, metoprolol, sotalol, losartan) over the 21 days of incubation in this condition only (all data supplied in the Supporting Information, Fig. S5).

### 3.1.2. Degradation and the influence of suspended solids

Considering conditions LSS, MSS, HSS and the sterilized condition HgCl<sub>2</sub>, 4 specific behaviors were noticeable (Fig. 2, all data are plotted in Fig. S5). The meprobamate-type compounds (Fig. 2.a) exhibited constant concentrations (N80% T0) in all conditions over the 4 weeks (bromazepam, nordiazepam, alprazolam, lorazepam, meprobamate, primidone, and carbamazepine). The bezafibrate-type compounds (Fig. 2.b) showed constant concentrations in the sterilized condition but decreasing concentrations under the biotic conditions with faster kinetics observed for higher SS concentrations (ketoprofen, naproxen, diclofenac, ibuprofen, hydroxy-ibuprofen, gemfibrozil, bezafibrate, 4-chlorobenzoic acid, fenofibric acid, pravastatin, metoprolol, sotalol, cetirizine, losartan, disopyramide). The atenolol-type (Fig. 2.c) concentration decrease was more rapid than for the bezafibrate-type and

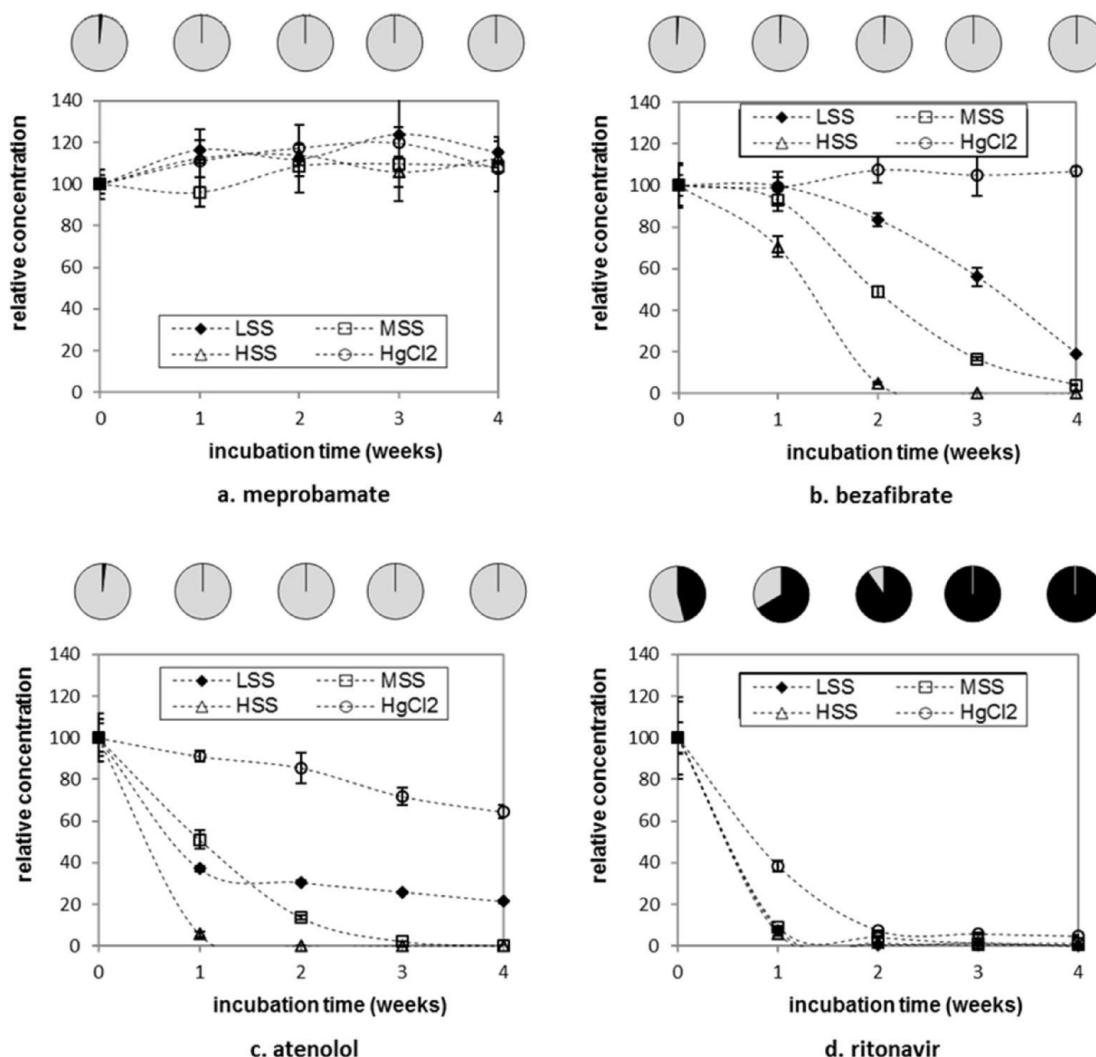


Fig. 2. Evolution of the relative concentrations for 4 molecules selected for the representativeness of the behaviors observed. LSS: low SS, MSS: intermediate SS, HSS: high SS, Unt: untreated waste water influent, HgCl<sub>2</sub>: abiotic reference, 10xD: higher WW dilution rate. The pie charts indicate the mass balance between the dissolved (grey) and particulate (black) phases in the condition MSS with intermediate particle concentration. Average values  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ).

included some degradation under sterilized conditions (lamivudine, zidovudine, atenolol, bisoprolol, propranolol, caffeine, theophylline, abacavir, acebutolol, ranitidine). The ritonavir-type compounds (Fig. 2.d) exhibited rapid decreasing concentrations in all the conditions with similar kinetics between sterilized and biotic conditions (ritonavir, oxazepam, amitriptyline, fluoxetine, clopidogrel). All the non-persistent molecules exhibited an initial slow concentration decrease (lag period) followed by an acceleration of the kinetics (Fig. 2.b).

Suspended solids are known to play a crucial role in biogeochemical processes between water, sediments and microorganisms (Turner and Millward, 2002). The degradation observed was mainly biotic (bezafibrate- and atenolol-type) as the sterilized condition remained higher or even constant. Only for the 5 molecules in the ritonavir-type category the similarity between sterilized and biotic conditions implied abiotic processes as the major degradation pathway. An overall increase in the biodegradation rate was measured for increasing concentrations of SS. Bacterial activity is largely dominated by bacteria living on particles in estuarine waters: Plummer and co-workers (Plummer et al., 1987) measured a contribution of freely suspended bacteria as little as 15% of the whole bacteria enumeration and activity in the Tamar TMZ (UK) while Servais and Garnier (2006) showed that the growth rates of attached bacteria were, on average, three times higher than those of free-living ones. Consequently, additional bacteria are brought with in-creasing SS concentrations and the biochemical processes are

promoted, in agreement with our findings. This is also in agreement with the increased microbial respiration measured as the depletion of dissolved oxygen in the TMZ of the Gironde estuary, France (Lanoux et al., 2013).

The observed kinetics is inconsistent with a first-order reaction, even though it was reported in previous studies (Li et al., 2015). The initial lag phase has also been identified during degradation by activated sludge of dissolved organic matter (Galvez et al., 1996), ibuprofen and ketoprofen (Almeida et al., 2013) as well as for bisphenol A, estradiol and ethinylestradiol degradation in the marine environment (Ying and Kookana, 2003). This evolution has been attributed to the acclimation and development of the microbial populations in general (Almeida et al., 2013; Chong, 2009; Ying and Kookana, 2003) and sigmoidal functions were previously proposed to model the kinetics. Biodegradation of amino acids in estuarine waters, in the absence of wastewater, also showed a delayed degradation after the initial compound spiking (Tappin et al., 2010). These studies and our observed kinetics suggest that a development and/or acclimation of the microbial populations occurred after mixing estuarine water with wastewaters. This supports the conclusions that the biodegradation was mainly the consequence of the degrading microbes from the turbid river water, un-acclimated yet to the wastewater born pharmaceuticals, and not the consequence of the wastewater effluent microorganisms, as the wastewater dilution rate showed no influence on the kinetics.

### 3.1.3. Influence of effluent treatment

Comparing conditions MSS and Unt, respectively comprising a WWTP effluent and influent, affords consideration of both the type of effluent and the SS concentration/nature (Fig. 3). Analytes exhibited slightly faster degradation under condition Unt, with half-lives a few days shorter (2.5 days and 10 days in the case of naproxen and zidovudine, respectively, Fig. 3.a and b). Only in the case of fenofibric acid (Fig. 3.c), a significantly slower degradation was observed with influent wastewater. Potentially high concentrations of fenofibrate (the unmonitored parent compound of fenofibric acid in human metabolism) in the influent could account for this result through degradation into fenofibric acid. However, studies on such a transformation have not been reported in literature.

### 3.1.4. Influence of dilution rate

Conditions MSS, HSS - composed of 50 vol.% effluent - and 10xD - composed of 10 vol.% effluent- were compared to explore the impact of dilution on the degradation kinetics. SS concentrations in condition 10xD were included between conditions MSS and HSS (Table S1). For all the degradable molecules in these 3 conditions, the kinetics was function of the SS concentration and no atypical behavior emerged from condition 10xD.

### 3.2. Sorption of pharmaceutical to suspended solid

The number of detected pharmaceuticals was dependent on the suspended solid concentration of the treatment considered. In condition MSS, with intermediate SS concentrations, up to 25 molecules were quantified on SS while 41 were found in dissolved phase. The evolution of the analyte concentrations on SS and in the dissolved phase were similar for all detected compounds (Fig. S6).

When comparing the experimental conditions LSS, MSS and HSS which were similar in terms of dilution rate and effluent type, the highest pharmaceutical concentrations on particles were observed for the lowest SS concentrations. It was found that the partition coefficient  $K_d$  decreased with SS concentration with a difference up to 2 log between the lowest and highest SS conditions (Fig. 4). This observation was not due to a change in organic content of SS as log  $K_{oc}$  exhibited a similar trend. Average partition coefficients measured in the intermediate condition MSS are available in the supporting information for every pharmaceutical detected in both the dissolved and particulate phases at least twice in the 4 weeks (Table S4). Ritonavir, amitriptyline and propranolol have the highest affinity with SS, as previously observed (Aminot et al., 2015).

The partitioning coefficients  $K_d$  and  $K_{oc}$ , ranging from 0.6 to 3.7 and 0.5 to 3.0 respectively, in the intermediate SS concentration condition

(MSS), were low to moderate (Table S4) and in agreement with previously reported values (Al-Khazrajy and Boxall, 2016; Aminot et al., 2015). Poor correlation ( $R^2 = 0.07$ ) was obtained when attempting to correlate log  $K_d$  with log  $D$  at pH 8 (Fig. S7). As an example, beta-blockers, all containing one (propranolol, metoprolol, bisoprolol) to two (sotalol, acebutolol) secondary amines moieties and positively charged at pH 8 showed an affinity to SS 1 to 2 orders of magnitude higher than diclofenac, fenofibric acid and bezafibrate, containing a carboxylic acid function and negatively charged at pH 8, despite a similar log  $D$  at pH 8. It was previously showed that compounds with basic characteristics, protonated under natural water pH, tend to show higher affinity to the negatively charged SS (Schaffer et al., 2012; Silva et al., 2011). Variabilities in the sorption of pharmaceuticals and other organic contaminants between different substrates are also attributed to factors like their organic carbon content and quality, mud/clay content or inorganic cation content (Aminot et al., 2015; Belles et al., 2016; Schaffer et al., 2012; Silva et al., 2011). Interestingly, the partitioning coefficients were found to be dependent on the SS concentration. Non-constant  $K_d$  indicate a non-linear adsorption isotherm, which could be better de-scribed by more complex adsorption models, outside the scope of this study. In our case, the type of particle is the same across experimental conditions and only its concentration varied. Similar behavior was observed for carbamazepine, propranolol and diclofenac on SS in Kent River, UK (Zhou and Broodbank, 2014). The authors proposed a power law to describe decreasing  $K_d$  for increasing SS and attributed this observation to a combination of multiple factors including a higher sorbing power of fine and organic-rich SS at low SS concentrations, increasing desorption at high SS concentrations due to more frequent interactions of SS, and potentially higher colloids being produced at high SS concentrations competing with SS.

### 3.3. Half-lives and persistence indices and pharmaceutical degradability

Half-lives as a function of SS concentrations (Fig. 5) followed a de-creasing exponential form. It indicates that a similar variation in SS concentrations will have a higher impact on the degradation kinetics at low SS values compared to high SS values. Between conditions 10xD and HSS, a 2-fold SS concentration increase has little effect on half-lives. Kinetics were different in condition Unt (influent wastewater) for losartan, gemfibrozil and bezafibrate, giving a point slightly aside of the exponential trend.

In order to compare relative compounds degradabilities, a persistence index was calculated (Table 2). Of the 43 molecules, 6 (paracetamol, abacavir, ritonavir, saquinavir, atorvastatine, clopidogrel) were considered as very degradable with an average score of 0 while 8, all psycholeptics (bromazepam, nordiazepam, alprazolam, diazepam,

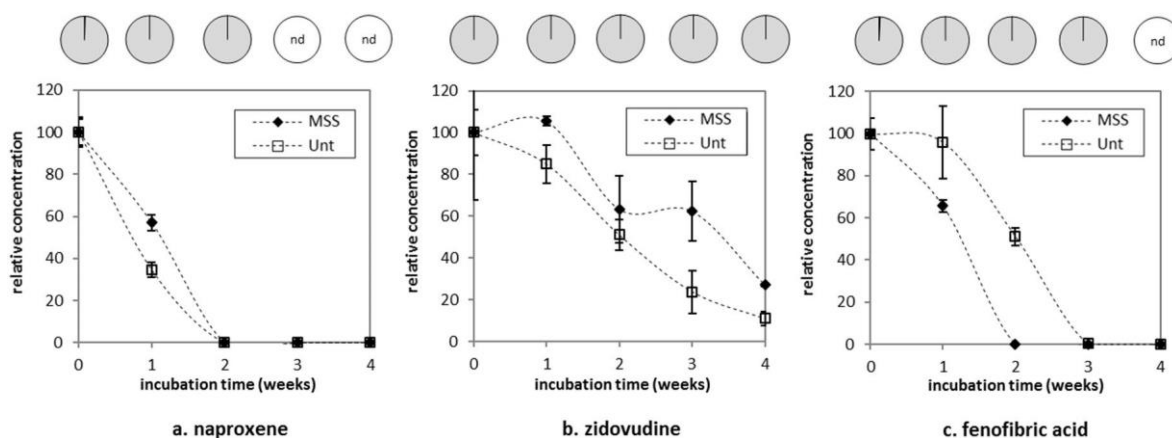


Fig. 3. Changes in the relative concentrations under conditions MSS (treated effluent) and Unt (untreated effluent) during the degradation experiment for 3 selected-molecules. The mass balance between particulate (dark) and dissolved (clear) phases is given in the pie charts for the condition MSS at each sampling time. Details of the conditions are given in Table 1. Average values  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ).

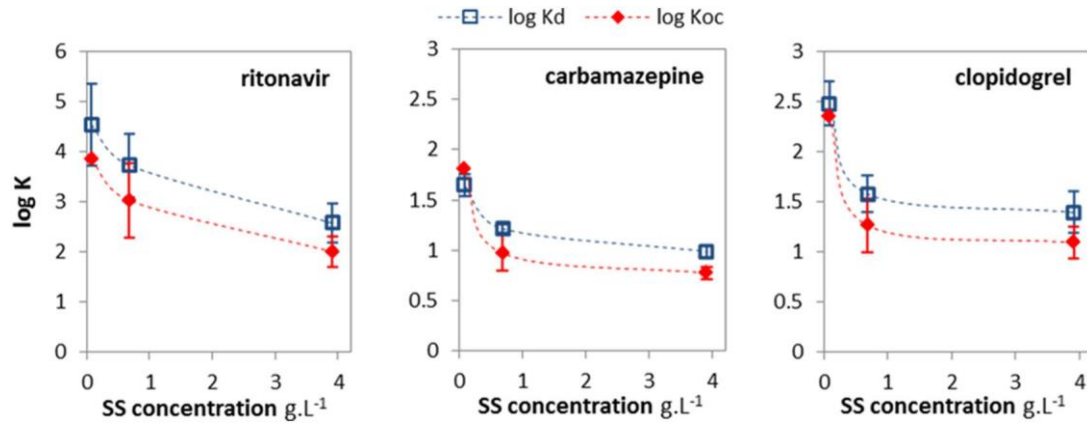


Fig. 4. Partition coefficient  $K_d$  and partition coefficient normalized by organic carbon content  $K_{oc}$  for 3 selected analytes as a function of SS concentration in conditions LSS, MSS and HSS. Average values  $\pm$  standard deviation,  $n = 5$  (time points).

lorazepam, meprobamate, primidone, carbamazepine), were very persistent (score 100). Oxazepam scored 80 but exhibited a very slight decrease with a half-life  $N$  60 days.

Up to 14 analytes (43 detected) were considered as stable in biotic conditions (bromazepam, nordiazepam, alprazolam, lorazepam, meprobamate, primidone, carbamazepine, ranitidine, acebutolol, diclofenac, timolol, cetirizine, nevirapine and disopyramide in the “LSS” condition). Relative persistence is consistent with those reported in literature: e.g. naproxen  $\gg$  gemfibrozil (Grenni et al., 2013); paracetamol  $\ll$  carbamazepine (Yamamoto et al., 2009); paracetamol  $\gg$  caffeine  $\gg$  ketoprofen  $\gg$  salbutamol  $\approx$  ranitidine  $\gg$  carbamazepine (Benotti and Brownawell, 2009). The relative persistence and half-lives values calculated in the highest SS condition (HSS) are in agreement with those calculated at the water sediment interface in a previous study (Li et al., 2015). Psycholeptics compounds like benzodiazepines showed minor to no degradation. Diazepam was found to be refractory in the absence of sun-light in a previous incubation of estuarine waters (Tappin et al., 2014). Oxazepam persistence in estuarine conditions is consistent with its stability through wastewater treatment (González Alonso et al., 2010; Yuan et al., 2013) and in fresh waters (Hass et al., 2012). Our findings emphasize the concerns on this pharmaceutical, recently reported as bioaccumulative (Lagesson et al., 2016) and toxic (Brodin et al., 2013).

#### 3.4. Implications on pharmaceutical degradability in estuaries

Macrotidal estuaries are characterized by their TMZ in which river water and its organic contaminants from upstream meet high SS concentrations in the freshwater/surface water Interface. In the estuarine

Garonne River, the SS concentration close to the discharge point of Bordeaux city effluents has seasonal variations from  $50 \text{ mg L}^{-1}$  during high flows to over  $10 \text{ g L}^{-1}$  during low flow periods (Etcheber et al., 2011). Additionally, intra-day variations are based on the tidal cycle with a maximum SS concentration reached at mid-ebb where a tenfold increase can be observed within 3 h. Considering the longitudinal trans-port of contaminants, when approaching the TMZ from upstream, contaminants are exposed to increasing SS concentrations while after the TMZ and along the salinity gradient, the SS concentration decreases. In agreement with the conclusions of our experiments, the rise in SS is expected to enhance the degradation rate of pharmaceuticals inducing high spatial and temporal variations on the compounds degradation rates. The seasonal removal of pharmaceuticals, previously demonstrated in the Garonne estuary (Aminot et al., 2016), is likely not only to be due to increased water residence time but, also a consequence of more turbid waters during the low flow summer period. A recent study also observed that river waters could show higher attenuation efficiencies than WWTPs for a same residence time, confirming that environmental degradation processes are significant and not only controlled by residence time (Aymerich et al., 2016).

When taking into account the numerous water physicochemical parameters that may influence degradation, the understanding of the processes governing in-stream attenuation becomes excessively complex and in-vitro experimentation is necessary. Besides, additional work on the microbial fauna is required to understand the degrading power of the different bacterial communities that may be associated with fresh-water, TMZ and marine waters. In addition to SS, it has been shown that pharmaceuticals tend to degrade faster in more eutrophic waters,

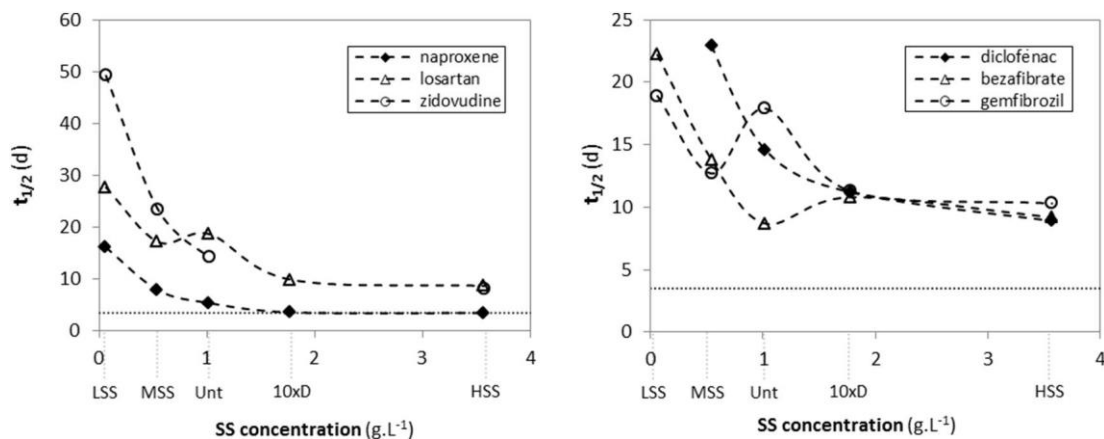


Fig. 5. Relationship between half-lives and SS concentration for 6 selected analytes in the biotic conditions. Note that zidovudine was not quantified in condition 10xD and diclofenac was stable in condition LSS. The minimal calculable half-life (3.5 days) is represented by a dotted line.

or waters more concentrated in biodegradable dissolved organic carbon (Benotti and Brownawell, 2009; Lim et al., 2008). Our degradation experiments have been conducted under aerobic conditions. Previous studies (Ying and Kookana, 2003) demonstrated that the stability of organic micropollutants (steroids, alkylphenols, bisphenol A) in seawater was significantly increased under anaerobic conditions. Similarly, enhancement in biodegradation rates was observed after introducing oxy-gen to an anoxic water/sediment system (Radke and Maier, 2014). In the estuarine Garonne River, dissolved oxygen can reach 30% at 1 m under the surface in summertime (Lanoux et al., 2013) while anoxic conditions have been observed in the fluid mud (SS concentrations  $N\ 140\ g\ L^{-1}$ ) (Abril et al., 1999). Persistence of the contaminants is then expected to be enhanced under such conditions.

#### 4. Conclusions

The quantification of 43 of the 53 screened pharmaceuticals enabled the evaluation of their stability. Persistent behavior was observed for 7 molecules during the 4 weeks of experiment, as indicated by the persistence index proposed (bromazepam, nordiazepam, alprazolam, diazepam, lorazepam, meprobamate, primidone, carbamazepine). By quantifying the analytes in the dissolved and particulate phases and comparing total concentrations to a sterilized condition, we provided evidence that biotic degradation and not sorption to particles was the main attenuation process. This biodegradation was enhanced by in-creasing concentrations of SS: half-lives were reduced by up to 6-fold by a 50-fold SS increase. The influence of the type of effluent as well as its mixing proportion appeared to be minor. When considering dis-solved and particulate phases separately, it was found that the equilibrium between these compartments was a function of the SS concentration, although most of the targeted analytes exhibited low to moderate affinity towards particles, as per the low log K<sub>d</sub> calculated.

In natural aquatic systems and in particular in estuaries where the penetration of light is limited by the turbidity of the waters, biodegradation is expected to be a major removal process for pharmaceuticals. However, the kinetics of this attenuation is water body-dependent and its moderation by different bacterial communities or by variations in organic carbon particle compositions, in salinities, in oxygen rates etc. can be significant and requires further investigations.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Etiage program (Agence de l'Eau Adour-Garonne, the CUB (Communauté Urbaine de Bordeaux) and Lyonnaise des Eaux), the Aquitaine Region and the European Union (CPER A2E project). Europe is moving in Aquitaine with the European Regional Development Fund. This study has been carried out in the framework of the Cluster of Excellence COTE. Professor James W. Readman from Plymouth University is also acknowledged for his helpful suggestions that improved the manuscript.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.162>.

#### References

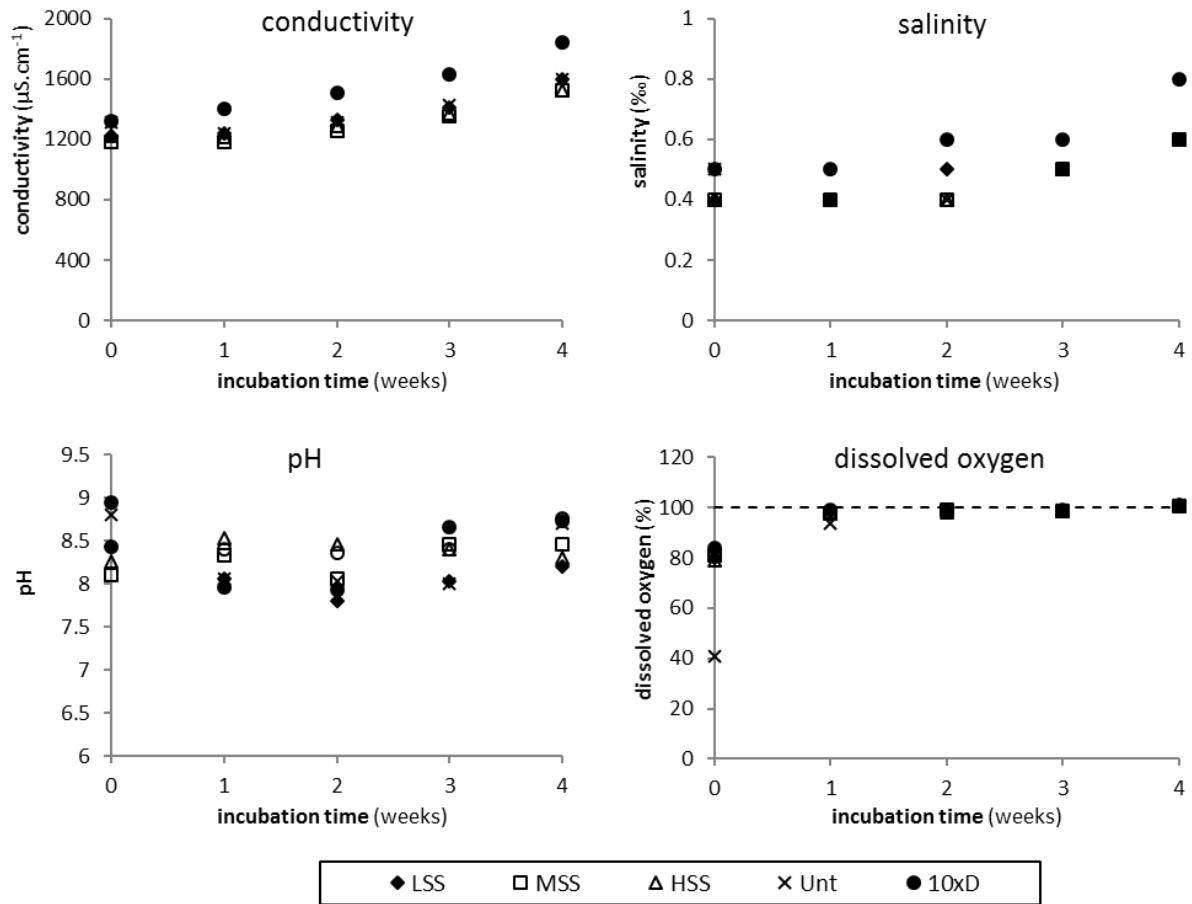
- Abril, G., Etcheber, H., Hir, P.L., Bassoullet, P., Boutier, B., Frankignoulle, M., 1999. Oxidation oscillations and organic carbon mineralization in an estuarine maximum turbidity zone (The Gironde, France). *Limnol. Oceanogr.* 44:1304–1315. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.1999.44.5.1304>.
- Abril, G., Nogueira, M., Etcheber, H., Cabeçadas, G., Lemaire, E., Brogueira, M.J., 2002. Behaviour of organic carbon in nine contrasting European estuaries. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 54:241–262. <http://dx.doi.org/10.1006/eccc.2001.0844>.
- Al-Khazrajy, O.S.A., Boxall, A.B.A., 2016. Impacts of compound properties and sediment characteristics on the sorption behaviour of pharmaceuticals in aquatic systems. *J. Hazard. Mater.* 317:198–209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.065>.
- Almeida, B., Oehmen, A., Marques, R., Brito, D., Carvalho, G., Barreto Crespo, M.T., 2013. Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture. *Bioresour. Technol.* 133:31–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.035>.
- Aminot, Y., Litrico, X., Chambolle, M., Arnaud, C., Pardon, P., Budzinski, H., 2015. Development and application of a multi-residue method for the determination of 53 pharmaceuticals in water, sediment, and suspended solids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 407:8585–8604. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-015-9017-3>.
- Aminot, Y., Le Menach, K., Pardon, P., Etcheber, H., Budzinski, H., 2016. Inputs and seasonal removal of pharmaceuticals in the estuarine Garonne River. *Mar. Chem.* 13th International Estuarine Biogeochemistry Symposium (IEBS) - Estuaries Under Anthropogenic Pressure. Vol. 185:pp. 3–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marchem.2016.05.010>.
- Aymerich, I., Acuña, V., Barceló, D., García, M.J., Petrovic, M., Poch, M., Rodriguez-Mozaz, S., Rodríguez-Roda, I., Sabater, S., von Schiller, D., Corominas, L., 2016. Attenuation of pharmaceuticals and their transformation products in a wastewater treatment plant and its receiving river ecosystem. *Water Res.* 100:126–136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.022>.
- Baena-Nogueras, R.M., González-Lazo, E., Lara-Martín, P.A., 2017. Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters: photolysis vs biodegradation. *Sci. Total Environ.* 591:643–654. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.015>.
- Baker, D.R., Kasprzyk-Hordern, B., 2011. Multi-residue determination of the sorption of illicit drugs and pharmaceuticals to wastewater suspended particulate matter using pressurised liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218:7901–7913. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.092>.
- Baker, D.R., Kasprzyk-Hordern, B., 2013. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: new developments. *Sci. Total Environ.* 454–455:442–456. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.043>.
- Barbic, S., Horvat, A.J.M., Mutavdzic, P., Kastelan-Macan, M., 2007. Determination of pK<sub>a</sub> values of active pharmaceutical ingredients. *Trends Anal. Chem.* 26:1043–1106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.004>.
- Belles, A., Alary, C., Mamindy-Pajany, Y., Abriak, N.-E., 2016. Relationship between the water-exchangeable fraction of PAH and the organic matter composition of sediments. *Environ. Pollut.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.077>.
- Benotti, M.J., Brownawell, B.J., 2007. Distributions of pharmaceuticals in an urban estuary during both dry- and wet-weather conditions. *Environ. Sci. Technol.* 41:5795–5802. <http://dx.doi.org/10.1021/es0629965>.
- Benotti, M.J., Brownawell, B.J., 2009. Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. *Environ. Pollut.* 157:994–1002. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.10.009>.
- Bradley, P.M., Barber, L.B., Kolpin, D.W., McMahon, P.B., Chapelle, F.H., 2007. Biotransformation of caffeine, cotinine, and nicotine in stream sediments: implications for use as wastewater indicators. *Environ. Toxicol. Chem.* 26:1116–1121. <http://dx.doi.org/10.1897/06-483R.1>.
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J., 2013. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science* 339:814–815. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1226850>.
- Burke, V., Treumann, S., Duennbier, U., Greskowiak, J., Massmann, G., 2013. Sorption behavior of 20 wastewater originated micropollutants in groundwater - column experiments with pharmaceutical residues and industrial agents. *J. Contam. Hydrol.* 154: 29–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconhyd.2013.08.001>.
- Challis, J.K., Hanson, M.L., Friesen, K.J., Wong, C.S., 2014. A critical assessment of the photodegradation of pharmaceuticals in aquatic environments: defining our current understanding and identifying knowledge gaps. *Environ. Sci. Process. Impacts* 16: 672–696. <http://dx.doi.org/10.1039/C3EM00615H>.
- Chenxi, W., Sponberg, A.L., Witter, J.D., 2008. Determination of the persistence of pharmaceuticals in biosolids using liquid-chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 73:511–518. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.026>.
- Chong, N.-M., 2009. Modeling the acclimation of activated sludge to a xenobiotic. *Bioresour. Technol.* 100:5750–5756. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.071>.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107, 907–938.
- Escher, B.I., Baumgartner, R., Koller, M., Trayer, K., Lienert, J., McArdell, C.S., 2010. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res.* 45:75–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.019>.
- Etcheber, H., Schmidt, S., Sottolichio, A., Maneux, E., Chabaux, G., Escalier, J.-M., Wennekes, H., Derriennic, H., Schmeltz, M., Quémener, L., Repecaud, M., Woerther, P., Castaing, P., 2011. Monitoring water quality in estuarine environments: lessons from the MAGEST monitoring program in the Gironde fluvial-estuarine system. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 15:831–840. <http://dx.doi.org/10.5194/hess-15-831-2011>.
- Fatta-Kassinos, D., Meric, S., Nikolaou, A., 2011. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal. Bioanal. Chem.* 399:251–275. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-4300-9>.
- Fitzhugh, R.D., Lovett, G.M., Venterea, R.T., 2003. Biotic and abiotic immobilization of ammonium, nitrite, and nitrate in soils developed under different tree species in the Catskill Mountains, New York, USA. *Glob. Chang. Biol.* 9:1591–1601. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2486.2003.00694.x>.
- Galvez, L., Hu, Y., Audic, J.M., Block, J.C., 1996. Cinétiques de biodégradation par boues activées de la matière organique soluble d'un effluent synthétique. *Rev. Sci. Eau* 9: 207. <http://dx.doi.org/10.7202/705249ar>.
- González Alonso, S., Catalá, M., Maroto, R.R., Gil, J.L.R., de Miguel, Á.G., Valcárcel, Y., 2010. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environ. Int.* 36:195–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2009.11.004>.
- Grenni, P., Patrolocco, L., Ademollo, N., Tolomei, A., Barra Caracciolo, A., 2013. Degradation of Gemfibrozil and Naproxen in a river water ecosystem. *Microchem. J.*, XIV Hungarian - Italian Symposium on Spectrochemistry: Analytical Techniques and Preservation of Natural Resources, Sumeg (Hungary), October 5–7, 2011. 107:pp. 158–164. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.06.008>.

- Hass, U., Duennbier, U., Massmann, G., 2012. Occurrence and distribution of psychoactive compounds and their metabolites in the urban water cycle of Berlin (Germany). *Water Res.* 46:6013–6022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.025>.
- Kattner, G., 1999. Storage of dissolved inorganic nutrients in seawater: poisoning with mercuric chloride. *Mar. Chem.* 67:61–66. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4203\(99\)00049-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4203(99)00049-3).
- Krawczyk, D.F., 1975. Preservation of wastewater effluent samples for forms of nitrogen and phosphorus. *ASTM Spec. Tech. Publ.* 152–163.
- Kunkel, U., Radke, M., 2011. Reactive tracer test to evaluate the fate of pharmaceuticals in rivers. *Environ. Sci. Technol.* 45:6296–6302. <http://dx.doi.org/10.1021/es104320n>.
- Kunkel, U., Radke, M., 2012. Fate of pharmaceuticals in rivers: deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions. *Water Res.* 46:5551–5565. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.033>.
- Lagesson, A., Fahlman, J., Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Byström, P., Klaminder, J., 2016. Bioaccumulation of five pharmaceuticals at multiple trophic levels in an aquatic food web - insights from a field experiment. *Sci. Total Environ.* 568:208–215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.206>.
- Lahti, M., Oikari, A., 2011. Microbial transformation of pharmaceuticals naproxen, bisoprolol, and diclofenac in aerobic and anaerobic environments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61:202–210. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-010-9622-2>.
- Lanoux, A., 2013. Caractérisation et rôle respectif des apports organiques amont et locaux sur l'oxygénation des eaux de la Garonne estuarienne. Bordeaux 1.
- Lanoux, A., Etcheber, H., Schmidt, S., Sotolichio, A., Chabaud, G., Richard, M., Abril, G., 2013. Factors contributing to hypoxia in a highly turbid, macrotidal estuary (the Gironde, France). *Environ. Sci. Process. Impacts* 15:585–595. <http://dx.doi.org/10.1039/C2EM30874F>.
- Lara-Martín, P.A., Renfro, A.A., Cochran, J.K., Brownawell, B.J., 2015. Geochronologies of Pharmaceuticals in a Sewage-Impacted Estuarine Urban Setting (Jamaica Bay, New York). *Environ. Sci. Technol.* 49:5948–5955. <http://dx.doi.org/10.1021/es506009v>.
- Li, Z., Sobek, A., Radke, M., 2015. Flume experiments to investigate the environmental fate of pharmaceuticals and their transformation products in streams. *Environ. Sci. Technol.* 49:6009–6017. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.5b00273>.
- Lim, M.-H., Snyder, S.A., Sedlak, D.L., 2008. Use of biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) to assess the potential for transformation of wastewater-derived contaminants in surface waters. *Water Res.* 42:2943–2952. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.03.008>.
- Liu, D., Pacepavicius, G.J., Maguire, R.J., Lau, Y.L., Okamura, H., Aoyama, I., 1999. Mercuric chloride-catalyzed hydrolysis of the new antifungal compound irgarol 1051. *Water Res.* 33:155–163. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00186-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00186-9).
- López-Serna, R., Pérez, S., Ginebreda, A., Petrović, M., Barceló, D., 2010. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction–liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Talanta* 83:410–424. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.046>.
- Plummer, D.H., Owens, N.J.P., Herbert, R.A., 1987. Bacteria-particle interactions in turbid estuarine environments. *Cont. Shelf Res.* 7:1429–1433. [http://dx.doi.org/10.1016/0278-4343\(87\)90050-1](http://dx.doi.org/10.1016/0278-4343(87)90050-1).
- Pomiès, M., Choubert, J.-M., Wisniewski, C., Coquery, M., 2013. Modelling of micropollutant removal in biological wastewater treatments: a review. *Sci. Total Environ.* 443:733–748. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.037>.
- Radke, M., Maier, M.P., 2014. Lessons learned from water/sediment-testing of pharmaceuticals. *Water Res.* 55:63–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.012>.
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* 44:578–588. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.004>.
- Schaffer, M., Börnick, H., Nödler, K., Licha, T., Worch, E., 2012. Role of cation exchange processes on the sorption influenced transport of cationic  $\beta$ -blockers in aquifer sediments. *Water Res.* 46:5472–5482. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.013>.
- Servais, P., Garnier, J., 2006. Organic carbon and bacterial heterotrophic activity in the maximum turbidity zone of the Seine estuary (France). *Aquat. Sci.* 68:78–85. <http://dx.doi.org/10.1007/s00027-005-0809-y>.
- Silva, B.F. da, Jelic, A., López-Serna, R., Mozeto, A.A., Petrović, M., Barceló, D., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere* 85:1331–1339. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.051>.
- Takayanagi, T.T., Amiya, M., Shimakami, N., Yabutani, T., 2015. Determination of acid dissociation constant of pravastatin under degraded conditions by capillary zone electrophoresis. *The Japan society for analytical chemistry* 31, 1193–1196.
- Tappin, A.D., Millward, G.E., Fitzsimons, M.F., 2010. Particle–water interactions of organic nitrogen in turbid estuaries. *Mar. Chem.* 122:28–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marchem.2010.08.006>.
- Tappin, A.D., Loughnane, J.P., McCarthy, A.J., Fitzsimons, M.F., 2014. Bacterio-plankton transformation of diazepam and 2-amino-5-chlorobenzophenone in river waters. *Environ. Sci. Process. Impacts* 16:2227–2236. <http://dx.doi.org/10.1039/c4em00306c>.
- Trawinski, J., Skibinski, R., 2017. Studies on photodegradation process of psychotropic drugs : a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24:1152–1199. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7727-5>.
- Turner, A., Millward, G.E., 2002. Suspended Particles : their role in estuarine biogeochemical cycles. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 55:857–883. <http://dx.doi.org/10.2006/ecss.2002.1033>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2004>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.033>.
- Wang, C.-Y., Wang, F., Wang, T., Yang, X.-L., Bian, Y.-R., Kengara, F.O., Li, Z.-B., Jiang, X., 2011. Effects of autoclaving and mercuric chloride sterilization on PAHs dissipation in a two-liquid-phase soil slurry. *Pedosphere* 21:56–64. [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(10\)60079-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(10)60079-3).
- Wolf, D.C., Dao, T.H., Scott, H.D., Lavy, T.L., 1989. Influence of sterilization methods on selected soil microbiological, physical, and chemical properties. *J. Environ. Qual.* 18, 39–44.
- Writer, J.H., Antweiler, R.C., Ferrer, I., Ryan, J.N., Thurman, E.M., 2013. In-stream attenuation of neuro-active pharmaceuticals and their metabolites. *Environ. Sci. Technol.* 47: 9781–9790. <http://dx.doi.org/10.1021/es402158t>.
- Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.039>.
- Ying, G.-G., Kookana, R.S., 2003. Degradation of five selected endocrine-disrupting chemicals in seawater and marine sediment. *Environ. Sci. Technol.* 37:1256–1260. <http://dx.doi.org/10.1021/es026222z>.
- Yu, J.T., Bouwer, E.J., Coelhan, M., 2006. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage. *Agric. Water Manag.* 86: 72–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2006.06.015>.
- Yuan, S., Jiang, X., Xia, X., Zhang, H., Zheng, S., 2013. Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere* 90:2520–2525. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.089>.
- Zhao, H., Zhou, J.L., Zhang, J., 2015. Tidal impact on the dynamic behavior of dissolved pharmaceuticals in the Yangtze Estuary, China. *Sci. Total Environ.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.055>.
- Zhou, J., Broodbank, N., 2014. Sediment-water interactions of pharmaceutical residues in the river environment. *Water Res.* 48:61–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.026>.



## Supplementary information

### Physicochemical parameters measured during the incubations

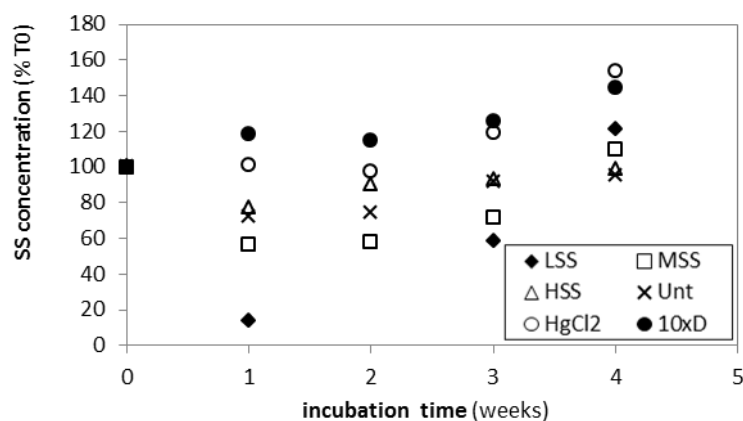


**Figure S1.** Evolution of the physicochemical parameters measured in each treatment (%).

**SS initial concentrations, their relative evolution during the experiment and SS organic carbon content.**

**Table S1.** Initial SS concentrations

	<i>LSS</i>	<i>MSS</i>	<i>HSS</i>	<i>Unt</i>	<i>HgCl2</i>	<i>10xD</i>
SS (g.L <sup>-1</sup> )	0.082	0.68	3.9	1.2	0.93	1.5

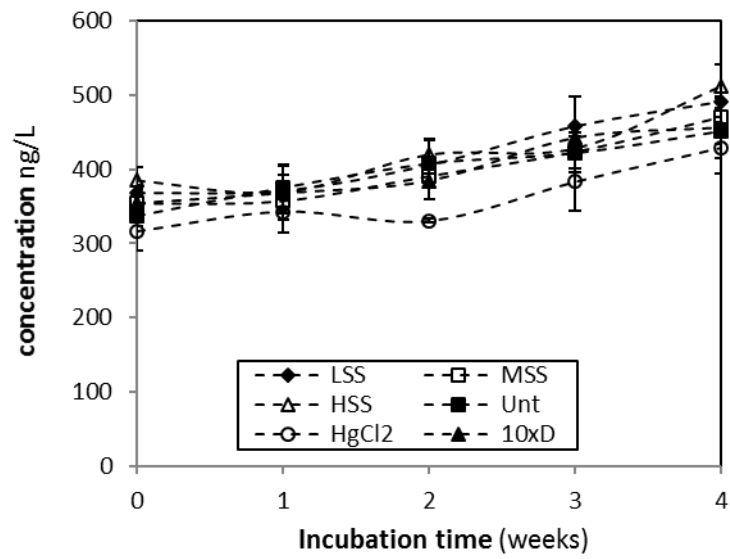


**Figure S2.** Evolution of the SS concentrations. SS concentrations given as relative to the initial concentration of each treatment (%).

**Table S2.** Percentage of organic carbon in the SS (%). Undet.: undetermined due to insufficient material on filter.

%	<i>LSS</i>	<i>MSS</i>	<i>HSS</i>	<i>Unt</i>	<i>HgCl2</i>	<i>10xD</i>
<b>t0</b>	1.0	1.0	1.3	4.2	0.8	1.0
<b>t0+1w</b>	undet.	1.7	1.3	2.9	1.1	1.3
<b>t0+2w</b>	undet.	1.2	1.2	2.8	1.3	1.4
<b>t0+3w</b>	undet.	1.3	1.3	2.5	1.5	1.3
<b>t0+4w</b>	undet.	1.3	1.3	2.9	1.5	1.4

### Carbamazepine uncorrected concentrations



**Figure S3.** Concentrations of carbamazepine as measured in the 6 experimental conditions.

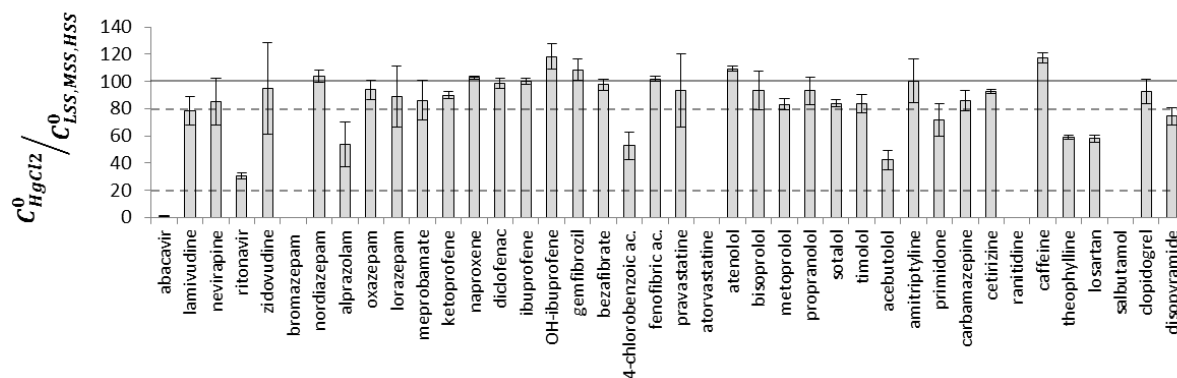
Average values  $\pm$  standard deviation (n=3).

## Quantified molecules

**Table S3. Molecules quantified above their MQL as specified in Aminot et al., 2015.**

Analyte	LSS	MSS	HSS	Unt	HgCl2	10xD	Analyte	LSS	MSS	HSS	Unt	HgCl2	10xD
abacavir	X	X	X	X		X	pravastatine	X	X	X	X	X	X
indinavir							atorvastatine		X		X		
lamivudine	X	X	X	X	X	X	atenolol	X	X	X	X	X	X
nelfinavir							bisoprolol	X	X	X	X	X	X
nevirapine	X	X	X	X	X		metoprolol	X	X	X	X	X	X
ritonavir	X	X	X	X	X	X	propranolol	X	X	X	X	X	X
saquinavir			X	X	X		sotalol	X	X	X	X	X	X
zidovudine	X	X	X	X	X		timolol	X	X	X	X	X	
bromazepam	X	X	X	X			acebutolol	X	X	X	X		X
nordiazepam	X	X	X	X	X		imipramine						
alprazolam	X	X					doxepine						
diazepam							amitriptyline	X	X	X	X	X	
oxazepam	X	X	X	X	X	X	fluoxetine	X	X	X	X	X	
lorazepam	X	X	X	X	X		primidone	X	X	X	X	X	X
clonazepam							carbamazepine	X	X	X	X	X	X
meprobamate	X	X	X	X	X	X	cetirizine	X	X	X	X	X	X
ketoprofene	X	X	X	X	X	X	ranitidine	X	X	X	X		
naproxene	X	X	X	X	X	X	clenbuterol						
diclofenac	X	X	X	X	X	X	caffeine	X	X	X	X	X	X
ibuprofene	X	X	X	X	X	X	theophylline	X	X	X	X	X	X
hydroxy- ibuprofene	X	X	X	X	X	X	sildenafil						
paracetamol				X		X	losartan	X	X	X	X	X	X
gemfibrozil	X	X	X	X	X	X	salbutamol	X	X	X			
bezafibrate	X	X	X	X	X	X	clopidogrel	X	X	X	X	X	X
4-chlorobenz. ac.	X	X	X		X		terbutaline						
fenofibric ac.	X	X	X	X	X	X	disopyramide	X	X	X	X	X	X
clofibric ac.													

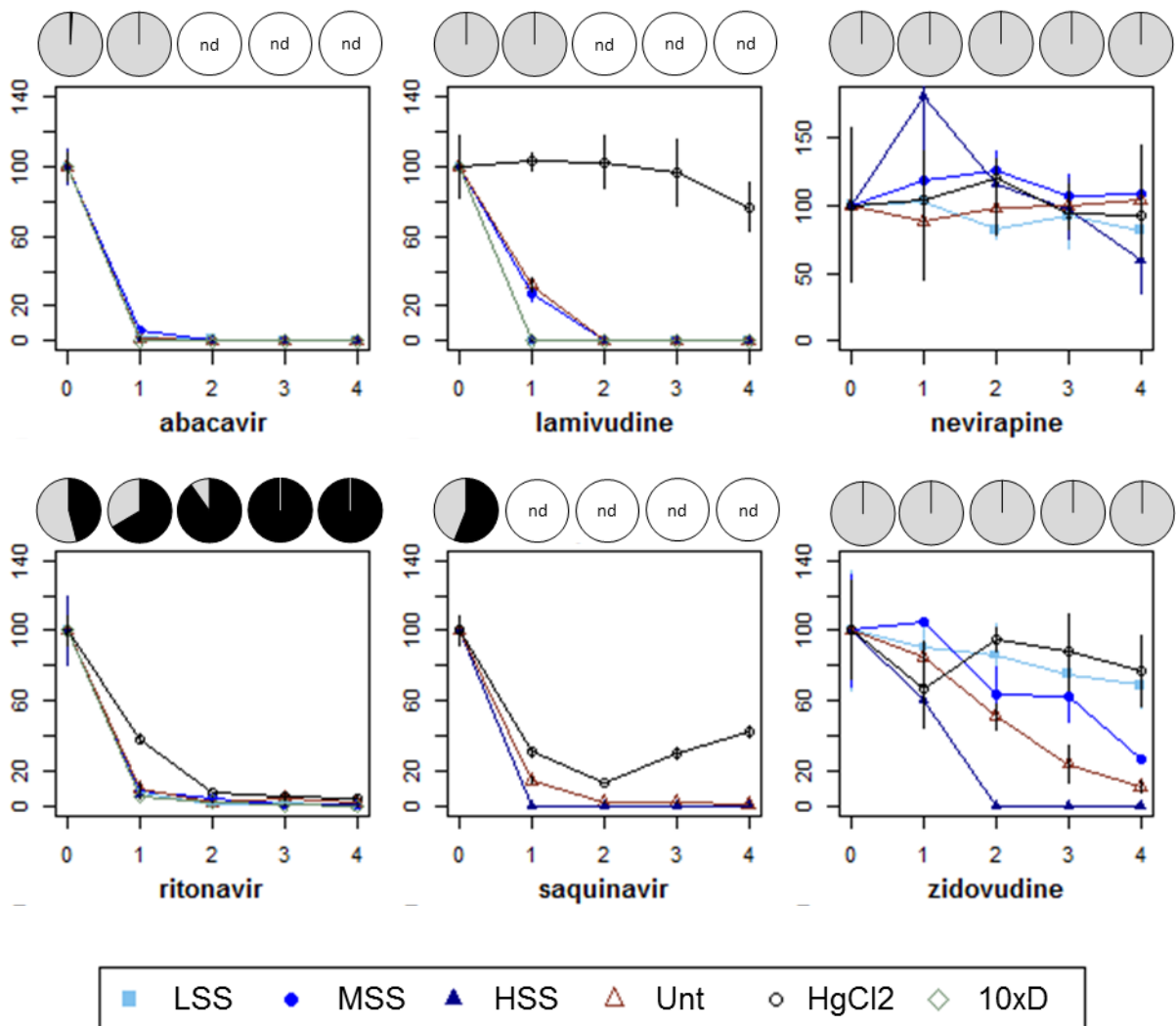
## Evaluation of mercury (II) chloride poisoning.

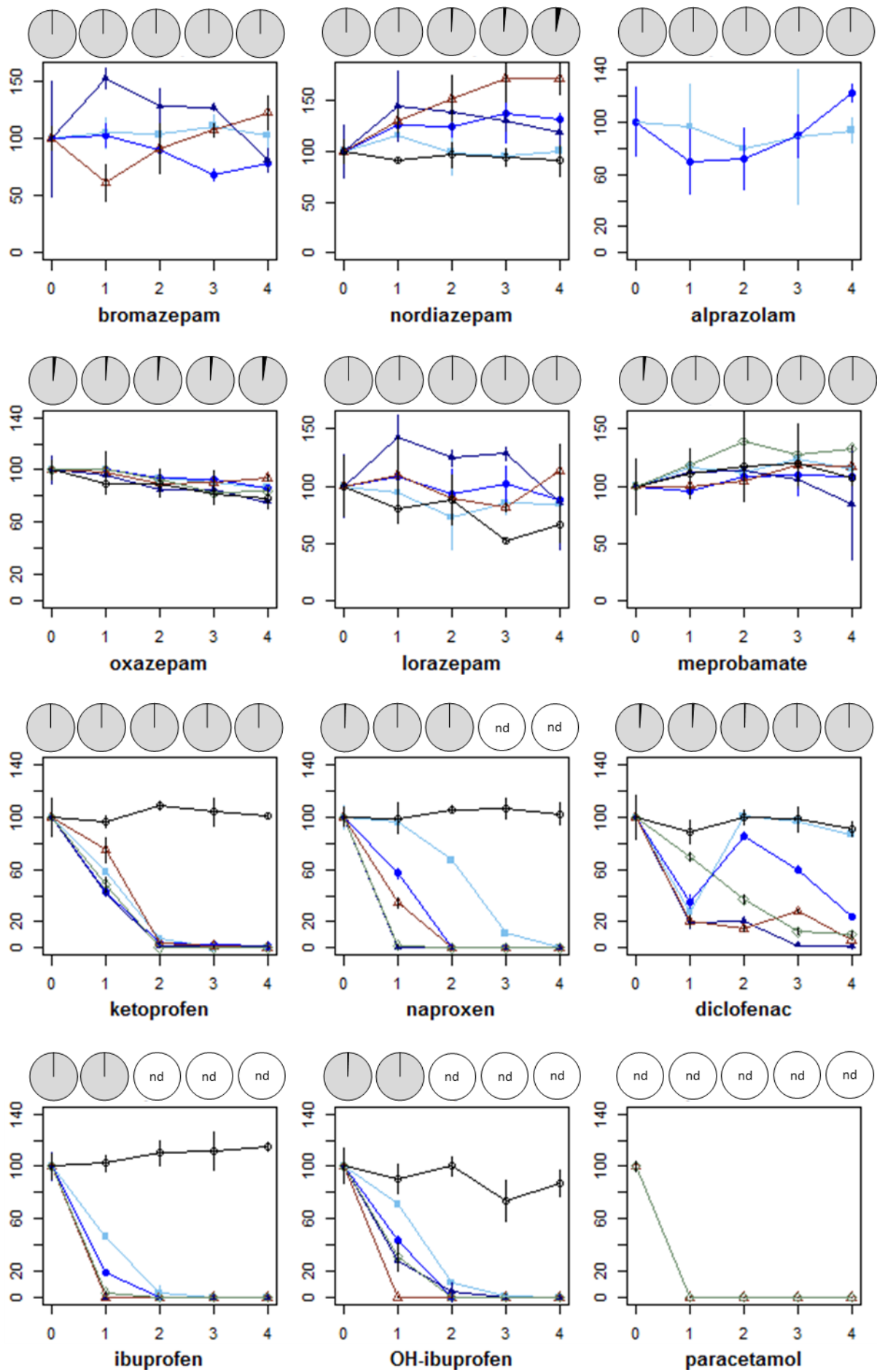


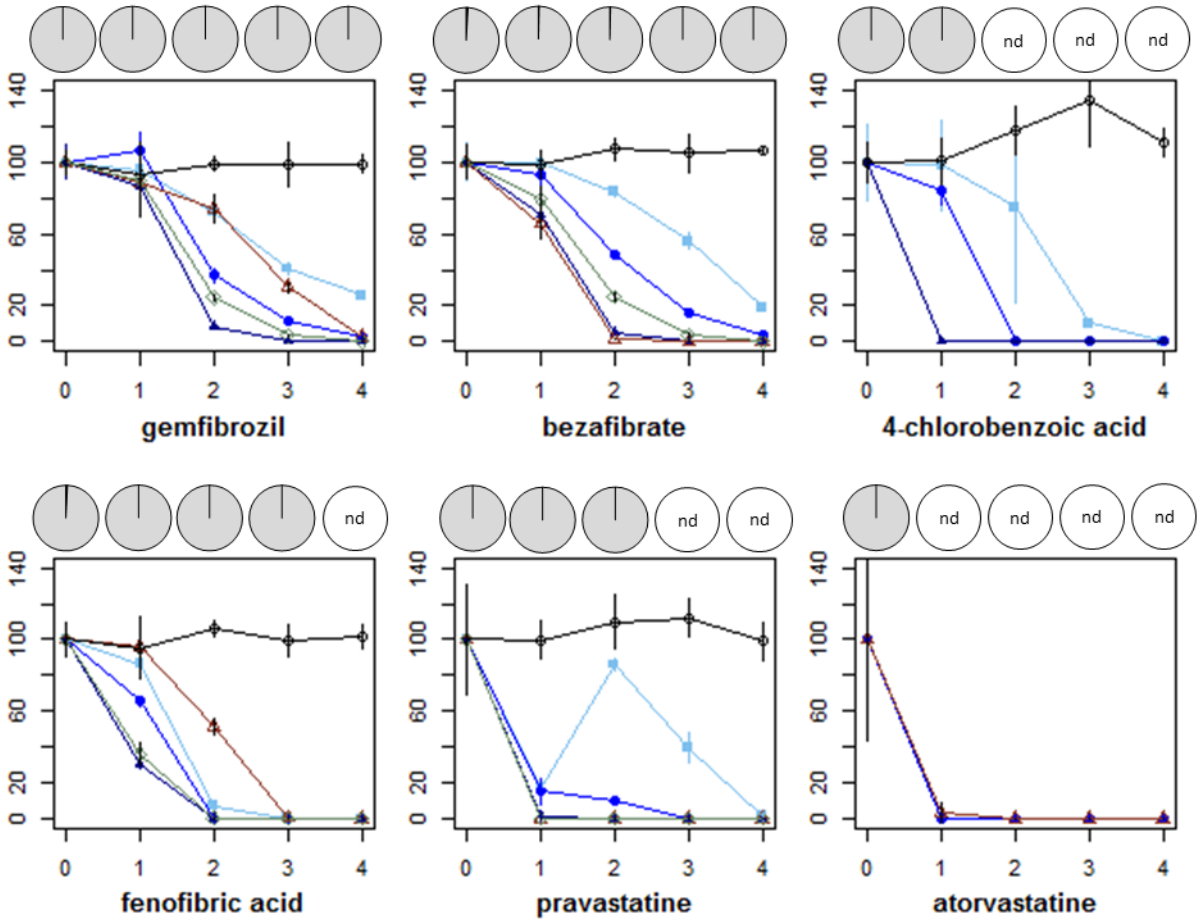
**Figure S4. Ratio initial concentration in the sterilized condition  $HgCl_2$  to the mean initial concentration in conditions  $LSS$ ,  $MSS$ ,  $HSS$  for all quantified molecules in conditions  $LSS$ ,  $MSS$ ,  $HSS$  expressed as a percentage. Also plotted the 20 % and 80 % thresholds. Average values  $\pm$  standard deviation**

## Behavior of each pharmaceutical during the incubation

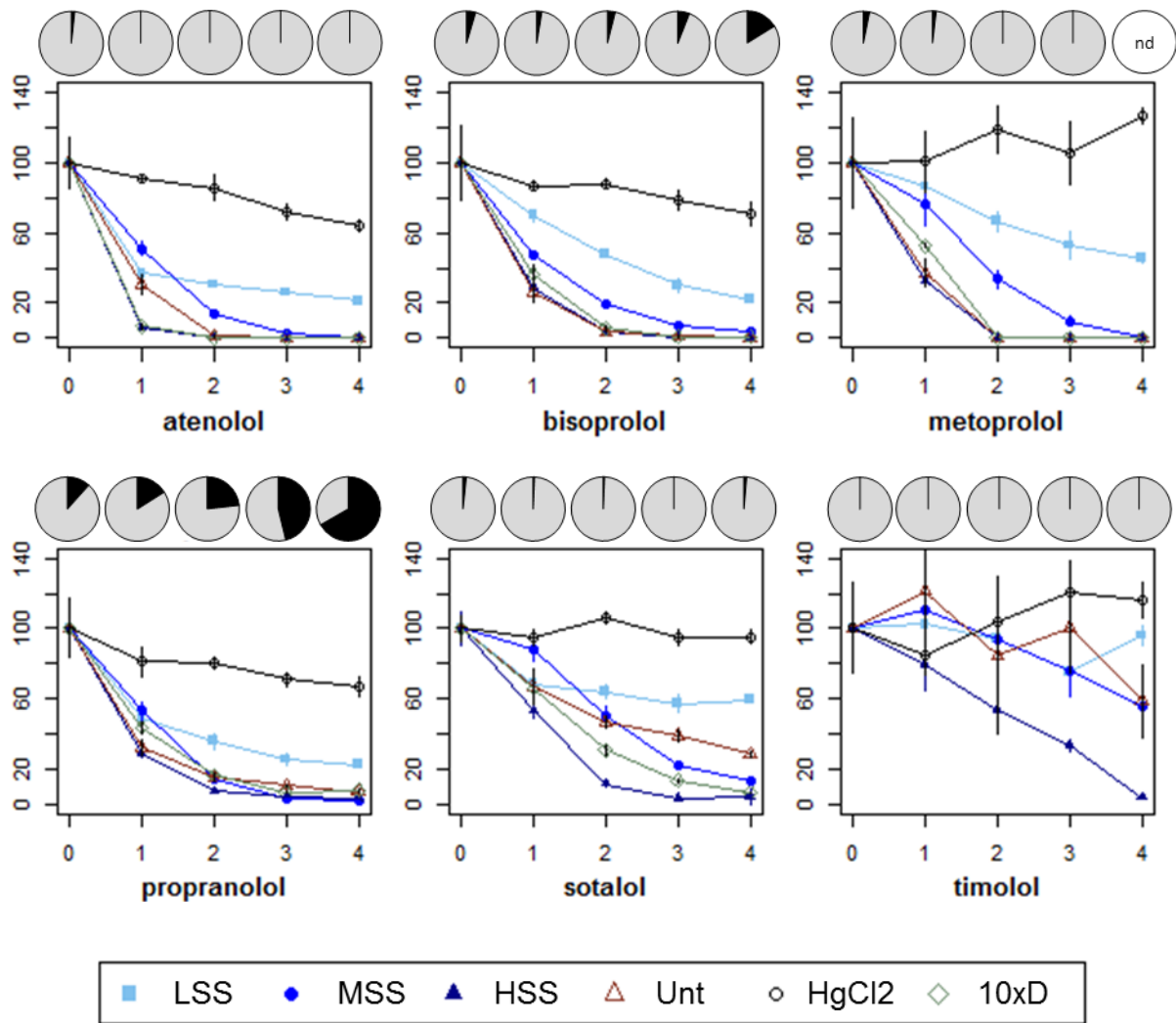
**Figure S5:** Evolution of the 43 quantified analytes. y axis: relative concentration (%), average values  $\pm$  standard deviation, n=3), x axis: incubation time (weeks). **LSS:** low SS, **MSS:** intermediate SS, **HSS:** high SS, **Unt:** untreated waste water influent, **HgCl<sub>2</sub>:** abiotic reference, **10xD:** higher WW dilution rate. Refer to table 1 for further detail. The pie charts indicate the mass balance between the dissolved (grey) and particulate (black) phases in the condition MSS with intermediate particle concentration.

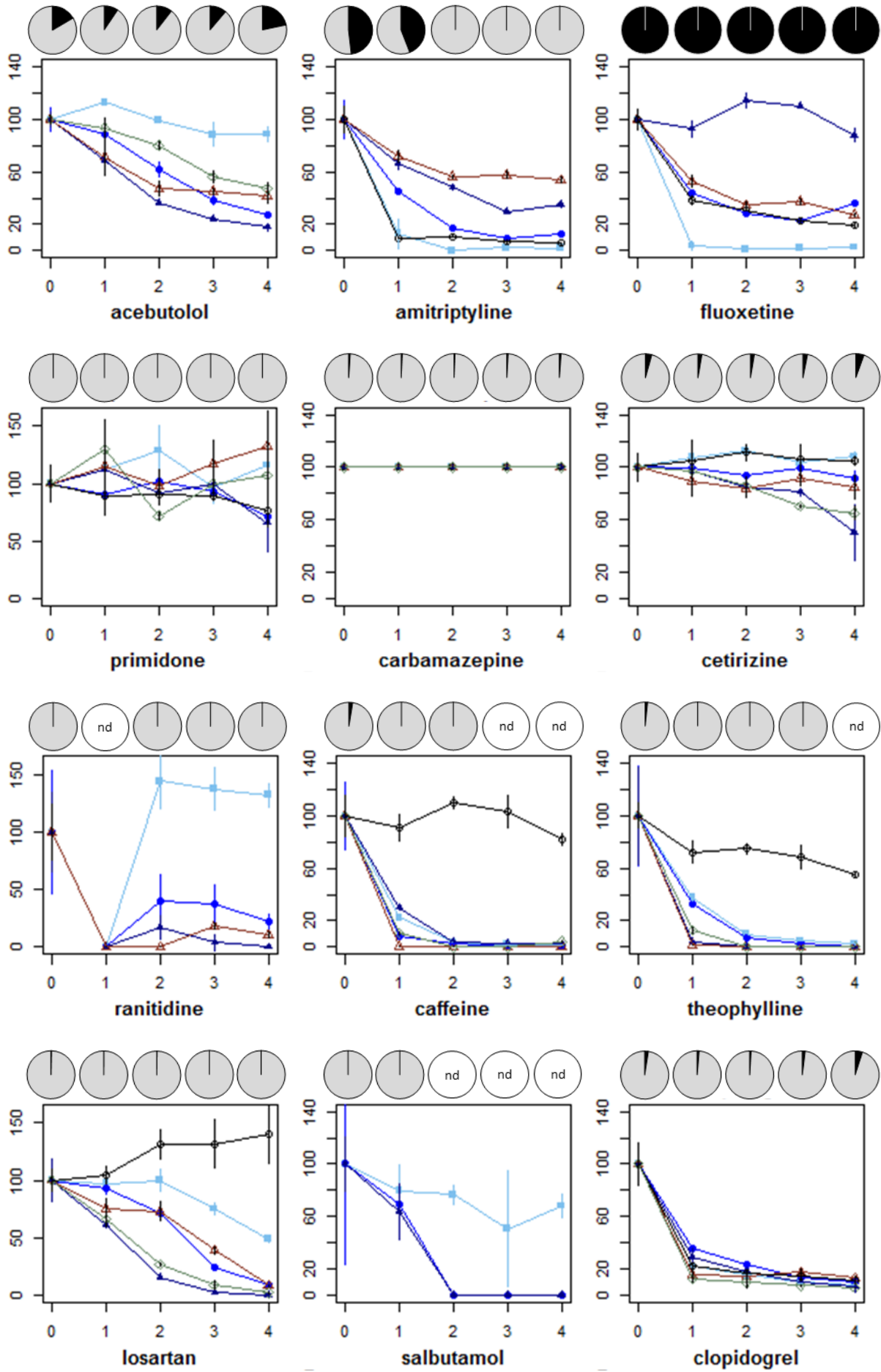


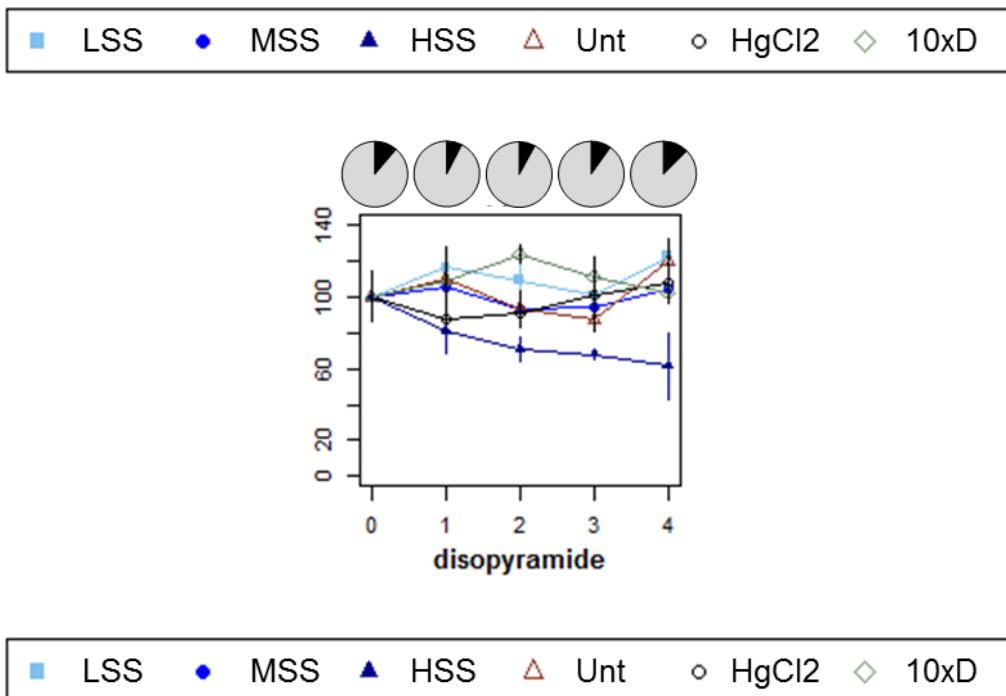










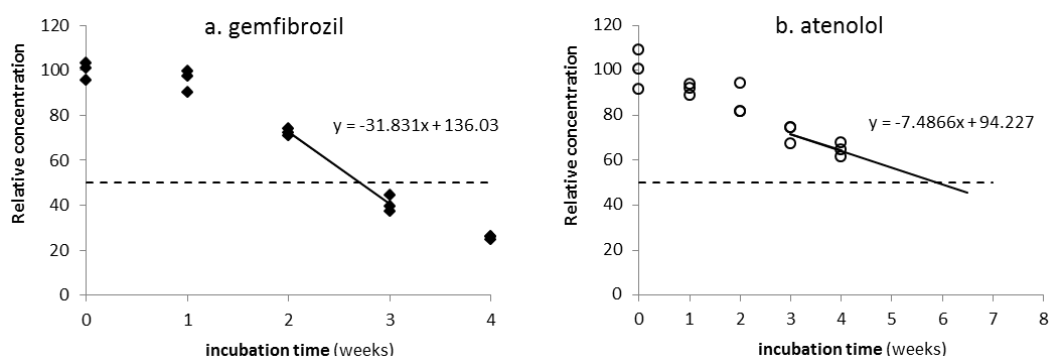


y axis: relative concentration (% , average values  $\pm$  standard deviation, n=3), x axis: incubation time (weeks). **LSS**: low SS, **MSS**: intermediate SS, **HSS**: high SS, **Unt**: untreated waste water influent, **HgCl2**: abiotic reference, **10xD**: higher WW dilution rate. Refer to table 1 for further detail. The pie charts indicate the mass balance between the dissolved (grey) and particulate (black) phases in the condition MSS with intermediate particle concentration.

## Half-life calculations

Considering that the kinetics did not follow a first order model, half-lives cannot be calculated from a simple exponential fitting curve. Calculations were made according to the following rules:

- If the relative concentration was smaller than 50 % on the 4 weeks of experiment (Fig. a), the kinetics was approximated by a linear function between the 2 points framing 50 %.
- If the relative concentration remained greater than 50 % on the 4 weeks of experiment (Fig. b), the trend given by the points « 3 weeks » and « 4 weeks » was extrapolated by a linear function,  $t_{1/2}$  being its intersection with  $y = 50$  %.



Coefficients from the linear functions were used to calculate the half-lives as well as its uncertainty, according to the following formulas, based on the mathematical methods of the propagation of uncertainties (coefficients  $a$  and  $b$  refer to the slope and the intercept of the linear function, respectively):

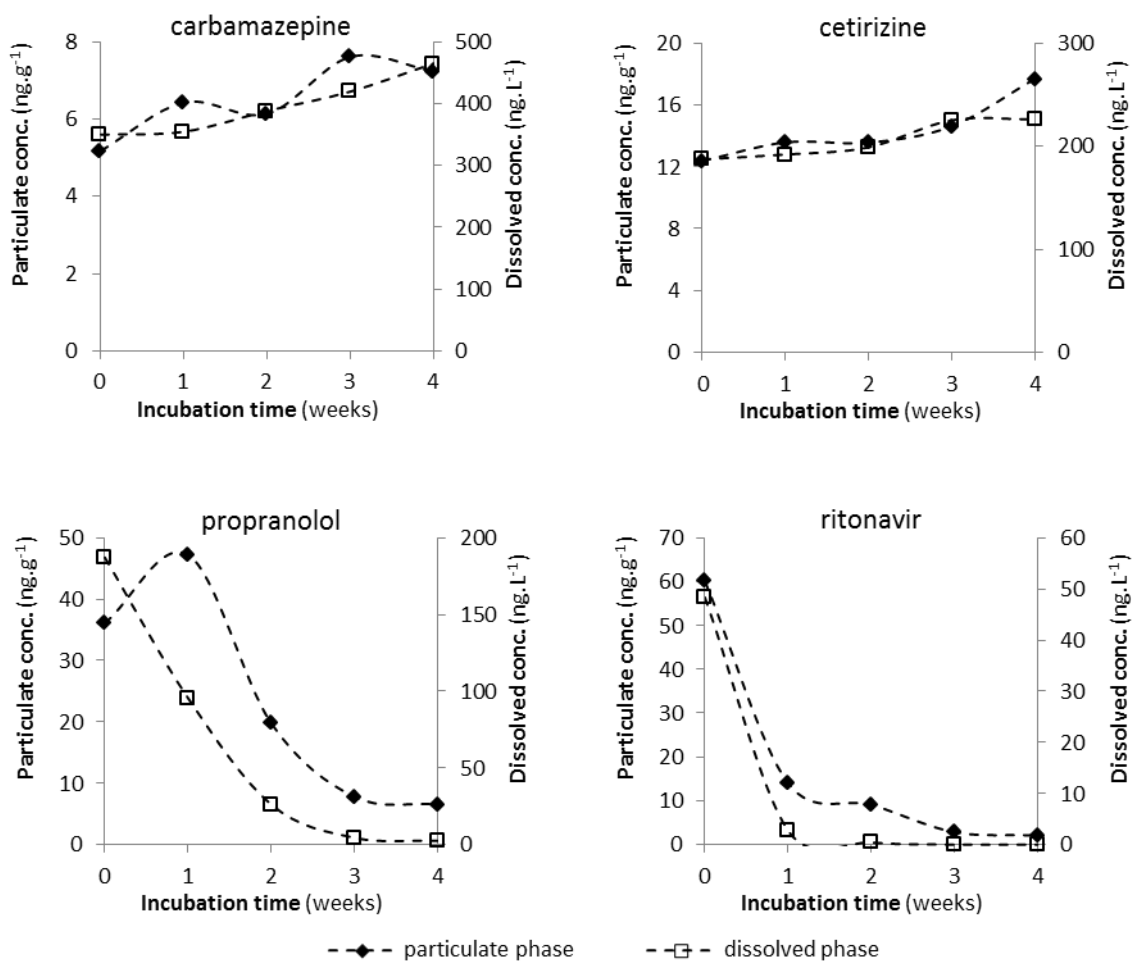
$$t_{1/2} = \frac{50}{a} - \frac{b}{a} \quad \text{and:} \quad \Delta t_{1/2} = \sqrt{\left(\Delta\left(\frac{50}{a}\right)\right)^2 + \left(\Delta\left(\frac{b}{a}\right)\right)^2}$$

$$\text{as: } \Delta\left(\frac{50}{a}\right) = \frac{\Delta a}{a^2} \quad \text{and:} \quad \Delta\left(\frac{b}{a}\right) = \frac{b}{a} \times \sqrt{\left(\frac{\Delta b}{b}\right)^2 + \left(\frac{\Delta a}{a}\right)^2}$$

$$\text{then: } \Delta t_{1/2} = \sqrt{\left(\frac{\Delta a}{a^2}\right)^2 + \left(\frac{b}{a} \times \sqrt{\left(\frac{\Delta b}{b}\right)^2 + \left(\frac{\Delta a}{a}\right)^2}\right)^2}$$

$\Delta a$  and  $\Delta b$  are the standard deviations on the slope and on the intercept given by the linear regression.

**Figure S6. Evolution of particulate and dissolved phase concentrations in the intermediate SS concentration condition (MSS).**

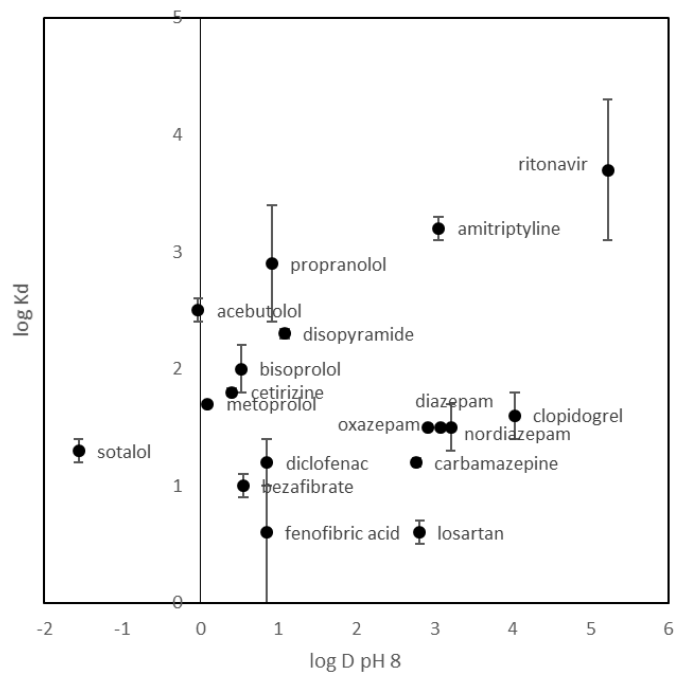


**Table S4. Average partition coefficients (log K<sub>d</sub> and K<sub>oc</sub>) in the intermediate SS concentration condition (MSS, initial pH = 8.1).**

Average values ± standard deviation (n=3).

<b>Analyte</b>	<b>log K<sub>d</sub></b>	<b>Log K<sub>oc</sub></b>
ritonavir	3.7 ± 0.6	3.0 ± 0.7
nordiazepam	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1
diazepam	1.5 ± 0.02	1.2 ± 0.1
oxazepam	1.5 ± 0.03	1.2 ± 0.2
diclofenac	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.3
bezafibrate	1 ± 0.1	0.8 ± 0.3
fenofibric acid	0.6 ± 0.6	0.6 ± 0.6
bisoprolol	2 ± 0.2	1.6 ± 0.3
metoprolol	1.7 ± 0.001	1.4 ± 0.5
propranolol	2.9 ± 0.5	2.3 ± 0.4
sotalol	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.3
acebutolol	2.5 ± 0.1	2.0 ± 0.4
amitriptyline	3.2 ± 0.1	2.6 ± 0.9
carbamazepine	1.2 ± 0.04	1.0 ± 0.2
cetirizine	1.8 ± 0.03	1.5 ± 0.3
losartan	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.2
clopidogrel	1.6 ± 0.2	1.3 ± 0.3
disopyramide	2.3 ± 0.04	1.9 ± 0.4

**Figure S7. Partition coefficient log Kd vs log D at pH 8 in the intermediate SS concentration condition (MSS).**



## 2.4 Priorization of polar pesticides and pharmaceuticals with taking account into their persistence in dissolved phase: Case of the Seine estuary

Fuster L., Pardon P., Le Menach K., Dévier M.H., Mazellier P., Budzinski H.

University of Bordeaux, EPOC UMR 5805 LPTC, Talence, France

E-mail contact: [helene.budzinski@u-bordeaux.fr](mailto:helene.budzinski@u-bordeaux.fr)

### ABSTRACT

The environmental risk assessment of organic chemicals cover generally two general aspects: exposure and hazard assessment (toxicity, bioaccumulation, persistence). Up to date, persistence in water is evaluated by *in silico* model such as BIOWIN survey model. Dissipation in dissolved phase is widely dependent on intrinsic properties of compounds but also on environmental conditions such as sunlight exposure, temperature, salinity, or presence of microorganisms. Estuaries are characterized by gradient and high variability of salinity and suspended solids. The environmental risk assessment may need to be adapted to dynamic conditions as transitional areas. This study focuses on the dissipation of polar pesticides and pharmaceuticals into turbidity maximum zone (TMZ) of the Seine estuary. Batch experiments were used in order to evaluate persistence in dissolved phase of these compounds in various conditions of solid suspension concentrations and salinity. Behaviour of pharmaceuticals and pesticides is strongly influenced by solid suspension concentrations. Because half-lives of compounds presented important variations between all experimental conditions, valuable prioritization is complex to achieve in transition zones. The use of a persistence index and measured concentration in the Seine estuary were used together and allow a categorize compounds into 5 levels of environmental concern.

\*NB: Pour des raisons de lisibilité les références bibliographiques ont été placées en fin de manuscrit.



## INTRODUCTION

Thousands of organic chemicals can reach the aquatic environment through various pathways. Although many compounds enter the aquatic environment by non-point sources pollutions (e.g. agricultural, livestock), wastewater treatment plant effluents represent a major vector of discharge (Petrie et al., 2014; Mandaric et al., 2015). Advances in environmental chemistry (Richardson and Kimura, 2016) have now made possible to detect the presence of large number of chemicals. However, only a small fraction is regulated and monitored. Pharmaceuticals and polar pesticides represent one of the most studied and thus detected class of chemicals in aquatic environment (Busch et al., 2010; Hernández et al., 2015). Their presence in surface waters (Togola and Budzinski, 2008; Wittmer et al., 2010; Lara-Martín et al., 2014; Ebele et al., 2017; Rousis et al., 2017), and estuarine waters (Keller and Coleman, 2011; Cruzeiro et al., 2016, 2017) have been confirmed by numerous works.

When considering the large number of chemicals potentially present in the environment, the scientific community seeks to establish a pertinent list of priority compounds. In order to identify relevant micropollutants per river basins, various prioritization exercises have been used based on risk assessment of organic chemical (Götz et al., 2010; Daginnus et al., 2011; Von der Ohe et al., 2011; Dulio and Slobodnik, 2015). The environmental risk assessment of organic chemicals cover generally two aspects: exposure and hazard assessment. Hazard assessment is the result of intrinsic characteristics of molecule as bioaccumulation factor or persistence in a medium. For example, Götz et al., (2010) categorized compounds according to physical and chemical properties and degradation data. In the line of REACH, persistence in water has been evaluated by *in silico* model such as BIOWIN survey model (Götz et al., 2010; Diamond et al., 2011). However, persistence of chemicals in dissolved phase is the result of various processes such as hydrolysis, dilution, sportion, biodegradation, direct or indirect photodegradation (Keller and Coleman, 2011; Seiwert et al., 2016). These processes are widely dependent on intrinsic properties of compounds but also on environmental conditions such as sunlight exposure, temperature, salinity, or presence of microorganisms (Mandaric et al., 2015). Several studies have been performed in order to evaluate the attenuation of pharmaceuticals and polar pesticides along river (Benotti and Brownawell, 2009; Yamamoto et al., 2009; Kunkel and Radke, 2011; Grenni et al., 2013; Li et al., 2016).

Estuarine systems are at the interface between fresh and sea water. As results, they are characterized by gradient and high variability of salinity and suspended solids (SS). Particulates in estuarine water and particularity within the turbidity maximum zone (TMZ), are often present at high concentration levels and are expected to play a crucial role on the fate of

organic compounds (Brenon and Le Hir, 1999b; Lanoux et al., 2013). Furthermore, estuaries include a great variety of environmental conditions that may influence persistence of organic compounds (Dauvin and Ruellet, 2009). Assessing the persistence of chemicals such as pharmaceuticals or polar pesticides represents a real challenge (Bu et al., 2016). Although chemical properties from molecular structures can be used to predict reactivity, the ability of *in silico* models to estimate real persistence in field conditions are limited (Fenner et al., 2013). Therefore, risk assessment needs to be adapted to dynamic conditions as transitional areas.

The goal of this study was to collect data focused on the dissipation in dissolved phase of organic compounds exposed to 5 experimental conditions miming variability of estuarine zone. Laboratory batch experiments simulating mixing conditions of the discharge of wastewater into the Seine estuary were performed. The influence of suspended solid concentration, salinity and abiotic control was assessed on a selection of polar pesticides and pharmaceuticals present in estuarine waters.

## **MATERIALS AND METHODS.**

### **2.1 Estuarine river water and waste water characteristics**

The watershed of the Seine is the most anthropized of France with more than 17 millions of inhabitants, and 30 % of agricultural activity concentrated only in 12 % of national surface area. Thereby, the Seine estuary received water from the most important city in France: Paris. Subsequently, the Seine estuary suffers from a high impact of anthropogenic activities. This estuary is also characterized by the formation of a turbidity maximum zone (TMZ), generally located between Honfleur and Tancarville (Romero et al., 2016). Within the TMZ, the concentration levels of suspended solids (SS) can reach 2 g.L<sup>-1</sup> (Etcheber et al., 2008). Moreover, Seine's TMZ is characterized by isoline salinity gradient generally ranging from 0.5 to 5 ‰ (Brenon and Le Hir, 1999b). Function of river discharge and tidal cycle, residence time of water can vary from 5-7 days (1000 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>) to 17-18 days (200 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>) during low flows (Even et al., 2007; Romero et al., 2016). The suspended solid concentrations can vary between 0.1 to 1 g.L<sup>-1</sup> in the TMZ (Lesourd et al., 2016).

River water (approx. 100 L) was collected in 20 L HDPE (High Density PolyEthylene) flasks from the estuarine Seine River adjacent to the city of Tancarville. Water was sampled at mid-ebb to ensure the highest SS concentration and with a salinity of 0.5 ‰. Three 20 L flasks were subjected to magnetic stirring to prevent particle settlement whilst two others were left without agitation few hours at room temperature in the dark. This treatment provided samples from the same water body with three different suspended solid conditions: un-agitated flask supernatant, stirred water and un-agitated flask concentrate from the settled particles giving respectively low (0.06 g.L<sup>-1</sup>), intermediate (0.3 g.L<sup>-1</sup>) and high (0.8 g.L<sup>-1</sup>) SS

concentrations. A few hours before the start of the experiment, large volume wastewater grab samples (approx. 80 L effluent) were collected in 20 L HDPE flasks from the major wastewater treatment plant (WWTP) of Rouen urban area in July 2015 (*Emeuraude* WWTP). This WWTP served 0.7 million population equivalents and is equipped with conventional primary sedimentation followed by aerobic biological treatment.

## 2.2 Incubation experiment set-up

Incubation experiments were performed as already undertaken in previous works on the degradation of pharmaceuticals in the estuarine Garonne river (Aminot et al., 2018). Cubic 30 L glass aquariums were filled with river water and wastewater under five conditions (Figure 72): (1) *low SS (LSS)* 8 L effluent, 17 L river water supernatant; (2) *intermediate SS (MSS)* 8 L effluent, 17 L stirred river water; (3) *high SS (HSS)* 8 L effluent, 17 L river water concentrate; (4) *high salinity (HSAL)* 8 L effluent, 17 L stirred river water with salinity of 5 ‰; (5) *sterilized condition (HgCl<sub>2</sub>)* 8 L effluent, 17 L stirred river water, mercury (II) chloride at 100 mg.L<sup>-1</sup>. Poisoning with mercury (II) chloride has already been used efficiently for water sterilization prior to pharmaceutical analysis (Yu et al., 2006; Aminot et al., 2018). Continuous mixing was performed by homemade glass rotors mounted on overhead stirrers while air was bubbled in through immersed frits at an approximate 1 L.min<sup>-1</sup> rate. The 5 experimental devices remained in an air-conditioned room (room temperature varied between 20 ± 0.8°C) in the dark.

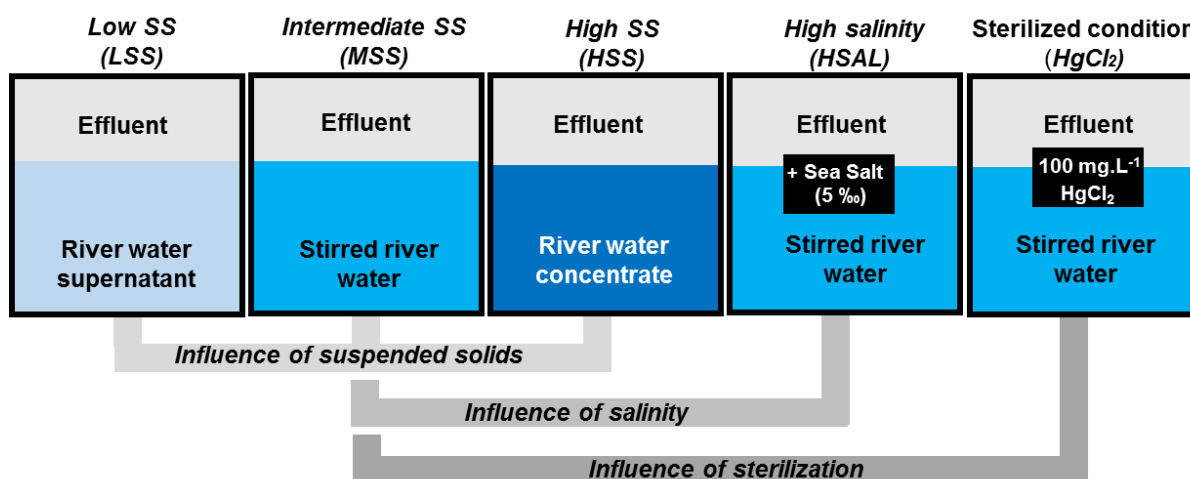


Figure 72: Experimental set up.

## 2.3 Sampling and analysis

Sampling was performed 10 min after water mixing (T<sub>0</sub>) and after 7, 14, 17, and 21 days in accordance with residence time of water in the Seine estuary (Romero et al., 2016). In parallel with conductivity, pH and water temperature measurements (note that the sterilized condition was not monitored to prevent probe damage and cross-contamination) were realized. Water

samples were filtered through glass microfiber filters, GF/F (0.7  $\mu\text{m}$ ) (Whatman, supplied by Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) and were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Fifty-one commonly used pharmaceuticals were chosen using multistep selection based upon sale statistics, occurrence and fate in aquatic environment. Selected pharmaceuticals belong to various therapeutic classes and physicochemical properties and were quantified in the studied wastewater effluent showing in preliminary studies (Aminot et al., 2015). Briefly, pharmaceutical analyses were conducted after solid phase extraction (OASIS<sup>®</sup> HLB 3 cc) by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Details on the pharmaceuticals, associated internal standards and limits of quantification (LOQ) are given in table S1.

In this work, a total of sixteen pesticides including herbicides, insectoids, fungicides and some transformation products (TPs) belonging to different chemical classes were also studied. Pesticide analyses were performed following two protocols. Water extraction was carried out according to Belles et al., (2014) and allowed to analyse 56 pesticides. Briefly, water samples (100 mL) were extracted using OASIS<sup>®</sup> HLB cartridge and analysed by liquid chromatography-coupled to mass spectrometry system. Analyses of fipronil and its degradation products (4 compounds) were performed by solid phase micro-extraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry system, as previously described by Le Coadou et al., (2016). Details on pesticides, associated internal standards and limits of quantification (LOQ) are given in table S2.

Accurate quantification was ensured by the use of sixteen labeled internal standards (given in Tables S1 and S2), added in the samples prior to extraction. One processed spiked sample and one procedural blank sample were included in each batch of 16 samples. Procedural and instrumental blanks revealed no contamination during sample preparation and analysis. Limits of detection did not exceed  $1 \text{ ng.L}^{-1}$  for 57 compounds,  $2 \text{ ng.L}^{-1}$  for 29 compounds and  $5 \text{ ng.L}^{-1}$  for 19 compounds (Tables S1 and S2).

## 2.4 Physico-chemical parameters

The evolution of conductivity, salinity, pH and dissolved oxygen during the 4-week incubation is presented in Figure S1. Initial conductivity was around  $1400 \mu\text{S.cm}^{-1}$  in conditions *LSS*, *MSS*, *HSS* and reached  $8310 \mu\text{S.cm}^{-1}$  in condition *HSAL* due to the higher sea salt content. In the 4 monitored conditions, conductivity showed a progressive 3 to 8 % increase during three weeks. This increase was attributed to a small evaporation of the water in the air-conditioned laboratory. pH values was around at initial time 7.3 and rapidly increased to 8.7 and stayed stable among the experimental conditions. *LSS*, *MSS*, *HSS*, *HSAL* and  $\text{HgCl}_2$  conditions were characterized respectively by 0.06, 0.35, 0.59, 0.38 0.40  $\text{g.L}^{-1}$  of SS. SS

concentrations varied between conditions by a factor of 100 from 0.06 to 0.6 g.L<sup>-1</sup> which are environmentally relevant levels in estuarine waters (Lesourd et al., 2016).

## **2.5 Data analysis**

### **2.6.1 Normalization of pharmaceutical concentrations**

The small evaporation over the 3 weeks of incubation caused a slight concentration increase. Considering carbamazepine's high stability (Benotti and Brownawell, 2009; Kunkel and Radke, 2012) and its good analytical robustness (Aminot et al., 2015), other analytes were normalized to carbamazepine concentration in each treatment and sampling time (with carbamazepine concentration set constant at 100 %).

### **2.6.2 Half-lives and persistence indices**

Half-lives were extrapolated from the experimental data (Table 2) by linear regression (detailed in supporting information "half-life calculation"). The application of a more sophisticated model would have required additional sampling points in the vicinity of the lag phase and more complex mathematical tools (Chong, 2009), outside the scope of this study. Analytes showing a concentration higher than 80 % of the initial concentration after 3 weeks were considered as stable. Concerning compounds undetected after 1 week, calculation gives a 3.5 d half-life but the actual half-life can be somewhat shorter.

In order to give a practical relative comparison of the compound degradabilities (including abiotic ones), a persistence index based on the compound half-lives was calculated. It consists of grading each pharmaceutical in each treatment where it was quantified. Marks depend on half-life values: < 7 d = 1; from 7 to 14 d = 20; from 14 to 21 d = 40; from 21 to 28 d = 60; > 28 d = 80; not calculable because of stable concentrations = 100. The average mark gives the persistence index (Table 2).

## **2.6 Risk assessment**

A risk assessment approach was realized in order to identify problematic pesticide and pharmaceutical loads into the estuarine Seine River. In accordance with different authors, risk quotient (RQ) is calculated with measured environmental concentrations (MEC) of each compound. Risk quotient is defined as the ratio between MEC and individual predicted non effect concentration of each chemicals (PNEC). MECs were derived of previous studies performed to the dam of the Seine estuary (internal laboratory data). All predicted-no effect concentrations (PNEC<sub>water</sub>) used in this study were obtained from the INERIS chemical portal (INERIS, 2017) , from Anses, (2017) , Von der Ohe et al., (2011) and Touseva et al., (2017).

## RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Initial concentration levels

From the 111 targeted analytes, only 15 pharmaceuticals and 18 pesticides were quantified above of LOQ, at least once whatever conditions or incubation times (details given in table S1 and S2). Concentration levels of compounds in each condition at the initial sampling are presented Table 1. Focused on twenty-two detected compounds, eight with concentration range from 1 to 10 ng.L<sup>-1</sup>, sixteen comprised between 10 and 100 ng.L<sup>-1</sup> and seven above 100 ng.L<sup>-1</sup> (table 1). Only 2 which were not detected after initial water mixing (T0) in all conditions, but were quantified in different incubation times: 1,3,4 dichlorodiphenylurea (1,3,4 DCPU), and desmethyl-diuron (1343 DCPMU). Concentration levels of each compounds were representative of levels founded in surface water and in the Seine estuary (Togola and Budzinski, 2007b). The initial concentrations (pharmaceuticals and pesticides) in wastewater effluent samples were sufficiently high to ensure that after mixing with estuarine water, concentrations were still sufficient high to be recorded and that additional spiking was not required (preventing from introduction of carrying solvents). The dilution rates were chosen as a compromise between garanting environmental relevant levels and ensure the detection of the analytes on the whole degradation kinetics.

To evaluate the impact of the addition of mercury (II) chloride and salt on the quantification of analytes, initial concentrations of contaminants in HgCl<sub>2</sub> and HSAL were compared to the average concentrations in conditions LSS, MSS and HSS which are similar in terms of effluent type and dilution. Only three compounds were considered affected by HgCl<sub>2</sub>: nevirapine, hydroxy-atrazine and carbendazime which were not detected in HgCl<sub>2</sub> condition (table S2). Concentration levels at initial time were similar in all batch conditions for the other analytes (table 1).

**Table 1. Summary of physicochemical properties and concentration levels of selected compounds at the initial sampling (T0 time).** The partitioning coefficient log Kow and log D at pH 8 were calculated using Chemaxon log D predictor tool (<https://disco.chemaxon.com/apps/demos/logd>).

Compounds	Molecular weight (g.mol <sup>-1</sup> )	log Kow	log D pH 8	Molecular formula	LSS	HgCl <sub>2</sub>	MSS	HSAL	HSS	Mean ± rsd
atenolol	266.34	0.43	-1.24	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	205	234	195	226	158	203 ± 30
bisoprolol	325.443	2.2	0.53	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub>	58	38	51	57	40	49 ± 9
caffeine	194.19	-0.55	-0.55	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	155	141	180	46	161	137 ± 53
carbamazepine	236.27	2.77	2.77	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	74	73	81	68	71	73 ± 5.0
cetirizine	388.89	0.86	0.4	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	319	351	375	384	325	351 ± 29
lorazepam	321.16	3.53	3.53	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	35	36	31	56	42	40 ± 10
metoprolol	267.36	1.76	0.09	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	32	23	29	28	30	28 ± 4
nevirapine	266.3	2.49	2.49	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O	5	n.d	10	7	5	7 ± 2
oxazepam	286.71	2.92	2.92	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	379	416	473	434	435	427 ± 34
propranolol	259.34	2.58	0.92	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	158	79	132	187	115	134 ± 41
sotalol	272.36	-0.4	-1.56	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	326	294	390	344	292	329 ± 41
ketoprofen	254.28	3.61	0.18	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	76	74	86	88	97	84 ± 9
naproxen	230.26	2.99	-0.36	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	8	6	8	8	7	8 ± 1
diclofenac	296.15	4.26	0.85	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	366	353	391	365	378	353 ± 15
ibuprofen	206.28	3.84	0.85	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	29	12	67	26	36	34 ± 21
atrazine	215.685	2.7	2.2	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>	19	19	19	19	18	18 ± 1
hydroxyatrazine	197.242	2.1	-0.97	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O	11	nd	10	10	10	10 ± 1
deisopropylatrazine	173.604	1.5	1.54	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>5</sub>	8	10	6	7	9	10 ± 2
desethylatrazine	187.631	1.1	1.12	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub>	39	38	32	45	43	38 ± 5
azoxystrobine	403.394	2.5	4.22	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	4	4	5	3	3	4 ± 1
carbendazime	191.19	1.5	1.79	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	6	n.d	12	9	9	9 ± 2
chlorotoluron	212.677	2.5	2.44	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> O	58	54	58	60	53	54 ± 3
diuron	233.092	2.9	2.53	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	35	34	34	34	36	35 ± 1
1,3,4 dichlorodiphenylurea	205.038	2.65	2.09	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Desmethyl diuron	219.065	2.9	2.31	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	nd	nd	nd	nd	nd	nd
imidacloprid	255.662	0.6	-3.84	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	24	22	28	23	23	24 ± 2
linuron	249.091	3	2.68	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	18	17	17	19	18	18 ± 1
isoproturon	206.289	2.5	2.57	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	6	7	7	7	7	7 ± 1
metolachlor	283.796	3.4	3.45	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>	5	5	5	5	5	5 ± 0
propiconazole	342.22	3.7	4.33	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	29	25	20	26	22	24 ± 3
terbutryn	241.357	3.6	2.87	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> S	14	11	16	11	12	11 ± 2
fipronil	437.141	3.75	4.49	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> OS	7	5	4	6	6	6 ± 1
fipronil sulfide	421.142	6.4	5.6	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> S	21	18	14	19	16	18 ± 3

### 3.2. Global evolution in dissolved phases and behaviour of contaminants

Evolution of total concentration (parent compounds) in dissolved phase is presented in Figure 2 in order to discriminate effect of abiotic control (Fig. 2a), solid suspension concentrations (Fig. 2b), and salinity (Fig. 2c). After 21 days, all the conditions resulted in a decrease of total concentration level ranging from 30 to 63 % (Fig. 2 a-c). With similar SS levels, HgCl<sub>2</sub> condition resulted in a lower reduction (30 %) of total concentrations than MSS condition (51%). The comparison between biotic and abiotic conditions allows to bring out implication of biodegradation process (Aminot et al., 2018). An effect of suspended solids on the rate of decrease has been also highlighted. Indeed, while a greater decrease was observed for HSS (63 %), LSS resulted in lower reduction of concentration (40%). Similar trend was observed between MSS condition and HSAL one with a reduction of total concentration

comprised between 47 % (HSAL) and 51 % (MSS) for the same SS amounts. Microorganisms as bacteria living on SS are known to play an important role in biodegradation processes (Turner and Millward, 2002; Lanoux et al., 2013). Degradation was significantly enhanced by increasing concentrations of suspended solids

Evolution of dissolved concentrations is greatly dependent of considered chemicals and experimental conditions. Three behaviors can be discriminated and are presented in the Figure 2. All data are given in the Supporting Information, (Figure S2 and Figure S3).

The *propiconazole-type* compounds (Fig. 2.d) exhibited similar kinetics of decreasing in all the conditions with similar kinetics between sterilized and biotic conditions (fipronil, oxazepam, propiconazole). Similar kinetics between abiotic and low SS controls involve abiotic degradations for these compounds.

The *atrazine-type* compounds (Fig. 2.e) exhibited constant concentrations (> 80 % T0) in all conditions over the 4 weeks (carbamazepine and atrazine). High stability of atrazine in surface water has been already reported in batch incubation with river autoclaved and non-autoclaved waters (Comber, 1999). Carbamazepine are known to be a persistent compound in various environmental conditions (Radke and Maier, 2014).

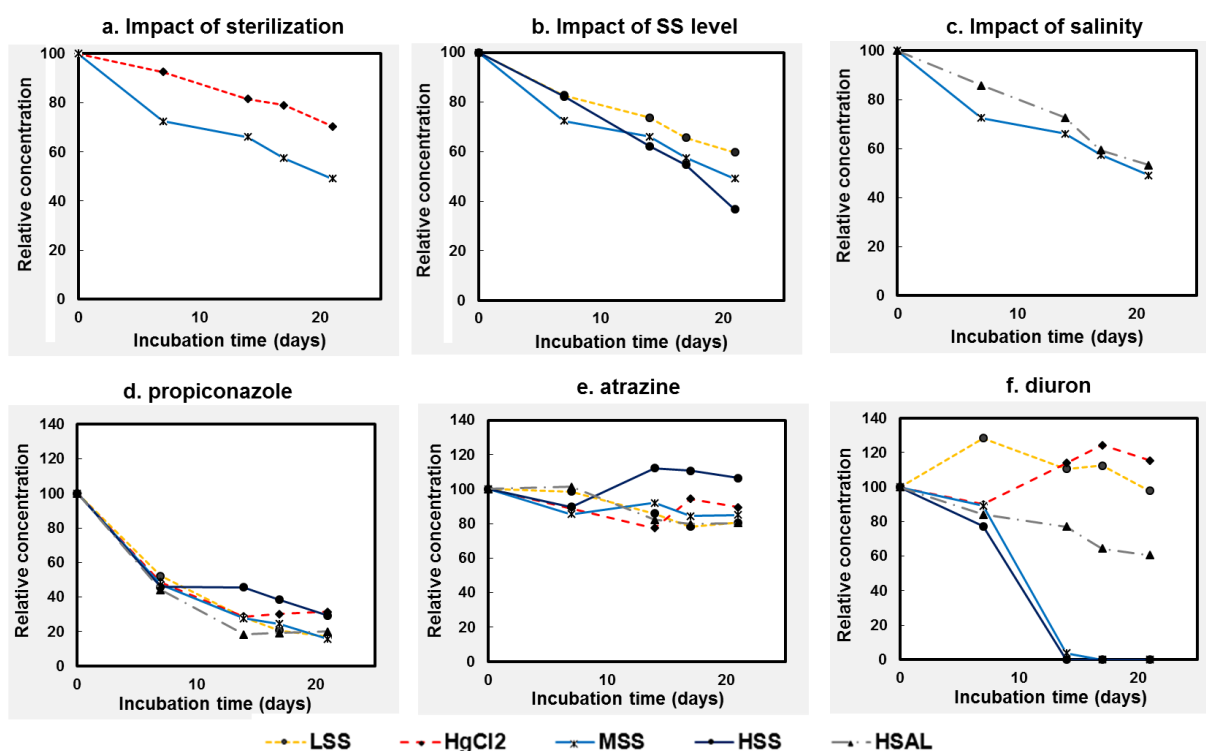


Figure 2. Evaluation of the relative concentration for total parent compounds (a-c) and focus on 3 molecules selected for the representativeness of observed behaviors (d-f).



*The diuron-type compounds* (Fig 2.f) showed constant concentrations in the sterilized condition but decreasing concentrations under the biotic conditions with faster kinetics observed for higher SS concentrations and lower salinity (atenolol, propranolol, bisoprolol, metoprolol, azoxystrobin, terbutryn, diclofenac, sotalol, lorazepam, ketoprofen, metolachlor, chlortoluron, cetirizine, imidacloprid, isoproturon and diuron). Taking into consideration pharmaceuticals in HSS, LSS, MSS and HgCl<sub>2</sub> conditions, similar trends are observed in previous a study in batch experiments with SS collected from the Garonne estuary (Aminot et al., 2018).

The HgCl<sub>2</sub> condition can be considered as an abiotic batch control experiment. Steady concentrations were observed for 15 parent compounds (7 pesticides and 8 pharmaceuticals) over the 21 days of incubation in this condition (metoprolol, chlortoluron, naproxen, ketoprofen, sotalol, diuron, lorazepam, isoproturon, metolachlor, ibuprofen, carbendazim, imidacloprid, cetirizine, carbamazepine, atrazine). Concerning pharmaceuticals, a similar stability trend of same compounds were observed in abiotic condition in a similar study realized using batch experiments mixing WWTP and with water from the estuarine Garonne River (Aminot et al., 2018). Photolysis, biotransformation and sportion constitute the most important dissipation processes involved in the attenuation of pharmaceuticals and polar pesticides in surface water (Fenner et al., 2013; Li et al., 2016). Photodegradation processes are excluded in our case because of experimental condition of this study. Due to their stable concentration in sterilized condition, the dissipation trend to be the result of biotic degradation for diuron-type compounds. Comparison of sterilized and unsterilized water sediment conditions, allowed to highlight biodegradation of compounds (ibuprofen, diclofenac, naproxen and ketoprofen) and exclude sportion and hydrolysis of compounds (Koumaki et al., 2017).

### **3.3. Persistence index of compounds in dissolved phase.**

Half-lives presented table 2 were calculated for each compound and for each conditions (see section 2.2.6). In order to compare relative compound persistence in dissolved phase, a persistence index (Table 2) was calculated as previously described by Aminot et al.,(2018). Of the 27 parent compounds quantified at initial time (see Table 1), 2 (propiconazole and terbutryn) were considered as no persistent with an average score between 5 and 9. Rapid decrease of dissolved concentrations were also observed in all condition for seven chemicals (atenolol, linuron, caffeine, propranolol, azoxystrobin, bisoprolol, and fipronil) with persistence indices comprise between 24 and 40. By contrast, two compounds (carbamazepine and atrazine) were very persistent in dissolved phase whatever the experimental conditions (score 100). Half-life times cannot be calculated in HgCl<sub>2</sub> condition because of nevirapine had been not detected. However, stability of this compounds in similar conditions (abiotic control by

HgCl<sub>2</sub> poisoning) was already reported by Aminot et al., (2018). Reduction of half-life dissipation times was significantly increase by high SS concentrations for ten chemicals (propranolol, azoxystrobine, bisoprolol, chlortoluron, diuron, lorazepam, isoproturon, carbendazim, and cetirizine). This result is consistent with previous report focusing on the fate pharmaceuticals in the TMZ of Garonne estuary (Aminot et al., 2018).

**Table 2. Calculated half-lives dissipation and persistence indices. Calculations are given in supplementary material. nc: not calculable.**

Analyte	Half-lives (days)					Persistence indexe					Mean
	LSS	HgCl <sub>2</sub>	MSS	HSAL	HSS	LSS	HgCl <sub>2</sub>	MSS	HSAL	HSS	
propiconazole	7.3	6.81	6.5	6.3	6.6	20	1	1	1	1	5
terbutryn	6.6	10.2	5.9	5.1	4.3	1	20	1	20	1	9
atenolol	11.8	14.9	7.4	12.0	10.8	20	40	20	20	20	24
linuron	12.7	12.4	12.4	10.8	13.0	20	20	40	20	20	24
caffeine	14.5	45.0	3.5	12.3	6.5	20	80	1	20	1	24
propranolol	15.2	25.0	5.1	14.3	7.7	40	60	1	40	20	32
azoxystrobine	16.4	22.1	13.6	19.4	5.5	40	60	20	40	1	32
bisoprolol	17.5	23.2	7.7	16.4	10.3	40	60	20	40	20	36
metoprolol	7.6	stable	9.3	14.6	11.7	20	80	20	40	20	36
fipronil	18.3	15.78	15.4	15.3	17.0	40	40	40	40	40	40
chlorotoluron	24.1	stable	9.9	3.5	10.8	60	100	20	1	20	40
naproxen	20.5	stable	18.0	13.0	18.1	40	100	40	20	40	48
diclofenac	21.9	44.6	13.8	22.8	16.7	60	80	20	60	40	52
oxazepam	22.9	23.7	23.6	23.1	23.7	60	60	60	60	60	60
ketoprofen	20.6	stable	24.4	17.5	22.5	40	100	60	40	60	60
sotalol	33.5	stable	19.5	21.8	14.2	80	100	40	60	40	64
diuron	stable	stable	9.5	32.2	10.2	100	100	20	80	20	64
lorazepam	stable	stable	16.7	20.3	16.0	100	100	40	60	40	68
isoproturon	stable	stable	16.1	19.8	22.0	100	100	40	40	60	68
metolachlor	23.4	stable	25.0	46.0	20.8	60	100	60	80	40	68
ibuprofen	stable	stable	20.4	stable	16.4	100	100	40	100	40	76
carbendazime	stable	stable	21.0	101.4	33.1	100	100	60	80	80	84
imidacloprid	stable	stable	stable	25.84	22.6	100	100	100	60	60	84
cetirizine	stable	stable	45.7	stable	22.2	100	100	80	100	60	88
carbamazepine	stable	stable	stable	stable	stable	100	100	100	100	100	100
nevirapine	stable	nc	stable	stable	stable	100	nc	100	100	100	100
atrazine	stable	stable	stable	stable	stable	100	100	100	100	100	100

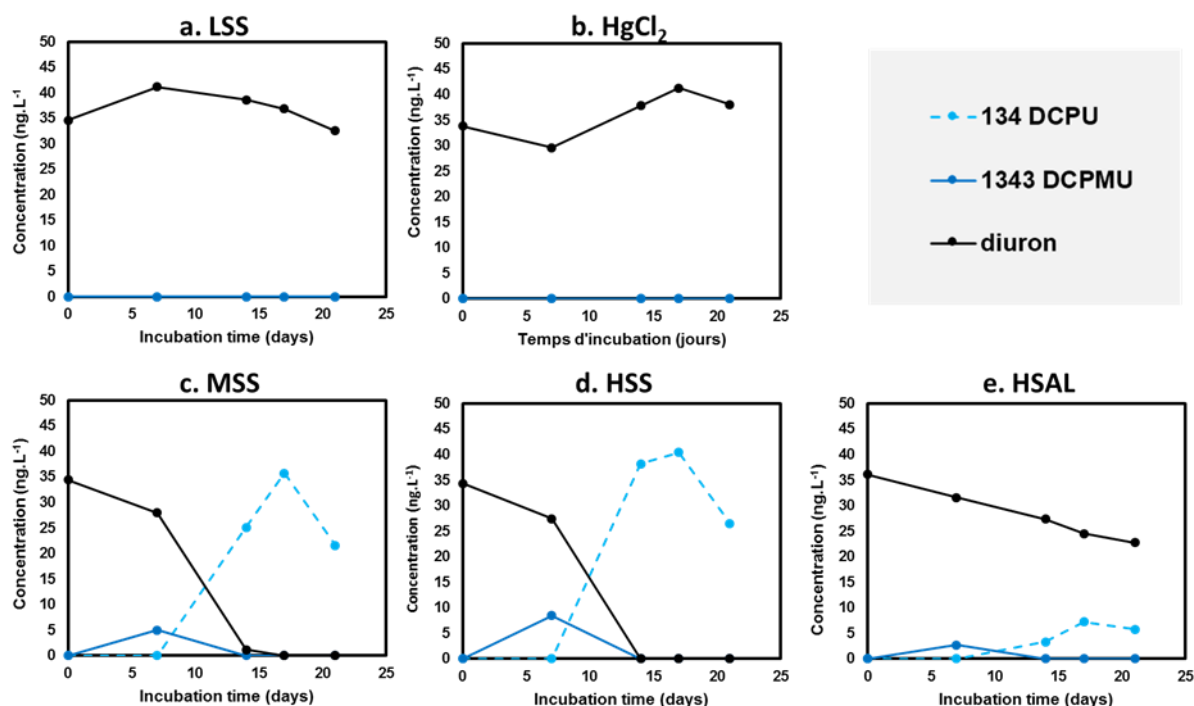
### 3.4. Study of transformation products

Evolution of three pesticides (atrazine, fipronil and diuron) and formation of their respective transformation products have been particularly studied. Calculated half-life times of TPs is complex because their presence results in balance between potential degradation of parent compounds and their own degradation. Effectively all transformation products resulting from fipronil and atrazine were initially present at initial time. Thus, discrimination between stability of TP concentrations and balance between creation/ degradation was difficult to establish. Ratios between TP and parent compound concentrations did not exhibit any difference for fipronil and atrazine whatever conditions.

However, concerning diuron and two of its TPs (1,3,4 DCPU and 1343 DCPMU), differential kinetics were observed depending on environmental conditions (Fig.4). No

evolution of diuron concentrations associated with no detection of TPs were observed in LSS and  $\text{HgCl}_2$  conditions (Fig. 4a and 4b). Rapid decrease of dissolved concentrations were observed for diuron (below LOQ after 15 days) in the MSS and HSS conditions (Fig. 4c and 4d). A decrease of diuron concentrations (35 to 25  $\text{ng.L}^{-1}$ ) was noted for the HSAL condition (fig. 4e). Sportive behaviour of diuron has been already studied using batch experiments reproducing estuarine water (Comber, 1999): although particulate matter enhanced sorption of this compounds, more 90 % of this compounds was present in dissolved phase (Comber, 1999). Rely on the prerequisites that diuron is not volatile (Giacomazzi and Cochet, 2004) and photodegradation phenomena minor in our experimental conditions, biodegradation tends to be the major process governing the loss of diuron concentrations. In spite of the lack of data for the biodegradation of diuron in environmental water, previous studies in soil, in activated sludge batch reactors, or using specific bacteria and fungi have also shown that diuron can be biodegraded under aerobic conditions and associated with a successive formations of DCPMU and DCPMU (Giacomazzi and Cochet, 2004).

Declining of diuron concentration was associated with an increase of concentration levels of 1343 DCPMU and more especially of 1,3,4 DCPU. Concentration of 1,3,4 DCPU rises reached 35-40  $\text{ng.L}^{-1}$  in the MSS and HSS conditions after 15 days of incubation times. In MSS, HSS and HSAL conditions, the decrease of DCPMU was rapid and followed by an increase of DCPU resulting in demethylation reaction. These results tend to highlight the formation of transformation products in biotic conditions and in particular with high level of SS. Previous studies have reported the aerobic degradation of diuron in soil (Cullington and Walker, 1999), in activated sludge (Stasinakis et al., 2009) and freshwater sediments (Pesce et al., 2010) with the production of metabolic products such as DCPMU and DCPU. Data available on toxicity and its metabolites have been highlighted their respective toxicity (Tixier et al., 2001; Stasinakis et al., 2009), embryotoxicity and genotoxicity (Behrens et al., 2016). This result clearly showed the importance of including transformation products in persistence assessments (Escher and Fenner, 2011).



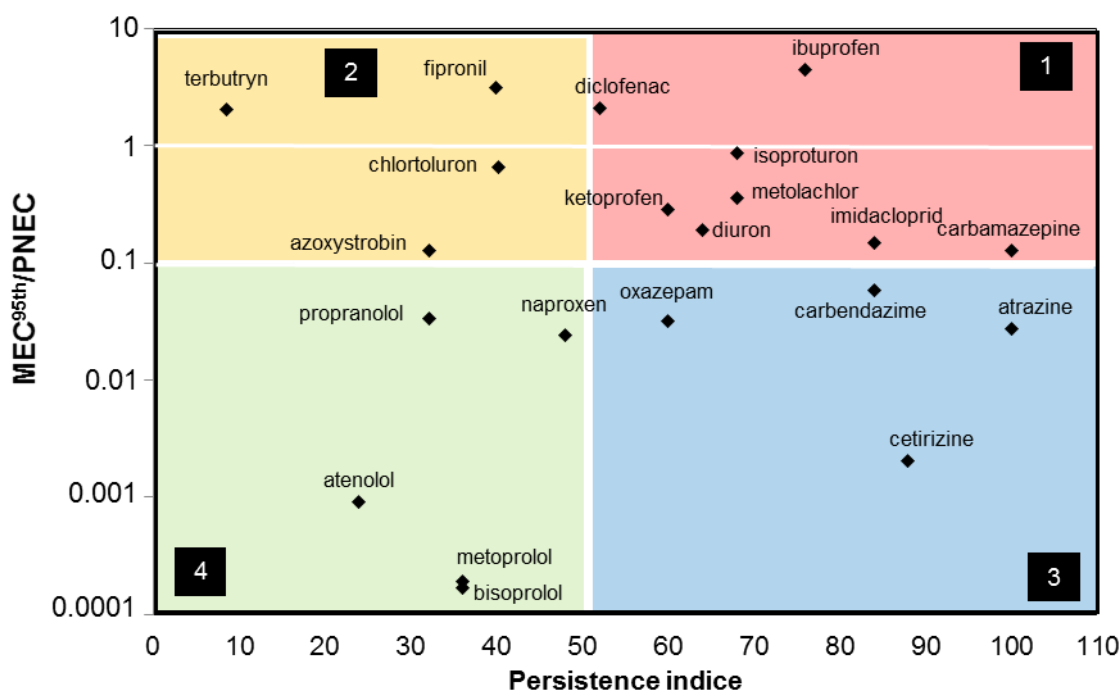
**Figure 3. Evolution of dissolved concentrations of diuron and of its TPs (134 DCPU and 1343 DCPMU) during 21 days of incubation under LSS (a), HgCl<sub>2</sub> (b), MSS (c), HSS (d), HSAL (e) conditions.**

### 3.5. Implication on the environmental risk assessment to the Seine estuary.

Estuarine environment represents a highly variable zone with important fluctuations of salinity, SS concentrations and microfauna's composition. In the estuarine Seine River, the SS concentrations have seasonal variations due to flow periods and intra-day variations resulting from the tidal cycle (Turner and Millward, 2002). Classical prioritization approach including persistence data which were calculated by regulatory studies such as OECD test (Organization for economic co-operation and development). However, the high variability of attenuation is a critical factor for environmental risk assessment (Radke and Maier, 2014).

A risk assessment approach relied on score for risk quotient and with persistence, was realized in order to prioritize relevant compounds for the Seine estuary. Because of half-lives of compounds presented important variations between all experimental conditions, valuable prioritization is complex. Effectively, with low SS concentration or abiotic condition, from 8 to 13 compounds are considered very stable and can be classified as high concern compounds (Fig. S4). However, with increasing salinity or SS content, persistence in dissolved phases drastically decrease. In estuarine zones, compounds are exposed to various conditions and thus differential times of persistence. Thus, in order to classified compounds, persistence indices of compounds in the Seine estuary was used (see Table 2). A comparison of ratio MEC<sup>95th</sup>/PNEC (risk quotient; RQ) and their respective persistence index is presented in figure

4. With this approach, 4 groups of compounds can be distinguished (Fig. 4): (1) *Category 4 (low RQ, low persistence)* with 6 compounds (naproxen, oxazepam, propranolol, atenolol, metoprolol and bisoprolol) classified as lower concern compounds (in green, Fig.4.) ; (2) *Category 3 (low RQ, high persistence)* with 4 molecules (atrazine, carbendazime, oxazepam, and cetirizine) were placed in the group 4 (blue, Fig. 4) ; *Category 2 (high RQ, low persistence)*: with 4 compounds (terbutryn, fipronil, chlortoluron and azoxystrobin) and (4) *Category 1 (high RQ, low persistence)* with seven compounds ibuprofen, diclofenac, isotroturon, metolachlor, imidacloprid, carbamazepine, ketoprofen, diuron, and carbamazepine (in red, Fig.4).



**Figure 4. Global risk assessment of pharmaceuticals and pesticides in dissolved phase of the Seine estuary.**

## CONCLUSION

The quantification of 33 compounds amount the 112 screened ones enabled the evaluation of their decay in dissolved phase. Three behaviors have been highlighted: propiconazole, atrazine and diuron types. Persistent behavior was observed only for 3 molecules during the 4 weeks of experiment (carbamazepine, névirapine and atrazine). Compounds classed as diuron-type tend to have a degradation in biotic conditions. This degradation was enhanced in particular by increasing concentrations of SS. The formation of diuron metabolites (1343 DCPMU and 1,3,4 DCPU) only in biotic conditions confirms that biodegradation seems to be the major process involved in degradation of diuron-type compounds.

Thus, in natural aquatic systems and in particular in estuaries, the kinetics of attenuation is water widely-dependent by SS concentrations. Due the variability of environmental condition

and behavior of chemicals, risk assessment was adapted to transition water. A risk assessment approach relied on score for risk quotient and persistence, was realized in order to prioritize relevant compounds for the Seine estuary. Compounds of categories 1–3 are potentially relevant for surface water quality of the Seine estuary. In order to improve risk assessment, formation of transformations products should be considered and included in prioritization schemes.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors also would to thank the multidisciplinary Seine Aval scientific program (CRAPPSE project), sponsored by the GIP Seine-Aval (<http://seine-aval.crihan.fr/web/>). This study has been carried out in the framework of the Investments for the future program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX 45).

## SUPPLEMENTARY INFORMATIONS

**Table S1: Pharmaceuticals quantified above their limits of quantification (LOQ)**

Analyte	Therapeutic classes	CAS n°	Associated internal standard	Ionization mode	LOQ (ng.L <sup>-1</sup> )	LSS	HgCl2	MSS	HSAL	HSS
abacavir	Antiretroviral	136470-78-5	abacavir d4	ESI pos	0.9					
indinavir	Antiretroviral	150378-17-9	indinavir d6	ESI pos	1.2					
lamivudine	Antiretroviral	134678-17-4	lamivudine 15N2-13C	ESI pos	0.9					
nefinavir	Antiretroviral	159989-64-7	nevirapine d3	ESI pos	1.8					
nevirapine	Antiretroviral	129618-40-2	nevirapine d3	ESI pos	1.1	x		x	x	x
ritonavir	Antiretroviral	155213-67-5	nevirapine d3	ESI pos	1.0					
saquinavir	Antiretroviral	127779-20-8	nevirapine d3	ESI pos	1.3					
zidovudine	Antiretroviral	30516-87-1	zidovudine d3	ESI neg	2.2					
bromazepam	Psycholeptic	1812-30-2	bromazepam d4	ESI pos	0.8					
nordiazepam	Psycholeptic	1088-11-5	nordiazepam d5	ESI pos	1.9					
alprazolam	Psycholeptic	28981-97-7	diazepam d5	ESI pos	0.7					
diazepam	Psycholeptic	439-14-5	diazepam d5	ESI pos	1.3					
oxazepam	Psycholeptic	35295-88-6	oxazepam d5	ESI pos	1.3	x	x	x	x	x
lorazepam	Psycholeptic	846-49-1	diazepam d5	ESI pos	1.1					
clonazepam	Psycholeptic	106955-87-7	diazepam d5	ESI pos	0.7					
meprobamate	Psycholeptic	57-53-4	meprobamate d3	ESI pos	3.1					
ketoprofen	Analgesic	172964-50-0	ketoprofen d3	ESI neg	1.9	x	x	x	x	x
naproxen	Analgesic	23981-80-8	naproxen d3	ESI neg	0.9	x	x	x	x	x
diclofenac	Analgesic	15307-86-5	diclofenac d4	ESI neg	2.8	x	x	x	x	x
ibuprofen	Analgesic	58560-75-1	ibuprofen d3	ESI neg	1.2	x	x	x	x	x
2-hydroxy-ibuprofen	Analgesic	51146-55-5	OH ibuprofen d6	ESI neg	4.8					
paracetamol	Analgesic	2248282.0	paracetamol d4	ESI pos	1.2					
gemfibrozil	Lipopenics	25812-30-0	gemfibrozil d6	ESI pos	1.1					
bezafibrate	Lipopenics	41859-67-0	bezafibrate d6	ESI pos	0.8					
4-chlorobenzoic acid	Lipopenics	74-11-3	diclofenac d4	ESI neg	3.6					
fenofibric acid	Lipopenics	42017-89-0	fenofibric acid d6	ESI neg	1.5	x	x	x	x	x
clofibrac acid	Lipopenics	882-09-7	clofibrac acid d4	ESI neg	0.5					
pravastatin	Lipopenics	81093-37-0	pravastatin d3	ESI neg	4.5					
atorvastatin	Lipopenics	134523-00-5	atorvastatin d5	ESI neg	1.3					
atenolol	β-blocker	60966-51-0	atenolol d7	ESI pos	2.4	x	x	x	x	x
bisoprolol	β-blocker	66722-44-9	propranolol d7	ESI pos	9.1	x	x	x	x	x
metoprolol	β-blocker	37350-58-6	propranolol d7	ESI pos	4.7	x	x	x	x	x
propranolol	β-blocker	13013-17-7	propranolol d7	ESI pos	5.1	x	x	x	x	x
sotalol	β-blocker	27948-47-6	sotalol d7	ESI pos	0.7	x	x	x	x	x
timolol	β-blocker	131628-37-0	propranolol d7	ESI pos	4.8					
acebutolol	β-blocker	37517-30-9	propranolol d7	ESI pos	1.1	x		x	x	x
imipramine	Antidepressant	50-49-7	amitriptyline d6	ESI pos	3.2					
doxepin	Antidepressant	1668-19-5	amitriptyline d6	ESI pos	2.0					
amitriptyline	Antidepressant	50-48-6	amitriptyline d6	ESI pos	1.4					
fluoxetine	Antidepressant	57226-07-0	fluoxetine d5	ESI pos	5.6					
primidone	Anticonvulsant	125-33-7	primidone d5	ESI pos	2.1					
carbamazepine	Anticonvulsant	298-46-4	carbamazepine d10	ESI pos	0.3	x	x	x	x	x
cetirizine	Antihistaminic	83881-51-0	cetirizine d8	ESI pos	0.5	x	x	x	x	x
ranitidine	Antihistaminic	66357-35-5	diazepam d5	ESI pos	1.4					
clenbuterol	β2 agonist	37148-27-9	diazepam d5	ESI pos	0.6					
caffeine	Stimulant	71701-02-5	caffeine d9	ESI pos	1.9	x	x	x	x	x
theophylline	Bronchodilatator	58-55-9	caffeine d9	ESI pos	0.6					
sildenafil	PDE-5-inhibitor	139755-83-2	sildenafil d3	ESI pos	0.6					
losartan	Antihypertensive	114798-26-4	diazepam d5	ESI pos	1.1					
salbutamol	Bronchodilatator	18559-94-9	diazepam d5	ESI pos	0.8					
clopidogrel	Antiplatelet agent	113665-84-2	diazepam d5	ESI pos	1.0					
terbutaline	Bronchodilatator	46719-29-3	diazepam d5	ESI pos	1.1					

**Table S2: Pesticides quantified above their limits of quantification (LOQ)**

Analyte	Targeted action	CAS n°	Associated internal standard	LOQ (ng.L <sup>-1</sup> )	LSS	HgCl2	MSS	HSAL	HSS
1,2,4 DCPU	TP. of diuron	5428-50-2	diuron d6	1.65					
1,3,4 DCPU	TP. of diuron	155998	diuron d6	2.71	x	x	x	x	x
1343 DCPMU	TP. of diuron	3567-62-2	diuron d6	5.11	x	x	x	x	x
acetochlor	Herbicide	34256-82-1	alachlor d13	1.49					
acetochlor ESA	TP. of acetochlor	947601-84-5	alachlor d13	3.46					
acetochlor OA	TP. of acetochlor	194992-44-4	alachlor d13	7.08					
alachlor	Herbicide	15972-60-8	alachlor d13	7.32					
amethryn	Herbicide	834-12-8	terbutylazine d5	1.19					
atrazine	Herbicide	1912-24-9	atrazine d5	0.63	x	x	x	x	x
hydroxy-atrazine	TP. of atrazine	2163-68-0	atrazine 2 hydroxy d5	0.19	x		x	x	x
azoxystrobine	Fungicide	131860-33-8	carbofuran d3	0.71	x	x	x	x	x
bentazone	Herbicide	82657-04-3	bentazone d7	1.15					
carbendazime	Fungicide	10650-21-7	carbendazime d3	0.29	x	x	x	x	x
carbetamide	Herbicide	16118-49-3	carbetamide d5	0.12					
carbofuran	Insectoid	1563-66-2	carbofuran d3	0.22					
chlorotoluron	Herbicide	15545-48-9	chlorotoluron d6	4.13	x	x	x	x	x
chlorsulfuron	Herbicide	64902-72-3	diuron d6	0.18					
cyanazine	Herbicide	21725-46-2	hexazinone d6	0.35					
cyromazine	Insectoid	66215-27-8	simazine d10	2.40					
DIA	TP. of atrazine	1007-28-9	DIA d5	3.34	x	x	x	x	x
DEA	TP. of atrazine	6190-65-4	DIA d5	0.19	x	x	x	x	x
diflufenican	Herbicide	83164-33-4	carbofuran d3	0.52					
dimetachlor	Herbicide	50563-36-5	terbutryn d5	0.75					
diuron	Herbicide	330-54-1	diuron d6	0.12	x	x	x	x	x
DMSA	TP. of dichlofluanide	4710-17-2	carbofuran d3	0.04					
DMST	TP. tolylfluanide	731-27-1	carbofuran d3	1.39					
flazasulfuron	Herbicide	104040-78-0	carbofuran d3	0.07					
fluazifop-p-butyl	Herbicide	79241-46-6	carbofuran d3	0.55					
flusilazole	Fungicide	85509-19-9	carbofuran d3	0.25					
hexazinone	Herbicide	51235-04-2	hexazinone d6	0.23	x	x	x	x	x
hydroxy simazine	TP of simazine	2599-11-3	atrazine d5	0.62					
imidacloprid	Insectoid	138261-41-3	imidacloprid d4	0.11	x	x	x	x	x
irgarol®	Herbicide	28159-98-0	irgarol d9	0.02					
isoproturon	Herbicide	34123-59-6	isoproturon D6	0.46	x	x	x	x	x
linuron	Herbicide	330-55-2	linuron d6	0.17	x	x	x	x	x
metazachlor	Herbicide	67129-08-2	terbutryn d5	0.27	x	x	x	x	x
methiocarb	Insectoid	2032-65-7	carbofuran d3	0.22					
metolachlor	Herbicide	51218-45-2	métolachlore d6	6.71	x	x	x	x	x
metolachlor ESA	TP. of metolachlor	947601-85-6	carbofuran d3	1.49					
metolachlor OA	TP. of metolachlor	152019-73-3	carbofuran d3	0.09					
metoxuron	Herbicide	19937-59-8	metoxuron d6	0.24					
metsulfuron-methyl	Herbicide	74223-64-6	metsulfuron-methyl d3	2.31					
nicosulfuron	Herbicide	111991-09-4	nicosulfuron d6	0.09					
promethryn	Herbicide	7287-19-6	promethryn d14	0.27					
propachlor	Herbicide	1918-1617	terbutylazine d5	0.74					
propazine	Herbicide	139-40-2	propazine d14	1.25					
propiconazole	Fungicide	60207-90-1	carbofuran d3	1.16	x	x	x	x	x
prosulfuron	Herbicide	94125-34-5	carbofuran d3	0.28					
pymethrozine	Insectoid	123312-89-0	terbutylazine d5	1.00					
quizalofop-ethyl	Herbicide	100646-51-3	quizalofop-ethyl d3	0.38					
quizalofop-p-tefuryl	Herbicide	200509-41-7	carbofuran d3	3.44					
simazine	Herbicide	122-34-9	simazine d10	0.07					
terbutryn	Herbicide	886-50-0	terbutryn D5	0.36	x	x	x	x	x
terbutylazine	Herbicide	5915-41-3	terbutylazine d5	0.53					
terbutylazine desethyl	TP. of terbutylazine	30125-63-4	terbutylazine desethyl d9	0.81					
thiamethoxan	Insectoid	153719-23-4	thiamethoxan d3	0.44					
fipronil	Insectoid	120068-37-3	fipronil 15N 13C	0.09	x	x	x	x	x
fipronil desulfenil	TP. of fipronil	205650-65-3	fipronil 15N 13C	0.01	x	x	x	x	x
fipronil sulfide	TP. of fipronil	120067-83-6	fipronil 15N 13C	0.12	x	x	x	x	x
fipronil sulfone	TP. of fipronil	120068-36-2	fipronil 15N 13C	0.26	x	x	x	x	x



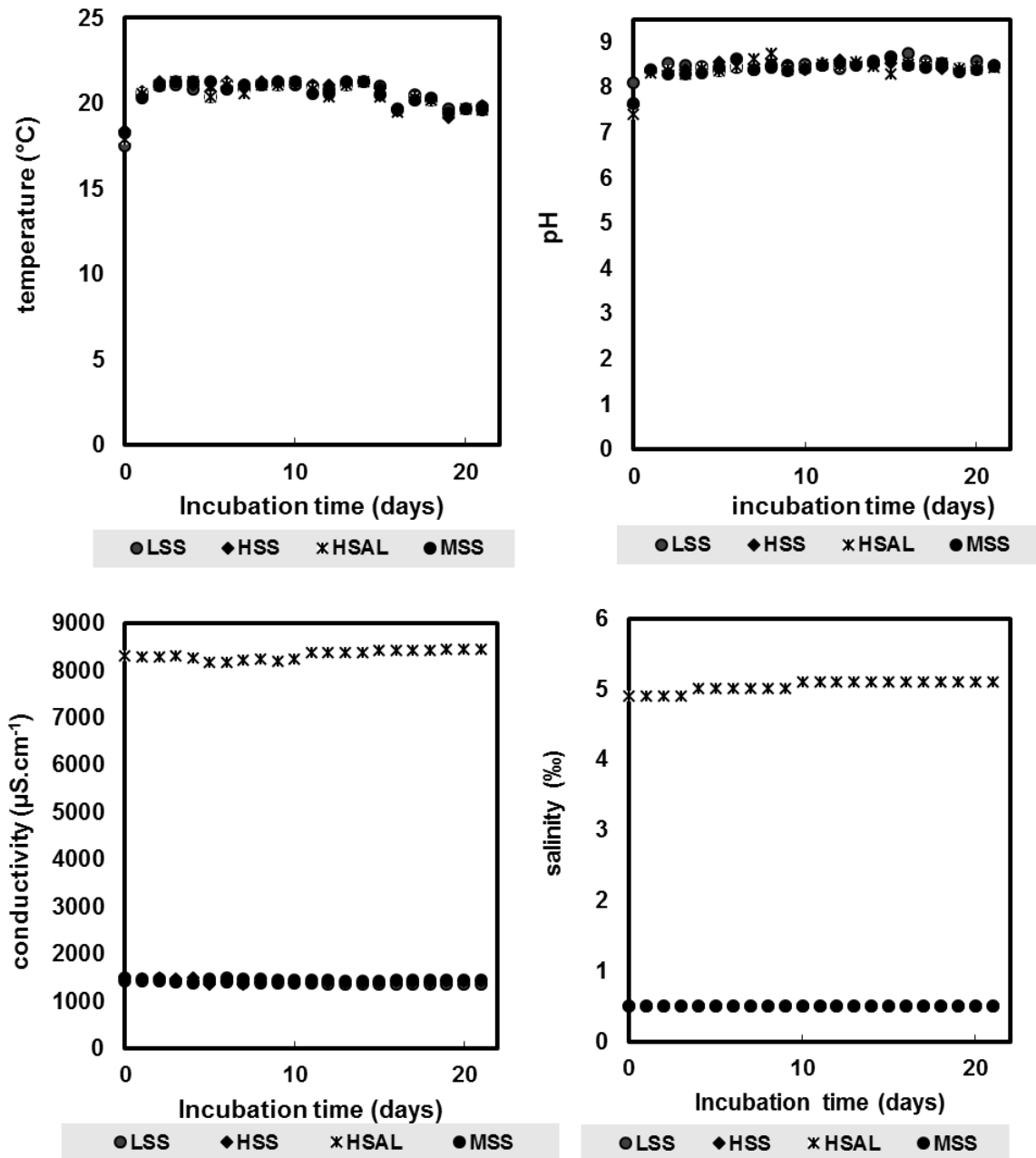
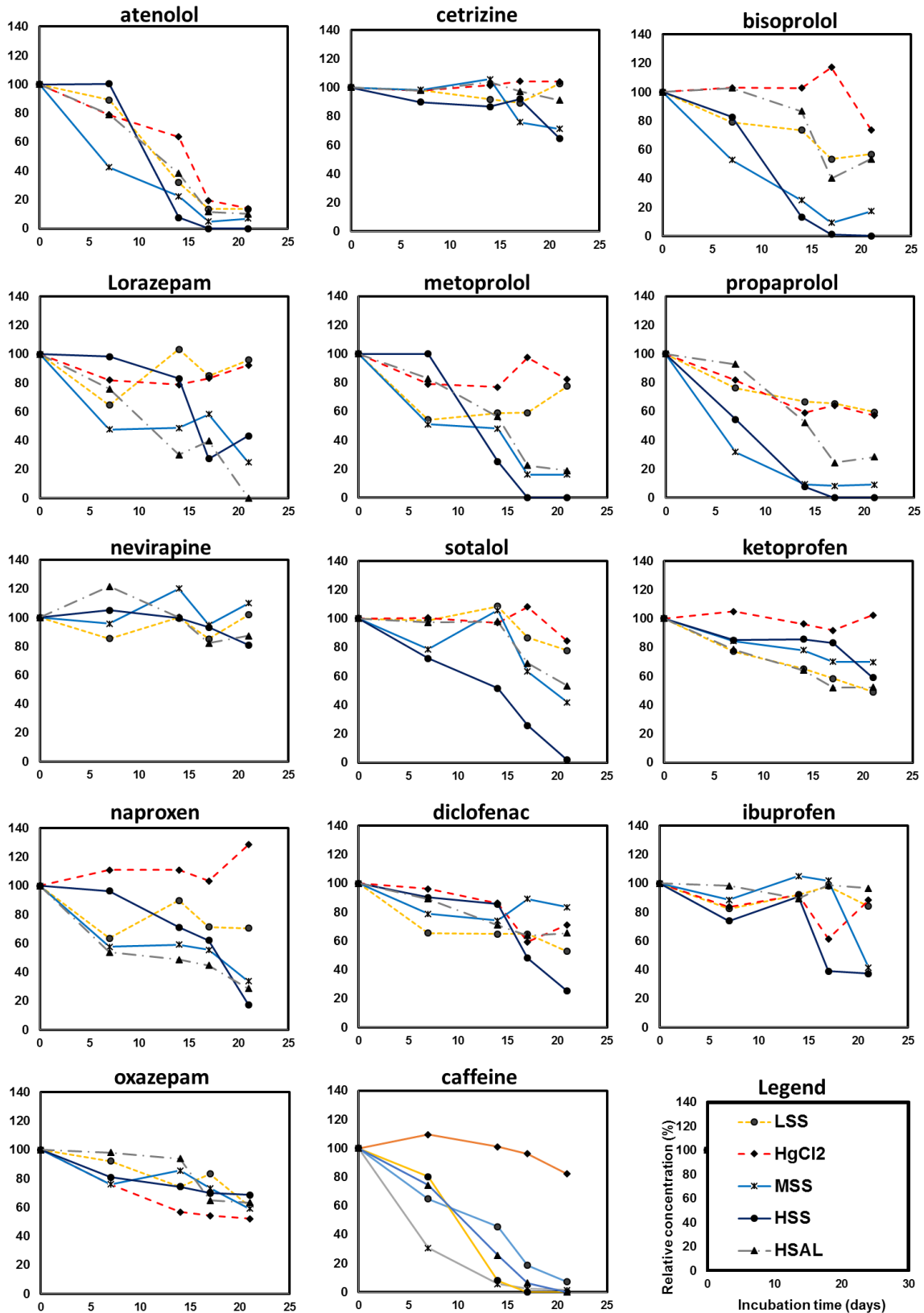
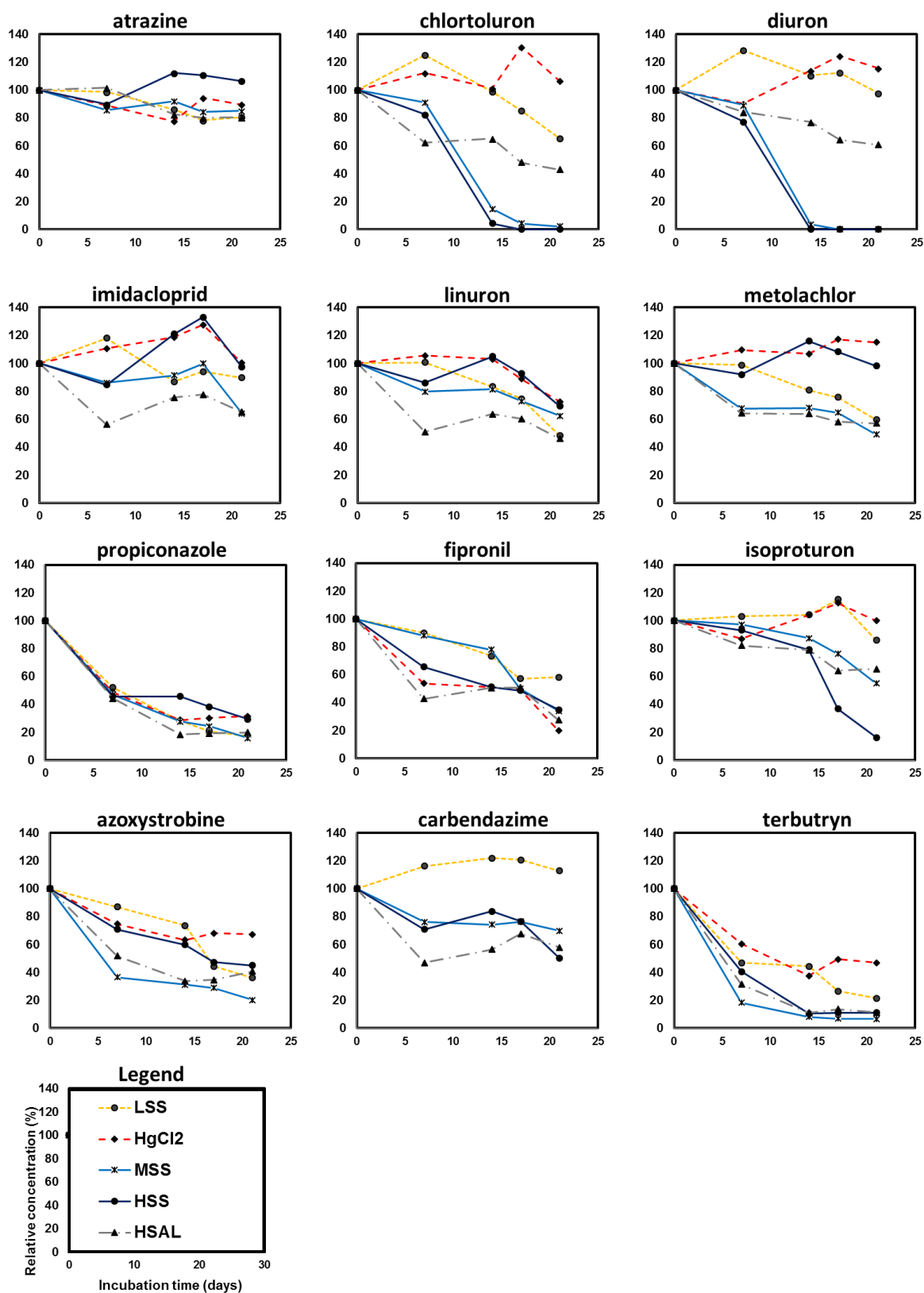


Figure S1. Evolution of the physicochemical parameters measured in each treatment (%).



**Figure S2.** Evolution of the pharmaceuticals analytes. y axis: relative concentration (% , average values  $\pm$  standard deviation, n=3), x axis: incubation time (weeks. Refer to table 1 for further detail.



**Figure S3.** Evolution of the pharmaceuticals analytes. y axis: relative concentration (%; average values  $\pm$  standard deviation, n=3), x axis: incubation time (weeks. Refer to table 1 for further detail.

### Half-life calculations

Considering that the kinetics did not follow a first order model, half-lives cannot be calculated from a simple exponential fitting curve. Calculations were made according to the following rules:

- If the relative concentration was smaller than 50 % on the 4 weeks of experiment (Fig. a), the kinetics was approximated by a linear function between the 2 points framing 50 %.
- If the relative concentration remained greater than 50 % on the 4 weeks of experiment (Fig. b), the trend given by the points « 3 weeks » and « 4 weeks » was extrapolated by a linear function,  $t_{1/2}$  being its intersection with  $y = 50 \%$ .

Coefficients from the linear functions were used to calculate the half-lives, according to the following formula :

$$t_{1/2} = \frac{50}{a} - \frac{b}{a}$$





## CHAPITRE V

### Apports de la spectrométrie de masse haute résolution à la surveillance chimique

#### Résumé

*Les études réalisées au niveau de l'estuaire de Seine ont permis de mettre en évidence une large gamme de contaminants organiques incluant des pesticides, des composés pharmaceutiques, des filtres UV et des molécules biologiquement actives. Cependant ces méthodes sont limitées aux molécules déjà connues et identifiées. Un point central de l'évaluation des molécules pertinentes réside dans l'identification de nouvelles molécules connues et inconnues dans les écosystèmes aquatiques. Ainsi l'identification de nouvelles molécules et de produits de transformation peut être abordée grâce à la spectrométrie de masse haute résolution par différentes approches : criblages non ciblés et suspects de matrices environnementales, études en laboratoire et approche dirigée par les effets. Ce chapitre s'intéresse à l'application de ces différentes approches visant à identifier de nouvelles molécules non initialement recherchées.*



# Chapitre V : Apports de la spectrométrie de masse haute résolution à la surveillance chimique

## Table des matières

1.	Identification de composés non ciblés par analyses classiques.....	280
2.	Identification de produits de transformation générés en laboratoire.....	284
2.1	Méthodologie générale appliquée et exemple d'identification des photoproduits de l'ofloxacin	285
2.1.1	Mise en évidence des photoproduits générés.....	285
2.1.2	Tentative d'identification et confirmation de la structure.....	287
2.2	Bilan des composés et limites de l'identification.....	290
2.3	Pertinence environnementale.....	294
3.	Identification de composés actifs par une approche EDA.....	300
3.1	Mise en évidence de composés biologiquement actifs.....	301
3.1.1	Génotoxicité.....	301
3.1.2	Œstrogénicité.....	301
3.1.3	Activité AhR.....	302
3.1.4	Bilan.....	304
3.2	Identification des composés responsables de l'œstrogénicité observée.....	304
4.	Publications.....	311
4.1	Photodegradation of novel oral anticoagulants under sunlight irradiation in aqueous matrices (acceptée dans Chemosphere).....	311
4.2	Bisphenols as major contributors of estrogenic activity in landfill leachates-Investigations by Effect-Directed Analysis (EDA).....	333
	Conclusions et perspectives.....	353
	Annexes.....	361
	Bibliographie.....	403



## 1. Identification de composés non ciblés par analyses classiques

Une approche non ciblée a été réalisée sur un panel réduit d'échantillons, dans le but de mettre en évidence des composés non recherchés par les méthodes classiques. Le criblage non ciblé, s'intéresse à l'ensemble des composés présents dans un échantillon. L'ensemble des composés détectés sont considérés et les molécules les plus abondantes sont automatiquement fragmentées dans le but d'obtenir des informations sur leurs structures. Les spectres de fragmentations ont été comparés à différentes bases de données dans le but d'identifier le plus de molécules possibles. De façon exploratoire, certains extraits issus de l'échantillonnage passif (Caudebec, Oissel, La Bouille et effluent de la STEU) ont été analysés avec une méthode non ciblée.

Cette approche préliminaire a permis par simple comparaison aux bases de données préexistantes (METLIN, Forensic) de mettre en évidence la présence probable de 26 molécules qui n'ont pas été incluses initialement dans les listes des 200 molécules ciblées. Différents niveaux d'identification ont été assignés pour chaque photoproduit détecté. En effet, la confirmation de la structure du photoproduit n'est pas systématique en raison de l'absence d'étalon. Ainsi le niveau d'identification assigné est dépendant du degré d'information acquis et dérive des travaux de Schymanski (2014a).

L'ensemble des molécules identifiées à un niveau de confiance entre 1 et 2 (Schymanski et al., 2014a) sont décrites dans le Tableau 36. En sortie de la STEU de Rouen (E), plus de 24 molécules sont probablement présentes, contre seulement 12 qui ont été également retrouvés dans l'estuaire de Seine (Caudebec (C), La Bouille (L), Oissel (O)). Cinq molécules sont ubiquistes : le dénatonium, l'irbésartan, la lidocaïne, le tramadol, et la venlafaxine. Parmi ces molécules, des médicaments de diverses classes thérapeutiques sont bien représentés. Certains métabolites ont également été retrouvés : c'est notamment le cas des métabolites de la méthadone (EEDP). Parmi ces molécules, certaines comme le vérapamil sont déjà connues pour engendrer des effets à des concentrations de l'ordre de 30 ng.L<sup>-1</sup> et notamment une inhibition de la croissance algale (Tousova et al., 2017). On retrouve également des molécules mères associées à leurs produits de métabolisation, comme par exemple, la venlafaxine et la o-desméthylvenlafaxine ou encore le tramadol et le o-desméthyltramadol qui ont déjà été recensées dans effluents urbains (Boix et al., 2015).

La confirmation des molécules présentes est fortement dépendante de l'implémentation des bases de données en ligne, et de la commercialisation de standards analytiques. Cependant, à l'heure actuelle, ces méthodes représentent un outil de diagnostic puissant pour mieux cibler par la suite des molécules à fort enjeu environnemental au niveau d'un estuaire (occurrence, toxicité). En effet, utilisées de façon complémentaire aux analyses

ciblées, elles permettent d'identifier et de mettre en avant des molécules non initialement recherchées.

**Tableau 36 : Liste des molécules probablement présentes (niveau 2 d'identification selon Schymanski et al., 2014a) dans les échantillons d'Oissel (O), Caudebec (C), La Bouille, et de la sortie de la STEU (E). Les échantillons de type POCIS ont été analysés en LC-QTOF (ionisation positive).**

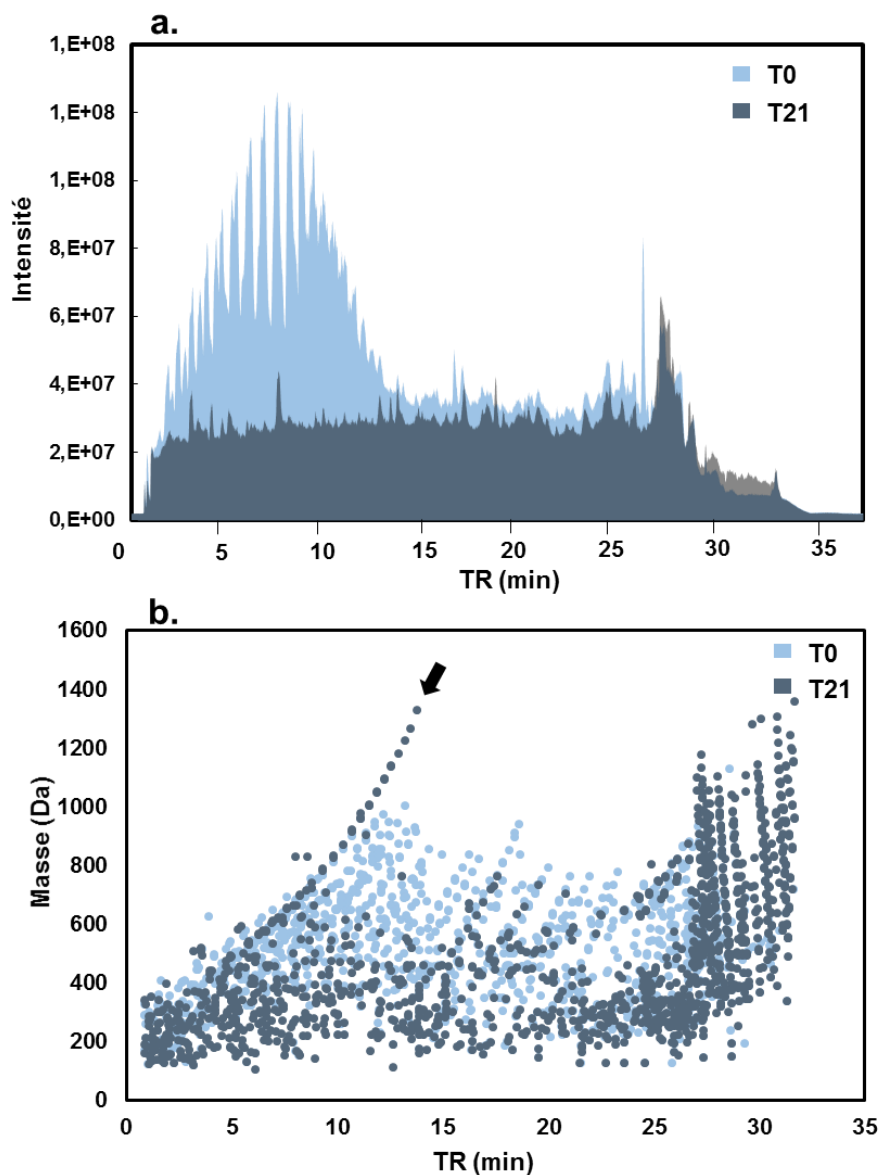
Composés	Formule	CAS	Niveau identification*	Sites	Usage / Origine
Amisulpride	C17H27N3O4S	71675-85-9	2	E, L, C	neuroleptique
Articaïne	C13H20N2O3S	23964-58-1	2	L, C	anesthésique local
Atazanavir	C38H52N6O7	198904-31-3	2	L, C	anti-VIH
Céliprolol	C20H33N3O4	56980-93-9	2	E, C	bêta-bloquant
Dénatonium	C21H29N2O	3334-33-6	2	E, L, C, O	anesthésique local
Dextrorphan	C17H23NO	125-73-5	2	E	métabolite actif dextrométhorphan (opiacé)
Diacétolol	C16H24N2O4	28197-69-5	2	E, C	bêta-bloquant
Dimoxystrobine	C19H22N2O3	149961-52-4	2	E	fongicide
EDDP	C20H23N	-	2	E	metabolite primaire de la méthadone
Escitalorpan	C20H21FN2O	128196-01-0	1	E	antidépresseur
Fexofénadine	C32H39NO4	83799-24-0	2	E	antihistaminique
Irbesartan	C25H28N6O	138402-11-6	2	E, L, C, O	antihypertenseur
Lamotrigine	C9H7Cl2N5	84057-84-1	2	E	anticonvulsivant
Lévométhadone	C21H27NO	125-58-6	2	E	analgésique (opioïde)
Lidocaïne	C14H22N2O	137-58-6	2	E, L, C, O	anesthésique local / anti-arythmique
Miansérine	C18H20N2	24219-97-4	2	E	antidépresseur
DEET	C12H17NO	134-62-3	2	E, C	répulsif, insecticide
O-Desméthyltramadol	C15H23NO2	-	2	E	metabolite du Tramadol
O-desméthylvenlafaxine	C16H25NO2	93413-62-8	2	E	antidépresseur
Pirimiphos-méthyl	C11H20N3O3PS	29232-93-7	2	E	insecticide
Propafénone	C21H27NO3	54063-53-5	2	E	antiarythmique
Sitagliptin	C16H15F6N5O	486460-32-6	2	E	antidiabétique
Tramadol	C16H25NO2	27203-92-5	2	E, L, C, O	antalgique
Triapride	C15H24N2O4S	51012-32-9	2	E	neuroleptique
Tropium	C25H30NO3	10405-02-4	2	E, L, C	anticholinergique
Venlafaxine	C17H27NO2	93413-69-5	1	E, L, C, O	antidépresseur
Vérapamil	C27H38N2O4	52-53-9	2	E	inhibiteur calcique

\* : selon Schymanski et al., 2004a ; E : Effluent Rouen, L: La Bouille, C: caudebec, O: Oissel

L'utilisation d'analyses globales grâce à des approches non ciblées est également envisageable dans le cadre de l'étude des phénomènes de dégradation afin de mettre en évidence la formation de produits de transformation. Ainsi, en parallèle des analyses ciblées et des bioessais *in vitro*, une analyse non ciblée a été réalisée sur les extraits d'eau issus des incubations en présence de bouchon vaseux. Cette approche a été réalisée sur l'aquarium ayant subi la forte diminution des concentrations. Les extraits ont été analysés en mode positif par des méthodes MS simple et MS/MS.

La complexité des extraits analysés est illustrée par les chromatogrammes (mode d'ionisation positif) des deux temps d'incubation dans la Figure 73 a. Le profil des masses nominales en fonction du temps de rétention pour les échantillons T0 et T21 jours (mode positif) sont présentés Figure 73 b. L'analyse en mode d'ionisation positif a mis en évidence des polymères dans les 2 temps d'incubation analysés. En effet, ce type de surfactants est facilement identifiable par la présence de distributions isotopiques particulières ayant une perte répétée de fragment 44,0262 m/z correspondant au groupement [-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O] (Lara-martín et al., 2011). Différentes études ont déjà mis en évidence la présence de surfactants dans

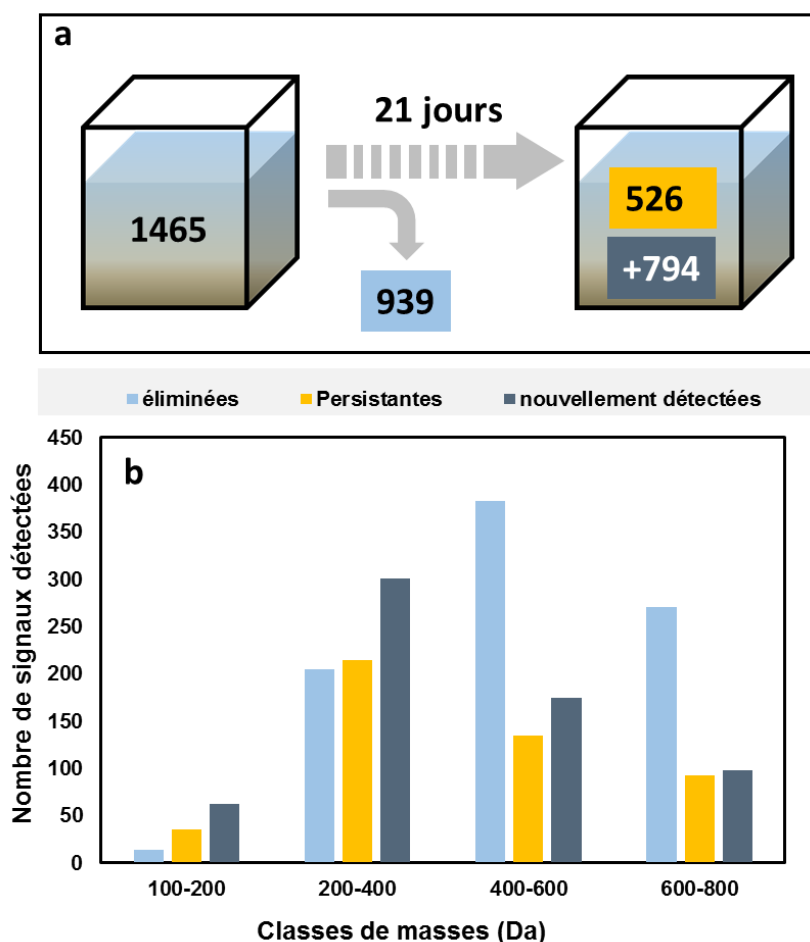
l'effluent de STEU, des eaux de surface et expériences en laboratoire (Castillo et Barceló, 1999; Aminot, 2013; Lara-Martín et al., 2014; Schymanski et al., 2014b; Gardia-Parège, 2015; Schollée et al., 2015).



**Figure 73 : Comparaison des chromatogrammes des extraits T0 et T21 (a) Masse moléculaire en fonction du temps de rétention des composés détectés (b).** La flèche indique un exemple de polymères.

La présence de ces polymères n'est pas sans incidence sur la tentative de mise en évidence de produits de transformations. En effet, comme l'a montré Gardia-Parège (2015), la présence de molécules polymériques comme les polyéthylène-glycols engendre des erreurs d'attribution de formule par l'algorithme automatique (MFE). Le retraitement manuel est envisageable seulement dans les matrices les plus simples en raison du temps qu'il nécessite.

Globalement, après 21 jours d'incubation plus de 939 signaux ont été éliminés alors que 794 sont nouvellement détectés (Figure 74 a). Près de 526 signaux sont présents dans les deux temps d'incubation et sont donc considérés comme persistants. La répartition des masses des signaux détectés est présentée dans la Figure 74 b. Alors que la majorité des signaux détectés en T0 ont des masses 400-800 Da, la majorité des signaux uniquement présents dans le T4 ont des masses majoritairement plus faibles.



**Figure 74 : (a) Schéma résumant les signaux détectés dans les incubations et (b) répartition des signaux détectés en mode d'ionisation positif en fonction de la masse uniquement dans T0 (éliminés), uniquement dans T4 (nouvellement détectés) et dans les 2 temps (persistants).**

Au vu du nombre important de signaux détectés dans ces matrices (+ 794 signaux nouvellement détecté en T21 jours ; Figure 74), l'élucidation des structures de l'ensemble des PT générés est difficilement envisageable. En effet, l'identification des PT générés en laboratoire sur des matrices complexes non artificiellement enrichies en composés représente encore un réel enjeu en raison de la grande quantité de données générée en une injection (Bletsou et al., 2015). En raison de la complexité de cette matrice, le processus n'a pas été poursuivi afin d'identifier de nouveaux produits de transformation dans le cadre de ces travaux mais demande une poursuite postérieure. En effet, les produits de transformation générés lors

de ces expériences, proche de situations environnementales sont complexes car : (1) les produits de transformation peuvent être générés par différents composés parents, (2) un composé parent peut former différents produits qui peuvent à leur tour se dégrader en produits de transformation (seconde génération) (Schollée et al., 2015). L'exploitation de bases de données en lignes telles que Chemspider, Pubchem peut faciliter le travail d'identification, cependant elles contiennent pour la grande majorité des composés parents et encore peu de produits de transformation (Bletsou et al., 2015; Letzel et al., 2015; Schollée et al., 2015).

La grande quantité de données générées est encore un frein à l'identification des produits de transformation dans des matrices complexes. Afin d'identifier les produits de transformation, une étape préliminaire de sélection des produits de transformation d'intérêt est nécessaire. Différentes types d'approches pourraient être envisagées pour poursuivre ce travail :

- Les outils statistiques multivariés comme les analyses en composantes principales ou les classifications ascendantes hiérarchiques pourraient représenter une perspective intéressante dans des matrices complexes (Schollée et al., 2016).
- L'utilisation des informations (formules brutes, substructures) de composés parents connus pour être présents, peut présenter également une aide afin de réduire le nombre de structures (Bletsou et al., 2015). Par ailleurs, certaines études ont montré l'utilité des modèles *in silico* afin de mimer les phénomènes de dégradation et prédire les PT formés. C'est notamment le cas de logiciel tel que Eawag PSS (Eawag-pathway prediction system ; Université des Minnesota) qui permet à partir des unités structurales d'une molécule de prédire la formation de produits typiques des transformations microbiennes (Escher and Fenner, 2011).
- Une alternative serait de comparer les données recueillies (masse exacte, spectre de fragmentation, temps de rétention) lors de ces expériences en laboratoire, telles que les incubations dans le bouchon vaseux de la Seine avec des échantillons environnementaux. L'utilisation d'un criblage « suspect » pourrait permettre de mettre en évidence des concordances entre les deux et ainsi de focaliser l'identification sur les produits de transformation présents dans l'environnement (Seiwert et al., 2016).

## **2. Identification de produits de transformation générés en laboratoire.**

L'identification de nouveaux produits de transformation pertinents dans l'environnement représente un véritable enjeu. Cependant, identifier des produits de transformation non connus dans des eaux naturelles reste encore difficile en raison de la complexité de ces matrices. Par

ailleurs, les approches non ciblées, sont encore longues à mettre en œuvre et sont dépendantes de l'implémentation des bases de données spectrales. Afin de faciliter le processus d'identification de nouvelles molécules il est nécessaire de réduire la complexité environnementale et de travailler avec des échantillons artificiels. Ainsi, un travail d'identification des produits de transformation issus de la photodégradation solaire de 7 molécules a été mené. Au total, sept composés pharmaceutiques provenant de 3 classes thérapeutiques ont été sélectionnés, pour rappel, sur différents critères : (1) présence dans l'environnement, (2) toxicité suspectée même à faible concentration, (3) molécules dont les données concernant leur photodégradation sont encore trop limitées. Ainsi, ce travail fait suite à différentes études réalisées dans le cadre des travaux de thèse de Montaha Yassine (2016) visant à déterminer les cinétiques de dégradation de ces 7 molécules dans différentes matrices (Tableau 37). Les analyses ont été réalisées sur des échantillons d'eau ultrapure artificiellement enrichis en composés cibles à des concentrations élevées (100 µg.L<sup>-1</sup> à 1 mg.L<sup>-1</sup>).

**Tableau 37 : Temps de demi-vie (h) calculés de certaines molécules artificiellement dopées dans différentes matrices irradiées en laboratoires (Yassine, 2016).** (- : non étudié ; n.d. : non déterminée par absence de points expérimentaux).

	Eau purifiée	Eau de rivière	Eau purifiée + acides humiques	Eau minérale	Eau purifiée + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Eau purifiée + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<b>Abacavir</b>	n.d.	5,7	-	-	-	-
<b>Danofloxacin</b>	0,03	0,04	0,39	-	-	-
<b>Ofloxacin</b>	0,23	1,17	2,31	-	-	-
<b>Sarofloxacin</b>	0,8	0,2	0,45	-	-	-
<b>Apixaban</b>	n.d.	96,3	-	23,6	10,4	26,9
<b>Rivaroxaban</b>	2,3	2,3	-	2,2	2	-
<b>Dabigatran</b>	19,9	24,1	-	7,4	6,8	-

## 2.1 Méthodologie générale appliquée et exemple d'identification des photoproduits de l'ofloxacin

### 2.1.1 Mise en évidence des photoproduits générés

Dans le but d'obtenir des informations précises sur la masse exacte des photoproduits générés, deux analyses successives ont été réalisées. Une première analyse en mode MS (uniquement temps de vol) a permis d'obtenir des informations sur la masse exacte des composés permettant ainsi de calculer les formules brutes des composés détectés. Les ions présents sont alors extraits sur la base de leurs caractéristiques moléculaires (temps de rétention, masse exacte, intensité) par l'algorithme de la fonction MFE (Feature by Molecular Extraction). La formule brute est ensuite établie automatiquement en se basant sur la masse mono-isotopique mesurée et en utilisant les atomes présents dans chaque composés parents (cf. formules brutes molécules mères ; Tableau 39).

Des comparaisons des masses présentes dans l'échantillon irradié, non irradié (T0, et témoin obscurité) par le logiciel MassProfiler (Agilent technologies, France) a permis de mettre en évidence les composés uniquement issus des phénomènes de photodégradation solaire. En effet, l'utilisation de ce logiciel permet de visualiser rapidement les molécules présentes uniquement dans l'échantillon irradié et absents des témoins « avant irradiation » et « obscurité ». Un exemple de comparaison pour l'ofloxacin, entre l'échantillon initial et l'échantillon irradié 80h, est donné Figure 75 a. Ainsi, l'irradiation de l'ofloxacin (80 h) a conduit à l'observation de 3 photoproduits OFX-1, OFX-2 et OFX-3 avec des m/z respectifs de 364,1323 ( $C_{17}H_{19}FN_3O_5$ ), 348,1357 ( $C_{17}H_{19}FN_3O_4$ ), et 378,1459 ( $C_{18}H_{21}FN_3O_5$ ). Les chromatogrammes obtenus avant et après 80h d'irradiation solaire sont décrits Figure 75 b et c. En 2012, une étude de la photodégradation solaire de l'ofloxacin en solution aqueuse a mise en évidence la formation de 3 photoproduits de m/z 348, 378 et 364 (Zgad Zaj et al., 2015). En absence de données structurales (données MS/MS), les structures des PT n'a pas pu être confirmée dans cette étude.

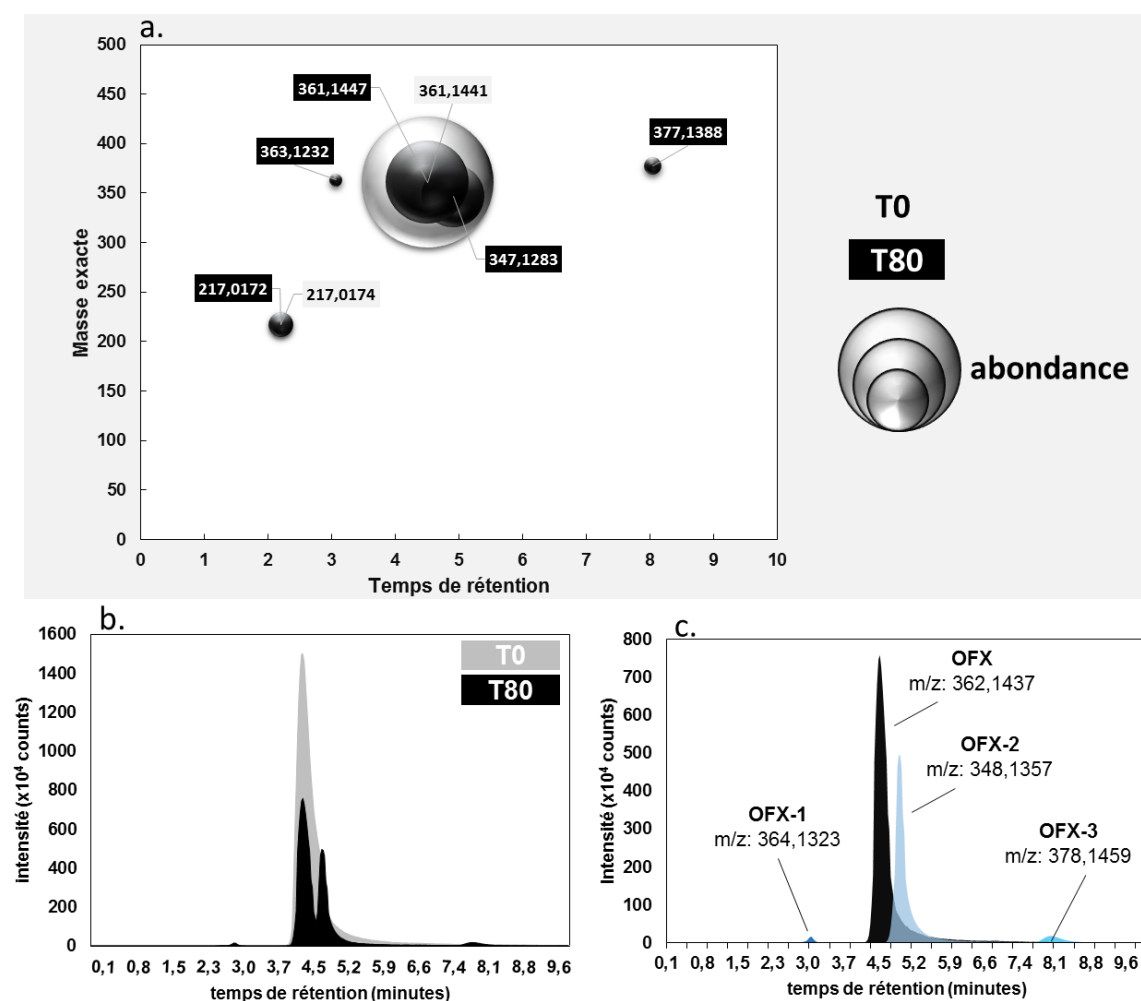


Figure 75 : Exemple de l'ofloxacin : Comparaison des échantillons par *MassProfiler* (a), chromatogramme de l'ofloxacin avant et après 80h d'irradiation solaire (b) et focus sur les ions détectés dans l'échantillon irradié 80 h (c).

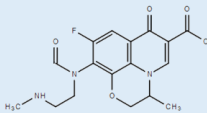
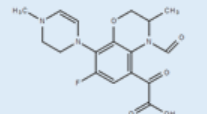
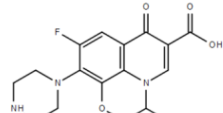
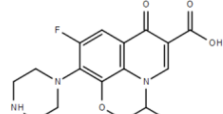
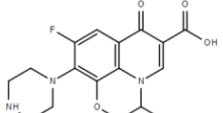
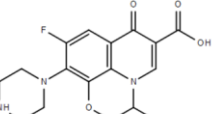
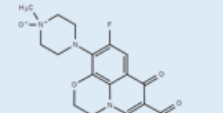
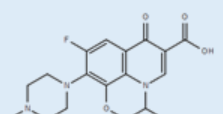
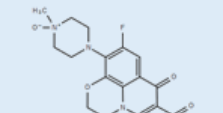
### 2.1.2 Tentative d'identification et confirmation de la structure

Une seconde analyse a été réalisée afin d'acquérir des informations structurales grâce aux spectres de fragmentation (MS/MS) des 3 photoproduits mis en évidence. La présence de PT avec des m/z équivalents à OFX-1, OFX-2, et OFX-3-avait déjà été mise en évidence dans différentes études en laboratoire visant à étudier la dégradation de l'ofloxacin sous l'action de traitements d'ozonation (Carbajo et al., 2015; Tay et Madehi, 2015), photocatalytique (Calza et al., 2008) et biodégradation (Gros et al., 2014). Les données relatives à la fragmentation des produits de transformations lors de cette étude et des données de la littérature sont récapitulées Tableau 38.

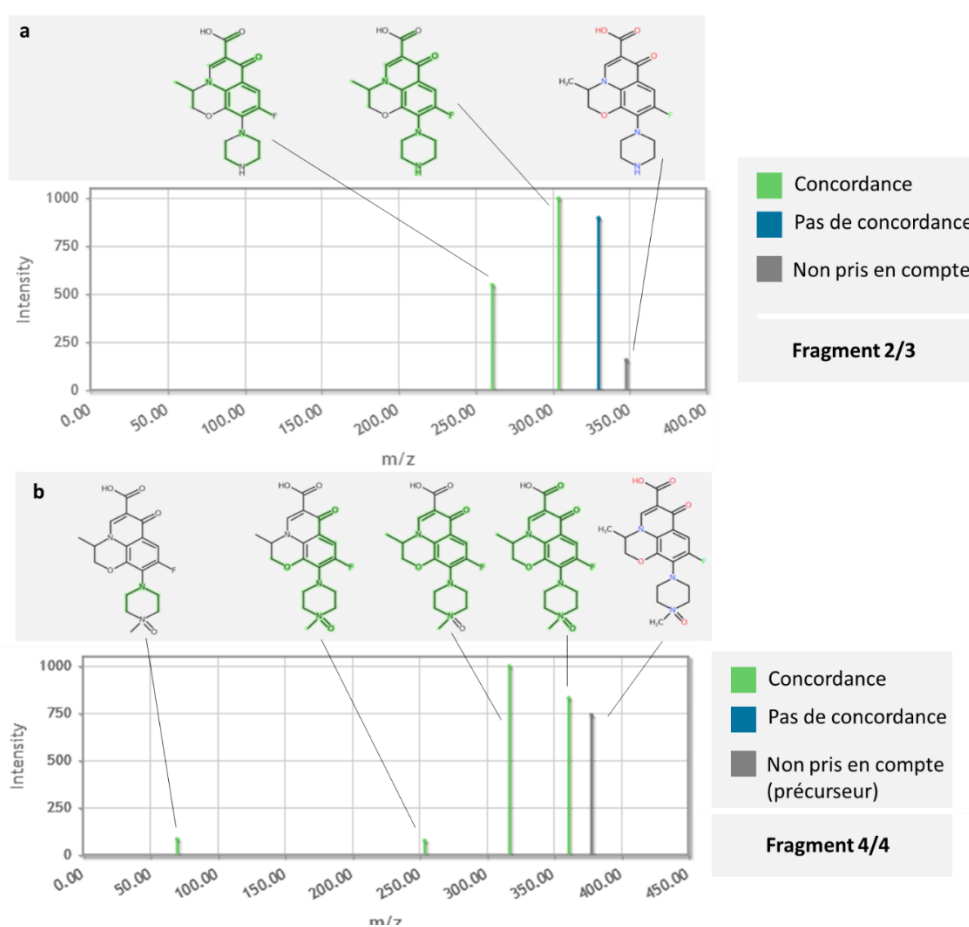
La fragmentation du PT de m/z 364.1323 (OFX-1) a conduit à l'observation de 4 fragments majoritaires de m/z : 346 ; 320 ; 333 et 289 qui avaient déjà été observés pour des produits de transformation issus de la dégradation de l'ofloxacin suite à des processus de biodégradation et d'ozonation. Les structures proposés pour les auteurs sont indiquées dans le Tableau 38, mais ne correspondent à aucune structure référencée dans la base de Chemspider (<http://www.chemspider.com>). La formation d'un produit de transformation de m/z 348 (OFX-2) suite à des traitements photocatalytiques, d'ozonation ou résultant de processus de biodégradation a déjà été recensée. Dans la présente étude, la fragmentation de l'OFX-2 (Tableau 38) a permis l'observation de 3 fragments majoritaires (m/z 330, m/z 304 et m/z 261) qui concordent avec les fragments recensés dans la littérature (m/z 361, m/z 317, et m/z 254). Bien que l'identité de la molécule n'ait pas été confirmée par l'injection d'un étalon analytique, la structure proposée par les différents auteurs est celle de la déméthyl-ofloxacin. Concernant le photoproduit OFX-3 (m/z 378), le pattern de fragmentation met en évidence 4 fragments majoritaires (m/z 361, m/z 317, m/z 254 et m/z 70). Parmi ces 4 fragments, 3 ont déjà été recensés dans des études précédentes (m/z 361, m/z 317 et m/z 254). Deux structures différentes ont été proposées dans la littérature : l'ofloxacin-n-oxide et une structure non référencée dans Chemspider (Tableau 38).



**Tableau 38 : Récapitulatif des données de HRMS dans la littérature concernant les produits de transformation (PT) de l'ofloxacine. \* cette étude, [1] (Calza et al., 2008); [2] (Gros et al., 2014); [3] (Tay et Madehi, 2015); [4] (Carbajo et al., 2015).**

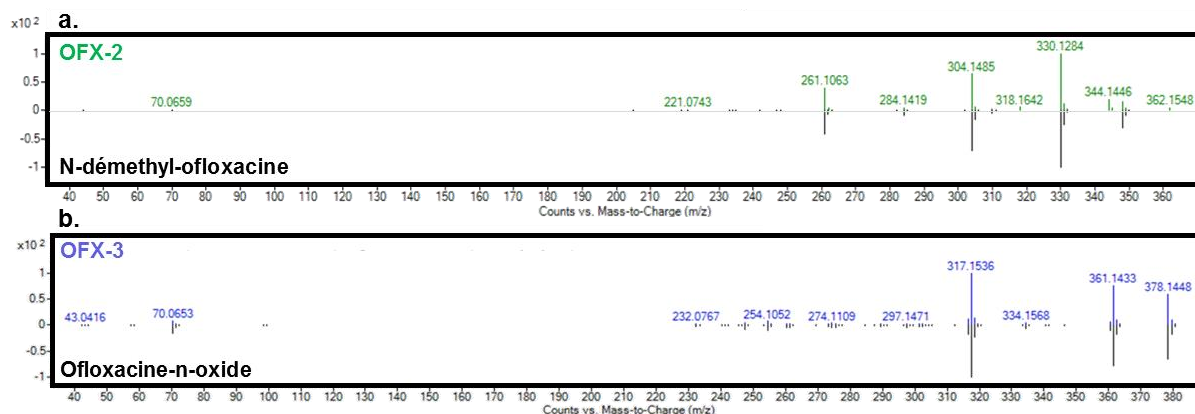
PT	Traitement	Appareillage	m/z	fragments fils	Structure proposée	Ref
OFX-1	Photodégradation	QTOF	364.1323	346,1189 ; 320,1397; 333,0879 ; 289,0969	-	*
	Biodegradation	Q/Orbitrap	364.1305	346,12009 ; 320,14096 ; 333,08850 ; 289,09863 ; 235,08807		[2]
	Ozonation	QTOF	364.1292	346,1197 ; 261,0660		[3]
OFX-2	Photodégradation	QTOF	348.1357	330,1309 ; 304,1508 ; 261,1037	-	*
	Ozonation	QTOF	348.1354	330,1249 ; 304,1456 ; 261,1034		[4]
	Biodegradation	Q/Orbitrap	348.1355	330,12497 ; 304,14584 ; 261,10367		[2]
	Photocatalytique	Orbitrap	348.1362	330,1280 ; 284,1422 ; 261,1060		[1]
	Ozonation	QTOF	348.1367	330,1259 ; 304,1466 ; 284,1402 ; 261,1040		[3]
OFX-3	Photodégradation	QTOF	378.1459	361,1433 ; 317,1542 , 254,1053 ; 70,0654	-	*
	Photocatalytique	Orbitrap	378.1465	361,1462 ; 317,1561 ; 334,1561 ; 297,1499 ; 254,1073		[1]
	Ozonation	LC-ESI-QTOF	378.1471	361,1429 ; 334,1570 ; 317,1530		[3]
	Ozonation	QTOF	378.1460	361,1432 ; 360,1354 ; 334,1562 ; 317,1496		[4]

Les spectres de fragmentation de ces structures n'étant pas référencés dans les banques de données spectrales (Metlin, MassBank, Forensic), une méthode alternative de fragmentation *in silico* a été appliquée afin d'élucider les structures. Le logiciel MetFrag (<https://msbi.ipb-halle.de/MetFragBeta/>) est basé sur des algorithmes mathématiques prédisant la fragmentation de composés grâce aux énergies de liaison et de dissociation (Ruttkies et al., 2016). La structure candidate a été préalablement dessinée grâce à l'interface Chemstreck (ACD/Labs ; <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>) puis importée au format SDF (i.e. structure data file) dans le logiciel MetFrag. Les fragments générés *in silico* et mesurés sont alors comparés. Le logiciel permet ainsi de calculer un score de probabilité entre les fragments détectés et la structure suspectée. Ce score est fonction du rapport m/z et de l'intensité de chaque fragment coïncidant et de l'énergie de liaison (Ruttkies et al., 2016). Un exemple du type de résultats obtenus est donné Figure 76. Les spectres de fragmentation mesurés pour les photoproduits OFX-2 et OFX-3 ont été respectivement comparés à la fragmentation *in silico* de déméthyl-ofloxacin (Figure 76 a) et de l'ofloxacin-n-oxide (Figure 76 b). Alors que l'ensemble des fragments concordent pour OFX-3 et l'ofloxacin-n-oxide, seuls 2 fragments sur 3 ont pu être générés par MetFrag pour la déméthyl-ofloxacin.



**Figure 76 : Exemple de résultat obtenu sur le logiciel MetFrag : Comparaison de la fragmentation *in silico*(a) de la déméthyl-ofloxacin et du spectre de fragmentation du photoproduit OFX-2 (b) de l'ofloxacin-n-oxide et du spectre de fragmentation du photoproduit OFX-3.**

Les structures proposées pour OFX-2 (déméthyl-ofloxacin) et OFX-3 (l'ofloxacin-n-oxide) ont respectivement 2/3 et 4/4 fragments concordants avec les modélisations *in silico*. Les informations acquises grâce à MetFrag, ont permis de suspecter deux composés la déméthyl-ofloxacin et l'ofloxacin-n-oxide comme étant respectivement les photoproduits OFX-2 et OFX-3 dont les étalons analytiques étaient commercialement disponibles. Finalement ces tentatives d'identification ont conduit à l'achat de deux étalons analytiques dans le but de confirmer l'identité de deux photoproduits majoritaires de l'ofloxacin : OFX-2, et OFX-3. Les spectres de fragmentation de ces deux composés sont présentés Figure 77 et ont respectivement obtenus des scores de concordance de 93,8 et 93.5 %. Les structures confirmées par l'injection de l'étalon analytique sont assignées au niveau 1 d'identification (Tableau 39). Il est a noté que le fragment 330 de OFX-2 n'a pas eu de concordance par fragmentation *in silico* (Figure 76 a), alors qu'il a bien été mesuré dans le spectre de fragmentation de la déméthyl-ofloxacin (Figure 77 a).

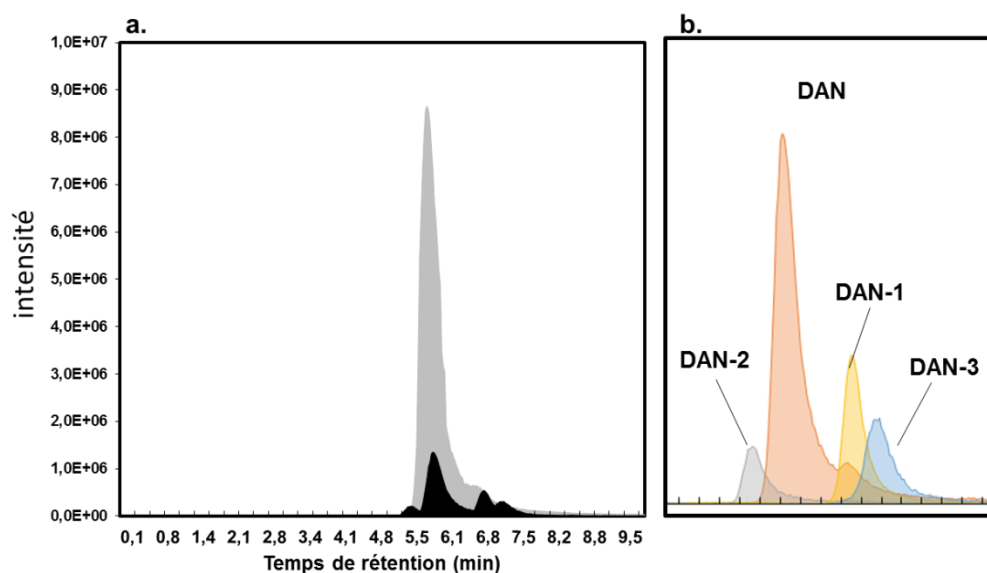


**Figure 77 : Comparaison des spectres de fragmentation des photoproduits détectés dans les échantillons irradiés avec les standards analytiques du N-déméthyl-ofloxacin (a) et de l'ofloxacin-n-oxide (b).**

## 2.2 Bilan des composés et limites de l'identification

L'irradiation solaire de l'ofloxacin, de la danofloxacin et de la sarafloxacin a respectivement générée la formation de 3, 3 et 4 photoproduits (Tableau 39). La formation de déméthyl-ofloxacin et celle de l'ofloxacin n-oxide ont déjà été recensées dans des études en laboratoire visant à étudier la dégradation de l'ofloxacin sous l'action de traitements d'ozonation (Carbajo et al., 2015; Tay and Madehi, 2015), de photocatalytique (Calza et al., 2008) et de biodégradation (Gros et al., 2014). Bien que non confirmé en raison de l'absence de données concernant leur fragmentation (données MS/MS), la formation de déméthyl-ofloxacin et celle de l'ofloxacin n-oxide, lors de phénomènes d'irradiation solaire avaient déjà été suspectée (Zgadzaj et al., 2015).

L'irradiation de la danofloxacin (DAN) a conduit à l'observation de 3 photoproduits (Figure 78) : DAN-1 ( $m/z$  : 344,1410), DAN-2 ( $m/z$  : 328,1666), et DAN-3 ( $m/z$  : 346,1567) (Tableau 39). La présence des produits de transformation de  $m/z$  équivalents avait également déjà été mis en évidence dans différentes études qui reproduisaient la photodegradation solaire et les traitements UV appliqués en STEU dans de l'eau ultrapure ou de rivière (Liu et al., 2011; Sturini et al., 2012a, 2012b; Hubicka et al., 2014). Une confirmation par l'injection d'un étalon analytique a permis de confirmer l'identité du photoproduit DAN-1 ( $m/z$  : 344,1410) : le N-déméthyl-danofloxacin. Les photoproduits DAN-2 ( $m/z$  : 328,1666) et DAN-3 ( $m/z$  : 346,1567), par manque d'informations structurales, d'informations dans les bases de données ou l'absence d'étalons analytiques, sont classés à des niveaux 2 et 3 d'identification selon la classification de Schymanski et al., 2014 (Tableau 39).



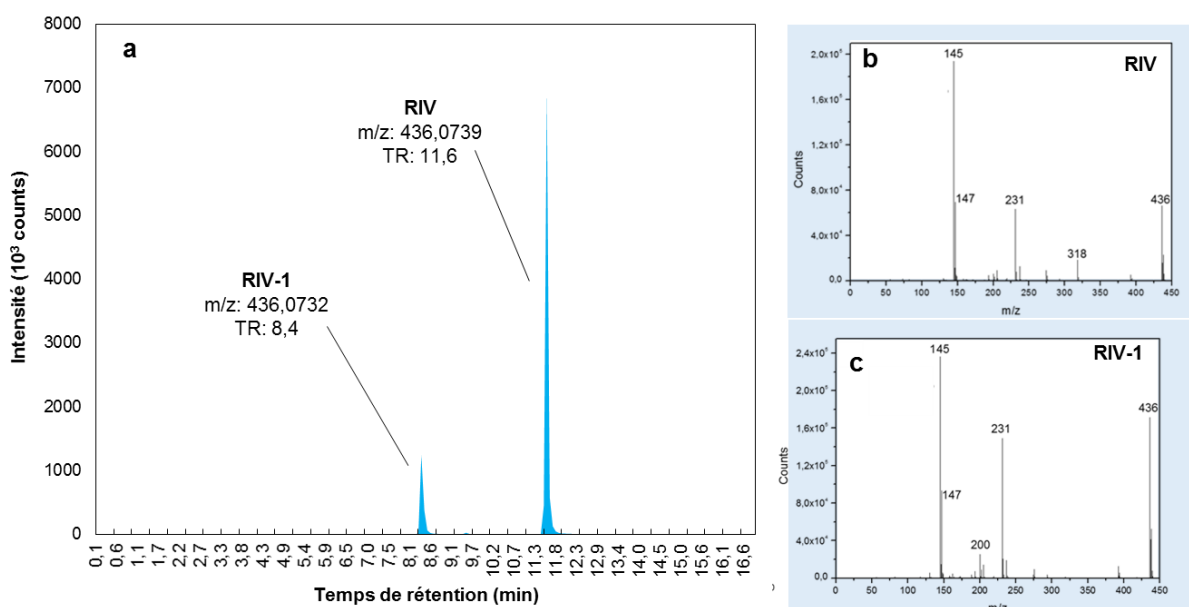
**Figure 78 : Chromatogramme de la danofloxacin avant et après 20h d'irradiation solaire (b) et focus sur les ions détectés dans l'échantillon irradié 20 h.**

Concernant les fluoroquinolones, ce travail d'identification a abouti à l'identification de 2 photoproduits d'un niveau 1 (confirmée par l'injection d'un étalon analytique) : le N-déméthyl-ofloxacin, l'ofloxacin-n-oxide et le N-déméthyl-danofloxacin.

Le travail initié sur l'identification des photoproduits de trois NACO (apixaban, dabigatran, rivaroxaban) a permis de mettre en évidence la présence de 2 photoproduits pour le dabigatran, d'1 PT pour le rivaroxaban et de 7 PT pour l'apixaban (Tableau 39). En raison de leur utilisation récente, les données bibliographiques concernant ces molécules sont encore très limitées en ce qui concerne leur occurrence et leur toxicité dans l'environnement. Cependant, ce travail a permis l'identification (niveau 1) de la 4-aminobenzamidine comme photoproduit majoritaire du dabigatran. A l'heure actuelle, ce travail de thèse est le premier recensant l'occurrence des composés parents dans les écosystèmes aquatiques. L'étude de

la photodégradation de ces 3 composés est décrite en détail dans la publication « *Photodegradation of novel oral anticoagulants under sunlight irradiation in aqueous matrices* ».

Dans le cas du dabigatran, le photoproduit de  $m/z$  égal à 136,0874 a été identifié de façon univoque comme étant la 4-aminobenzamidine (niveau 1 d'identification). L'étude des produits de dégradation des NACO a permis d'observer un unique photoproduit primaire pour le rivaroxaban. L'étude de ce photoproduit est un bon exemple des limites de l'approche d'identification par LC-QTOF. Ce dernier est plus polaire que la molécule mère avec un temps de rétention de 8,4 min (Figure 79 a) et possède la même masse exacte (436,0732, ESI+). Leurs spectres de fragmentation similaires ont compliqué le processus d'identification de la structure des photoproduits (Figure 79 b). En effet, seul deux fragments diffèrent entre la molécule mère et son photoproduit :  $m/z$  312,1081 et  $m/z$  205,0970. À partir du spectre de fragmentation, le photoproduit est identifié en tant que rivaroxaban (base de données Chemspider) avec un score de 0,93 et en identifiant les 3 fragments majoritaires du rivaroxaban (Tableau 39). Finalement, une analyse RMN (résonance magnétique nucléaire) a conduit à identifier la structure du photoproduit. Ainsi, le rivaroxaban subit une photoisomérisation et en particulier un réarrangement de type « photo-Fries » qui est décrit dans l'article 5.

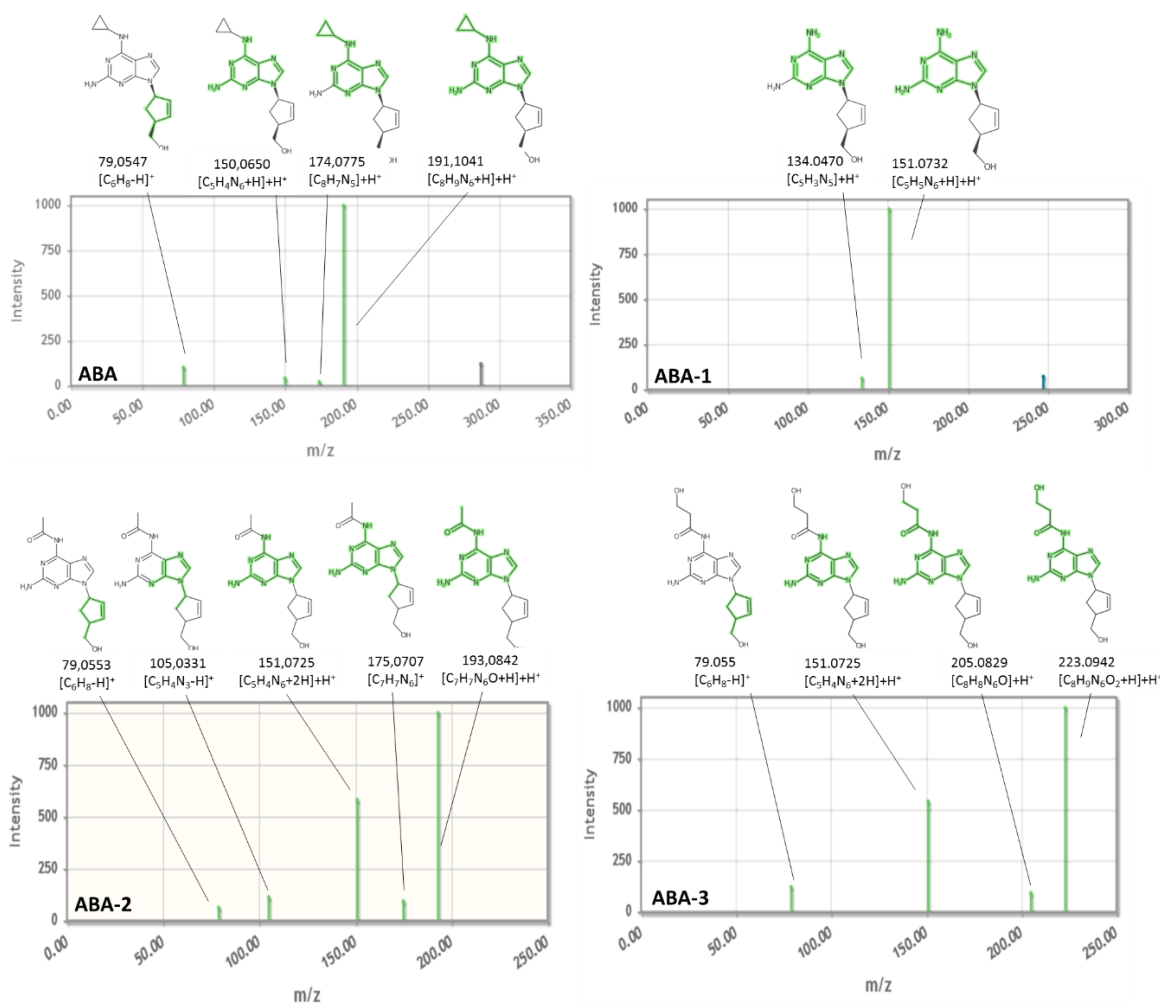


**Figure 79 : a. Chromatogramme représentant le rivaroxaban (RIV) et son photoproduit (RIV-1). Spectres de fragmentation du rivaroxaban (b) et du photoproduit RIV-1 à une énergie de collision 20 eV.**

Une aide non négligeable à l'identification et l'élucidation structurale réside dans l'observation de la présence ou l'absence d'ion fils caractéristique dans le spectre de fragmentation. En effet, ces éléments renseignent sur la stabilité ou réactivité d'une certaine partie de la molécule mère. Un exemple est donné par l'élucidation de la structure des 4 photoproduits de l'abacavir. Les analyses en HRMS ont mis en évidence 4 photoproduits formés durant l'irradiation de l'abacavir de  $m/z$  247,1313,  $m/z$  319,1521,  $m/z$  289,1411 et 275,1256 Tableau 39. Les spectres fragmentation observés présentent 2 fragments communs à tous les photoproduits de  $m/z$  151,0725 et  $m/z$  79,0554. En 2015, Prasse et al., ont également étudiés la phototransformation de l'abacavir dans l'eau provenant de zones humides. Cette équipe a également mis en évidence la présence de 3 photoproduits de  $m/z$  319,15070,  $m/z$  289,14023 et  $m/z$  247,12975 (Prasse et al., 2015) dont les spectres fragmentation possédaient également les 2 fragments ( $m/z$  151 et  $m/z$  89). Des structures avaient été proposées sur la base de la présence du fragment  $m/z$  151 assure une structure commune à l'ensemble des photoproduits détectés : le 2-aminoadénine.

Ainsi, les spectres de fragmentation expérimentaux de l'abacavir et de ces photoproduits ont été comparés à la fragmentation *in silico* des structures proposés par Prasse et al., 2015 (Figure 80). Ces données et les structures proposées suite à l'utilisation de l'algorithme de fragmentation *in silico* (Figure 80) sont en accord avec l'étude précédente (Prasse et al., 2015). Par ailleurs, alors qu'ABA-2 et 3 ne sont pas référencés dans Chemspider, la structure proposée par ABA-1 correspond à l'6-aminocarbovir et commercialement disponible. Il apparait donc nécessaire par la suite d'injecter cet étalon analytique afin de confirmer la structure d'ABA-1.

Au final, ce travail en spectrométrie de masse haute résolution a permis d'identifier et confirmer la structure de 4 photoproduits (l'ofloxacin-n-oxide, le N-déméthyl-ofloxacin, le N-desméthyldanofloxacin, et le 4-aminobenzamidine) de suspecter la structure d'un grand nombre de produits de transformation issus du dabigatran, apixaban, rivaroxaban, ofloxacin, sarafloxacin, danofloxacin et de l'abacavir. L'ensemble des photoproduits est récapitulé Tableau 39.



**Figure 80 : Comparaison des spectres de fragmentation de l'abacavir et de ces produits de transformation avec la fragmentation *in silico* des structures figurant dans le Tableau 39.**

### 2.3 Pertinence environnementale

L'identification de nouveaux produits de transformation offre de nouveaux champs de recherche afin de mieux évaluer la présence des contaminants organiques. Un des objectifs suivants a été de rechercher dans différentes matrices, les produits de phototransformation qui avaient été préalablement identifiées lors des expériences en laboratoire. Un des problèmes concernant la recherche des produits de transformation dans l'environnement réside dans l'absence d'étalons analytiques. Face à ce problème, la spectrométrie de masse haute résolution offre également de nouvelles perspectives. En effet, l'injection des solutions irradiées a permis d'obtenir les spectres de fragmentation de chaque photoproduit mais également leur temps de rétention. A partir de ces informations il est possible de réaliser un criblage « suspect » de l'ensemble des photoproduits présents dans un échantillon. Le choix des échantillons sélectionnés s'est basé sur les données d'ensoleillement récupérées au niveau de Rouen (<http://www.meteociel.fr/>). Des extraits issus des échantillonnages ponctuels et passifs issus de la Bouille, Caudebec et Poses ont été analysés. Aucun produit de

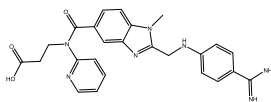
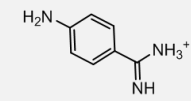
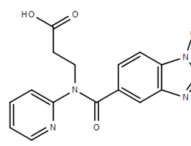
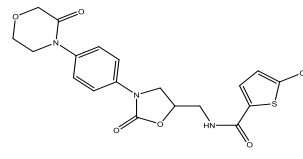
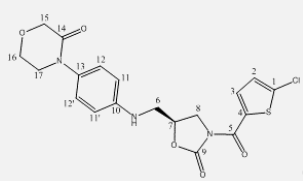
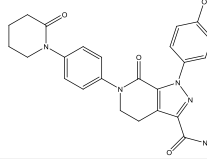
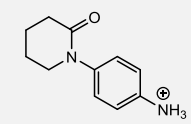
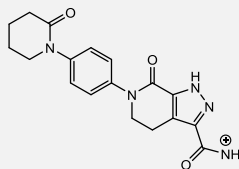
transformation préalablement identifié en laboratoire (Tableau 39) durant les expériences de photodégradation n'a pu être mis en évidence dans ces échantillons qu'ils soient issus de l'échantillonnage ponctuel ou de l'échantillonnage passif. Ceci est probablement le résultat des faibles concentrations de ces composés retrouvées en estuaire de Seine. Effectivement, la danofloxacin et la sarafloxacin n'ont pas été détectées lors du suivi initial réalisé à Poses (chapitre III). L'apixaban, le rivaroxaban, l'ofloxacine, l'abacavir et le dabigatran ont quant à eux respectivement été retrouvés à des concentrations moyennes de 0,3, 0,9, 1,7, 8, 23 ng.L<sup>-1</sup>. Pourtant le couplage des échantillonneurs passifs et de l'HRMS a déjà permis de mettre en évidence des produits de transformations issus de la carbamazépine à des niveaux proches du ng.L<sup>-1</sup> ans des eaux côtières (Bueno-Martínez et al., 2014).

Par ailleurs, les études menées dans le cadre de ce travail sont à replacer dans un contexte environnemental. En effet, les processus de phototransformation solaire dans l'environnement sont le résultat de processus directs mais aussi indirects par l'intermédiaire d'éléments dissous tels que la matière organique ou les ions (Agüera et al., 2013). Par exemple, une étude récente s'est notamment intéressée à la dégradation de l'abacavir dans différents milieux : eau ultrapure et eau naturelle (Prasse et al., 2015). La majorité des processus de photodégradation de l'abacavir résultent de processus indirects (50-95 % en fonction du pH de l'eau). Ainsi, les processus de transformations indirectes peuvent impliquer d'autres schémas réactionnels et donc induire des photoproduits différents. De plus, les phénomènes de phototransformation et de biotransformation sont généralement en compétition dans les eaux naturelles. Ainsi, le processus de dégradation préférentiel est intimement dépendant des conditions du milieu et du composé considéré. A titre d'exemple, Prasse et son équipe (2015) ont montré des différences de cinétiques de photodégradation et des photoproduits formés en présence ou en absence de microorganismes pour l'abacavir. Ce constat appuie la difficulté de prédire en laboratoire l'ensemble de produits de transformation réellement formés dans l'environnement.

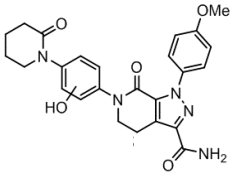
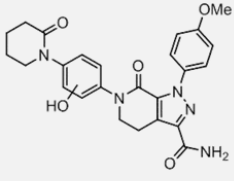
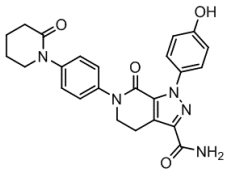
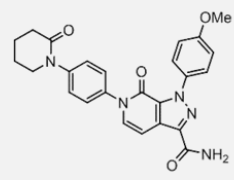
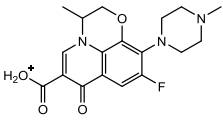
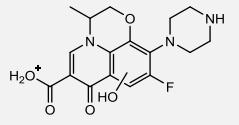
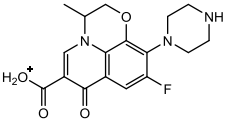
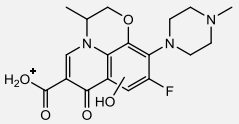
Bien que les expériences en laboratoire ne fournissent pas toujours l'ensemble des PT formés, l'ensemble des données générées en laboratoire (masse exactes, temps de rétention, spectres de fragmentation), constitue une base de données intéressante en vue de criblage environnementaux. En effet, plusieurs exemples, ont déjà démontré l'intérêt d'utiliser des listes de PT générés en laboratoires afin de réaliser un criblage suspect de masses d'eau (Chibwe et al., 2016; Deeb et al., 2017).



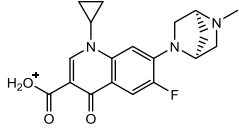
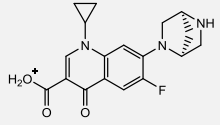
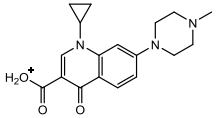
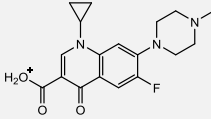
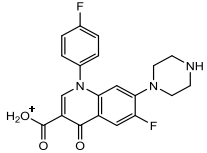
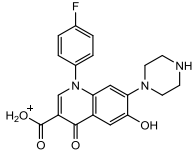
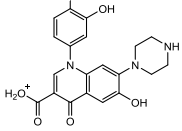
**Tableau 39 : Récapitulatifs de l'ensemble des photoproduits détectés et identifiés** (PT : photoproduits, TR : temps de rétention, d(m/Z) : différence de masse, NI : niveau d'identification, DAB : dabigatran, RIV, rivaroxaban, API : apixaban, \* : composé parent).

Code PT	[M+H] <sup>+</sup> (TR)	Formule brute	d(m/z) (ppm)	Fragments SM/SM (intensité in %)*	score MetFrag (nb. Frag expliqué)	Structure proposée	NI*
DAB*	472,2116 (6,6)	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	-4,02	472,2100 (67) 400,1888 (7) 324,1460 (47) 306,1354 (64) 289,1090 (100)	-		-
DAB-1	136,0874 (2)	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	0,73	<b>119,0608</b> (100) <b>92,0498</b> (17)	2/2	 <b>4-aminobenzamidine</b>	1
DAB-2	323,1145 (2,3)	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	-0,31	<b>251,0942</b> (100)	1/1		3
RIV*	436,0739 (11,3)	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	-1,15	436,0724 (18) 318,1081 (4) 231,1123 (20) 205,0970 (4) 144,9508 (100)	-		-
RIV-1	436,0732 (8,2)	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	0,46	<b>436,0724</b> (73) <b>231,1123</b> (63) <b>144,9508</b> (100)	3/3		2
API*	460,2012 (11,7)	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	-5,87	460,1970 (44) 443,1472 (100)	-		-
API-1	191,1186 (1,5)	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	1,05	191,1183 (100) <b>147,0919</b> (16) <b>107,0611</b> (13)	2/2		3
API-2	287,1146 (5,4)	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	-0,7	270,0874 (100) 242,0922 (9)	-	nd	3
API-3	354,1581 (5,5)	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	-4,24	<b>337,1304</b> (100)	1/1		3

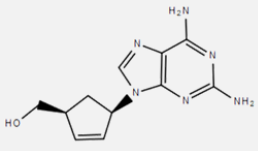
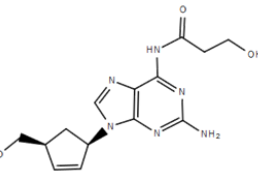
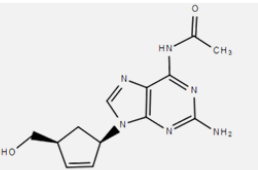
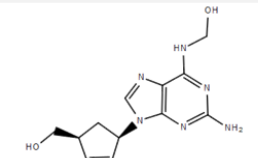
**Tableau 39: (Suite)** (PT : photoproduits, TR : temps de rétention, d(m/Z) : différence de masse, NI : niveau d'identification, API : apixaban, OFX : ofloxacin, \* : composé parent).

Code PT	[M+H] <sup>+</sup> (TR)	Formule brute	d(m/z) (ppm)	Fragments SM/SM (intensité in %)*	score MetFrag (nb. Frag expliqué)	Structure proposée	NI*
API-4	476,1939 (8,5)	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	-1,05	<b>459,1662</b> (100) <b>241,0669</b> (13) <b>199,0866</b> (74)	3/3		3
API-5	476,1939 (8,0)	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	-1,05	<b>459,1662</b> (100) <b>361,1709</b> (11) <b>241,0609</b> (18) <b>199,0866</b> (70)	4/4		3
API-6	446,1818 (8,8)	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	2,24	<b>430,1585</b> (23) <b>429,1562</b> (83) 282,1239 (13) <b>227,0454</b> (15) <b>185,0713</b> (100) <b>171,0554</b> (12) 93,0339 (11)	5/7		3
API-7	458,182 (12,17)	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	1,75	<b>458,1827</b> (42) <b>441,1549</b> (100) <b>385,1657</b> (64) 342,1463 (10) <b>277,1093</b> (15) 199,0867 (36)	4/6		3
OFX*	362,1516 (4,9)	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0,81	362,1531 (20) 344,1407 (30) 318,1617 (100) 261,1034 (21)	-		-
OFX-1	364,1323 (3,2)	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	-3,92	<b>364,1434</b> (100) <b>346,1189</b> (25) <b>333,0879</b> (15) 320,1397 (6) <b>289,0969</b> (8)	3/4		3
OFX-2	348,1357 (5,3)	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0,74	348,1403 (33) 330,1309 (100) <b>304,1508</b> (53) <b>261,1037</b> (35)	2/3	 déméthyl-ofloxacin	1
OFX-3	378,1459 (8,9)	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	1,65	378,1473 (74) <b>361,1433</b> (83) <b>317,1542</b> (100) <b>254,1053</b> (7) <b>70,0654</b> (8)	4/4	 ofloxacin-n-oxide	1

**Tableau 39 : (Suite)** (PT : photoproduits, TR : temps de rétention, d(m/Z) : différence de masse, NI : niveau d'identification, DAN : danofloxacine, SARA : sarafloxacine, \* : composé parent).

Code PT	[M+H] <sup>+</sup> (TR)	Formule brute	d(m/z) (ppm)	Fragments SM/SM (intensité in %)*	score MetFrag (nb. Frag expliqué)	Structure proposée	NI*
DAN*	358,1575 (6,4)	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	1,23	358,1562 (23) 340,1450 (100) 314,1667 (7) 283,1241 (4)	-		-
DAN-1	344,1410 (7,3)	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	0,13	344,1391 (27) <b>326,1304</b> (100)	1/1	 déméthyl-danofloxacine	1
DAN-2	328,1666 (5,9)	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-1,47	328,1674 (6) <b>310,1580</b> (100)	1/1		3
DAN-3	346,1567 (7,8)	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-0,01	<b>328,1475</b> (100) 326,1299 (10)	1/2		3
SARA*	386,1312 (7,7)	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	2,4	386,1315 (13) 368,1219 (100) 342,1417 (13) 299,0992 (6)	-		-
SARA-1	370.1205 (4,0)	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-0,52	352,1118 (19) 324,1160 (83) 281,1103 (77) 238,0913 (100) 225,0831 (17)	nd	-	3
SARA-2	384.1365 (6,9)	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-1,41	<b>366,1240</b> (59) <b>323,0819</b> (65) <b>297,0667</b> (100) <b>241,0767</b> (21)	4/4		3
SARA-3	342.1255 (7,4)	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-0,31	324,1134 (70) 307,0880 (9) 266,1090 (13) 238,0903 (100)	nd	-	3
SARA-4	400.1309 (8,7)	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	-0,06	<b>382,1198</b> (96) <b>354,1252</b> (56) <b>311,0835</b> (100) <b>285,0664</b> (55) 226,0670 (20)	4/5		3

**Tableau 39 (Suite)** (PT : photoproduits, TR : temps de rétention, d(m/Z) : différence de masse, NI : niveau d'identification, ABA : abacavir, \* : composé parent).

Code PT	[M+H] <sup>+</sup> (TR) (RT)	Formule brute	d(m/z) (ppm)	Fragments SM/SM (intensité in %) *	score MetFrag (nb. Frag expliqué)	Structure proposée	NI*
ABA-1	247,1313 (2,1)	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>6</sub> O	-2,3	151,0732 (100) 134,0470 (6)	2/2		3
ABA-2	319,1521 (2,8)	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	-2.4	223,0942 (100) 205,0829 (9) 151,0725 (54) 79,0550 (12)	4/4		3
ABA-3	289,1411 (3,3)	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	-1,6	193,0842 (100) 175,0707 (9) 151,0725 (58) 105,0331 (11) 79,0553 (6)	4/5		3
ABA-4	275,1256 (5,9)	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	-2.3	179,0679 (100) 151,0735 (86) 137,0469 (9) 97,0648 (7) 79,0554 (27)	5/5		3

Utilisée seule, la spectrométrie de masse haute résolution ne permet pas de renseigner sur la pertinence environnementale et la toxicité des photoproduits générés. Par exemple, les fluoroquinolones représentent une classe de molécules à fort enjeu environnemental en raison des effets néfastes pour les organismes aquatiques (Obinson et al., 2005; Khadra et al., 2012; Janecko et al., 2016). Ce groupe de molécules est en particulier connu pour être à l'origine d'antibio-résistance de certaines bactéries (Baquero et al., 2008; Osinska et al., 2016) mais également des effets génotoxiques (Khadra et al., 2012). Des produits de transformation (PT) de m/z 348 et 378 et avec des spectres de fragmentation similaires avaient été mis en évidence dans des solutions de l'ofloxacin ayant subi des traitements d'ozonation (Tableau 38). Dans cette étude, le programme ECOSAR (i.e. *Ecological Structure Activity Relationship*) a été utilisé afin de prédire *in silico* la toxicité aiguë des PT (m/z 378 et 348). Ce modèle a prédit une toxicité non préoccupante des produits de transformation pour les poissons, les daphnies et les algues (Tay et Madehi, 2015). Deux études ont montré une augmentation des effets génotoxiques d'une solution d'ofloxacin soumise à des traitements solaires ou photocatalytiques (Vasquez et al., 2013; Zgadzaj et al., 2015). Cependant, dans aucun de ces cas, le lien entre la toxicité mesurée et la molécule responsables n'a réellement pu être établi. Pour combler ce manque, de plus en plus d'études combinent l'étude des phénomènes de

dégradation à des bioessais *in vitro* (Gros et al., 2015; Kinani et al., 2016) et des approches dirigées par les effets (EDA) dans le but d'identifier les molécules, et des produits de transformation les plus pertinents (Schulze et al., 2010).

### 3. Identification de composés actifs par une approche EDA

Les méthodes présentées précédemment : non ciblée et simulée en laboratoire présentent toutes deux un frein tel qu'elles ont été appliquées. En effet, ces deux approches ne permettent pas de discriminer les molécules pertinentes à suivre en reliant leur présence et leur toxicité. L'identification des molécules responsables des effets biologiques observés dans un échantillon, s'avère souvent être une tâche ardue en raison de la grande complexité des matrices environnementales. Dans l'optique de répondre à cet enjeu, l'approche dite EDA « Effect-Directed Analysis » a été développée dans les années 80 (Brack, 2003).

Les lixiviats de décharges sont, comme toutes les matrices environnementales, très complexes résultant de la percolation d'eau au travers des massifs de déchets. La composition de ces matrices est très variable en fonction de l'origine, l'âge et le niveau de décomposition des déchets stockés (Renou et al., 2008; Ramakrishnan et al., 2014; Clarke et al., 2015). Il n'est pas surprenant que de nombreuses études aient déjà rapporté la détection d'une grande variété de composés organiques (Eggen et al., 2010).

Dans ce contexte, l'identification des composés à l'origine des effets œstrogéniques mesurés dans les lixiviats d'installation de stockage de déchets non dangereux (ISDND) est en accord avec les priorités recensées dans la littérature scientifique, mais aussi avec les préoccupations ministérielles qui ont conduit à la création du Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE) en 2005. Cependant, le choix des contaminants à prendre en considération reste difficile à établir. En effet, les analyses chimiques de routine donnent une image partielle de la complexité des matrices environnementales, et ne prennent pas compte de potentiels effets agonistes, synergiques et antagonistes de certains composés. L'utilisation de bioessais *in vitro*, basés sur la biodétection des composés par leur mécanisme d'action (liaison à un récepteur) représente un outil intégratif pour prendre en compte l'ensemble de ces effets. Cette étude s'est focalisée sur des lixiviats provenant de 3 ISDND prélevés à différents stades de traitement (brut : LB, aération : LA et après traitement : LT).

### 3.1 Mise en évidence de composés biologiquement actifs

#### 3.1.1 Génotoxicité

Le potentiel génotoxique des extraits organiques des différents lixiviats a été évalué à l'aide du SOS-Chromotest, avec et sans ajout d'une fraction microsomale S9. L'ensemble des résultats pour les deux campagnes sont présentés Tableau 40. Une génotoxicité directe (sans S9) a pu être mesurée dans deux extraits organiques de lixiviats non traités : Site1-LB et Site3-LBJ avec un facteur d'induction significativement supérieur à 1,2. L'extrait organique du lixiviat brut du site 1 révèle une génotoxicité avec un facteur d'induction de 1,35 sans bioactivation et 1,35 avec bioactivation à une concentration non cytotoxique de l'échantillon vis à vis de l'organisme d'essai soit 15%. Le SOS-Chromotest met également en évidence une génotoxicité directe (-S9) de l'extrait organique de Site3-LBJ (facteur d'induction de 1,29).

**Tableau 40 : Facteur d'induction SOS suite à une exposition des bactéries à du milieu supplémenté ou non par du S9 et contaminé par des concentrations non cytotoxiques d'extraits organiques.** Les résultats représentent la moyenne des facteurs d'induction SOS de 3 répliquats  $\pm$  écart-type ; \* Signifie qu'IF  $\geq$  1,2 avec un seuil  $\alpha < 0.05$  (Test de Student).

	Sans S9		Avec S9	
Blanc DMSO	1,04	$\pm 0,06$	0,96	$\pm 0,03$
Blanc Extraction	1,14	$\pm 0,04$	1,03	$\pm 0,04$
NQO	2,86*	$\pm 0,10$	-	-
B(a)P	-	-	2,85*	$\pm 0,05$
Site1-LB	1,35*	$\pm 0,03$	1,35 *	$\pm 0,07$
Site1-LA	1,11	$\pm 0,11$	1,02	$\pm 0,13$
Site1-LT	1,07	$\pm 0,06$	0,99	$\pm 0,06$
Site2-LB	0,97	$\pm 0,05$	1,21	$\pm 0,03$
Site2-LA	0,95	$\pm 0,06$	1,03	$\pm 0,06$
Site2-LT	0,94	$\pm 0,06$	0,97	$\pm 0,10$
Site3-LBJ	1,29 *	$\pm 0,04$	1,07	$\pm 0,04$
Site3-LBTJ	1,08	$\pm 0,14$	1,09	$\pm 0,05$
Site3-LA	0,98	$\pm 0,05$	1,10	$\pm 0,07$

#### 3.1.2 Œstrogénicité

Afin de caractériser la présence de certains perturbateurs endocriniens, l'activité œstrogénique des extraits organiques a été évaluée. Une activité œstrogénique dose-dépendante de 5 lixiviats a été constatée (Tableau 41). Cette activité est variable en fonction des différents sites échantillonnés allant de 24 à 270 ng EEQ.L<sup>-1</sup>. Des activités œstrogéniques équivalentes ont déjà été recensées dans différents lixiviats provenant d'installation de stockage des déchets non dangereux (Coors et al., 2003; Kawagoshi et al., 2003; Gong et al., 2014). Les stations de traitement des eaux usées sont souvent considérées comme les vecteurs principaux de perturbateurs endocriniens, c'est pourquoi la majorité des études se focalisent sur les affluents et effluents urbains. Cependant, l'activité retrouvée au niveau des lixiviats bruts est comparable (20 à 300 ng EEQ) à celle retrouvée dans les eaux usées

urbaines (Körner et al., 2000; Tan et al., 2007; Muller et al., 2008). La première phase de traitement des lixiviats a conduit à un abattement des composés responsables de l'induction de l'activité œstrogénique. En effet, les lixiviats aérés des sites 1 et 2 ont une activité plus faible que leur lixiviat brut respectif avec un abattement de l'activité de 75 à 100 %. En sortie de traitement, aucune activité significative n'a pu être détectée suite à l'exposition des cellules MELN, suggérant une bonne élimination des composés œstrogéno-mimétiques, quel que soit le mode de traitement.

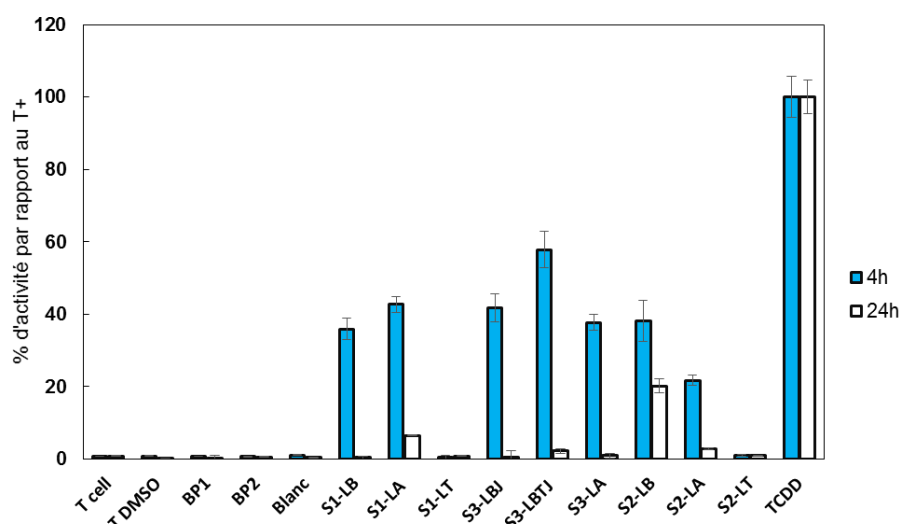
En parallèle des bioessais, des analyses chimiques ciblées ont permis de mettre en évidence la présence de certains alkylphénols (4 tert octylphénol, 4 nonylphénol) et pesticides organochlorés (2,4'DDD) dans les lixiviats. La comparaison des équivalents œstradiol théoriques (CHEM-EEQ) et mesurés (BIO-EEQ) est présentée Tableau 41. On constate que l'activité mesurée est expliquée entre 0,09 et 0,95 % par les composés ciblés par les analyses chimiques, ce qui montre que les alkylphénols et les pesticides retrouvés ne contribuent que faiblement aux activités détectées.

**Tableau 41 : Comparaison des équivalents œstrogéniques théoriques (Chem-EEQ) aux équivalents extrapolés à partir du test œstrogénique réalisé sur les extraits organiques des lixiviats (Bio-EEQ).** na : non actifs, nd : non calculé car composés non détectés).

	Site 1			Site 2			Site 3		
	S1-LB	S1-LA	S1-LT	S2-LB	S2-LA	S2-LT	S3-LBTJ	S3-LBJ	S3-LA
Bio-EEQ (ng-E <sub>2</sub> EQ.L <sup>-1</sup> )	269,90	na	na	23,55	5,66	na	na	136,35	122,56
ΣChem-EEQ (ng-E <sub>2</sub> EQ.L <sup>-1</sup> )	0,24	0,03	0,01	0,03	0,03	nc	0,08	0,25	1,16
Activité expliquée (%)	0,09	nc	nc	0,12	0,52	nc	nc	0,19	0,95

### 3.1.3 Activité AhR

La mesure de l'activité dioxine-like suite à deux temps d'exposition 4 et 24h, a entraîné une réponse transitoire et majoritairement présente après 4h d'exposition (Figure 81). Bien que le lixiviat brut du site 2 (Site2-LB) induise une activité après 24h d'exposition des cellules, l'effet détecté reste en dessous des limites de quantification. Ce constat suggère la présence de composés facilement métabolisables de type hydrocarbure aromatique polycyclique à chaîne courte (Louiz et al., 2008). L'aération des lixiviats dans les différents sites n'a eu que peu d'impact sur l'abattement des composés de type dioxine-like.



**Figure 81 : Activité dioxin-like mesurée sur les cellules PLHC-1 suite à une exposition de 4 ou 24h à des différents extraits organiques de lixiviats.** Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport à la Tcdd (1 nM) et représentent la moyenne de 3 répliquats et écart-type.

En revanche, le traitement final réduit de façon conséquente la présence des composés capables de se fixer au récepteur AhR puisque les activités mesurées pour les lixiviats traités sont inférieures aux limites de détection (Tableau 42). L'activité mesurée dans les extraits organiques de lixiviats bruts et aérés équivaut à celle induite par 5-10 µg de B(a)P. Cette concentration est équivalente à celle que l'on peut retrouver dans certains sédiments de rivière (Creusot et al., 2013a) et dans des sols d'installation de stockage des déchets (Swati et al., 2014). Une analyse d'équilibre des masses a été réalisée dans l'optique de mettre en évidence la contribution des 19 HAP dosés dans l'activité mesurée. L'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau 42. Ainsi, il est important de souligner que les concentrations en 19 HAP quantifiés expliquent seulement que 0,2 à 11 % de l'activité biologique étudiée. Ce résultat met en évidence la présence d'autres composés que ceux ciblés par les analyses de routine.

**Tableau 42 : Comparaison des équivalents biologiques théoriques (Chem-BEQ) aux équivalents extrapolés à partir du test AhR (4h) réalisé sur les extraits organiques des lixiviats (Bio-BEQ).** na : non actifs, nd : non calculé car composés non détectés).

	Site 1			Site 2			Site 3		
	S1-LB	S1-LA	S1-LT	S2-LB	S2-LA	S2-LT	S3-LBTJ	S3-LBJ	S3-LA
Bio-BEQ (ng-BaP-EQ.L <sup>-1</sup> )	9904	663	na	9036	1582	na	8154	7010	5040
ΣChem-BEQ (ng-BaP-EQ.L <sup>-1</sup> )	684	663	nc	17	68	nc	80	176	128
Activité expliquée (%)	6,91	10,83	nc	0,19	4,30	nc	0,98	2,51	2,53



### 3.1.4 Bilan

Globalement, les bioessais appliqués ont permis d'évaluer la toxicité potentielle de différents lixiviats d'âge, de localisation, et de phase de traitement différents (Figure 82 a). Leur réactivité est variable en fonction des sites et de l'âge. La présence de composés de type dioxine-like, génotoxique et œstrogénique est potentiellement problématique car ils pourraient présenter des risques environnementaux et sanitaires en cas de fuite de lixiviats à travers les membranes géosynthétiques et/ou dans le cas de diffusion de certains de ces composés au travers de celles-ci. Les procédés de traitement semblent efficaces pour abattre la grande majorité des composés induisant les effets biologiques étudiés puisqu'une absence d'effet biologique a été mise en évidence dans ces échantillons. Les concentrations efficaces 20 % (CE20) obtenues pour les activités « dioxine-like » (HPLC-1) et œstrogéniques (MELN) ainsi que les facteurs d'induction SOS (bactéries E.Coli), sur les lixiviats les plus actifs ont été comparés dans (Figure 82 b). On constate que le paramètre qui discrimine le mieux les lixiviats étudiés est l'activité œstrogénique qui est plus variable en fonction des échantillons.

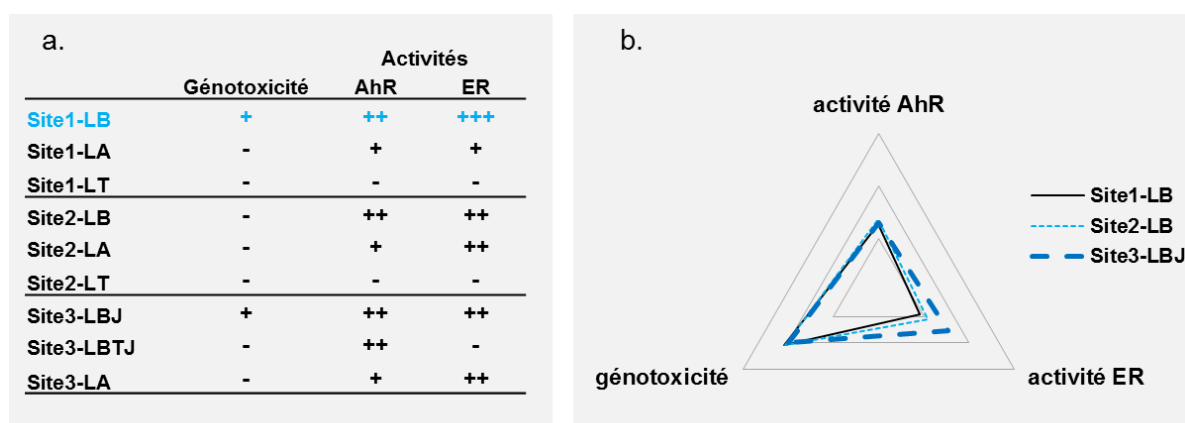


Figure 82 : Bilan et comparatif des activités biologiques mesurées dans les différents lixiviats étudiés.

### 3.2 Identification des composés responsables de l'œstrogénicité observée

En raison de la forte œstrogénicité observée dans le lixiviat site1-LB, une recherche des composés responsables de l'activité observée a été initiée sur cet échantillon. Cependant, comme vu précédemment, l'application de la spectrométrie de masse haute résolution peut s'avérer délicate en raison de la complexité des matrices environnementales. Ce constat est d'autant plus vrai pour les lixiviats issus des lixiviats d'ISDND. En effet, les lixiviats de déchets sont notamment connus pour être riches en contaminants organiques divers dont certains ont un caractère œstrogénique (Coors et al., 2003). Cependant, la complexité de ces matrices et le nombre réduit de composés recherchés en analyse chimique de routine, rendent difficile une identification des composés responsables de l'œstrogénicité de ces effluents.

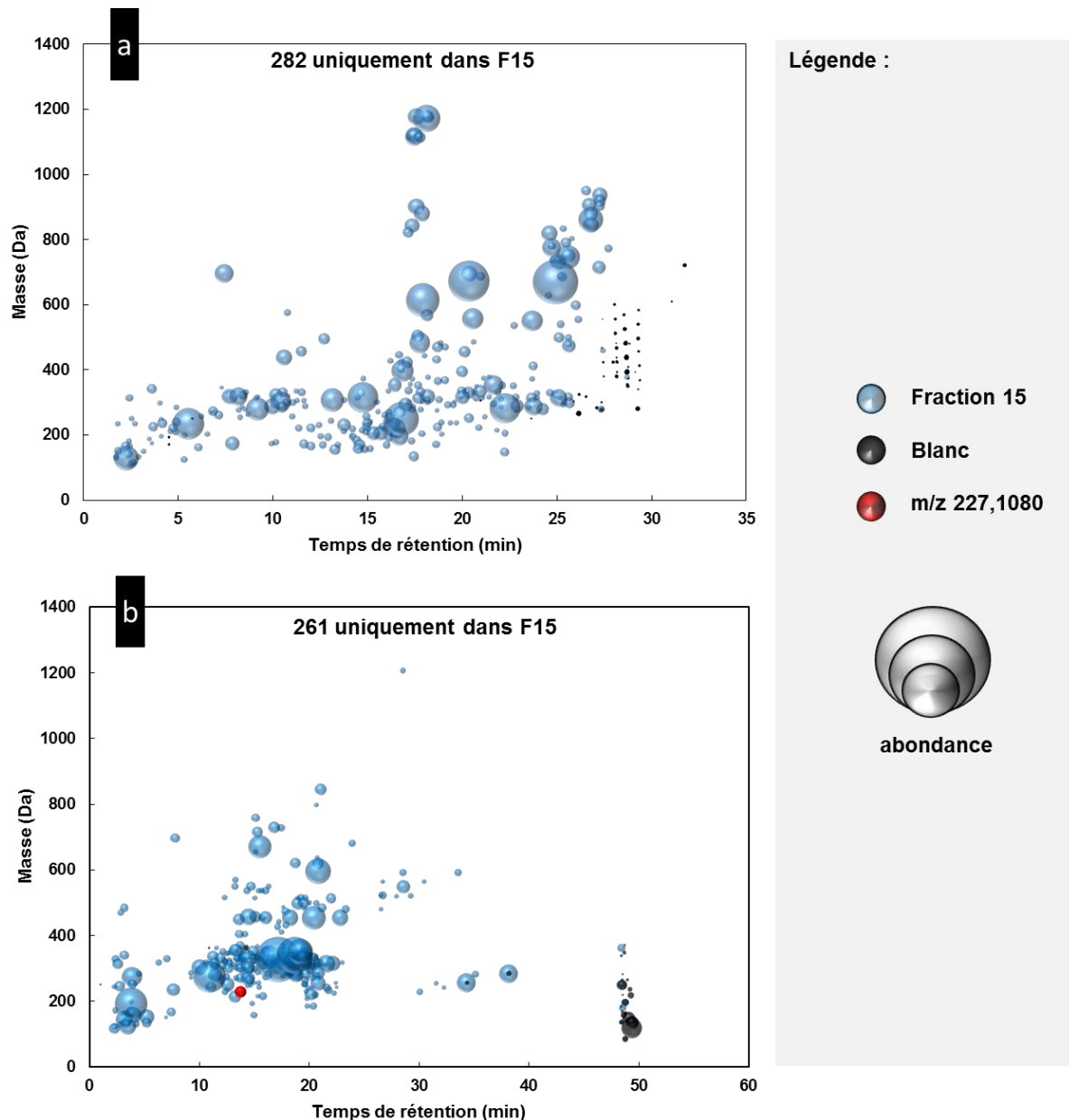
Actuellement des méthodes dites bio-analytiques, comme l'analyse dirigée par les effets, pourraient représenter un outil de choix pour identifier les composés actifs au sein de ces mélanges environnementaux. La mise en œuvre de cette approche est développée en détail dans la publication: « *Landfill leachates a source of estrogenic compound: Investigations by Effect-Directed Analysis (EDA)* ».

En résumé, parmi les 40 hyperfractions obtenues, seules quatre fractions (1, 2, 15 et 16) ont été capables d'interagir de façon significative avec les récepteurs aux œstrogènes (Figure 84 A). La majorité de l'activité a été mise en évidence dans la fraction 15 avec 160 ng-EEQ/L. Les trois autres hyperfractions présentaient un équivalent d'œstradiol plus modéré variant entre 8 et 12 ng-EEQ/L. Une analyse par HPLC-QTOF en ionisation positive et négative a été réalisée sur les 4 fractions actives afin d'identifier les composés responsables de l'œstrogénicité observée. Même après une étape de fractionnement, la composition des fractions s'est avérée complexe.

Au total, 282 et 261 signaux ont été respectivement détectés dans la fraction 15 (Figure 83). Parmi les centaines de composés détectés en ionisation négative, un composé de masse déprotonée 227,1080 (temps de rétention : 15.3 min) a pu être isolé (Figure 83 b). Ce composé, non présent dans les blancs analytiques et protocoles, a également pu être détecté en fraction 16. En accord avec sa masse expérimentale et son amas isotopique, une formule brute  $C_{15}H_{16}O_2$  (score de 92%) a été générée. Une modélisation *in silico* (Metfrag) des structures réalisées à partir du spectre de fragmentation a permis de suspecter le bisphénol A. L'injection du bisphénol A en LC-QTOF a permis de générer son spectre de fragmentation et ainsi confirmer la présence de ce composé en fraction 15 et 16 (score lib 92,26 %). La présence de bisphénol A dans deux fractions a révélé une séparation incomplète du composé lors du fractionnement. Ce phénomène a déjà été signalé et pourrait être le résultat d'un dépassement de la capacité de sorption de la colonne analytique dû à des effets matriciels (Hartnik et al., 2007). L'identification du bisphénol A dans ces deux fractions a permis de confirmer les soupçons obtenus dès la phase de fractionnement. En effet, l'injection de la solution étalon utilisée avant chaque fractionnement, avait déjà mis en évidence l'élution du bisphénol A en fraction 15 (Figure 84). La présence de bisphénol A en grande quantité dans des lixiviats d'ISDND a également été reportée dans différentes études réalisées en Europe (Masoner et al., 2014), aux Etats Unis (Coors et al., 2003) et en Asie (Asakura et al., 2004). Le bisphénol A est un des composés synthétiques les plus produits dans le monde avec une consommation mondiale qui excède les 5 millions de tonnes par an (Flint et al., 2012). Les domaines d'utilisation de ce composé sont multiples : résines époxydes, polycarbonates, synthèse de retardateur de flammes, révélateur de papier thermiques. Ce composé pseudo persistant est classé parmi les perturbateurs endocriniens en raison de ses propriétés

œstrogéniques qui ont déjà été démontrées par des tests *in vitro* et *in vivo* (Kang et al., 2015). Ce xéno-œstrogène est lixivié des massifs de déchets durant les phases de dégradation acide de plastiques et de papiers thermosensibles (Morin et al., 2015).

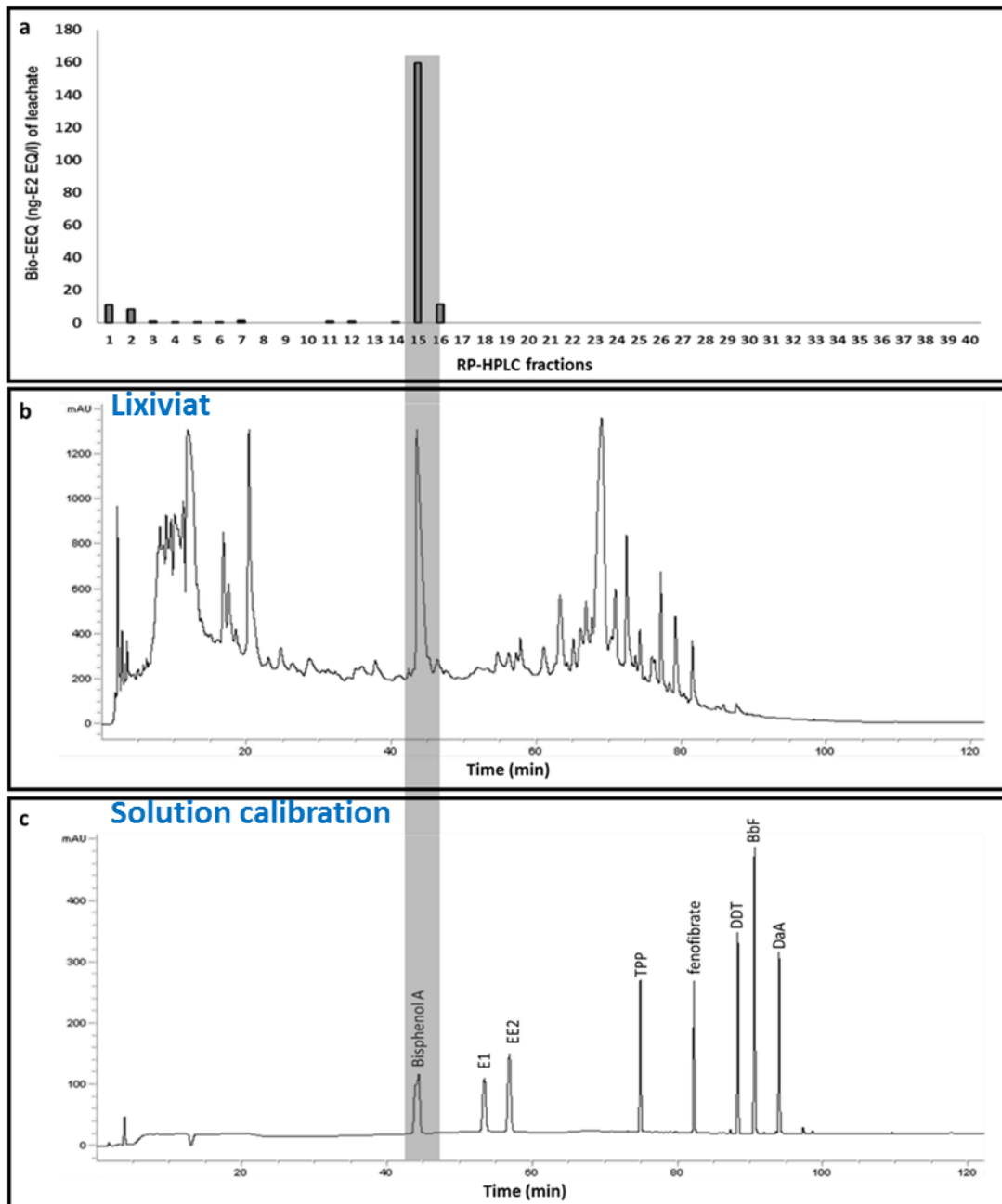
Un composé de formule brute  $C_{12}H_{10}O_4S$  (score : 91 %) présent dans les fractions les plus polaires (F1 et F2), a pu être identifié par comparaison aux banques de spectres disponibles (*MassBank*). Ainsi, la comparaison du temps de rétention et du spectre de fragmentation de la molécule inconnue présente dans F1 et F2 avec ceux du bisphénol S a permis de confirmer l'identité de ce composé (score MS/MS : 88,16). Le bisphénol S a connu une utilisation croissante du fait de l'interdiction / restriction du bisphénol A dans certains produits (emballage alimentaire, papiers thermiques). Cependant, aucune donnée n'a été trouvée pour décrire sa production en France et en Europe. Il est possible d'estimer grâce aux données d'enregistrement de l'ECHA (agence européenne des produits chimiques) que sa production / importation au sein de l'Union Européenne est comprise entre 1000 à 10000 tonnes / an. Les données concernant son activité biologique sont plus rares que celles de son analogue, le bisphénol A. Cependant, quelques études ont déjà rapporté des effets œstrogéno-mimétiques par des bioessais *in vivo* et *in vitro* (Fol et al., 2015; Rochester and Bolden, 2015).



**Figure 83 : Mise en évidence des composés présents dans la fraction 15 en mode de ionisation positif (a) et négatif (b) . Les points noirs représentent les données du blanc protocole et les points bleus, les données de la fraction 15. La taille de chaque point est dépendante de l'abondance moléculaire.**

Finalement, les calculs d'équilibre des masses confirment que la majorité (94 % à 102 %) de l'activité œstrogénique mesurée dans ces fractions est expliquée par les fortes concentrations de BPA et BPS quantifiées confirmant ainsi les suspicions de plusieurs études (Coors et al., 2003; Svenson et al., 2011). Les lixiviats de décharge sont des matrices complexes recevant un grand nombre de produits synthétiques utilisés quotidiennement. L'utilisation d'un bioessai in vitro des différents lixiviats a permis de mettre en évidence la présence de composés ayant des effets œstrogéniques dans les lixiviats bruts confirmant ainsi les potentiels risques environnementaux et sanitaires pouvant être engendrés par les

transferts advectifs et/ou diffusifs des polluants contenus dans les lixiviats à travers les barrières d'étanchéités des installations de stockage.



**Figure 84 : Comparaison du profil d'activité des fractions (a), des chromatogrammes HPLC, de l'extrait organique site1-LB (b) et d'une solution étalon de 8 composés appartenant à différentes classes (c). Les fractions, collectées toutes les 3 minutes. (E1 : Œstrone, EE2 : Ethinylestradiol ; TPP : triphénylphosphate ; DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane ; BbF : benzo(b)fluoranthène ; DaA : Dibenzo(ah)anthracène).**

Les résultats de ces mêmes biotests appliqués aux échantillons prélevés après les deux traitements de lixiviats utilisés sur les sites d'étude (évapo-concentration suivie d'une osmose inverse (site 1) ou bioréacteur membranaire suivi d'une filtration sur charbon actif (site 2))

confirment que ces traitements permettent d'abattre la grande majorité des composés œstrogéniques.

De façon générale, cette étude souligne l'intérêt de l'approche EDA pour établir un lien entre une activité spécifique comme l'activation des récepteurs aux œstrogènes et les molécules présentes en mélange. L'utilisation de la HRMS paraît indispensable pour détecter et considérer l'ensemble des molécules présentes dans une fraction active. Cependant, son succès est lié au fractionnement de l'échantillon initial.

Malgré l'étape de fractionnement par HPLC, les fractions analysées se sont avérées très complexes. Bien que chaque fraction obtenue par fractionnement en HPLC contienne beaucoup moins de composés que l'extrait total, les fractions analysées en LC-QTOF ont tout de même conservé une grande complexité. En effet, en considérant seulement le mode négatif pour la fraction 15, plus de 260 empreintes moléculaires ont été détectées. En ce sens, d'autres types de séparation /purification auraient pu être utilisés comme notamment l'utilisation de colonne d'affinités ou encore un fractionnement plus résolutif en augmentant la fréquence de fractionnement (Creusot et al., 2013a; Brack et al., 2016).

Même dans les matrices les plus complexes, l'approche EDA est un outil pertinent pour mettre en évidence les molécules responsables d'activités spécifiques. En effet, l'EDA fait partie de techniques majeures pour implémenter les listes de molécules pertinentes à suivre dans le cadre réglementaire. Cette approche s'intègre tout à fait dans une démarche d'évaluation du risque chimique et dans la mise en évidence de nouvelles molécules préoccupantes.

- Les approches non ciblées réalisées sur des échantillons environnementaux ont permis de mettre en évidence des molécules non initialement recherchées. Utilisées sur des expériences d'incubation, elles permettent de mettre en évidence la production de nouvelles molécules. Cependant, en raison de la complexité environnementale et du nombre encore limité de molécules recensées dans les bases de données, la recherche automatique n'est pas suffisante.
- Les approches d'identification à partir d'expérimentations menées en laboratoire dans des matrices simplifiées, permettent de mettre en évidence les produits de transformation générés par un mécanisme précis. A défaut d'étalon analytique, elles permettent de générer des banques de données spectrales indispensables au criblage « suspect » des masses d'eau. Cependant dans le cadre d'une mise en évidence des produits de transformation préoccupants, cette approche, utilisée seule ne permet pas de renseigner la toxicité des PT formés.
- L'utilisation de bioessais in vitro a permis de mettre en évidence la présence de composés œstrogéniques au sein de lixiviats de décharge et de discriminer le site le plus actif. Les molécules initialement recherchées n'expliquaient qu'une faible partie de l'activité œstrogénique (0,2 à 10 %). L'utilisation d'une approche de type EDA a permis faire un lien entre activité biologique mesurée et l'identité des molécules responsables (bisphénol A et S) de cette activité. En ce sens, l'EDA représente un outil pertinent en vue de l'identification des molécules les plus préoccupantes.

## 4. Publications

### 4.1 Photodegradation of novel oral anticoagulants under sunlight irradiation in aqueous matrices (acceptée dans Chemosphere)

Montaha Yassine<sup>1,2</sup>, Laura Fuster<sup>1</sup>, Marie-Hélène Dévier<sup>1</sup>, Emmanuel Geneste<sup>1</sup>, Patrick Pardon<sup>1</sup>, Mohamad Al Iskandarani<sup>2</sup>, Selim Aït-Aïssa<sup>3</sup>, Jeanne Garric<sup>4</sup>, Hélène Budzinski<sup>1,5</sup>, Patrick Mazellier<sup>1</sup>, Aurélien S. Trivella<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Univ. Bordeaux, EPOC-LPTC, UMR 5805, F-33405 Talence, France

<sup>2</sup>National Council of Scientific Research (NCSR), Lebanese Atomic Energy Commission (LAEC), Laboratory of Analysis of Organic Pollutants (LAOP), B. P. 11-8281, Riad El Solh - 1107 2260 - Beirut, Lebanon

<sup>3</sup>INERIS, Unité d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo* (ECOT), Verneuil-en-Halatte, France

<sup>4</sup>Irstea, UR MALY, centre de Lyon-Villeurbanne, F-69616 Villeurbanne, France

<sup>5</sup>CNRS, EPOC-LPTC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

\*Corresponding author: Aurélien Trivella

[aurelien.trivella@u-bordeaux.fr](mailto:aurelien.trivella@u-bordeaux.fr)

Tel: +33 (0)553352429

#### Abstract

---

Kinetics of photodegradation of novel oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban, and apixaban were studied under simulated solar light irradiation in purified, mineral, and river waters. Dabigatran and rivaroxaban undergo direct photolysis with polychromatic quantum yields of  $2.2 \times 10^{-4}$  and 0.044, respectively. The direct photodegradation of apixaban is not observed after 19 hours of irradiation. Kinetics of degradation of rivaroxaban are not impacted by the nature of the aqueous matrix while photosensitization from nitrate ions is observed for dabigatran and apixaban. Photosensitized reactions are partially blocked in the tested river water (Isle River, Périgueux, France) due to the hydroxyl radical scavenging effect of the dissolved organic matter. The study of photoproduct structures allowed to identify two compounds for dabigatran. One of them is the 4-aminobenzamidine while the second one is a cyclisation product. In the case of rivaroxaban only one photoproduct was observed *i.e.* a photoisomer. Finally, seven photoproducts were clearly identified from the degradation of apixaban under simulated solar light.

**Keywords:** photolysis, solar light irradiation, surface water, apixaban, dabigatran, rivaroxaban

\*NB: Pour des raisons de lisibilité les références bibliographiques ont été placées en fin de manuscrit.



## 1. Introduction

Until recently, oral anticoagulants were synonyms of vitamin K antagonists (VKAs) such as warfarin. These medicines are used for venous thromboembolism, stroke, atrial fibrillation, and most generally in medicinal conditions that require chronic anticoagulation (Hanslik and Prinseau, 2004). VKAs can be not appropriate for many patients especially due to the necessity of dietary precautions and frequent laboratory monitoring (El-Helou et al., 2013). In fact, if warfarin concentration is too low the anticoagulation effect does not act efficiently; a too high concentration causes excess bleeding. In this context, novel oral anticoagulants (NOACs) were developed (Beyer-Westendorf, et al., 2014). The U.S. Food and Drug Administration (F.D.A.) recently approved the use of three new active ingredients, namely dabigatran etexilate (2010), rivaroxaban (2011), and apixaban (2012) (Wanat, 2013). Dabigatran etexilate is a prodrug which is converted to dabigatran and acts as a direct thrombin inhibitor (Khoo and Lip, 2010). Rivaroxaban and apixaban are direct factor Xa inhibitors that does not require cofactors for activities (Gulseth et al., 2008; Frost et al., 2013). These three compounds are also increasingly used in Europe. In particular, these NOACs currently represent 30% of ingested anticoagulants in France with an increase of the consumption of a factor 10 between the second trimester 2012 and the third trimester 2013 (ANSM, 2012). The main limitation for their use was the absence of antidote. In 2015, the F.D.A. approved the idarucizumab as dabigatran antidote while rivaroxaban and apixaban antidote (andexanet alpha) is about to be validated (Pollack et al., 2015). It is thus expected that their prescriptions continue to rise in the near future.

To our knowledge information reported in the literature about the occurrence of NOACs in the aquatic compartment, about their fates, and about their toxicity and those of their degradation products are very scarce (Kasad, 2013; Ramiseti and Kuntamukkala, 2014; Secrétan et al., 2015; Swain et al., 2016; Tantawy et al., 2016; Wingert et al., 2016). This is especially troubling since human metabolism studies show that NOACs are eliminated in urines as unchanged forms at levels between 27 and 85% of the delivered dose (eVidal, 2017). In fact, organic pollutants are known to undergo degradation processes which must be taken into account. Photolysis can be one of the major ways of degradation for pharmaceutical compounds absorbing solar light and for those degraded by photosensitization (Szabo et al., 2011; Carlson et al., 2015; Zhang, Y.-N., Xie, Q., Sun, G., Yang, K., Song, S., Chen, J., Zhou, C., Li, 2016).

The presented study has for objective to bring information on the environmental fate of NOACs and especially on their direct and indirect photolysis reactions that they undergo into the aquatic compartment. Results on molar absorption coefficients, rate constants and

polychromatic quantum yields of photodegradation are discussed. Rate constants were obtained from simulated solar light irradiation in purified, mineral, and river waters to evaluate the effect of ions and dissolved organic matter naturally present in surface waters. Finally, the elucidation of structures of photoproducts was performed.

## **2. Experimental Section**

### **2.1. Chemicals.**

Novel oral anticoagulants (NOACs) dabigatran (APiChem Technology, CAS 211914-51-1, 99%), rivaroxaban (AKSci, CAS 366789-02-8, 98%), and apixaban (APiChem Technology, CAS 503612-47-3, 99%), and 4-aminobenzamidine dihydrochloride ( $\geq 99.0\%$ ), methanol (CHROMASOLV®,  $\geq 99.9\%$ ), and sodium bicarbonate salt ( $\geq 99.5\%$ ) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Sodium nitrate salt (analytical reagent grade) was provided by Fisher Chemical. All chemicals were used as received. Purified water was obtained using a Milli-Q® Direct-Q® 5 system (Millipore, resistivity 18.2 M $\Omega$ .cm). The chosen mineral water contains 7.2 and 74.0 mg.L<sup>-1</sup> of nitrate and hydrogen carbonate ions, respectively. River water was collected from the Isle river (Périgueux, France). This surface water contained 7.7 and 140-200 mg.L<sup>-1</sup> of nitrate and hydrogen carbonate ions, respectively. Before use, the river water was filtered on a 0.45  $\mu$ m hydrophilic PVDF Durapore® membrane (Millipore). Stock solutions of NOACs were prepared in purified water at concentrations of  $5 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ , and  $3 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> for dabigatran, rivaroxaban, and apixaban, respectively. During the preparation, volumetric flasks were covered with aluminum foils and solutions were left under magnetic stirring during one week. Then, stock solutions were stored in amber glass bottles at room temperature until use. In the case of kinetics studies, purified, mineral, and river waters were spiked with the stock solutions to obtain final concentrations of  $3.5 \times 10^{-7}$ ,  $3.5 \times 10^{-7}$ , and  $4.5 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> for dabigatran, rivaroxaban, and apixaban, respectively. For the elucidation of photoproduct structures, non-irradiated and irradiated stock solutions were analyzed without pre-treatment.

### **2.2. UV-Visible spectroscopy.**

UV-Visible absorption spectra were recorded on a UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu, Japan). A 1-nm resolution and a “medium” scan rate were used to record the reference spectrum and spectra in the range 200-400 nm (NOACs do not absorb visible light) using either 1 or 5 cm quartz cuves (QS, Hellma Analytics).

Molar absorption coefficients of dabigatran and rivaroxaban in purified water were calculated from the absorbance of five solutions with concentrations enclosed in the range  $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>. Due to the low solubility of apixaban in water (calculated solubility:  $3.4 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> at pH 7 and 25°C) (ACD Software), a stock solution was prepared in methanol at a concentration

of  $9.6 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>. Then, this stock solution was used to prepare five solutions at concentrations between  $10^{-6}$  and  $4.8 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> by adding purified water (*i.e.* the maximal proportion of methanol was of 50%).

### 2.3. Irradiation experiments.

Solar radiations at the Earth surface were simulated with a SUNTEST CPS apparatus from Atlas Material Testing Solutions (Illinois, USA). The irradiance was set to 250 W.m<sup>-2</sup>. Before irradiation, samples were placed into 12 mL transparent glass tubes (optical pathlength: 1.5 cm) and were sealed to avoid water evaporation. NOACs were irradiated in purified water alone and doped with nitrate and bicarbonate ions (same concentrations than in the mineral water), in mineral water, and in river water. For each aqueous matrix, two tubes were filled with 10 mL of solution and one of them was wrapped in an aluminum foil for dark control. To obtain kinetics data, aliquots of each sample were taken off before irradiation and after scheduled irradiation time. For each kinetics, at least five samplings were performed and they were repeated in triplicates. The maximal irradiation time was of 10 hours for dabigatran, 4 hours for rivaroxaban, and 19 hours for apixaban. In the goal to calculate the polychromatic quantum yields of photodegradation, photon fluence rates were measured with a one nanometer interval in the range 290-350 nm with an USB2000+ radiometer coupled to an optical fiber (Ocean Optics, Florida, USA).

### 2.4. HPLC and LC-QToF analyses.

For kinetics studies, HPLC analyses were carried out using an Agilent 1100 Series (Agilent Technologies) equipped with a variable wavelength detector. For dabigatran and rivaroxaban, the column was a Nucleosil® C<sub>18</sub> Nautilus, 250 mm x 4.6 mm, with a particle size of 5 µm (Macherey-Nagel) while for apixaban the column was a Nucleodur® 100-5 C<sub>18</sub> ec, 250 mm x 4.6 mm, with a particle size of 5 µm (Macherey-Nagel). Solvent A was methanol and solvent B purified water. Analyses were carried out in isocratic mode with a ratio of 60:40 (A:B, v/v) for rivaroxaban and apixaban, and a ratio of 30:70 (A:B, v/v) for dabigatran. The UV detection was performed at 303, 248, and 277 nm for dabigatran, rivaroxaban, and apixaban, respectively.

UV absorption spectra of photoproducts were recorded with an HPLC Spectra System P1000 coupled with a diode array detector model UV6000LP (Thermo Separation® Products). For each NOAC, experimental conditions described above were used. In the goal to check the elution of all the products formed after irradiation, other analyses were performed in gradient mode. The gradient elution started with 10% of A and reached 100% in 25 minutes linearly. Then, it was kept stable during 5 minutes. No new photoproduct was observed comparing to isocratic mode analyses.

For LC-QToF experiments, liquid chromatography analyses were carried out using an Agilent Technologies 1200 HPLC system coupled to an Agilent Technologies 6540 QToF mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source. The chromatographic separation (gradient mode) of the parent compound and of its photoproducts was performed on a Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> column (100 x 2.1 mm, particle size 1.7 μm) regulated at 30°C. Ultra-pure water and acetonitrile (both acidified with 0.1% of formic acid (v/v)) were used as mobile phases and a flow rate of 0.5 mL.min<sup>-1</sup> was used. The gradient mode started with 90% of ultra-pure water to reach linearly 65% in 13 minutes. Sample injection volume was set at 5 μL. Mass spectrometry experiments were performed in positive mode. In the aim to record the fragmentation spectra, the collision energy was adjusted from 20 to 60 eV. Argon was used as collision gas. A tension of 3.0 kV was applied to the capillary voltage. Source and desolvation temperatures were set at 350°C and 400°C, respectively. Desolvation gas (nitrogen) flow was adjusted at 12 L.min<sup>-1</sup>.

## 2.5. Rate constants and polychromatic quantum yields.

Following the absorption of a photon, an organic contaminant (C) can be degraded and one or several photoproducts (P) are formed. The equation of the reaction is:



This reaction generally follows an apparent first-order kinetics modeled by equation 1:

$$\ln\left(\frac{[C]_0}{[C]_t}\right) = k_{poly} \cdot t \quad \text{eq. (1)}$$

where  $[C]_0$  and  $[C]_t$  are the organic contaminant concentrations (mol.L<sup>-1</sup>) respectively before irradiation and at the instant  $t$ ,  $k_{poly}$  is the apparent first-order rate constant under polychromatic irradiation (s<sup>-1</sup>), and  $t$  is the irradiation time (s).

In this framework, the rate of photolysis of C is given by equation 2:

$$v(C) = k_{poly} \cdot [C]_0 = \sum_{\lambda_1}^{\lambda_n} I_{0,\lambda_i} \cdot (1 - e^{-2.303 \cdot A_{\lambda_i}}) \cdot \phi_{\lambda_i} \quad \text{eq. (2)}$$

where  $I_{0,\lambda_i}$  is the photon fluence rate of the irradiation source (E.L<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>),  $A_{\lambda_i}$  is the absorbance of C and  $\phi_{\lambda_i}$  is the quantum yield of photolysis of C (mol.E<sup>-1</sup>) at the  $\lambda_i$  wavelength.  $\lambda_1$ - $\lambda_n$  is the overlapping wavelength range between the UV-Vis absorptions of the organic contaminant and the emission spectrum of the radiation source.

In environmental conditions, the absorbance of C is generally low ( $A < 0.02$ , hyper dilute medium). Based on this hypothesis, the expression of polychromatic quantum yield of photolysis ( $\phi_{poly}$ , mol.E<sup>-1</sup>) of C is given by equation 3:

$$\Phi_{poly} = \frac{k_{poly}}{2.303 \cdot l} \cdot \sum_{\lambda_1}^{\lambda_n} \frac{1}{\epsilon_{\lambda_i} \cdot I_{0,\lambda_i}} \quad \text{eq. (3)}$$

where  $l$  is the sample's optical pathlength (cm) and  $\epsilon_{\lambda_i}$  is the molar absorption coefficient ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) at the  $\lambda_i$  wavelength.

## 2.6. Nuclear magnetic resonance spectroscopy.

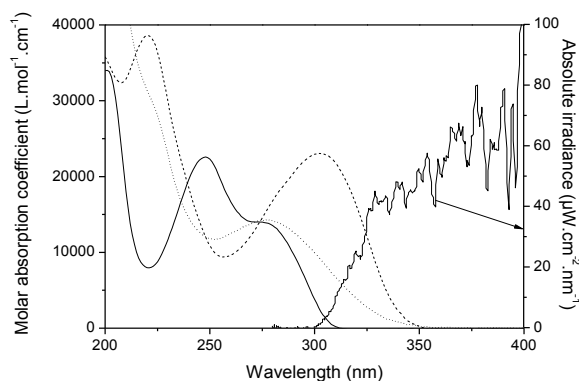
In the aim of concentrate the rivaroxaban photoisomer, a solution of rivaroxaban at an initial concentration of  $52.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  in methanol was irradiated with a SUNTEST CPS+ ( $250 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ ) during 8 hours. A volume of 8 mL of this solution was evaporated and the residue dissolved in  $500 \mu\text{L}$  of methanol- $d_3$  for NMR experiments. A second sample of pure rivaroxaban (few mg of powder were dissolved in methanol- $d_3$ ) was prepared.

1D and 2D NMR spectra of non-irradiated and irradiated rivaroxaban were recorded at room temperature on Bruker Avance III HD SB 700 MHz and 800 MHz spectrometers. The 700 MHz spectrometer was equipped with a 5 mm  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ / $^{15}\text{N}$ /D TXI probe with Z-gradients operating at 176.07 MHz and 700.15 MHz for  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ , respectively. The 800 MHz spectrometer was equipped with a 5 mm  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ / $^{15}\text{N}$ /D TCI cryoprobe with Z-gradients operating at 81,08 MHz, 201.21 MHz and 800.23 MHz for  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ , respectively. In order to assign the 2 structures, the following experiments were performed: proton, carbon, HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , COSY, TOCSY, NOESY, and SOFAST-HMQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Ultraviolet absorption spectra.

UV absorption spectra of novel oral anticoagulants (NOACs), namely dabigatran, rivaroxaban, and apixaban, are presented in Figure 1. Dabigatran dissolved in deionized water displays two maxima located at 302 nm ( $\epsilon_{302} = 24\,180 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) and 220 nm ( $\epsilon_{220} = 40\,940 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). In the case of rivaroxaban, the spectrum recorded in the aqueous medium shows a maximum at 248 nm ( $\epsilon = 23\,820 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Moreover, a shoulder is observed at 273 nm ( $\epsilon = 14\,930 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). UV absorptions of apixaban were studied in a mixture of methanol and water due to the very low solubility of the drug into the inorganic solvent. A maximum of absorption is observed at 278 nm ( $\epsilon = 14\,320 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). This maximum was found at the same wavelength in pure methanol and in pure water. The calculated molar absorption coefficient in pure methanol was of  $14\,700 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .



**Figure 1. UV absorption spectra of dabigatran (dashed line) and rivaroxaban (plain line) dissolved in purified water, and of apixaban (dotted line) dissolved in a methanol-water mixture. Solar light emission spectrum at the Earth surface on May 5, 2016 at coordinates (45.195510, 0.718811).**

The three NOACs absorb photons above 300 nm. Therefore, they absorb the solar light reaching the Earth surface and they can undergo direct photolysis (Figure 1). The study of this abiotic degradation pathway is of main concern on the environmental point of view. Moreover, the role of ions and dissolved organic matter (DOM) naturally present in surface waters is also discussed further.

### 3.2. Rate constants and quantum yields of photolysis.

Dabigatran, rivaroxaban, and apixaban were irradiated under simulated solar light in not spiked and spiked purified water with nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and hydrogen carbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) ions, in mineral water, and in river water. Calculated rate constants, coefficients of determination, half-lives ( $t_{1/2}$ ), and polychromatic quantum yields of photolysis are compiled in Table 1. In each case, NOACs photolysis followed an apparent first-order kinetics. From dark control samples no thermal degradation and no hydrolysis were observed in the meantime of the irradiation experiments.

Kinetics of photodegradation of dabigatran is dependent on the nature of the aqueous matrix. The calculated half-life was of 19.9 hours in the deionized water and decreased of a factor 2.7 to reach 7.4 hours in the mineral water. Following, dabigatran was irradiated in purified water spiked with nitrate ions at a concentration of  $7.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  *i.e.* same concentration as the mineral water used. The obtained half-life was of 6.8 hours which is almost the same value than those obtained in mineral water. In river water (nitrate ions concentration:  $7.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 50% of dabigatran was degraded in 24.1 hours; therefore, in this aqueous medium the degradation induced by light is less efficient of a factor 3.3 comparing to the mineral water. For rivaroxaban, kinetics of photodegradation are not significantly dependent on the nature of the aqueous matrix. In fact, half-lives of 2.3, 2.1, and 2.2 hours were obtained in purified,

mineral, and river waters, respectively. Photolysis of rivaroxaban in purified water spiked with nitrate ions led to a half-life of 2.0 hours.

The behavior of apixaban under simulated solar light irradiation is function of the aqueous medium. In purified water no degradation of the drug is observed after 19 hours of irradiation. At the opposite, in mineral water, a degradation was observed; the calculated half-life was of 23.6 hours. This half-life decreases of a factor 2.3 (10.4 hours) when apixaban is irradiated in purified water in presence of nitrate ions. When both nitrate and hydrogen carbonate ( $74.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ions are present in the medium, the half-life increases to 26.9 hours. In the river water, 50% of degradation are reached after 96.3 hours, clearly showing a lowering of the efficiency of the photodegradation.

**Table 1. Apparent first-order rate constants ( $k$ ,  $\text{min}^{-1}$ ), coefficient of determination ( $R^2$ ), half-lives ( $t_{1/2}$ , h), and polychromatic quantum yields of photolysis ( $\Phi$ ,  $\text{mol.E}^{-1}$ ) obtained from Suntest irradiation of NOACs in aqueous matrices. ND: not degraded. Error bar on first-order rate constants:  $\pm 10\%$ .**

NOAC	Aqueous matrix	$k \times 10^4$	$R^2$	$t_{1/2}$	$\Phi$
Dabigatran	purified water	6.0	0.9944	19.9	$2.2 \times 10^{-4}$
	mineral water	14.1	0.9778	7.4	-
	purified water + $\text{NO}_3^-$	17.1	0.9953	6.8	-
	river water	4.7	0.9633	24.1	-
Rivaroxaban	purified water	49.4	0.9975	2.3	0.044
	mineral water	55.9	0.9943	2.1	-
	purified water + $\text{NO}_3^-$	57.5	0.9808	2.0	-
	river water	51.6	0.9960	2.2	-
Apixaban	purified water	ND	-	-	ND
	mineral water	4.9	0.9924	23.6	-
	purified water + $\text{NO}_3^-$	11.1	0.9892	10.4	-
	purified water + $\text{NO}_3^-$ + $\text{HCO}_3^-$	4.3	0.9823	26.9	-
	river water	1.2	0.9875	96.3	-

At the light of these results, we can affirm that among the three studied NOACs, dabigatran and rivaroxaban undergo direct photolysis under simulated sunlight irradiation, *i.e.* a degradation occurs in purified water. At the opposite, direct photodegradation of apixaban is not significant. In addition of direct photolysis, photosensitized reactions are clearly observed for dabigatran and apixaban. Ions naturally present in the mineral water can be at the origin of this process. Especially, the photosensitizing potential of nitrate ions was studied by (Mack et al., 1999). These ions absorb solar light and then react with water to produce hydroxyl radicals. The photodegradation kinetics of dabigatran is accelerated in mineral water and in purified

water spiked with nitrate ions. Both aqueous media lead to a half-life close to 7.0 hours. We can thus conclude that the ion mainly responsible for the acceleration of dabigatran photodegradation is  $\text{NO}_3^-$ . In the case of apixaban, circumstances are slightly different. Nitrate ions are also proved to accelerate the photolysis of the drug but this result is not enough to explain the obtained half-life in mineral water. In fact, 50% of degradation are reached after 23.6 and 10.4 hours in mineral water and deionized water spiked with  $\text{NO}_3^-$ , respectively. The adding of hydrogen carbonate ions to nitrate ions spiked water induces an increase of half-life of a factor 2.6 ( $t_{1/2} = 26.9$  h). Hydrogen carbonate ions are among the most widespread anions in environmental waters and are known to act as scavengers of hydroxyl radicals (Nakatani et al., 2007; Tercero Espinoza et al., 2007). Therefore, in our case the increase of apixaban half-life is mainly due to the reaction of  $\text{HCO}_3^-$  ions with hydroxyl radicals produced by nitrate ions under simulated sunlight irradiation. Finally, rivaroxaban photolysis seems not to be significantly impacted by ions present in the mineral water. This result can be explained by a specific photochemical reactivity of rivaroxaban, *i.e.* photoisomerization, which involves an intramolecular process of transformation as it will be discussed further.

In the river water, the concentration of nitrate ions ( $7.7 \text{ mg.L}^{-1}$ ) is close to that measured in the mineral water ( $7.2 \text{ mg.L}^{-1}$ ). The concentration of hydrogen carbonate ions is enclosed between 200 and  $140 \text{ mg.L}^{-1}$ , *i.e.* at least twice as high as in the mineral water. Thus, the  $\text{HCO}_3^-$  ions scavenging effect is expected more efficient in the river water than in the mineral water. In surface waters, the ions effects are added to those of DOM which can act as photosensitizer, screen through competitive light absorption, quencher of excited triplet state, and radical scavenger (Walse et al., 2004; Wenk et al., 2011; Liang et al., 2015; R. Zhang et al., 2016). In the case of dabigatran, the half-life increases of a factor 3.3 by comparison to the mineral water. This increase cannot be assigned only to the scavenging effect of  $\text{HCO}_3^-$  ions. In fact, the comparison of results in mineral water and purified water spiked with  $\text{NO}_3^-$  ions show no clear effect of  $\text{HCO}_3^-$  ions on the rate constants of photolysis of dabigatran (Table 1). In the same way, apixaban half-life increases of a factor 4.1. Thus, the increase of half-lives of dabigatran and apixaban cannot be explained only by the increase in concentration of  $\text{HCO}_3^-$  ions in the river water but by the effect of DOM. Results obtained with rivaroxaban help to understand its role. In fact, rivaroxaban phototransformation is apparently not impacted by the presence of DOM. Thus, no screen effect is observed. This result leads to the conclusion that the degradation slowing down observed for dabigatran and apixaban in river water is mainly due to a scavenging of hydroxyl radicals. The effect of DOM is emphasized with apixaban, for which the degradation occurs only by means of photosensitization.

Finally, the efficiency of NOACs direct photolysis was evaluated from polychromatic quantum yields of photodegradation. Values of  $2.2 \times 10^{-4}$  and  $0.044 \text{ mol.E}^{-1}$  were calculated for



dabigatran and rivaroxaban, respectively. This result highlight the fact that rivaroxaban direct photolysis is 200 fold more efficient than those of dabigatran. In the case of apixaban, no quantum yield of photolysis was determined due to the absence of degradation after 19 hours of simulated sunlight irradiation.

#### **3.4. Structures of NOACs photoproducts.**

For each NOAC, non-irradiated and irradiated solutions were analyzed by means of an HPLC coupled to a high resolution mass spectrometer. Results led to the observation of three products (D1, D2, and D3) for dabigatran and one product (R1) for rivaroxaban both irradiated in purified water. For apixaban, seven products (A1 to A7) were observed in mineral water. Results are gathered in Table 2.

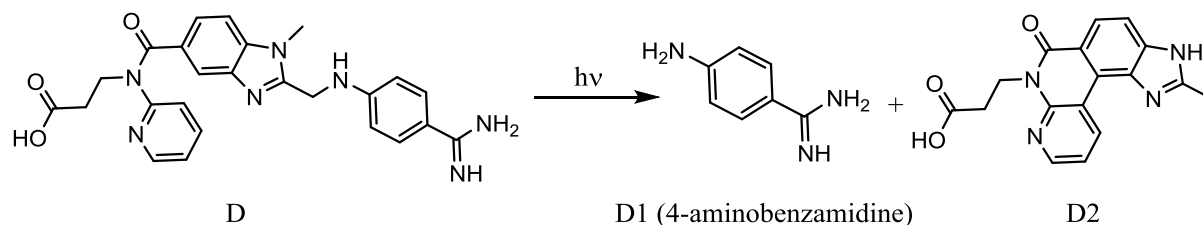
In the case of dabigatran, among the three photoproducts observed two of them were associated to the drug photodegradation (Scheme 1). These compounds have m/z of 136.0874 (D1, C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>) and 323.1145 (D2, C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>). D1 fragmentation spectrum displays m/z at 119 (-17) associated to the loss of a NH<sub>3</sub> group located on the amidine part, and at 92 (-27) associated to the loss of the C=NH fragment (see supplementary material).

**Table 2. LC-MS/MS ESI+ analyses of NOACs and of their photoproducts. RT: retention time.**

NOAC	Name	m/z (RT in min)	Proposed chemical formula	$\Delta(m/z)$ (ppm)	Fragments (relative intensity in %)
Dabigatran	D	472.2116 (2.2)	$C_{25}H_{26}N_7O_3$	-4.02	-
	D1	136.0874 (1.0)	$C_7H_{10}N_3$	0.73	119 (100), 92 (17)
	D2	323.1145 (2.3)	$C_{17}H_{15}N_4O_3$	-0.31	251 (100%)
	D3	279.1248 (3.2)	$C_{16}H_{15}N_4O$	-0.72	251 (100%)
Rivaroxaban	R	436.0739 (11.3)	$C_{19}H_{19}ClN_3O_5S$	-1.15	-
	R1	436.0732 (8.2)	$C_{19}H_{19}ClN_3O_5S$	0.46	436 (73), 231 (63), 145 (100)
Apixaban	A	460.2012 (11.7)	$C_{25}H_{26}N_5O_4$	-5.87	-
	A1	191.1186 (1.5)	$C_{11}H_{15}N_2O$	-1.05	191 (100), 147 (16), 107 (13)
	A2	287.1146 (5.3)	$C_{14}H_{15}N_4O_3$	-0.70	270 (100), 242 (9)
	A3	354.1581 (5.5)	$C_{18}H_{20}N_5O_3$	-4.24	337 (100)
	A4	476.1939 (8.0)	$C_{25}H_{26}N_5O_5$	-1.05	459 (100), 241 (13), 199 (74)
	A5	476.1939 (8.5)	$C_{25}H_{26}N_5O_5$	-1.05	459 (100), 361 (11), 241 (18), 200 (13), 199 (70)
	A6	446.1818 (8.8)	$C_{24}H_{24}N_5O_4$	2.24	430 (23), 429 (83), 282 (13), 227 (15), 186 (13), 185 (100), 171 (12), 93 (11)
	A7	458.1820 (12.3)	$C_{25}H_{24}N_5O_4$	1.75	458 (42), 441 (100), 385 (64), 342 (10), 277 (15), 199 (36)

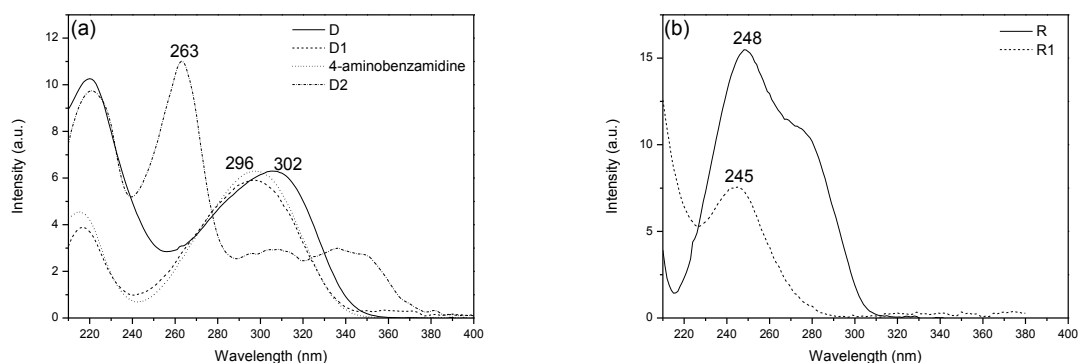
D1 was identified as the 4-aminobenzamidine (4-AB). This hypothesis has been confirmed from LC-UV (Figure 2a) and LC-QToF (see supplementary material) analyses of the

standard. 4-AB is known to act as inhibitor of the trypsin, an enzyme involved in the digestion of proteins (Safarik et al., 2002). D2 structure is formed from the other moiety of dabigatran for which an intramolecular cyclization and a demethylation occurred (Scheme 1). Only one fragment ( $m/z = 251$ ) is clearly observed for D2. This fragment is associated to a decarboxylation and a CO elimination. The UV spectrum of D2 is displayed in Figure 2a.



**Scheme 1. Photodegradation of dabigatran under simulated solar light irradiation in purified water.**

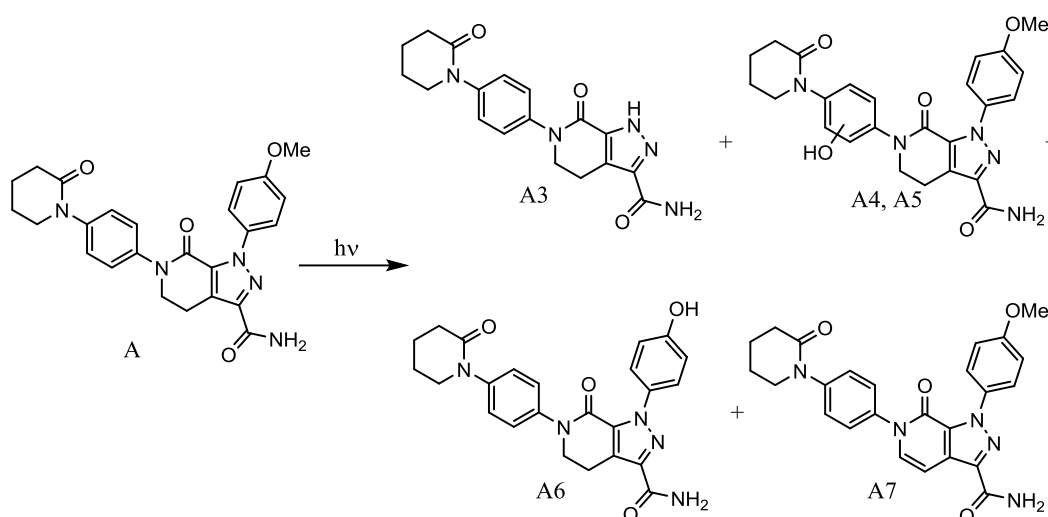
Finally, a last photoproduct (D3) with a  $m/z$  of 279.1248 ( $C_{16}H_{15}N_4O$ ) was observed. This one is not directly formed from dabigatran but from D2. In fact, D2 and D3 have a  $m/z$  difference of 44 ( $CO_2$  group) and produce the same fragment at  $m/z = 251$ . Therefore, we can assume that D3 is formed from the photo-decarboxylation of D2.



**Figure 2. UV absorption spectra of (a) dabigatran (plain line), D1 (dashed line), 4-aminobenzamidine (dotted line), and D2 (dashed-dotted line); (b) rivaroxaban (plain line) and of its photoisomer (R1, dashed line).**

Rivaroxaban degradation induced by simulated solar light irradiation in purified water produces only one main photoproduct associated to a molecular ion at 436.0732 (named R1) in ESI+ mode (Table 2). R1 has the same  $m/z$  than rivaroxaban, *i.e.* a photoisomerization occurred. The UV absorption spectrum of R1 displays one band at 245 nm while those of rivaroxaban presents a maximum at 248 nm with a shoulder at 273 nm (Figure 2b). The substituted thiophene moiety is responsible for the maximum of absorption around 245 nm (Boig et al., 1953); this part of the parent compound is unchanged in R1. This result is supported by the presence of a fragment at  $m/z$  145 assigned to the substituted thiophene ring and observed on both spectra of isomers (see supplementary material).





**Scheme 3. Major photoproducts of apixaban formed under simulated solar light irradiation in mineral water.**

A1 ( $m/z = 191.1186$ ), A2 ( $m/z = 287.1146$ ) are assigned to  $C_{11}H_{15}N_2O$ ,  $C_{14}H_{15}N_4O_3$ , and  $C_{25}H_{26}N_5O_5$  chemical formula, respectively. Concerning the main photoproducts, A3 ( $354.1581$ ,  $C_{18}H_{20}N_5O_3$ ) is formed from the release of methoxybenzene, A5 ( $476.1939$ ,  $C_{25}H_{26}N_5O_5$ ) is obtained by hydroxylation of the phenyl group (as well as A4), A6 ( $446.1818$ ,  $C_{24}H_{24}N_5O_4$ ) is formed from the substitution of the methoxy group by a hydroxy group, and A7 ( $458.1820$ ,  $C_{25}H_{24}N_5O_4$ ) is obtained from the formation of an unsaturation into the 2-oxo-1-piperidinyl ring linked to the pyrazole ring. This latter structure is in agreement with a lowering of polarity and thus an increase of retention time. The fragmentation pattern of each photoproduct is described in supplementary material.

#### **4. Conclusion**

Kinetics of photodegradation show that photolysis can be one of the main ways of degradation for NOACs present in surface waters. Rivaroxaban degradation is not significantly impacted by the nature of the aqueous matrix. This compound seems only to undergo direct photolysis leading to a photoisomerization. The structure of the photoisomer has been clearly identified from NMR spectra. Dabigatran is photolyzed by direct and indirect routes. Nitrate ions are mainly responsible for the acceleration of dabigatran degradation. Results in river water shown that dissolved organic matter slows down the degradation of dabigatran probably from its action as scavenger of hydroxyl radicals. Two photoproducts are formed, *i.e.* the 4-aminobenzamidine and a cyclization product. Apixaban is degraded only by photosensitization which is induced by nitrate ions. At the opposite, hydrogen carbonate ions partially block the degradation of apixaban. This effect is also observed in presence of dissolved organic matter. Seven photoproducts were clearly identified under simulated solar light irradiation of apixaban. At the light of these results, it will be important to evaluate the ecotoxicological impact of NOACs photoproducts. Especially, the isomer of rivaroxaban and the 4-aminobenzamidine known as inhibitor of the trypsin could be at the origin of toxic effects.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the French national program EC2CO-Ecodyn (PATNACOT). Financial support from the TGIR-RMN-THC Fr3050 CNRS for conducting the research is gratefully acknowledged. The authors also would to thank the multidisciplinary Seine Aval scientific program (CRAPPSE project), sponsored by the GIP Seine-Aval (<http://seine-aval.crihan.fr/web/>). This study has been carried out in the framework of the investments for the future program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX 45).

## Supplementary material

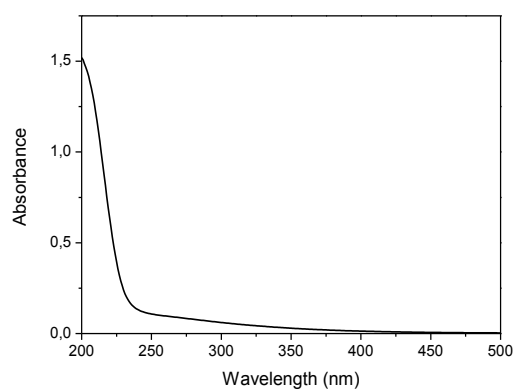


Figure 1. UV-Vis absorption spectrum of the Isle River (Périgueux, France) recorded after filtration on a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane.

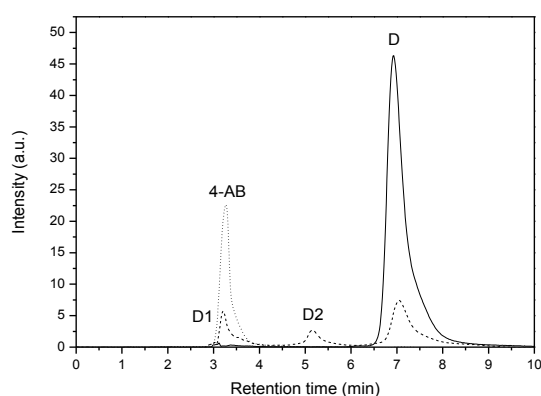


Figure 2. LC-UV chromatograms of dabigatran before (plain line) and after 4 hours of Suntest irradiation (dashed line), and of the non-irradiated 4-aminobenzamidine (4-AB, dotted line).

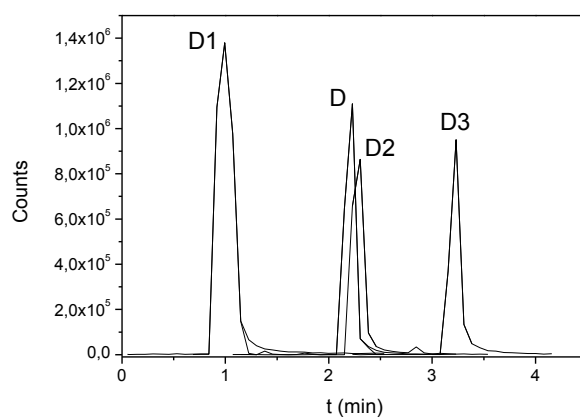


Figure 3. Extracted-ion chromatogram from LC-MS/MS analysis of dabigatran irradiated 4 hours under simulated sunlight in purified water.

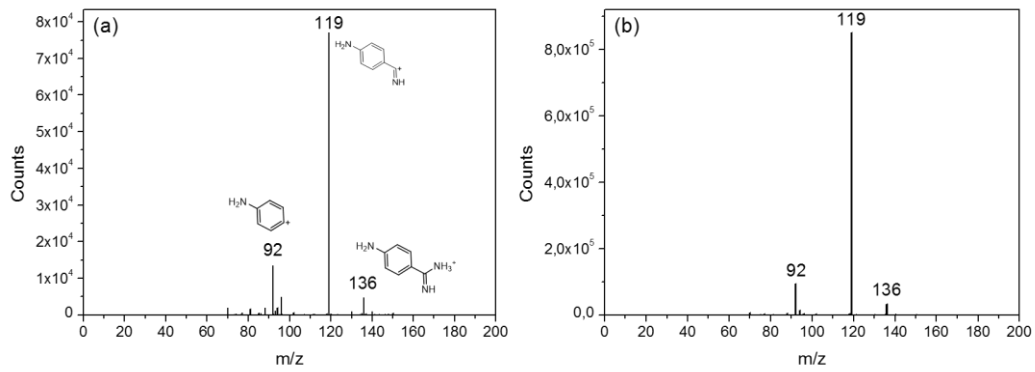


Figure 4. Fragmentation spectra of (a) D1 and (b) 4-aminobenzamidine recorded using a collision energy of 20 eV.

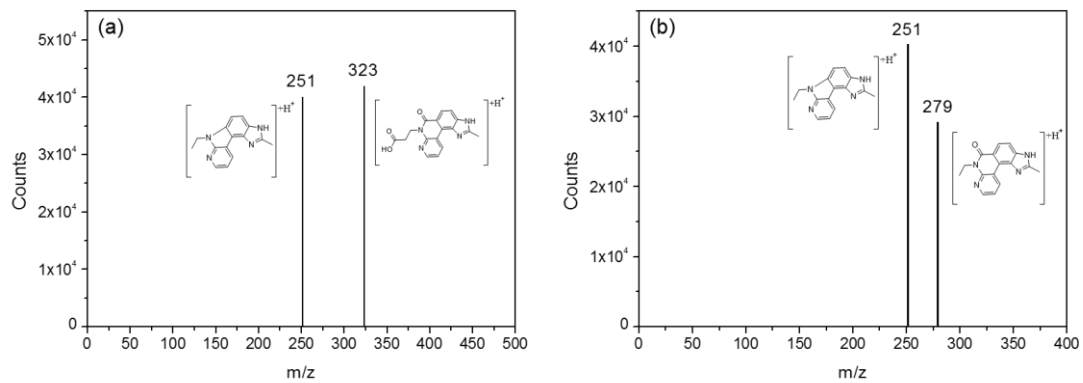


Figure 5. Fragmentation spectra of (a) D2 and (b) D3 recorded using a collision energy of 20 eV.

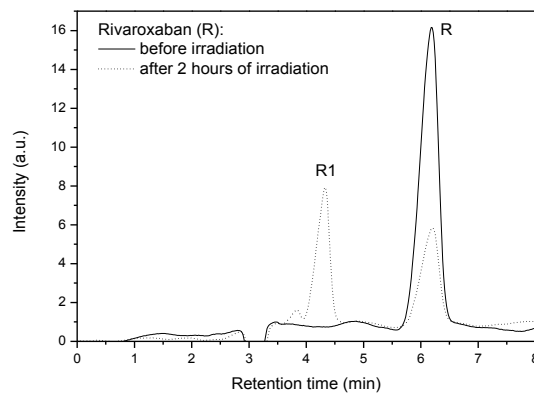


Figure 6. LC-UV chromatograms of rivaroxaban before (plain line) and after 2 hours (dotted line) of Suntest irradiation.



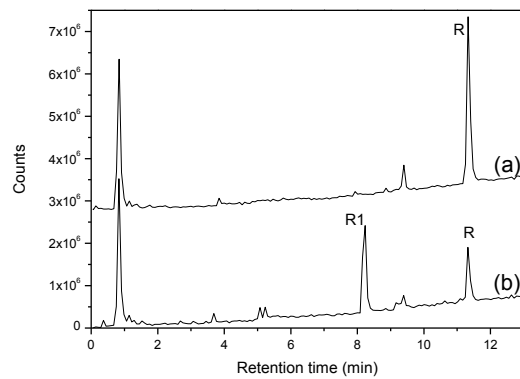


Figure 7. Total ion current chromatograms of rivaroxaban (a) before and (b) after 2 hours of Suntest irradiation in purified water.

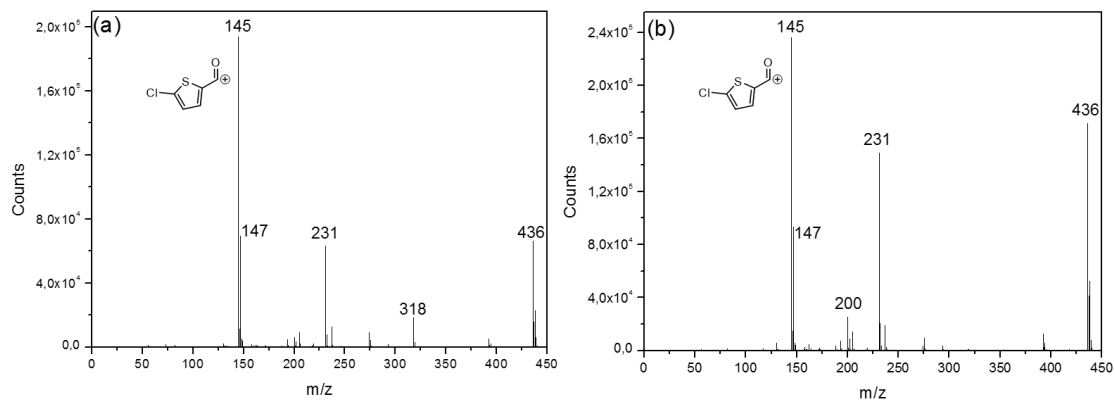
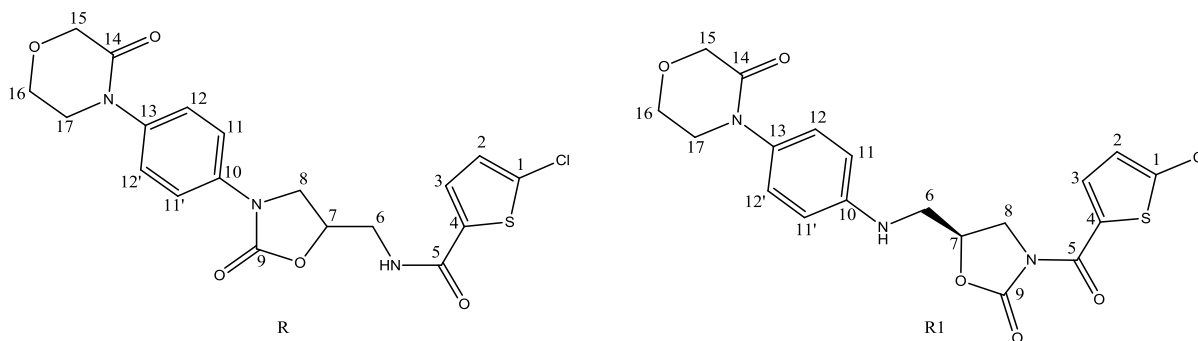


Figure 8. Fragmentation spectra of (a) R and (b) R1 recorded using a collision energy of 20 eV.



Scheme 1. Numbering of carbon atoms of rivaroxaban (R) and of its photoisomer (R1).

Table 1. <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H chemical shifts, splitting patterns, and proton-proton coupling constants of rivaroxaban (R) and its photoisomer (R1) recorded with a 800 MHz spectrometer. Assignment of chemical shifts in italic are subject to caution.

C atom number	R				R1			
	<sup>13</sup> C (ppm)	<sup>1</sup> H (ppm)	Splitting pattern	J (Hz)	<sup>13</sup> C (ppm)	<sup>1</sup> H (ppm)	Splitting pattern	J (Hz)
1	135.16	-	-	-	123.31	-	-	-
2	127.31	7.04	d	4.0	122.42	7.42	<i>d</i>	3.5
3	128.26	7.55	d	4.0	129.23	7.89	<i>d</i>	3.5
4	137.28	-	-	-	134.36	-	-	-
5	162.49	-	-	-	164.70	-	-	-
6	42.31	3.74	d	5.2	42.10	3.84/3.74	dd/dd	14.4/5.1;4.1
7	72.07	4.92	m	*	72.06	4.96	m	*
8	48.44	4.24/3.95	dd/dd	8.9/9.2;5.9	48.46	4.26/4.00	dd/dd	8.9/9.2;6.0
9	155.29	-	-	-	155.31	-	-	-
10	137.32	-	-	-	137.30	-	-	-
11/11'	118.96	7.64	d	9.1	118.90	7.67	d	9.1
12/12'	126.21	7.39	d	9.1	126.21	7.40	d	9.1
13	137.13	-	-	-	137.14	-	-	-
14	168.11	-	-	-	168.11	-	-	-
15	67.61	4.29	s	-	67.61	4.29	s	-
16	63.63	4.05	m	-	63.63	4.05	m	-
17	49.73	3.78	m	-	49.86	3.78	m	-
NH	-	8.93	t	-	-	8.75	t	-

\*under water signal

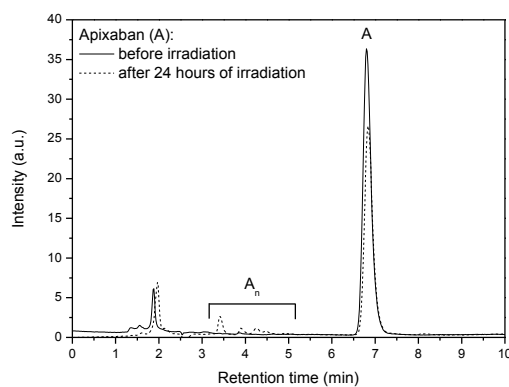


Figure 9. LC-UV chromatograms of apixaban before (plain line) and after 24 hours of Suntest irradiation (dashed line).

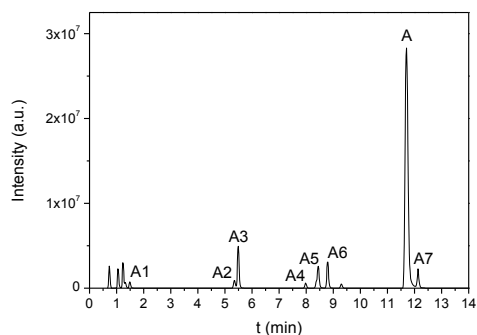
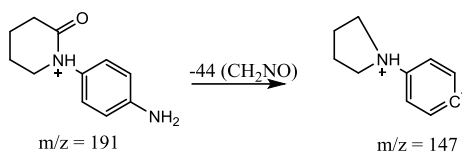
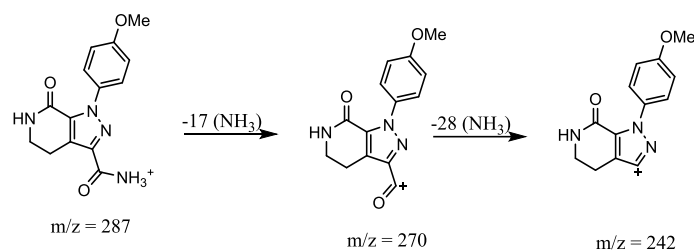


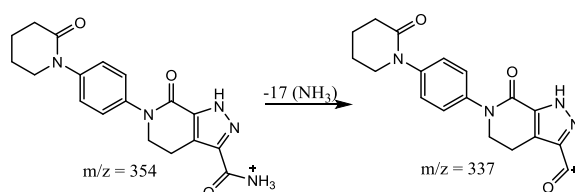
Figure 10. LC-MS chromatograms of apixaban after 24 hours of Suntest irradiation in mineral water.



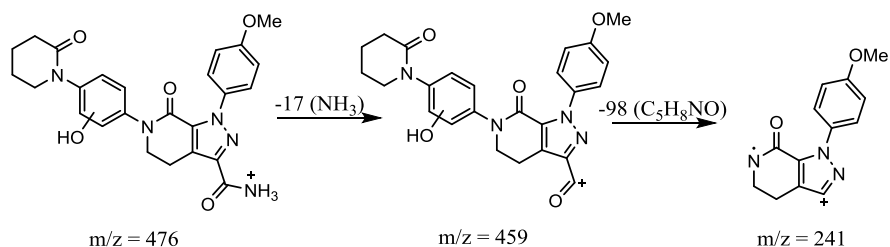
Scheme 2. Fragmentation pattern of A1 ( $m/z=191$ ) obtained using a collision energy of 20 eV.



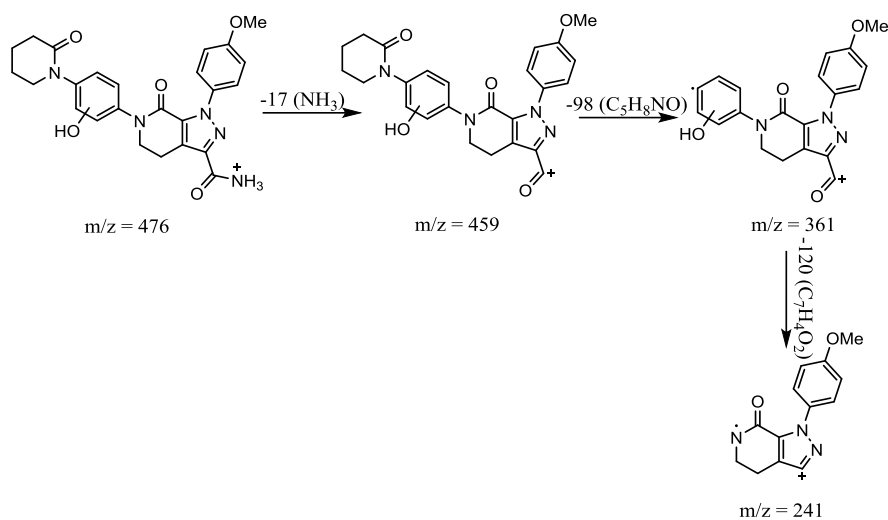
Scheme 3. Fragmentation pattern of A2 ( $m/z=287$ ) obtained using a collision energy of 20 eV.



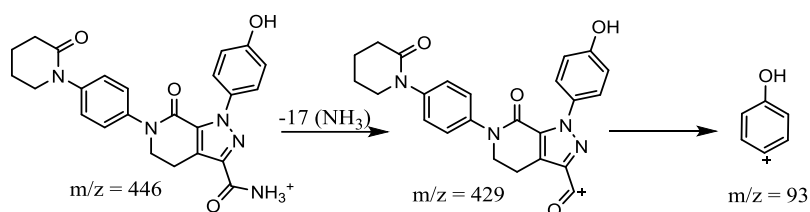
Scheme 4. Fragmentation pattern of A3 ( $m/z=354$ ) obtained using a collision energy of 20 eV.



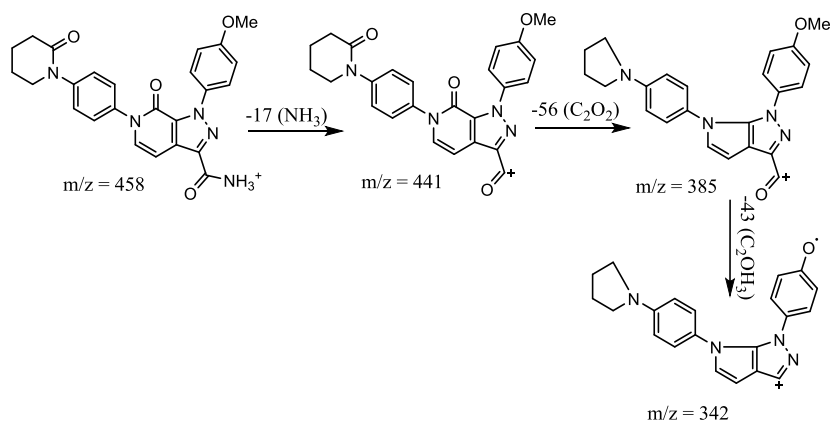
Scheme 5. Fragmentation pattern of A4 ( $m/z=476$ ) obtained using a collision energy of 40 eV.



Scheme 6. Fragmentation pattern of A5 ( $m/z=476$ ) obtained using a collision energy of 40 eV.



Scheme 7. Fragmentation pattern of A6 ( $m/z=446$ ) obtained using a collision energy of 40 eV.



Scheme 8. Fragmentation pattern of A7 ( $m/z=458$ ) obtained using a collision energy of 40 eV.



#### 4.2 Bisphenols as major contributors of estrogenic activity in landfill leachates- Investigations by Effect-Directed Analysis (EDA)

Fuster L.<sup>1</sup>, Mazeas L.<sup>2</sup>, Le Menach K.<sup>1</sup>, Guenne A.<sup>2</sup>, Dévier MH.<sup>1</sup>, Creusot N.<sup>3</sup>, Rouillac L.<sup>2</sup>, Mazellier P.<sup>1</sup>, Dévier MH.<sup>1</sup>, Aït Aïssa S.<sup>3</sup>, Budzinski H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Bordeaux, EPOC UMR 5805-LPTC, Talence, France

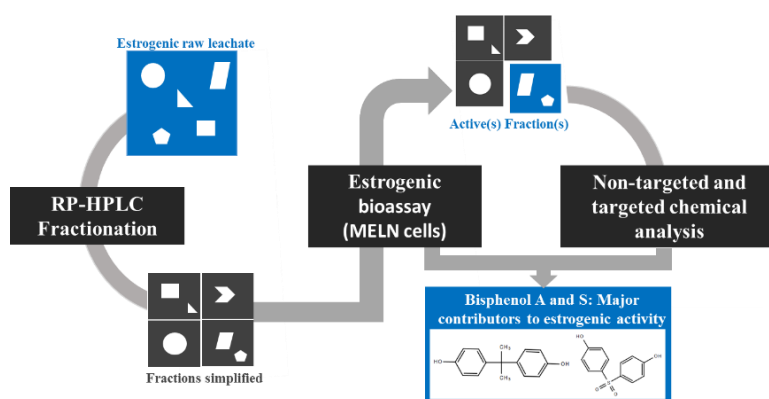
<sup>2</sup> Unité Hydrosystèmes et bioprocédés, IRSTEA, Antony, France

<sup>3</sup> Unité d'Ecotoxicologie, INERIS, Verneuil en Halatte, France

E-mail contact: [h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr)

### ABSTRACT

Population growth, urbanization and emergence of consumer society have been followed by an increase of municipal waste production. Landfill wastes, in the form of leachates, carry a wide diversity of organic compounds. Moreover, landfill leachates are known to represent a source of endocrine disrupting chemicals such as those that can interfere with estrogen regulated processes. The complexity of these matrices and the restricted number of molecules assessed by targeted chemical analysis can therefore represent a challenge when it comes to identify molecules responsible for biological activities. In this context, an approach combining chemical analysis and toxicity tests such as "Effect-Directed Analysis" could be valuable. First, estrogenicity of untreated landfill leachates was studied by *in vitro* bioassay on reporter cell lines MELN. Secondly, investigations were focused on an untreated leachate of municipal waste disposal. Effect-Directed Analysis, used in this work, has allowed to identify Bisphenol A (BPA) as main contributor (88%) to estrogenic activity in this landfill leachate and brings to light the presence of another polar estrogenic compound: Bisphenol S (BPS) that explained the remaining part of the activity.



Graphical abstract (adapted from Brack 2003)

**Keywords:** landfill leachate, Effect-Directed analysis, estrogenicity, bisphenol A, bisphenol S

\*NB: Pour des raisons de lisibilité les références bibliographiques ont été placées en fin de manuscrit.

## INTRODUCTION

In the last decade, population growth, urbanization and emergence of consumer society have been followed by an increase of municipal wastes production. In 2013, 481 kg of wastes per inhabitant were produced in Europe. Overall, 31 % of these wastes were stored in municipal solid waste (MSW) landfills (Eurostat). Consequently, landfills are final disposal of a broad range of consumer products and thus of ten thousands of individual chemicals (Brack, 2003).

Landfill leachates are complex matrices resulting from percolation of water through wastes. The composition of leachates is variable and mainly linked to origin, age and level of waste decomposition that form various transformation products (Renou et al., 2008). It is not surprising that numerous studies have reported the detection of a great variety of organic compounds (Eggen et al., 2010; Ramakrishnan et al., 2014; Clarke et al., 2015). To prevent soil and water contaminations, modern landfills in Europe are built with impermeable plastic layers named geomembranes. Leachates are collected and often treated at local wastewater treatment plants. Activated sludge, flocculation and advanced oxidation are the most commonly performed treatments for leachates. Despite these devices, the exposure to the environment of landfill leachates may occur following different ways. Firstly, these complex mixtures can be leached into soil and groundwater by advective transfers through holes (Mery et al., 2014) or by diffusion through geosynthetic liner. Secondly, a contamination of surface water is also possible if landfill leachate treatment processes are not fully efficient to remove pollutants.

Among compounds found in landfill leachates, endocrine disrupting chemicals (EDCs) can seriously affect the reproduction of exposed organisms. For example, Noaksson et al., (2003), brought out sexual immature female perches in a Swiss lake contaminated by leachates. Strong evidences suggest that landfill leachates are the source of EDCs. Moreover, different studies highlight the estrogenic potency of landfill leachates (Behnisch et al., 2001; Coors et al., 2003; Gong et al., 2014; Ghosh et al., 2017). Because of diversity of their structures, their physico-chemical properties and of their effects at level traces, treatments of EDCs are not always efficient.

In this context, European directives such as E-PRTR regulation impose to assess discharges of chemicals. Therefore, in order to realize a better management of leachates, it is crucial to identify major estrogenic compounds and evaluate their concentrations in both raw leachates and treated effluents. However the choice of chemicals that have to be taken into consideration represents a real challenge. Classical monitoring, based on quantification of target chemicals, gives a partial picture of co-occurrence of known compounds which can have synergistic, antagonistic or agonistic effects. The complexity of these matrices and the

restricted number of molecules assessed by targeted chemical analysis can therefore represent a challenge when it comes to identify molecules responsible for biological activities. *In vitro* bioassays using recombinant cell systems represent an interesting tool to assess overall estrogenic effects in a complex mixture but this method is not sufficient to give information on precise active compounds (Giesy et al., 2002; Dévier et al., 2011).

Against this drawback, Effect-Directed Analysis (EDA) (Brack, 2003; Brack et al., 2016) combines fractionation processes with chemical and biological approaches in order to isolate and identify active compounds in a complex sample. EDA approaches have successfully been applied in numerous matrices: soils (Legler et al., 2011), sediments (Creusot et al., 2013a), biota (Simon et al., 2013), waste waters (Grung et al., 2007) and landfill leachates (Lei and Aoyama, 2010b). Up to date, no study has been conducted in order to identify origin of estrogenic activity of leachate without a priori knowledge on chemical composition. The aim of this work was to (1) evaluate the presence of estrogenic compounds in different treatment steps of leachates, (2) identify compounds responsible for estrogenic activity in landfill leachates.

## **MATERIALS AND METHODS.**

### **Chemicals and culture cell reagents**

High density polyethylene (HDPE) bottles (Nalgene®) and glass microfiber filters were obtained from Fisher Bioblock Scientific (Illkirch, France). Oasis Hydrophilic-Lipophilic Balanced cartridges (6cc, 200 mg) were supplied by Waters (Guyancourt, France). Methanol and acetonitrile from J.T Baker and dichloromethane (HPLC reagent grade) were purchased from Atlantic Labo (Bruges, France). Ultra-pure water was prepared with Milli-Q water system using an EDS-Pack® filter (Millipore SA, Guyancourt, France). Ligands, compound standards and deuterated (<98% purity) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France). All cell culture media and supplements were obtained from GIBCO® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and fetal calf serum from Sigma Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France). For *in vitro* bioassay, dimethylsulfoxid (DMSO) (biological reagent grade quality) was supplied by Sigma Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France) and D-luciferin was purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

### **Leachate collection**

Leachates were respectively collected from three French sites 1, 2 and 3 which have been used for non-hazardous solid waste disposal. Main characteristics of these leachates are given in Table 1. Raw leachates (RL) were sampled at the output of leachate collection. Aerated leachates (AL) were collected in aeration lagoon. Finally, treated leachates were



sampled at the outlet treatment processes: evapo-concentration followed by reverse osmosis in site 1 and membrane bioreactor followed by activated carbon filtration in site 2.

All samples were collected in HDPE bottles, filtered through glass microfiber filters (GF/F 0.7  $\mu\text{m}$ ; Wathman) and then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

**Table 1 : Main characteristics of studied landfill leachates.**

Samples	Site	Process stage	Type of treatment	pH	Conductivity $\mu\text{S.cm}^{-1}$
S1-RL	1	Raw tank	-	8.4	23697
S1-AL	1	Aeration lagoon	-	8.4	15017
S1-TL	1	After treatment	Evapo-concentration and reverse osmosis	6.2	127
S2-RL	2	Raw tank	-	7.5	4260
S2-AL	2	Aeration lagoon	-	7.9	7120
S2-TL	2	After treatment	Membrane bioreactor and activated carbon filtration	7	6150
S3-RL-vy	3	Raw tank	-	7.5	17370
S3-RL-y	3	Raw tank	-	7.8	27000
S3-AL	3	Aeration lagoon	-	7.9	22600

Cartridges (Oasis<sup>®</sup> HLB 200 mg, 6cc) were previously cleaned with 5 mL dichloromethane and conditioned successively by 5 mL methanol and 5 mL ultra-pure water. Each sample (250 ml) was percolated through cartridges under gentle vacuum at a flow rate of  $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Elution of compounds was performed in 3 steps:  $2\times 5 \text{ mL}$  dichloromethane;  $2\times 5 \text{ mL}$  dichloromethane and methanol mixture (50/50; v: v) and  $2\times 5 \text{ mL}$  methanol. The eluted solution was dried under nitrogen flux and then dissolved in methanol (500  $\mu\text{L}$ ). Finally, a part of extract was dried and dissolved in DMSO for *in vitro* bioassay and extracts were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Cell culture and estrogenic *in vitro* bioassay

Estrogenic activities of extracts were assessed by using an *in vitro* bioassay based on the cell line MELN (Balaguer et al., 2001) previously described to give robust and reproducible results (Witters et al., 2010). This cell line consists of human MCF-7 cells that were stably transfected with the luciferase reporter gene controlled by endogenous estrogen receptor. Description of routine cell culture has been already reported in detail by Louiz et al., (2008).

Briefly, MELN cells were maintained in growth medium constituted with phenol red and Dulbecco's Modified eagle's medium (DMEM) supplemented with 5 % inactivated fetal calf serum, 1% non-essential amino acids, 1% G418 and penicillin/ streptomycin (50 U/mL each). Cells were grown in humidified atmosphere with 5 %  $\text{CO}_2$  at  $37^{\circ}\text{C}$ .

Two days prior to experiment, cells were incubated in free phenol DMEM and then, cells were seeded at 80 000 cells / mL into white 96 well-culture plates (Greiner Bio One, Germany). After 24h, cells were exposed to reference compounds,  $17\beta$ -estradiol ( $17 \beta\text{E}_2$ ), solvent control

(0.5 % v/v DMSO) and different dilutions of leachate extracts. After 16h of incubation, medium was removed and replaced by medium containing 0.3 mM of d-luceferin. Measure of luminescence signal was performed by microtiter plate luminometer (Synergy 2, BioTek®, Colmar, France). Relative luminescence units (RLUs) of sample were compared with the maximal luminescence induced by positive control (10 nM 17-βE2).

### **Reverse-phase fractionation procedure**

An untreated leachate (S1-RL) was fractionated using reverse phase - high performance liquid chromatography (Agilent 1200, Agilent technologies, Santa Clara, USA) equipped with C18 column (Spherisorb OD52; 5 μm, 4.6 Å ×250mm; Water; Milford USA). Fractionation process was performed as described and validated by Creusot (2014). Briefly, separation was realized at 25°C at a flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup> with the following gradient of ultra-pure water and acetonitrile: 0-10 min (80: 20), 60 min (55: 45), 100-120 min (0: 100) and 120-125 min (80: 20). Finally, 40 fractions were collected each 3 minutes, dried under nitrogen flux and then dissolved in 250 μL of acetonitrile. A part of each fraction was pooled in order to create a reconstituted extract and to evaluate potential loss, due to fractionation process, of active chemicals compared with original extract. Quality of this fractionation procedure has been assessed using a mixture of 8 chemicals that represents a broad range of polarity. In order to evaluate the cross contamination, a procedural blank was fractionated with the same protocol.

### **Data analysis: bioassay and instrumental derived estradiol equivalent**

#### *Biological data modelling*

Dose-response curves of standards and extracts were modelling using the Hill equation given by the free Microsoft Excel™ Macro 7.5 ([http://www.normalesup.org/~vindimian/fr\\_index.html](http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html)). Modelling of curves allows to calculate effective concentration 20 % (EC20) corresponding to concentration giving 20 % of the maximum luciferase. Biological estradiol-equivalent (Bio-EEQ) of each extract was evaluated by divided EC20 of standard (g/L) by EC20 of sample (L-EQ/L). Results are expressed in ng-EQ of E<sub>2</sub> per liter.

#### *Contribution of chemicals to biological activity: Mass-balance calculations*

In order to evaluate the contribution of analyzed compounds to biological activity (Bio-EEQ), measured concentrations were convert to estradiol equivalent derived from chemical analysis (Chem-EEQ). Chem-EEQ were determined with the following equation: Chem-EEQ =  $\sum EEF_i \times C_i$ . Estradiol equivalent factor (EEF) was determined as ratio of EC20 of reference compounds on EC20 of compounds. Finally, measured (Bio-EEQ) and calculated (Chem-EEQ) activities were compared in order to evaluate the contribution of quantified compound(s) to the observed effect.

## Chemical analysis

### *Target analysis*

Chemical analysis of raw leachates were targeted on alkylphenols (AKP) and organochlorine pesticides. Analytical procedures were adapted from Cailleaud et al., (2007) for the alkylphenols, and Alder et al., (2006) for the organochlorine pesticides.

Bisphenol A and S analysis in fractions were performed by liquid chromatography-coupled with mass spectrometry system (Agilent 1100, Agilent technologies, Santa Clara, USA) using C18 column (KROMASIL; 3 $\mu$ m, 2 Å ×150 mm). The injection volume was set at 5  $\mu$ L with a flow rate of 0.15 mL.min<sup>-1</sup> and with gradient elution condition using methanol/water/ammonium acetate (A) and methanol (B). Gradient elution began with 60% B during 2 min, increased to 80% B and kept isocratic during 18 min. At 25 min, initial condition were reached and kept isocratic for 10 min. The ionization was performed by negative electrospray . BPA and BPS were quantified relatively to BPA<sub>16</sub>.

### *Non target screening on active fractions*

#### *Instrumental parameters*

Analyses were carried out on an Agilent Infinity 1290 HPLC system coupled to an Agilent 6540 accurate mass quadrupole time-of-flight mass spectrometer (LC-QTOF-MS; Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Compounds were separated on an analytical C18 column (Kinetex Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 2.1 mm; 1.7  $\mu$ m; Agilent Technologies, Les Ulis, France) kept at 40°C. For each extract, 2  $\mu$ L were injected. Mobile phase a mixture of ultra-pure water (A) and acetonitrile (B) both with 0.1 % of formic acid for positive ionization mode and ultra-pure water and acetonitrile for negative ionization at a flow rate of 0.3 mL.min<sup>-1</sup>. The elution gradient program was the following: 90 % of A and 10 % of B and attained rapidly to 20 % B in 5 min, then increased to 37 % B until 27 min, augmented to 60 % B at 32 min, reached to 100 % B at 36 min and held at 100 % B for 2 min, before returning to the initial value at 43 min and kept until 48 min.

The fractions were analyzed using positive and negative mode electrospray ionizations (ESI+, ESI-) (Agilent Jet Stream source). The operating conditions for the ESI source were as follows: source temperature 300°C, gas flow rate 8 L.min<sup>-1</sup>, capillary voltage 3000 V, nebulizer gas pressure 40 PSI, sheath gas temperature 400°C, nozzle voltage 1500 V and fragmentor 110 V. The instrument was operated in 2 GHz. The data acquisitions were performed using (data-dependent) auto-MS/MS acquisition mode. This consists, in the same run, to perform a full HR-MS analysis and to select the most abundant precursor ions from a TOF mode scan and then fragmented in MS/MS mode (Q-TOF). Full-MS spectra were

acquired with a scan range of 70–1700  $m/z$ . The most abundant precursor ions were isolated in width of  $\sim 1.3$  amu and fragmented with three fixed collision energies: 10, 20 and 40 eV. A constant flow of an Agilent TOF reference solution through the reference nebulizer allowed the system to continuously correct for any mass drift by using the reference mass ion HP-921 [hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)-phosphazine] at  $m/z$  922.009798  $[M+H]^+$  or 966.000725  $m/z$   $[M+HCO_2]^-$  (formate adduct) respectively in the positive and negative ionization mode. Before all injection, stability of mass accuracy was checked with an Agilent standard solution and the system was re-calibrated if values went above 0.2 ppm error. A standard solution containing 36 compounds was injected before the sample to check the retention time of compounds and the instrumental sensitivity.

### **Data analysis and analytical confirmation**

The data were processed using the MassHunter Qualitative software (version B.05.00, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A compound screening was performed on the total ion chromatogram using the molecular feature extraction (MFE) which is an untargeted feature finding algorithm of the software. Only peaks with intensity  $> 1500$  counts were searched. The elemental formulae were generated using relative isotopic abundance of mass spectra profiles and precursor ion mass. The composition was defined by Generate Formulas function of the software. The calculation of most probable molecular formula included the common elements C, H, N, O, S, Cl, F, P, score higher than 50 % and an error margin of 5 ppm. Different ionization products were considered:  $[M+H]^+$  or  $[M+NH_4]^+$  for positive mode and  $[M-H]^-$  and  $[M+Cl]^-$  for negative mode. In order to isolate compounds of interest, the list of compounds detected in the water samples was compared to this of procedural blank using MassProfiler Agilent software. The characterization of compounds was performed on peak only present in water samples. Then, the most abundant candidates were manually examined in order to confirm the elemental formula given by algorithm and to search the molecular structure using MS/MS spectra. The fragmentation mass spectrum was compared to MS/MS spectra include in exhaustive spectral libraries namely Metlin, Forensics and MassBank. When no MS/MS spectra were reported, molecular formulas were searched in compound database specifically ChempSpider. Associated with this criterion, a research using Metfrag (CDK 1.3.9) which is an *in silico* fragmenter prediction software was used. Only proposal compounds with score higher to 0.7 and mass difference of 5 ppm were accepted.

In order to confirm the identity of the compound, reference standard was purchased, when it was available. The purchased molecule was analyzed in the same LC-QTOF-MS method that unknown compounds. The identity of the molecule was confirmed by retention

time match ( $\pm 0.3$  min), accurate mass ( $\pm 5$  ppm), isotope pattern (score > 70%) and the fragmentation spectra (score > 80%).

### **Quality control**

To avoid sample contamination during the procedure, prior to use, all glassware was washed with detergent and carefully rinsed with Milli-Q water. The glassware was calcinated at 450°C overnight. A procedural blank was performed for each batch of experiments in order to check the absence of contamination during the whole procedure (fractionation and reconstitution of extracts).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Estrogenic activities of raw landfill leachates and unexplained activities**

Dose-dependent estrogenic activities of three raw landfill leachates were evaluated by MELN-cell bioassay. Raw leachate induced incomplete dose-response curves with maximal activation at 73 %. With 270 ng-E<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> (Figure S1), studied landfill leachates could represent an important source of estrogenic compounds. The estrogenicity of the three leachates differed by a factor of 10: 270 ng EEQ.L<sup>-1</sup> for S1-RL, 136 ng EEQ.L<sup>-1</sup> for S3-RLy and 24 ng EEQ.L<sup>-1</sup> for S2-RL (Table 2). Whatever treatments in place, estrogenicity of leachate landfills was reduced to an undetectable level by MELN bioassay. A good efficiency of these treatment types for removal of estrogenic compounds has already been reported by Coors and al., in 2003. Actually, this study demonstrated efficiency of advanced treatments to remove EDCs present in landfill leachates, superior to 97% and without production of active transformation products (TPs).

To our knowledge, assessment of estrogenicity in landfill leachates by *in vitro* bioassays has been less reported as compared to other wastewaters. In litterature, estrogenicity of leachates is described as very variable (4.8 at 52 ng-EEQ.L<sup>-1</sup>) function of landfill type and age (Behnisch et al., 2001; Coors et al., 2003; Svenson et al., 2011). Because WWTP (wastewater treatment plant) effluent is consider as the major source of EDCs, smaller attention has been given to estrogenicity from landfill effluents. However, estrogenic potency of landfill leachates, observed in our study, is comparable with estrogenic activities detected to WWTP effluent which were from 20 to 300 ng-EEQ.L<sup>-1</sup> (Körner et al., 2000; Tan et al., 2007; Muller et al., 2008; Jugan et al., 2009; Bellet et al., 2012).

**Table 2 : Estrogenic activity (EEQ) of landfill leachate extracts using *in vitro* bioassays and mass balance analysis of the potential contribution to estrogenic of alkylphenols and organochlorine pesticides.**

	Site 1			Site 2			Site 3		
	S1-RL	S1-AL	S1-TL	S2-RL	S2-AL	S2-TL	S3-RL-vy	S3-RL-y	S3-AL
Bio-EEQ (ng-E <sub>2</sub> EEQ.L <sup>-1</sup> )	269.9	<LOQ	<LOQ	23.5	5.6	<LOQ	<LOQ	136.3	122.6
ΣChem-EEQ (ng-E <sub>2</sub> EEQ.L <sup>-1</sup> )	0.24	0.03	0.01	0.03	0.03	nd	0.08	0.25	1.16
Explained activity (%)	0.09	nd	nd	0.12	0.52	nd	nd	0.19	0.95

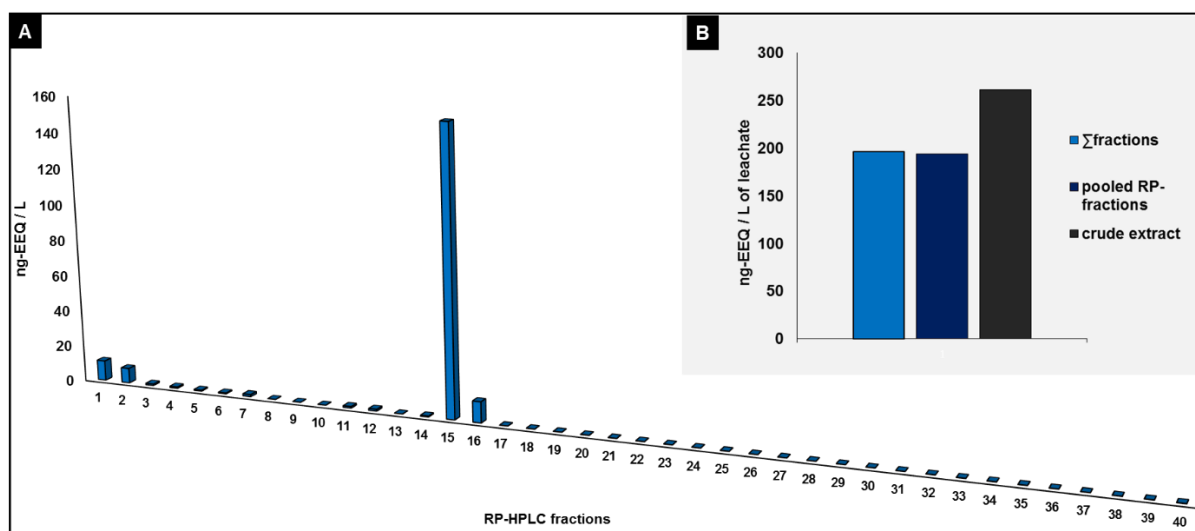
Estimation of relative contribution of alkylphenols and pesticides to estrogenic activity was realized by mass balance analysis approach (Table 2). Alkylphenols and organochlorine pesticides have been already reported as ligands of estrogen receptor (Fenet et al., 2003; Pillon et al., 2005; Louiz et al., 2008; Kinani et al., 2010). Considering initial targeted compounds such as 4-nonylphenol or dieldrin, less than 1% of leachate estrogenic activity could be explained (Table 2).

### Identification of major estrogenic compounds

#### Quality of fractionation process and assessment of active fractions

In order to reduce matrix complexity, a fractionation process was performed on the most estrogenic raw leachate: S1-RL (270 ng-EEQ.L<sup>-1</sup>). Estrogenic profile is given in Figure 1(A). No activity was detected in procedural blank (data not shown). Among the 40 fractions, only 4 had a significant estrogenicity: F1, F2, F15 and F16 (Figure 1 (A)). The major activity was found in fraction 15 with 160 ng-EEQ.L<sup>-1</sup> which represented 81 % of pooled activity. Fractions 1 and 2 had also a significant estrogenicity with respectively 11 and 8 ng-E<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, suggesting the occurrence of polar estrogenic compounds.

A part of each fraction was mixed to recreate the original extract (Figure 1(B)). The slightly loss (26 %) of activity of initial extract as compared to activity in pooled RP-HPLC fractions was probably caused by a loss of active compounds during the fractionation process. Moreover, the sum of individual fraction activities was equivalent to activity of pooled fractions, suggesting an additive effect of active chemicals and no anti-estrogenic effect. This comparison is a crucial stage of EDA to prove the relevance of estradiol equivalent model. Estradiol-equivalent approach is the most applied for risk assessment of EDCs, but imposes to assume additivity of active compounds in complex mixtures (Safe et al., 1998; Wagner et al., 2013).



**Figure 1 : Estrogenic activities (A) in RP-HPLC fractions (A), sum and pooled of RP-HPLC fractions and crude extract (B) of leachate landfill. Results are expressed as ng-EEQ.L<sup>-1</sup>.**

### Identified compounds in active fractions

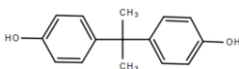
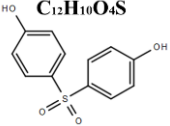
Chemical screening in positive and negative ionization mode was performed on the four active fractions. Although each fraction obtained by HPLC contained less compounds than the crude extract, fractions analyzed by LC-HRMS were still complex. More than two hundred compounds were detected in each fraction and each ionization mode. To illustrate this complexity Figure S2 shows the chromatographic profile (extract compound chromatogram (ECC) generating by MFE function) of fraction 15 in both positive and negative ionization mode. In fact, considering only the positive ionization mode for this fraction, more than 282 molecular fingerprints that might correspond to different compounds were detected. This result underlines compound richness of these matrices and the need to improve fractionation methods. For example, using ER affinity column could help to limit the number of detected molecules and facilitate identification (Riu et al., 2008). To reduce the suspect compounds' list, chemical identification focused only on the most intense ions by auto-MS/MS analysis. The acquired mass spectra were deconvoluted and compared to spectra databases (Metlin, MassBank, and Forensics).

Focusing on potential biological effect, one compounds with elemental formula ([M+H]<sup>+</sup> : 227,1077) corresponding to C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup> : 227,1080) was interesting in F15 and 16 (table 3). According to in silico fragmentation using the open-source fragmenter MetFrag (n.b. database ChempSpider), this molecule would be identified as bisphenol A. In F1 and F2, spectra of fragmentation of unknown compounds with elemental formula ([M+H]<sup>+</sup> : 249.0194) corresponding to C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>S were compare to MS/MS spectra databases (MassBank). This comparison allowed suspecting the presence of bisphenol S in these two fractions (Figure S3). Finally, two suspected compounds were purchased. Comparison

between spectra of analytical standards and suspected compounds (Figure S4 and S5) allowed to confirmed presence of two analogues: bisphenol A and S (Table 3).

Presence of these compounds in two fraction (F1 -F2 for bisphneol S and F15 –F16 for bisphneol A) reveals thar an incomplete separation occurred during fractionation process by HPLC. This phenomenon has already been reported and can indicate that the capacity limit of HPLC-column was reached because of very high level concentrations of compounds (Hartnik et al., 2007).

**Table 3 : Compound list of confirmed compounds in active fractions.**

Identified Compounds	RT	m/z	Species	Mesured monoisotopic mass	Theoretical monoisotopic mass	Diff	Score (lib)	Fractions
-	min	-	-	Da	Da	ppm	%	-
<p><b>Bisphenol A</b> <b>C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub></b></p> 	15.16	227.1077	[M+H] <sup>-</sup>	228.1153	228.1150	-1.53	92.26	F 15, 16
<p><b>Bisphenol S</b> <b>C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>S</b></p> 	7.13	249.0194	[M+H] <sup>-</sup>	250.0316	250.0299	-6.64	87.46	F 1, 2

### Bisphenols as main contributors to estrogenic activity

A target chemical analysis focused on quantification of bisphenol A (BPA) and bisphenol S (BPS) was performed on fractions in order to confirm the estrogenic implication of these molecules. BPA was effectively detected at 3621 and 249 µg.L<sup>-1</sup> in F15 and 16 extracts (Table 4). BPS concentration levels were 10 times lower than BPA with respectively 190 and 111 µg.L<sup>-1</sup> in F1 and 2.

This result is not surprising because numerous studies have already reported the occurrence at high concentration levels of BPA in landfill leachates in Europe (Fromme et al., 2002), USA (Coors et al., 2003; Masoner et al., 2014) and Asia (Asakura et al., 2004). Thus, BPA concentrations may vary between 10 at 10 000 µg.L<sup>-1</sup> depending on waste composition of landfill and biological population. The release of this xenoestrogen may occur associated with plastic and thermal paper coating degradation during acidogenic conditions (Asakura et al., 2004; Morin et al., 2015). Because of toxicity at low concentration levels, uses of BPA were restricted by governmental commission and BPA was substituted by structural analogue such as BPS. Commercially used in lot a manufactured products, BPS is found in various manufactured products as epoxy-resin, thermal paper and personal care products (Liao et al., 2012b; Liao and Kannan, 2014; Pivnenko et al., 2015). Although shift to bisphenol analogues occurs in Europe since 2011 (Glausiusz, 2014; Usman and Ahmad, 2016), data concerning



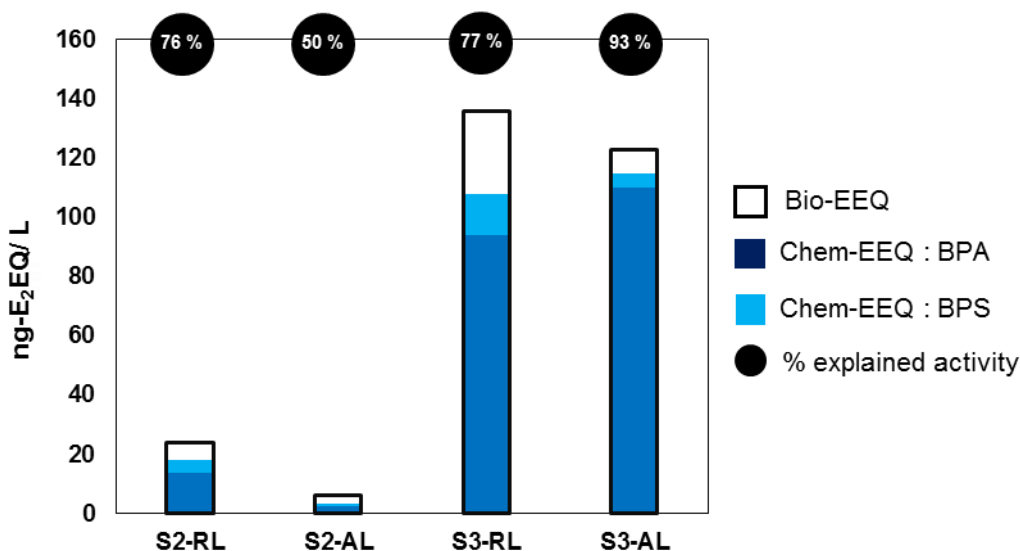
occurrence in environment are sparse (Vandenberg et al., 2017). Effectively, few recent studies reported presence of BPS in human urine (Liao et al., 2012a; T. Zhang et al., 2016), waste water (Lee et al., 2015), surface water (Yang et al., 2014; Yamazaki et al., 2015; Jin and Zhu, 2016), sediments (Liao et al. 2012) and sewage sludge (Song et al., 2014; Ruan et al., 2015; Yu et al., 2015). In contrast, toxicological information of bisphenol analogues have been already well documented. Estrogenicity of bisphenol analogues has already been reported in different works (Delfosse et al., 2012; Grignard et al., 2012; Fol et al., 2015; Rochester and Bolden, 2015). In order to estimate EEQ of BPS, analytical standard was tested in MELN-cell line (detailed curve in Figure S6). In accordance with previous work, BPA showed activity 10 times more active than BPS (Table 4).

Mass balance calculations are performed to evaluate fraction activities explained by BPA and BPS (Table 4). BPA explained respectively 102 and 96 % of fraction 15 and 16 activities. Finally, 88 % of total activity of pool extract was explained by BPA. This result confirms suspicion of numerous studies concerning high concern of BPA in landfill leachate (Coors et al., 2003; Svenson et al., 2011). In addition, BPS explained more than 80 % of activities of F1 and 2.

**Table 4: Contribution of BPA and BPS to estrogenic activity of S1-RL, using mass balance analysis.**

Detected compounds	Fractions	Concentration $\mu\text{g/L}$	EEF* -	Chem-EEQ $\text{ng-E}_2\text{EQ.L}^{-1}$	Bio-EEQ $\text{ng-E}_2\text{EQ.L}^{-1}$	Explained activity %
<b>Bisphenol S</b>	F1	190.3	5.65E-04	10.9	11.9	<b>98</b>
	F2	110.9	5.65E-04	6.7	8.2	<b>81</b>
<b>Bisphenol A</b>	F15	3621.1	4.50E-05	162.9	159.7	<b>102</b>
	F16	249.5	4.50E-05	11.2	11.7	<b>96</b>

BPA and BPS were also researched in all landfill leachates (detailed value in table S2). To establish a link between biological activities and BPA concentrations level, a mass balance approach was used. Figure 2 shows a good adequacy between BPA and BPS concentration levels in active leachates and observed estrogenic activities; Chem-EEQ explained 53 to 93 % of Bio-EEQ. This result differs from WWTP situations where the predominant estrogens are natural hormones such as 17- $\beta$  estradiol, and synthetic hormones as 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (Brack, 2003). Moreover, bisphenol analogues explained only 0.05 to 1.47% of estrogenicity from sewage sludge in China (Lee et al., 2015). Although, our approach had not been applied to a sufficient number of landfill leachates to make a general conclusion, this result tends to indicate that BPA represents the major contributor to the estrogenicity of sampled landfill leachates. Effect-Directed Analysis can represent a crucial issue for the selection of appropriate analyses to be conducted. With no *a-priori* knowledge on chemical suspect, EDA allows a comprehensive and an integrative assessment of estrogenicity of one landfill leachate.



**Figure 2 : Mass balance analysis of bisphenol contribution to observed estrogenic activities**

Regarding high level concentrations of BPA in raw and aerated landfill leachates, these matrices can represent a significant source of estrogeno-mimetic compounds to environment. For instance, important BPA concentrations have been already reported in groundwater near a landfill site (Kawagoshi et al., 2003; Barnes et al., 2008; Peng et al., 2014). In Europe, although HDPE membranes protect soil and groundwater, in case of large defects of aged geosynthetic liners, dangerous concentrations of BPA can diffuse to environmental matrices (Mery et al., 2014). This risk is not negligible when considered that BPA does not degrade under anaerobic conditions. While sources, occurrence, degradation, treatment and effects of BPA are well documented, to date only little work focused on bisphenol analogues as BPS. The need of data collection on this chemical is all the more true since uses of bisphenol analogues is expecting to rise in the future.

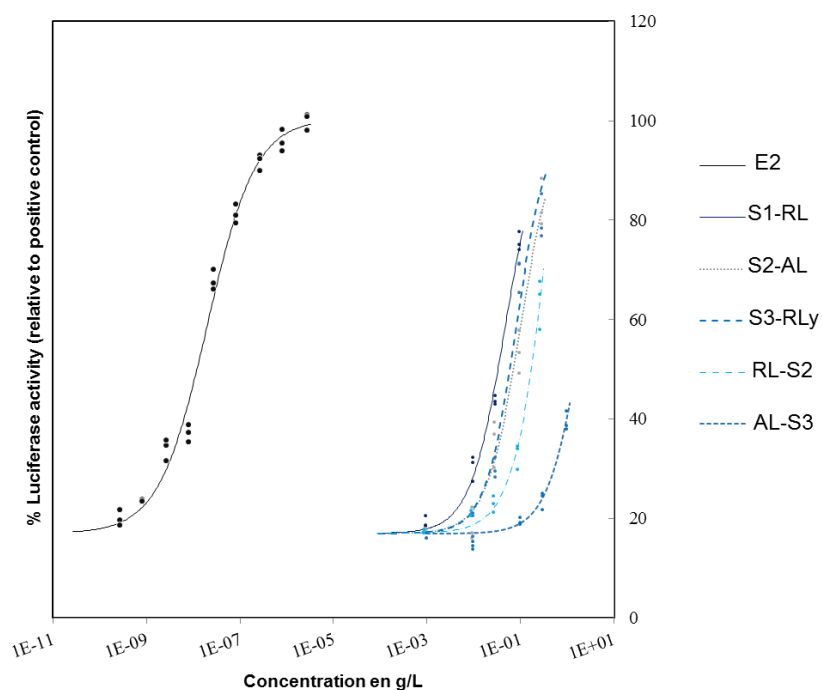
## CONCLUSION

Landfill leachate are complex matrices that receive a large number of synthetic products used daily. *In vitro* activities of raw landfill leachate extracts showed a contamination by estrogenic active chemicals. A good efficiency of advanced treatment such as reverse osmosis for removal of estrogenic compounds was observed with *in vitro* bioassays. Investigations were focused on an untreated leachate of municipal waste disposal with high estrogenic activity (270 ng.EEQ.L<sup>-1</sup>). Considering the thousands of compounds present in initial extracts, EDA allowed to simplify samples focusing only on four active fractions and so to simplify the identification process. EDA approach allowed to identify BPA as the main contributor (88 %) of estrogenic activity and brings to light the presence of a polar estrogenic compound: BPS.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

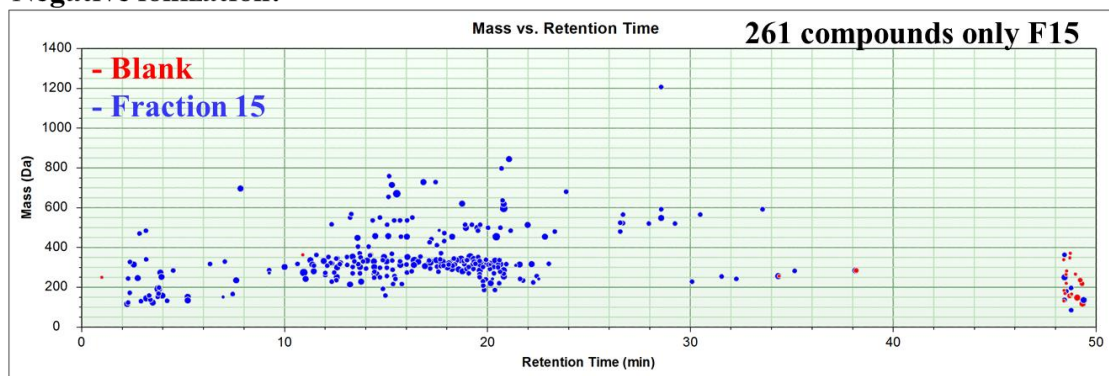
This study has been carried out with financial support from the French National Environmental Agency (ADEME) in the frame of the TOXLIX research project. This study has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX 45). The reviewers are acknowledged for their helpful comments on the manuscript.

## SUPPORTING INFORMATION

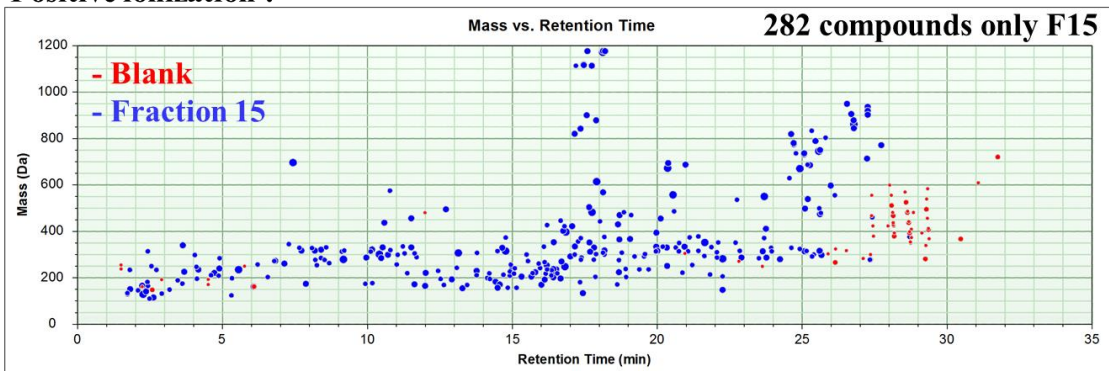


**Figure S1:** Dose-response curves of estradiol and landfill leachate extracts. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by 10 nM of 17-β E2.

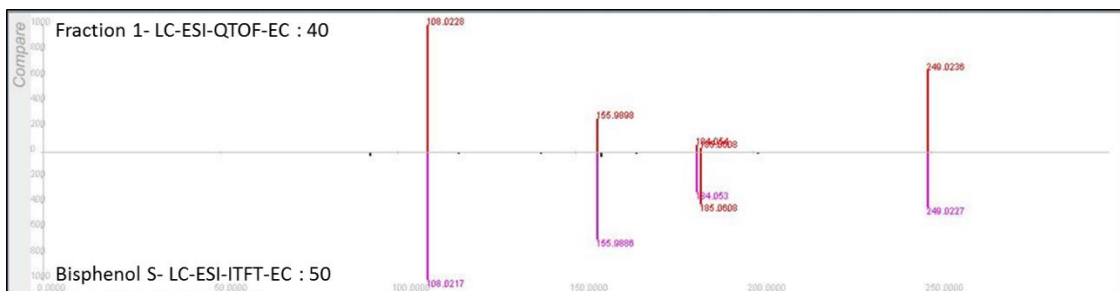
### Negative ionization:



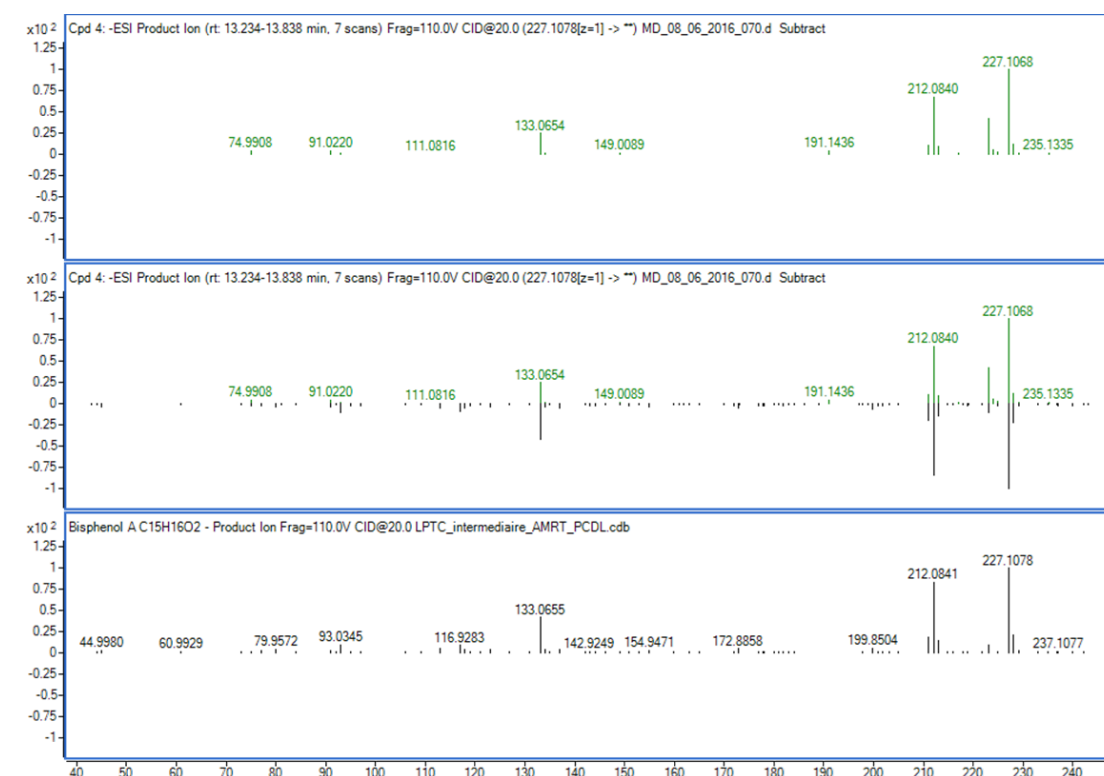
### Positive ionization :



**Figure S2:** Extract compound chromatogram generating by MFE function and visualizing by Mass Profiler (Agilent technologies)



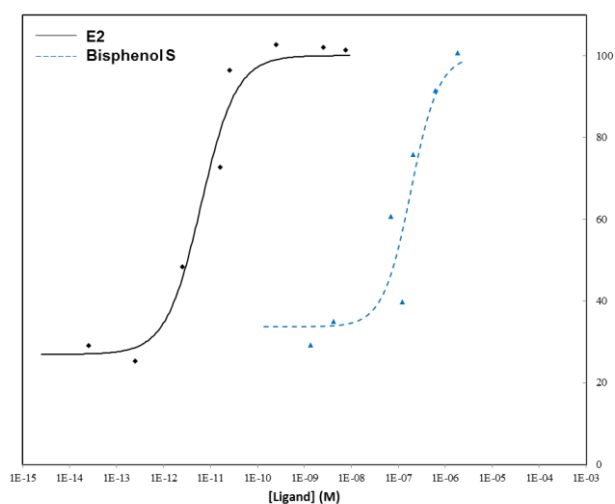
**Figure S3.** Comparison of fragmentation spectrum of suspect compounds present in F1, F2 with MassBank (Bisphenol S)



**Figure S4.** Comparison of fragmentation spectrum of suspect compounds present in F15, F16 with analytical standard (Bisphenol A)



**Figure S5.** Comparison of fragmentation spectrum of suspect compounds present in F1, F2 with analytical standard (Bisphenol S)



**Figure S6.** Dose-response curve of bisphenol S and standard ligand ) in MELN cell lines





# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**





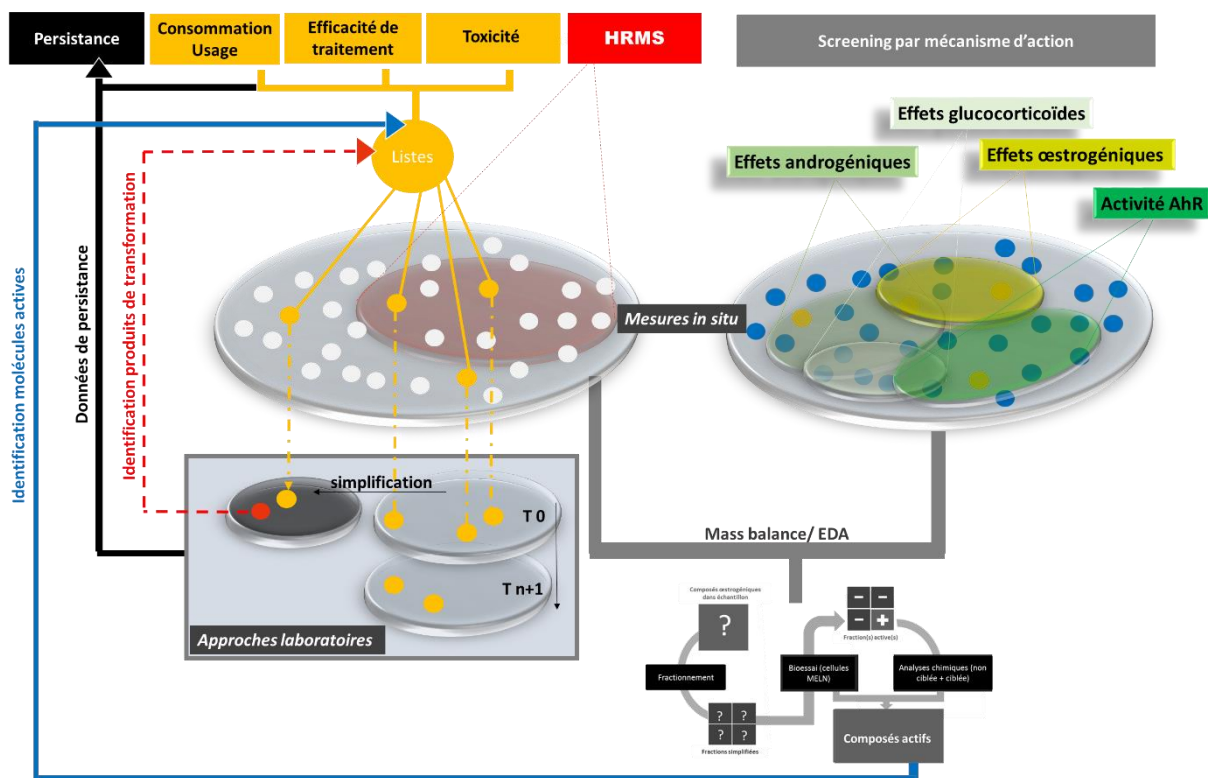
## Conclusions et perspectives

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans le cadre de l'implémentation de nouvelles molécules à suivre dans les écosystèmes aquatiques. De manière plus générale, l'objectif de ces travaux a été d'utiliser différentes méthodes afin d'identifier des molécules préoccupantes qui pourraient représenter de bons candidats pour un suivi plus poussé dans l'environnement. Ainsi comme illustré Figure 85, différentes approches complémentaires ont été utilisées pour répondre à cet objectif.

### Mise en évidence de molécules préoccupantes

Les études réalisées en estuaire de Seine ont été basées sur des listes de molécules (pharmaceutiques, pesticides polaires et FUV) présélectionnées sur la base de différents exercices de priorisation (consommation, usage, présence et toxicité). L'utilisation de divers protocoles multi-résidus ultra-traces a permis de mettre en avant des apports importants provenant majoritairement du bassin amont. Les apports provenant des affluents et des STEU intra-estuariennes ne représentent que 10 % des apports globaux en pharmaceutiques. Par ailleurs, les apports de l'amont en pharmaceutiques et en pesticides sont 38 à 300 fois supérieurs à ceux générés par la STEU la plus importante de l'estuaire (Rouen). Les molécules suivies de longue date dans l'estuaire (pharmaceutiques), n'ont subi que de faibles variations depuis 15 ans. Les contaminants émergents tels que les médicaments, les pesticides polaires, mais également de molécules biologiquement actives (génotoxiques, perturbateurs endocriniens) sont bien présents en estuaire de Seine à des concentrations parfois supérieures à celles retrouvées dans d'autres estuaires français. Les niveaux en pharmaceutiques retrouvés dans la Seine sont équivalents à ceux recensés dans le Rhin, qui a pourtant une population 5 fois supérieure.

Ces molécules ne sont néanmoins pas toujours associées au même type d'apport. En effet, ces travaux ont mis en évidence des molécules apportées en continu qui sont le reflet d'un usage plutôt urbain. Ce groupe rassemble notamment les composés pharmaceutiques mais aussi certains pesticides comme le glyphosate, le diuron, le fipronil et ses métabolites. A l'inverse, certaines molécules ont des apports périodiques en lien avec des usages agricoles et des phénomènes de dégradation comme l'isoproturon, le métazachlore, le métolachlore et ses métabolites. Parmi les molécules recherchées et quantifiées, l'utilisation de données de toxicité provenant de la littérature a permis de mettre en avant 10 molécules ayant des niveaux préoccupants comme notamment le diclofénac, le DEA, l'imidaclopride, l'ibuprofène, le fipronil et la terbutryne.



**Figure 85: Récapitulatif des méthodes mises en œuvre pour évaluer la présence de molécules préoccupantes.**

Cependant, ce type d'approche reste limité dans le choix des molécules initialement choisies et ne prenant pas compte de molécules inconnues, non réglementées ou ne faisant pas partie d'exercices de priorisation antérieurs. Ainsi différentes méthodes alternatives ont été appliquées.

L'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) a permis de réaliser des analyses globales (Figure 85) sur différents échantillons et ainsi mettre en évidence des molécules non suivies initialement mais pouvant représenter un risque pour les écosystèmes aquatiques (ex : verapamil, PNEC : 30 ng.L<sup>-1</sup>). Des approches d'identification conduites dans le cadre d'expérimentations menées en laboratoire dans des matrices plus ou moins simplifiées, permettent également de mettre en évidence les produits de transformation générés (Figure 85). Les études spécifiques menées ont permis d'identifier et de confirmer la structure de 4 photoproduits (l'ofloxacin-n-oxide, le N-déméthyl-ofloxacin, le N-desméthyl-danofloxacin, et le 4-aminobenzamidine) et de suspecter la structure de 20 produits de transformation issus de la photodégradation du dabigatran, de l'apixaban, du rivaroxaban, de l'ofloxacin, de la sarafloxacin, de la danofloxacin et de l'abacavir. Ce type de travaux constitue une base à l'établissement de banques de données spectrales indispensables au criblage en mode « suspect » des masses d'eau environnementales. L'établissement et le partage de ces bases de données (molécules mères et produits de

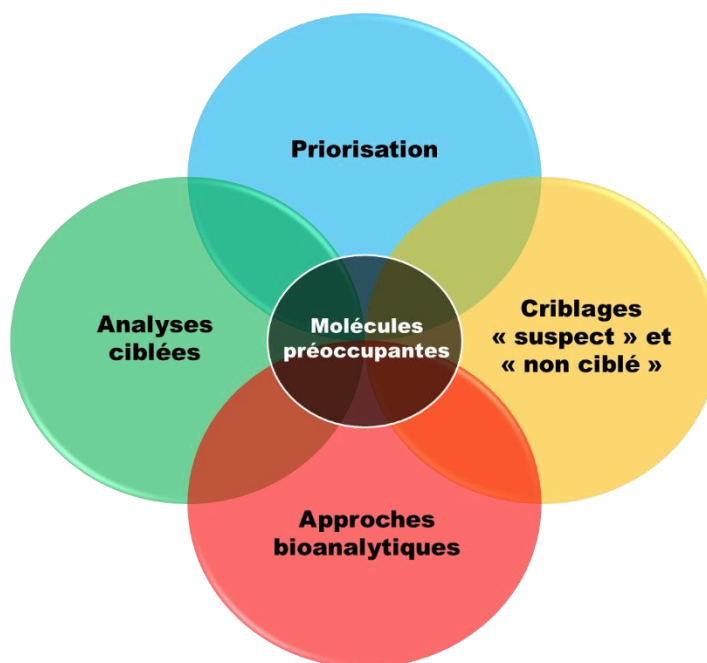
transformation) représentent à l'heure actuelle un besoin émergent ainsi que la clé d'une meilleure prise en compte des produits de transformation. De plus, le criblage non ciblé réalisé sur des eaux estuariennes a révélé la formation de 794 molécules au cours de ces 4 semaines d'incubation. Ce constat met en avant le besoin de renforcer les méthodologie sur l'identification de produits de transformation générés dans des matrices complexes. En effet, en raison de la grande quantité de données générées en HRMS, l'identification des produits de transformation générés doivent encore être réalisée. Pour cela, différentes perspectives d'action peuvent être envisagées. La comparaison des données issues de ces expériences avec des échantillons environnementaux pourraient permettre de se focaliser sur les produits transformation réellement présent dans l'environnement et ainsi faciliter le travail d'identification. Par ailleurs, l'utilisation d'analyses statistiques sophistiquées et de modèles *in silico* pourraient également faciliter le travail d'identification de produits de transformation pertinents.

Une autre limitation des schémas de priorisation est que les molécules sont généralement considérées individuellement et non en mélange. Les bioessais *in vitro* représentent ainsi des outils de diagnostic précoces afin de mettre en évidence la présence de molécules actives dans les mélanges environnementaux (Figure 85). En effet, L'utilisation de bioessais *in vitro* a permis confirmer la présence, dans l'effluent de STEU (Rouen) et dans l'eau de Seine, d'activités de type œstrogénique, glucocorticoïdique et génotoxique, quelle que soit la période d'échantillonnage. Une des perspectives de ce travail sera de rechercher des composés connus pour agir sur ces récepteurs (œstrogènes, glucocorticoïdes, HAP) afin d'évaluer leur contribution dans les activités retrouvées en Seine. Par ailleurs, afin d'identifier les produits de transformation les plus préoccupants, l'utilisation d'approche de type EDA sur des échantillons fortement reconcentrés semblerait tout à fait adaptée.

Ces méthodes permettent également de discriminer les sites les plus problématiques en vue d'une investigation plus poussée. Ces outils combinés aux analyses chimiques représentent un premier pas vers un lien entre la contamination chimique et la détérioration de la qualité des milieux. Les approches de type EDA représentent un outil plus approfondi pour identifier les molécules responsables des effets biologiques mesurés, grâce à l'utilisation combinée d'outils de fractionnement, de bioessais et d'HRMS (Figure 85). Dans ces travaux, l'utilisation de cette approche a non seulement permis de confirmer la responsabilité majoritaire du bisphénol A dans les effets œstrogéniques mesurés dans des lixiviats, mais également de révéler des préoccupations relatives à un de ses analogues : le bisphénol S.

Ainsi, la mise en évidence des molécules préoccupantes dans l'environnement demande ainsi d'utiliser ces approches de façon combinée (Figure 86). Les méthodes de

criblage comme les bioessais *in vitro* et les analyses globales en HRMS représentent des outils précoces de diagnostic, préliminaires aux approches plus approfondies (analyses chimiques ciblées, EDA, priorisation). Un des challenges futurs pour une meilleure surveillance est le passage d'un suivi centré sur les composés chimiques vers une vigilance axée sur les impacts biologiques.



**Figure 86 : Récapitulatifs des approches nécessaires afin de mettre en évidence des molécules préoccupantes (Slobodnik and Dulio, 2014).**

#### Complexité environnementale et dynamique

L'évaluation du risque environnemental ne nécessite pas seulement d'identifier les molécules les plus préoccupantes en termes d'effets, mais également de considérer la nature de l'exposition. Type d'usage, fréquence d'usage, partition, et persistance sont autant de paramètres à prendre en compte afin de mieux évaluer le risque chimique. La composition des matrices environnementales est complexe et variable spatialement et temporellement. Ainsi, les études menées en estuaire de Seine ont mis en avant des variabilités saisonnières, et journalières de la contamination. Ceci est le résultat combiné des apports en contaminants mais aussi de l'hydrodynamisme et de l'hydromorphologie du système considéré qui vont impacter le devenir d'une molécule. En effet, des comportements saisonniers non conservatifs ont pu être mis en évidence pour des molécules comme l'aténolol, le diclofénac, l'ibuprofène ou encore le fipronil alors que d'autres molécules comme le diuron ou l'atrazine possèdent un comportement similaire quelle que soit la saison. L'augmentation du temps de résidence favorisant les phénomènes de dégradation semble un des paramètres impliqués dans cette atténuation saisonnière. L'utilisation des temps de demi-vie et des indices de persistance à

partir des données simulées en laboratoires pourrait permettre une évaluation plus intégrée du risque environnemental dans ces zones de transition.

L'échantillonnage est également un point clé d'une bonne évaluation de l'exposition du fait des fluctuations environnementales, temporelles et spatiales. Par ailleurs, il n'est pas à démontrer que certaines molécules peuvent avoir des effets à des concentrations très faibles (exemple : fipronil, 0,8 ng.L<sup>-1</sup>). Aussi pour éviter une sous-évaluation ou une surévaluation du risque, l'utilisation d'échantillonnage intégratif tel que les POCIS représente une stratégie efficace pour une meilleure représentativité de l'exposition. L'utilisation d'échantillonneur passif a permis dans ces travaux de mettre en avant le comportement saisonnier de certains contaminants résultant de l'augmentation des temps de résidence lié au débit fluvial, mais aussi à des phénomènes de dégradation. Par ailleurs, l'utilisation des POCIS semble être prometteuse afin de pallier les problèmes de sensibilité relatifs aux milieux dilués comme les estuaires. Ainsi, les couplages POCIS/HRMS, POCIS/bioessais *in vitro* et POCIS/EDA pourraient permettre de révéler et d'identifier des molécules biologiquement actives et qui pourraient passer inaperçues lors de prélèvement classiques. L'utilisation du couplage POCIS/HRMS associées à des analyses statistiques pourrait également permettre d'obtenir des empreintes moléculaires caractéristiques des différents sites en Seine, des sources potentielles mais aussi de discriminer plus finement la saisonnalité de la contamination.

A terme, l'utilisation d'approches de modélisation pour anticiper le devenir des contaminants pourrait être une perspective intéressante afin de mieux appréhender l'exposition des organismes. En lien avec la forte variabilité saisonnière des dynamiques des contaminants il serait intéressant d'implémenter un réseau de surveillance basé sur les échantillonneurs passifs tant pour une caractérisation chimique que par biotests. Pour améliorer la compréhension de ces dynamiques fortement liées et leur modélisation, un suivi haute-fréquence des contaminants serait nécessaire tout au long de la Seine (amont et aval).

L'évaluation de la persistance des contaminants dans un milieu donné représente également un réel besoin en vue d'une évaluation de l'exposition. Le comportement des molécules est très dépendant des conditions environnementales telles que les matières en suspension, la salinité, la lumière, la matière organique. En effet, les expériences menées en laboratoire ont mis en avant une diminution marquée des temps de demi-vie pour 8 molécules en Seine (cétirizine, lorazépam, propranolol, sotalol, chlortoluron, diuron, isoproturon, imidaclopride) et 10 molécules en Garonne (cétirizine, aténolol, bisoprolol métoprolol, lorazépam, propranolol, sotalol, naproxène, diclofénac, diuron, imidaclopride) associé à l'augmentation des concentrations en MES. Par ailleurs, l'évaluation du risque environnemental doit prendre en compte la persistance des composés parents de manière

adaptée au milieu d'étude mais également la formation de produits de transformation. En effet, l'expérience menée en Seine a permis de mettre en avant la formation de produits de transformation qui peuvent présenter un risque pour les organismes (cas du diuron et ses métabolites). Les études en conditions contrôlées sur des matrices complexes représentent une base en vue d'une modélisation plus approfondie de la dynamique de la contamination et du risque associé.

De manière générale, ces travaux mettent en avant la complexité d'une évaluation intégrée du risque environnemental. En ce sens, une vision pluridisciplinaire semble être la clé d'une meilleure évaluation du risque chimique et une réponse à l'implémentation de molécules préoccupantes dans les listes de surveillance des masses d'eau.

..



# ANNEXES





## Annexes

Annexe 1 : Détails échantillonnage-Campagne CRAPPSE 1 .....	362
Annexe 2 : Détails échantillonnage-Campagne CRAPPSE 2 .....	363
Annexe 3 : Détails échantillonnage-Campagne DYNAMOSEINE .....	364
Annexe 4 : Méthodes analytiques (groupe 1-10) .....	367
Annexe 5 : Performances analytiques .....	386
Annexe 6 : Données brutes : Caractérisation des apports en Seine ( CRAPPSE 1) .....	390
Annexe 7 : Données brutes : Cycles de marée, Campagnes MOSAIC .....	393
Annexe 8 : Données brutes : Campagnes CRAPPSE-2 (Oissel, La Bouille, Caudebec).....	396
Annexe 9 : Données brutes-Photodégradation d'un effluent de STEU.....	397
Annexe 10 : Données brutes Incubation Seine .....	398
Annexe 11 : Données brutes Incubation Garonne .....	399
Annexe 12 : Liste des publications et des communications .....	400

## Annexe 1: Détails échantillonnage-Campagne CRAPPSE 1

Stations	Niveau	Date de prélèvement	Type de prélèvement	coordonées GPS	Conditionnement
Poses	≈ 1m	13/05/2014	ponctuel	44°47'55.5"N / 0°31'43.0"W	bouteilles ambrées verre
Poses	≈ 1m	08/07/2014	ponctuel	44°47'55.5"N / 0°31'43.0"W	bouteilles ambrées verre
Poses	≈ 1m	15/09/2014	ponctuel	44°47'55.5"N / 0°31'43.0"W	bouteilles ambrées verre
Poses	≈ 1m	18/11/2014	ponctuel	44°47'55.5"N / 0°31'43.0"W	bouteilles ambrées verre
Poses	≈ 1m	14/01/2017	ponctuel	44°47'55.5"N / 0°31'43.0"W	bouteilles ambrées verre
Poses	≈ 1m	11/03/2017	ponctuel	44°47'55.5"N / 0°31'43.0"W	bouteilles ambrées verre
Effluent Rouen	-	13/05/2014	moyenné 24 h	Station Emeraude- Sortie	bouteilles ambrées verre
Effluent Rouen	-	08/07/2014	moyenné 24 h	Station Emeraude- Sortie	bouteilles ambrées verre
Effluent Rouen	-	15/09/2014	moyenné 24 h	Station Emeraude- Sortie	bouteilles ambrées verre
Effluent Rouen	-	18/11/2014	moyenné 24 h	Station Emeraude- Sortie	bouteilles ambrées verre
Effluent Rouen	-	14/01/2017	moyenné 24 h	Station Emeraude- Sortie	bouteilles ambrées verre
Effluent Rouen	-	11/03/2017	moyenné 24 h	Station Emeraude- Sortie	bouteilles ambrées verre

## Annexe 2 : Détails échantillonnage-Campagne CRAPPSE 2

Stations	Niveau	Date d'exposition	Type de prélèvement	coordonées GPS	Conditionnement
Oissel	≈ 1m	15/12/2016	Ponctuel	49°20'18.4"N / 1°05'47.3"E	bouteilles ambrées verre
Oissel	≈ 1m	16/01/2017	Ponctuel	49°20'18.4"N / 1°05'47.3"E	bouteilles ambrées verre
Oissel	≈ 1m	10/02/2017	Ponctuel	49°20'18.4"N / 1°05'47.3"E	bouteilles ambrées verre
Oissel	≈ 1m	16/03/2017	Ponctuel	49°20'18.4"N / 1°05'47.3"E	bouteilles ambrées verre
Oissel	≈ 1m	07/04/2017	Ponctuel	49°20'18.4"N / 1°05'47.3"E	bouteilles ambrées verre
Oissel	≈ 1m	05/05/2017	Ponctuel	49°20'18.4"N / 1°05'47.3"E	bouteilles ambrées verre
La Bouille	≈ 1m	15/12/2016	Ponctuel	49°21'08"N / 00°55'50"E	bouteilles ambrées verre
La Bouille	≈ 1m	16/01/2017	Ponctuel	49°21'08"N / 00°55'50"E	bouteilles ambrées verre
La Bouille	≈ 1m	10/02/2017	Ponctuel	49°21'08"N / 00°55'50"E	bouteilles ambrées verre
La Bouille	≈ 1m	16/03/2017	Ponctuel	49°21'08"N / 00°55'50"E	bouteilles ambrées verre
La Bouille	≈ 1m	07/04/2017	Ponctuel	49°21'08"N / 00°55'50"E	bouteilles ambrées verre
La Bouille	≈ 1m	05/05/2017	Ponctuel	49°21'08"N / 00°55'50"E	bouteilles ambrées verre
Caudebec	≈ 1m	15/12/2016	Ponctuel	49°31'08"26N / 00°43'27"E	bouteilles ambrées verre
Caudebec	≈ 1m	16/01/2017	Ponctuel	49°31'08"26N / 00°43'27"E	bouteilles ambrées verre
Caudebec	≈ 1m	10/02/2017	Ponctuel	49°31'08"26N / 00°43'27"E	bouteilles ambrées verre
Caudebec	≈ 1m	16/03/2017	Ponctuel	49°31'08"26N / 00°43'27"E	bouteilles ambrées verre
Caudebec	≈ 1m	07/04/2017	Ponctuel	49°31'08"26N / 00°43'27"E	bouteilles ambrées verre
Caudebec	≈ 1m	05/05/2017	Ponctuel	49°31'08"26N / 00°43'27"E	bouteilles ambrées verre

Stations	Niveau	Date d'exposition	Type de prélèvement	coordonées GPS
Oissel	≈ 1m	21/11/2016 au 15/12/2016	Passif (POCIS)	49°20'18.4"N / 1°05'47.3"E
Oissel	≈ 1m	15/12/2016 au 16/01/2017	Passif (POCIS)	49°20'18.4"N / 1°05'47.3"E
Oissel	≈ 1m	16/01/2017 au 10/02/2017	Passif (POCIS)	49°20'18.4"N / 1°05'47.3"E
Oissel	≈ 1m	10/02/2017 au 16/03/2017	Passif (POCIS)	49°20'18.4"N / 1°05'47.3"E
Oissel	≈ 1m	16/03/2017 au 07/04/2017	Passif (POCIS)	49°20'18.4"N / 1°05'47.3"E
Oissel	≈ 1m	07/04/2017 au 05/05/2017	Passif (POCIS)	49°20'18.4"N / 1°05'47.3"E
La Bouille	≈ 1m	21/11/2016 au 15/12/2016	Passif (POCIS)	49°21'08"N / 00°55'50"E
La Bouille	≈ 1m	15/12/2016 au 16/01/2017	Passif (POCIS)	49°21'08"N / 00°55'50"E
La Bouille	≈ 1m	16/01/2017 au 10/02/2017	Passif (POCIS)	49°21'08"N / 00°55'50"E
La Bouille	≈ 1m	10/02/2017 au 16/03/2017	Passif (POCIS)	49°21'08"N / 00°55'50"E
La Bouille	≈ 1m	16/03/2017 au 07/04/2017	Passif (POCIS)	49°21'08"N / 00°55'50"E
La Bouille	≈ 1m	07/04/2017 au 05/05/2017	Passif (POCIS)	49°21'08"N / 00°55'50"E
Caudebec	≈ 1m	21/11/2016 au 15/12/2016	Passif (POCIS)	49°31'08"26N / 00°43'27"E
Caudebec	≈ 1m	15/12/2016 au 16/01/2017	Passif (POCIS)	49°31'08"26N / 00°43'27"E
Caudebec	≈ 1m	16/01/2017 au 10/02/2017	Passif (POCIS)	49°31'08"26N / 00°43'27"E
Caudebec	≈ 1m	10/02/2017 au 16/03/2017	Passif (POCIS)	49°31'08"26N / 00°43'27"E
Caudebec	≈ 1m	16/03/2017 au 07/04/2017	Passif (POCIS)	49°31'08"26N / 00°43'27"E
Caudebec	≈ 1m	07/04/2017 au 05/05/2017	Passif (POCIS)	49°31'08"26N / 00°43'27"E

## Annexe 3 : Détails échantillonnage-Campagne DYNAMOSEINE

DYNAMOSEINE-1							
CODE ECHANTILLON	STATION	LAT N	LON E	DATE	HEURE	PROFONDEUR	TYPE
MOSAIC-DYN-2-HT1	Honfleur	49.25.883	000.13.755	26/09/2015	15:00	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-HT4	Honfleur	49.25.878	000.13.752	26/09/2015	18:00	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-HT7	Honfleur	49.25.843	000.13.982	26/09/2015	21:00	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-FT1	Fatouville	49.26.229	000.19.337	27/09/2015	09:32	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-FT5	Fatouville	49.26.182	000.19.213	27/09/2015	13:40	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-FT10	Fatouville	49.26.169	000.19.389	27/09/2015	18:30	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-TT1	Tancarville	49.28.089	000.27.465	29/09/2015	08:35	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-TT4	Tancarville	49.28.128	000.27.559	29/09/2015	11:45	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-TT11	Tancarville	49.28.118	000.27.460	29/09/2015	18:35	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-CT1	Caudebec	49.31.158	000.45.277	28/09/2015	09:10	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-CT3	Caudebec	49.31.158	000.45.287	28/09/2015	11:10	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-CT7	Caudebec	49.31.160	000.45.288	28/09/2015	15:15	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-HT1	Honfleur	49.25.883	000.13.755	26/09/2015	15:00	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-HT4	Honfleur	49.25.878	000.13.752	26/09/2015	18:00	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-HT7	Honfleur	49.25.843	000.13.982	26/09/2015	21:00	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-FT1	Fatouville	49.26.229	000.19.337	27/09/2015	09:32	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-FT5	Fatouville	49.26.182	000.19.213	27/09/2015	13:40	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-FT10	Fatouville	49.26.169	000.19.389	27/09/2015	18:30	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-TT1	Tancarville	49.28.089	000.27.465	29/09/2015	08:35	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-TT4	Tancarville	49.28.128	000.27.559	29/09/2015	11:45	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-TT11	Tancarville	49.28.118	000.27.460	29/09/2015	18:35	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-CT1	Caudebec	49.31.158	000.45.277	28/09/2015	09:10	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-CT3	Caudebec	49.31.158	000.45.287	28/09/2015	11:10	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-CT7	Caudebec	49.31.160	000.45.288	28/09/2015	15:15	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-HT1	Honfleur	49.25.883	000.13.755	26/09/2015	15:00	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-HT4	Honfleur	49.25.878	000.13.752	26/09/2015	18:00	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-HT7	Honfleur	49.25.843	000.13.982	26/09/2015	21:00	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-FT1	Fatouville	49.26.229	000.19.337	27/09/2015	09:32	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-FT5	Fatouville	49.26.182	000.19.213	27/09/2015	13:40	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-FT10	Fatouville	49.26.169	000.19.389	27/09/2015	18:30	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-TT1	Tancarville	49.28.089	000.27.465	29/09/2015	08:35	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-TT4	Tancarville	49.28.128	000.27.559	29/09/2015	11:45	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-TT11	Tancarville	49.28.118	000.27.460	29/09/2015	18:35	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-CT1	Caudebec	49.31.158	000.45.277	28/09/2015	09:10	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-CT3	Caudebec	49.31.158	000.45.287	28/09/2015	11:10	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-CT7	Caudebec	49.31.160	000.45.288	28/09/2015	15:15	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-2-H100	Honfleur	49.25.842	000.13.983	26/09/2015	20:45	-	PARTICULAIRE
MOSAIC-DYN-2-F100	Fatouville	49.26.164	000.19.566	27/09/2015	21:11	-	PARTICULAIRE
MOSAIC-DYN-2-T100	Tancarville	49.28.146	000.27.515	29/09/2015	09:00	-	PARTICULAIRE
MOSAIC-DYN-2-C100	Caudebec	49.31.161	000.45.287	28/09/2015	09:25	-	PARTICULAIRE
MOSAIC-DYN-2-H100	Honfleur	49.25.842	000.13.983	42273	20:45	-	SEDIMENTS
MOSAIC-DYN-2-F100	Fatouville	49.26.164	000.19.566	42274	21:11	-	SEDIMENTS
MOSAIC-DYN-2-T100	Tancarville	49.28.146	000.27.515	42276	09:00	-	SEDIMENTS

DYNAMOSEINE-2							
CODE ECHANTILLON	STATION	LAT N	LON E	DATE	HEURE	PROFONDEUR	TYPE
MOSAIC-DYN-1-HT1	Honfleur	49.25.893	000.13.836	26/04/2015	11:50	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-HT5	Honfleur	49.25.865	000.13.967	26/04/2015	15:50	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-HT7	Honfleur	49.25.856	000.13.960	26/04/2015	17:50	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-FT4	Fatouville	49.26.212	000.19.293	27/04/2015	11:45	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-FT7	Fatouville	49.26.196	000.19.297	27/04/2015	14:45	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-FT12	Fatouville	49.26.205	000.19.385	27/04/2015	19:45	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-TT3	Tancarville	49.28.473	000.28.240	29/04/2015	10:38	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-TT6	Tancarville	49.28.448	000.28.199	29/04/2015	13:30	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-TT11	Tancarville	49.28.471	000.28.243	29/04/2015	18:35	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-CT1	Caudebec	49.31.138	000.45.352	28/04/2015	11:33	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-CT3	Caudebec	49.31.136	000.45.351	28/04/2015	13:35	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-CT6	Caudebec	49.31.138	000.45.352	28/04/2015	16:37	surface	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-HT1	Honfleur	49.25.893	000.13.836	26/04/2015	11:50	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-HT5	Honfleur	49.25.865	000.13.967	26/04/2015	15:50	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-HT7	Honfleur	49.25.856	000.13.960	26/04/2015	17:50	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-FT4	Fatouville	49.26.212	000.19.293	27/04/2015	11:45	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-FT7	Fatouville	49.26.196	000.19.297	27/04/2015	14:45	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-FT12	Fatouville	49.26.205	000.19.385	27/04/2015	19:45	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-TT3	Tancarville	49.28.473	000.28.240	29/04/2015	10:38	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-TT6	Tancarville	49.28.448	000.28.199	29/04/2015	13:30	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-TT11	Tancarville	49.28.471	000.28.243	29/04/2015	18:35	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-CT1	Caudebec	49.31.138	000.45.352	28/04/2015	11:33	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-CT3	Caudebec	49.31.136	000.45.351	28/04/2015	13:35	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-CT6	Caudebec	49.31.138	000.45.352	28/04/2015	16:37	mi-fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-HT1	Honfleur	49.25.893	000.13.836	26/04/2015	11:50	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-HT5	Honfleur	49.25.865	000.13.967	26/04/2015	15:50	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-HT7	Honfleur	49.25.856	000.13.960	26/04/2015	17:50	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-FT4	Fatouville	49.26.212	000.19.293	27/04/2015	11:45	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-FT7	Fatouville	49.26.196	000.19.297	27/04/2015	14:45	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-FT12	Fatouville	49.26.205	000.19.385	27/04/2015	19:45	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-TT3	Tancarville	49.28.473	000.28.240	29/04/2015	10:38	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-TT6	Tancarville	49.28.448	000.28.199	29/04/2015	13:30	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-TT11	Tancarville	49.28.471	000.28.243	29/04/2015	18:35	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-CT1	Caudebec	49.31.138	000.45.352	28/04/2015	11:33	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-CT3	Caudebec	49.31.136	000.45.351	28/04/2015	13:35	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-CT6	Caudebec	49.31.138	000.45.352	28/04/2015	16:37	fond	DISSOUS
MOSAIC-DYN-1-H100	Honfleur	49.25.860	000.13.976	26/04/2015	17:00 à 17:15	-	PARTICULAIRE
MOSAIC-DYN-1-F100	Fatouville	49.26.208	000.19.385	27/04/2015	19:30	-	PARTICULAIRE
MOSAIC-DYN-1-T100	Tancarville	49.28.448	000.28.198	29/04/2015	14:45	-	PARTICULAIRE
MOSAIC-DYN-1-C100	Caudebec	49.31.138	000.45.353	28/04/2015	16:50	-	PARTICULAIRE
MOSAIC-DYN-1-H100	Honfleur	49.25.860	000.13.976	26/04/2015	17:00 à 17:15	-	SEDIMENT
MOSAIC-DYN-1-F100	Fatouville	49.26.208	000.19.385	27/04/2015	19:30:00	-	SEDIMENT
MOSAIC-DYN-1-T100	Tancarville	49.28.448	000.28.198	29/04/2015	14:45:00	-	SEDIMENT

DYNAMOSEINE 3							
CODE ECHANTILLON	STATION	LAT N	LON E	DATE	HEURE	PROFONDEUR	TYPE
La Carosse 1	La Carosse	49.28.996	000.01.687	23/04/2016	7h57	surface	DISSOUS
La Carosse 3	La Carosse	49.29.009	000.01.787	23/04/2016	10h08	surface	DISSOUS
La Carosse 6	La Carosse	49.28.987	000.01.737	23/04/2016	13h00	surface	DISSOUS
Honfleur 1	Honfleur	49.25.906	000.13.842	23/04/2016	15h16	surface	DISSOUS
Honfleur 5	Honfleur	49.25.910	000.13.842	23/04/2016	19h06	surface	DISSOUS
Honfleur 7	Honfleur	49.25.906	000.13.842	23/04/2016	21h01	surface	DISSOUS
Fatouville 1	Fatouville	49.26.204	000.19.281	24/04/2016	8h30	surface	DISSOUS
Fatouville 4	Fatouville	49.26.227	000.19.470	24/04/2016	11h26	surface	DISSOUS
Fatouville 10	Fatouville	49.26.230	000.19.283	24/04/2016	17h50	surface	DISSOUS
Tancarville 3	Tancarville	49.28.452	000.28.200	26/04/2016	10h30	surface	DISSOUS
Tancarville 6	Tancarville	49.28.467	000.28.238	26/04/2016	13h30	surface	DISSOUS
Tancarville 10	Tancarville	49.28.454	000.28.199	26/04/2016	17h30	surface	DISSOUS
Tans-1 (Caud 100)	Caudebec PK 310	49.31.241	000.44.834	25/04/2016	10h00	surface	DISSOUS
Tans-7 (Dauc)	Duclair PK 280	49.27.862	000.51.542	25/04/2016	12h35	surface	DISSOUS
Trans 14 (Rouen 100)	Rouen	49.26.168	001.02.546	25/04/2016	16h00	surface	DISSOUS
La Carosse 1	La Carosse	49.28.996	000.01.687	23/04/2016	7h57	mi-fond	DISSOUS
La Carosse 3	La Carosse	49.29.009	000.01.787	23/04/2016	10h08	mi-fond	DISSOUS
La Carosse 6	La Carosse	49.28.987	000.01.737	23/04/2016	13h00	mi-fond	DISSOUS
Honfleur 1	Honfleur	49.25.906	000.13.842	23/04/2016	15h16	mi-fond	DISSOUS
Honfleur 5	Honfleur	49.25.910	000.13.842	23/04/2016	19h06	mi-fond	DISSOUS
Honfleur 7	Honfleur	49.25.906	000.13.842	23/04/2016	21h01	mi-fond	DISSOUS
Fatouville 1	Fatouville	49.26.204	000.19.281	24/04/2016	8h30	mi-fond	DISSOUS
Fatouville 4	Fatouville	49.26.227	000.19.470	24/04/2016	11h26	mi-fond	DISSOUS
Fatouville 10	Fatouville	49.26.230	000.19.283	24/04/2016	17h50	mi-fond	DISSOUS
Tancarville 3	Tancarville	49.28.452	000.28.200	26/04/2016	10h30	mi-fond	DISSOUS
Tancarville 6	Tancarville	49.28.467	000.28.238	26/04/2016	13h30	mi-fond	DISSOUS
Tancarville 10	Tancarville	49.28.454	000.28.199	26/04/2016	17h30	mi-fond	DISSOUS
Tans-1 (Caud 100)	Caudebec PK 310	49.31.241	000.44.834	25/04/2016	10h00	mi-fond	DISSOUS
Tans-7 (Dauc)	Duclair PK 280	49.27.862	000.51.542	25/04/2016	12h35	mi-fond	DISSOUS
Trans 14 (Rouen 100)	Rouen	49.26.168	001.02.546	25/04/2016	16h00	mi-fond	DISSOUS
La Carosse 1	La Carosse	49.28.996	000.01.687	23/04/2016	7h57	fond	DISSOUS
La Carosse 3	La Carosse	49.29.009	000.01.787	23/04/2016	10h08	fond	DISSOUS
La Carosse 6	La Carosse	49.28.987	000.01.737	23/04/2016	13h00	fond	DISSOUS
Honfleur 1	Honfleur	49.25.906	000.13.842	23/04/2016	15h16	fond	DISSOUS
Honfleur 5	Honfleur	49.25.910	000.13.842	23/04/2016	19h06	fond	DISSOUS
Honfleur 7	Honfleur	49.25.906	000.13.842	23/04/2016	21h01	fond	DISSOUS
Fatouville 1	Fatouville	49.26.204	000.19.281	24/04/2016	8h30	fond	DISSOUS
Fatouville 4	Fatouville	49.26.227	000.19.470	24/04/2016	11h26	fond	DISSOUS
Fatouville 10	Fatouville	49.26.230	000.19.283	24/04/2016	17h50	fond	DISSOUS
Tancarville 3	Tancarville	49.28.452	000.28.200	26/04/2016	10h30	fond	DISSOUS
Tancarville 6	Tancarville	49.28.467	000.28.238	26/04/2016	13h30	fond	DISSOUS
Tancarville 10	Tancarville	49.28.454	000.28.199	26/04/2016	17h30	fond	DISSOUS
Tans-1 (Caud 100)	Caudebec PK 310	49.31.241	000.44.834	25/04/2016	10h00	fond	DISSOUS
Tans-7 (Dauc)	Duclair PK 280	49.27.862	000.51.542	25/04/2016	12h35	fond	DISSOUS
Trans 14 (Rouen 100)	Rouen	49.26.168	001.02.546	25/04/2016	16h00	fond	DISSOUS
La Carosse 100	La Carosse	49.28.989	000.01.700	23/04/2016	13h20	-	PARTICULAIRE
Fatouville 100	Fatouville	49.26.216	000.19.479	24/04/2016	11h15	-	PARTICULAIRE
Caudebec 100	Caudebec PK 310	49.31.241	000.44.834	25/04/2016	10h00	-	PARTICULAIRE
Rouen 100	Rouen PK 245	49.25.913	001.01.712	25/04/2016	15h35	-	PARTICULAIRE
La Carosse sédiment	La Carosse	49.29.001	000.01.775	23/04/2016	9h30	-	SEDIMENT
Fatouville 100	Fatouville	49.26.216	000.19.479	24/04/2016	11h15	-	SEDIMENT
Tancarville shipek	Tancarville	49.27.494	000.26.152	26/04/2016		-	SEDIMENT
Rouen Sédiment	Rouen	49.26.168	001.02.546	25/04/2016	16h00	-	SEDIMENT

## Annexe 4 : Méthodes analytiques (groupe 1-10)

### Récapitulatif

	Groupes (nombre de composés)	Méthode d'extraction	Séparation -détection	Quantification	Axes	Réf.
Pharmaceutiques	Groupe 1 (54)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1, 2	Aminot et al., (2015)
	Groupe 1-a (8)	Injection directe	LC-MS/MS	EI	2	-
	Groupe 2 (2)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1	Dévier et al., (2013)
	Groupe 3 (5)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1	Dévier et al., (2013)
	Groupe 4 (65)	SPE classique	LC-MS/MS	EE+EI	1	Capdeville (2001)
Pesticides / biocides	Groupe 5 (3)	Injection directe	LC-MS/MS	AD	1, 2	-
	Groupe 6 (56)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1, 2	Belles et., (2013)
	Groupe 6-a (9)	SPE en ligne	LC-MS/MS	EI	2	-
	Groupe 7 (2)	Injection directe	LC-MS/MS	EI	1, 2	-
	Groupe 8 (4)	SPME en ligne	GC-MS/MS	EI	1, 2	Le Coadou et al., (2016) ; Cruz (2015)
FUV	Groupe 9 (2)	SPE classique	LC-MS/MS	EE	1, 2	Aquaref (2008)
	Groupe 10 (6)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1	Aminot (2013)
	Non ciblée	SPE classique	bioessais <i>in vitro</i> + LC-QTOF	-	1,2,3	Creusot et al., (2013)

**SPE** : extraction sur phase solide ; **SPME**: microextraction sur phase solide ; **LC** : chromatographie en phase liquide ; **GC** : chromatographie en phase gazeuse ; **MS/MS** : spectrométrie de masse en tandem ; **QTOF** : quadripôle/temps de vol ; **EI** : étalonnage interne, **EE** : étalonnage externe, **AD** : ajouts dosés, **FUV** : filtres ultra-violets

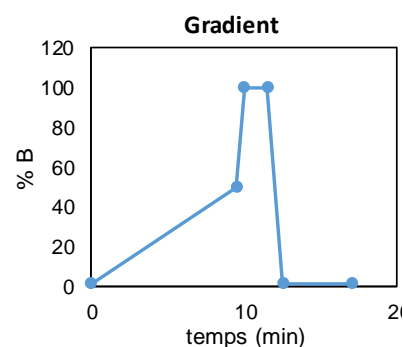


## Groupe analytique n° 1

### CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE :

#### Rapid Resolution LC 1200 - Agilent Technologies

**Voie A :** eau MilliQ +0,1 % acide formique  
**Voie B :** acétonitrile + 0,1 % acide formique  
**Injection :** 5 µl  
**Débit :** 0,6 ml.min<sup>-1</sup>  
**Colonne :** Zorbax SB-C18 2,1\*50 mm, 1,8µm



### SPECTROMETRIE DE MASSE :

#### 6410 Triple quadripole - Agilent Technologies

**Acquisition :** MRM  
**T° gaz :** 300°C  
**Débit gaz séchant :** 8 L.min<sup>-1</sup>

**Pression nebulizer :** 30 psi  
**T° gaz fourreau :** 400 °C  
**Débit gaz fourreau :** 11 L.min<sup>-1</sup>  
**Tension de capillaire :** 3000 V

#### Transitions :

Molécules	Ionisation	Ion précurseur	Ion fils	Frag.	coll.	EI
lamivudine 15N2-13C	ESI +	233.2	115	78	4	-
lamivudine	ESI +	230	112	70	8	lamivudine 15N2-13C
lamivudine	ESI +	230	95	70	46	
paracétamol-d4	ESI +	156	114	100	18	-
paracétamol	ESI +	152	110	100	16	paracétamol d4
paracétamol	ESI +	152	93	110	26	
terbutaline	ESI +	226	152	100	14	diazépam d5
terbutaline	ESI +	226	125	110	24	
sotalol d7	ESI +	280.2	262.1	103	4	-
sotalol d6	ESI +	279.2	261.1	103	4	-
sotalol	ESI +	273.1	255.1	110	10	sotalol d7
sotalol	ESI +	273.1	133	110	30	
salbutamol-d3	ESI +	243	151	100	18	-
salbutamol	ESI +	240	166	110	15	salbutamol d3
salbutamol	ESI +	240	148	100	18	
ranitidine	ESI +	315.2	176.1	98	12	diazépam d5
ranitidine	ESI +	315.2	130.1	98	24	
atenolol-d7	ESI +	274.2	145	130	30	-
atenolol	ESI +	267.1	145	130	28	aténolol d7
atenolol	ESI +	267.1	74.1	130	22	
theophylline	ESI +	181	124	110	18	caféine d9
theophylline	ESI +	181	96	120	26	
abacavir d4	ESI +	291.2	195.1	126	16	-
abacavir	ESI +	287.1	191	150	18	abacavir d4
abacavir	ESI +	287.1	150	150	32	
cafeine d9	ESI +	204.1	144.1	131	16	-
cafeine-C13	ESI +	196	139	130	20	-
cafeine	ESI +	195	138	130	18	caféine d9
cafeine	ESI +	195	41.7	130	30	

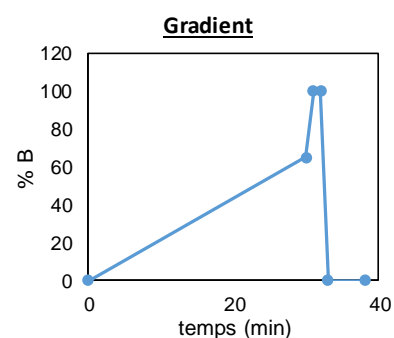
Molécules	Ionisation	Ion précurseur	Ion fils	Frag.	coll.	EI
primidone d5	ESI +	224.1	167.1	73	4	-
primidone	ESI +	219.1	162.1	91	8	primidone d5
primidone	ESI +	219.1	91.1	91	28	
clenbuterol	ESI +	277	259	110	12	diazépam d5
clenbuterol	ESI +	277	203	110	16	
metoprolol	ESI +	268.1	116.1	140	18	propranolol d7
metoprolol	ESI +	268.1	74.1	140	22	
acebutolol	ESI +	337.2	116.1	136	20	propranolol d7
acebutolol	ESI +	337.2	56.1	136	36	
gabapentine	ESI +	172.1	154.1	20	12	gabapentine d4
gabapentine	ESI +	172.1	137.2	20	15	
timolol	ESI +	317.1	261	130	14	propranolol d7
timolol	ESI +	317.1	74	130	22	
disopyramide	ESI +	340.2	239.1	117	12	diazépam d5
disopyramide	ESI +	340.2	194.1	117	48	
omeprazole	ESI +	346.1	198	98	4	diazépam d5
omeprazole	ESI +	346.1	136	98	36	
nevirapine d3	ESI +	270.2	229.1	136	24	-
névirapine	ESI +	267.1	226	150	28	nevirapine d3
névirapine	ESI +	267.1	80	150	42	
bisoprolol	ESI +	326.2	116	150	16	propranolol d7
bisoprolol	ESI +	326.2	74	150	24	
méprobamate d3	ESI +	222.2	161.1	60	4	-
méprobamate	ESI +	219.1	158.1	74	0	méprobamate d3
méprobamate	ESI +	219.1	55.2	74	24	
bromazépam-d4	ESI +	320	186.1	136	36	-
bromazépam	ESI +	316.1	209	130	28	bromazépam-d4
bromazépam	ESI +	316.1	182	120	34	
propranolol-d7	ESI +	267.1	56	110	36	-
propranolol	ESI +	260.1	116.1	120	16	propranolol-d7
propranolol	ESI +	260.1	56.1	130	32	
indinavir d6	ESI +	310.8	133.1	102	8	-
indinavir	ESI +	307.7	133	70	10	indinavir d6
indinavir	ESI +	307.7	97	70	34	
doxépine	ESI +	280	107	120	24	amitriptyline d6
doxépine	ESI +	280	84.1	130	24	
carbamazépine-13C-15N	ESI +	239.1	194	109	16	-
carbamazépine-d10	ESI +	247.1	204.1	119	16	-
sildénafil-d3	ESI +	478.2	61	210	54	-
sildénafil	ESI +	475.1	58.1	210	46	sildénafil-d3
sildénafil	ESI +	238.1	58.1	110	20	
carbamazépine	ESI +	237	194	130	20	carbamazépine-d10
carbamazépine	ESI +	237	192	120	20	
imipramine-d4	ESI +	285	85.7	120	22	-
imipramine	ESI +	281	86	120	20	imipramine-d4
imipramine	ESI +	281	57.6	110	30	
nordiazépam-d5	ESI +	276	140	120	30	-
oxazépam d5	ESI +	292.1	246.1	121	20	-
oxazépam	ESI +	287.1	269	132	8	oxazépam d5
oxazépam	ESI +	287.1	241	132	20	
nordiazépam	ESI +	271	164.7	130	30	nordiazépam-d5
nordiazépam	ESI +	271	140	130	27	
cétirizine d8	ESI +	397.2	201	116	16	-
cetirizine	ESI +	389.2	201	98	16	cétirizine d8
cetirizine	ESI +	389.2	166.1	98	48	
lorazepam	ESI +	321	303	117	8	diazépam d5
lorazepam	ESI +	321	275	117	16	
losartan	ESI +	423.2	405.1	136	4	diazépam d5
losartan	ESI +	423.2	207.1	136	20	
fluoxétine-d5	ESI +	315.2	44.2	98	8	-
clonazepam	ESI +	316.1	270.1	141	20	diazépam d5
clonazepam	ESI +	316.1	214.1	141	40	

Molécules	Ionisation	Ion précurseur	Ion fils	Frag.	coll.	EI
fluoxetine	ESI +	310.1	148	110	8	fluoxetine-d5
fluoxetine	ESI +	310.1	43.8	100	22	
amitryptiline-d6	ESI +	284.3	233	120	20	-
amitryptiline	ESI +	278	232.4	130	20	amitryptiline-d6
amitryptiline	ESI +	278	91	110	24	
alprazolam	ESI +	309	281	120	26	diazépam d5
alprazolam	ESI +	309	205	130	42	
clopidogrel	ESI +	322.1	212	98	12	diazépam d5
clopidogrel	ESI +	322.1	184	98	20	
diazepam-d5	ESI +	290	154	120	30	-
diazepam	ESI +	285	256.7	120	22	diazépam d5
diazepam	ESI +	285	154	120	28	
nefinavir	ESI +	568.2	467.2	150	30	indinavir d6
nefinavir	ESI +	568.2	330.1	150	34	
bézafrate d6	ESI +	368.2	139	98	24	-
bézafrate	ESI +	362.1	316.1	87	8	bézafrate d6
bézafrate	ESI +	362.1	139	87	24	
saquinavir	ESI +	336.3	285.6	110	10	indinavir d6
saquinavir	ESI +	336.3	128	110	46	
ritonavir	ESI +	721.2	296	130	18	nevirapine d3
ritonavir	ESI +	721.2	268.1	140	32	

## CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE :

### Rapid Resolution LC 1200 - Agilent Technologies

**Voie A :** eau MilliQ  
**Voie B :** acétonitrile  
**Injection :** 5 µl  
**Débit :** 0,6 ml.min<sup>-1</sup>  
**Colonne :** Zorbax SB-C18 2,1\*50 mm, 1,8µm



## SPECTROMETRIE DE MASSE :

### 6410 Triple quadripole - Agilent Technologies

**Acquisition :** MRM  
**T° gaz :** 300°C  
**Débit gaz séchant :** 8 L.min<sup>-1</sup>  
**Pression nebulizer :** 30 psi  
**T° gaz fourreau :** 400 °C  
**Débit gaz fourreau :** 11 L.min<sup>-1</sup>  
**Tension de capillaire :** 3000 V

### Transitions :

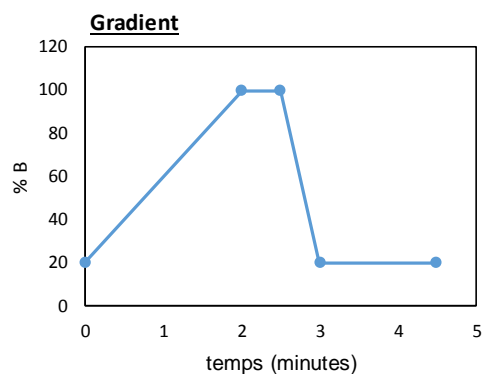
Molécules	Ionisation	Q-MRMa	Q-MRMa	Frag.	coll.	EI
		Ion précurseur	Ion fils			
atorvastatine d5	ESI -	562,3	283,1	149	48	-
atorvastatine	ESI -	557,2	397,2	159	28	atorvastatine d5
atorvastatine	ESI -	557,2	278,1	159	48	-
pravastatine d3	ESI -	426,3	321,1	151	8	-
pravastatin-COOH	ESI -	423,2	321,1	151	8	pravastatine d3
pravastatin-COOH	ESI -	423,2	101,1	151	32	-
acide fénofibrique d6	ESI -	323,1	231	82	8	-
acide fenofibrique	ESI -	317,1	231	88	4	acide fénofibrique d6
acide fenofibrique	ESI -	317,1	92	88	60	-
diclofenac-d4	ESI -	298,1	253,9	90	6	-
diclofenac	ESI -	294,1	249,9	90	6	diclofenac-d4
diclofenac	ESI -	294,1	214	80	18	-
zidovudine d3	ESI -	269,1	225,8	78	4	-
zidovudine	ESI -	266	223	90	2	zidovudine d3
zidovudine	ESI -	266	193	100	6	-
ketoprofene-d3	ESI -	256,2	212	60	1	-
gemfibrozil d6	ESI -	255,4	120,8	90	12	-
ketoprofene	ESI -	253,2	209	60	1	ketoprofene-d3
gemfibrozil	ESI -	249,2	126,8	70	4	gemfibrozil d6
gemfibrozil	ESI -	249,2	120,8	90	12	-
naproxene-d3	ESI -	232,1	172,9	60	12	-
naproxene	ESI -	229,1	184,9	70	1	naproxene-d3
naproxene	ESI -	229,1	169,9	60	10	-
hydroxy ibuprofene d6	ESI -	227,2	183,2	72	0	-
hydroxy ibuprofene	ESI -	221,1	177,1	65	0	hydroxy ibuprofene d6
acide clofibrique d4	ESI -	217,1	131	75	8	-
acide clofibrique	ESI -	213	126,9	76	8	acide clofibrique d4
acide clofibrique	ESI -	213	85	76	0	-
ibuprofene d3	ESI -	208,2	163,9	70	1	-
ibuprofene	ESI -	205,2	160,9	80	1	ibuprofene d3
acide 4-chlorobenzoïque d4	ESI -	159	115	71	8	-
acide 4-chlorobenzoïque	ESI -	155	111	71	8	acide 4-chlorobenzoïque d4
acide 4-chlorobenzoïque	ESI -	155	35	71	16	-

## Groupe analytique n° 2

### CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE :

#### Acquity Ultra Performance LC (Waters)

**Voie A :** eau MilliQ +0,05 % ac. formique  
**Voie B :** Méthanol  
**Injection :** 5 µl  
**Débit :** 0,4 ml.min<sup>-1</sup>  
**Colonne :** Acquity UPLC BEH C18 100 \* 2,1mm; 1,7µm



### SPECTROMETRIE DE MASSE :

#### Acquity Quattro Premier triple quadripole (Waters)

**Acquisition :** MRM  
**T° gaz :** 120°C  
**Débit gaz séchant :** 8 L.min<sup>-1</sup>  
**T° gaz fourreau :** 400 °C  
**Débit gaz fourreau :** 11 L.min<sup>-1</sup>  
**Tension de capillaire :** 3000 V

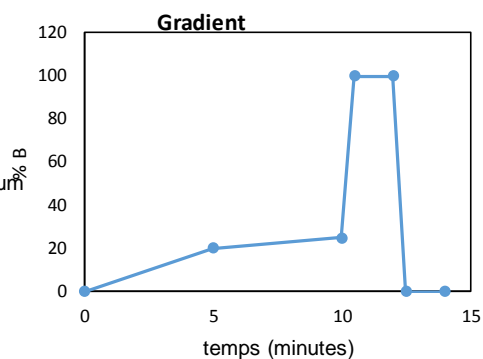
Molécules	Ionisation	Q-MRMa	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	C-MRMb	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	EI
acide salicylique	ESI -	136.8 > 92.9	30	17	136.8 > 64.9	30	25	acide salicylique d6
aspirine	ESI -	178.9 > 136.6	15	9	178.9 > 92.80	15	20	aspirine d4
acide salicylique d6	ESI -	183 >141	15	7	183 >96.90	14	20	-
aspirine d4	ESI -	141 > 97	30	17	-	-	-	-

## Groupe analytique n° 3

### CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE :

#### Acquity Ultra Performance LC (Waters)

**Voie A :** eau MilliQ +0,1 % ac. formique  
**Voie B :** acétonitrile + 0,1 % ac. Formique  
**Injection :** 5 µl  
**Débit :** 0,4 ml.min<sup>-1</sup>  
**Colonne :** Kineyex ULPC BEH C18, 2,1\*100 mm; 1,7 µm



### SPECTROMETRIE DE MASSE :

#### Acquity Quattro Premier triple quadripole (Waters)

**Acquisition :** MRM  
**T° gaz :** 120°C  
**Débit gaz séchant :** 8 L.min<sup>-1</sup>  
**T° gaz fourreau :** 400 °C  
**Débit gaz fourreau :** 11 L.min<sup>-1</sup>  
**Tension de capillaire :** 3000 V

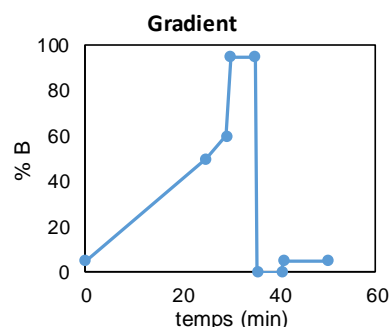
Molécules	Ionisation	Q-MRMA	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	C-MRMB	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	EI
carbamazépine	ESI+	237>194	130	20	237>192	120	20	carbamazépine d10
10,11-Dihydro carbamazépine	ESI+	253.2>180.1	20	30	253.2>210.2	20	15	carbamazépine d10
2-Hydroxy Carbamazépine	ESI+	253.2>210.2	20	15	253.2>167.1	32	38	carbamazépine d10
3-Hydroxy Carbamazépine	ESI+	253.2>210.2	20	15	253.2>167.1	32	38	carbamazépine d10
Trans 10,11 dihydro-10,11-dihydroxy carbamazépine	ESI+	239.2>194.1	32	22	239.2>91.0	32	40	carbamazépine d10
carbamazépine d10	ESI+	247,1 -> 204,1	119	16	-	-	-	-

## Groupe analytique n° 4

### CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE :

#### Rapid Resolution LC 1200 - Agilent Technologies

**Voie A :** eau MilliQ + 0,3 % acide formique  
**Voie B :** acétonitrile + 0,3 % acide formique  
**Injection :** 5 µl  
**Débit :** 0,4 ml.min<sup>-1</sup>  
**Colonne :** Zorbax SB-C18 2,1\*100 mm, 1,8µm



### SPECTROMETRIE DE MASSE :

#### 6410 Triple quadripole - Agilent Technologies

**Acquisition :** MRM  
**T° gaz :** 300°C  
**Débit gaz séchant :** 8 L.min<sup>-1</sup>  
**Pression nebulizer :** 30 psi  
**T° gaz fourreau :** 400 °C  
**Débit gaz fourreau :** 11 L.min<sup>-1</sup>  
**Tension de capillaire :** 3000 V

#### Transitions :

Molécules	Q-MRMa		Q-MRMa		coll.	EI
	Ionisation	Ion précurseur	Ion fils	Frag.		
gemcitabine	ESI +	264	112	110	16	x
gemcitabine	ESI +	264	95	110	48	
sulfanilamide	ESI +	173	93	110	24	sulfaméthazine-13C6
sulfanilamide	ESI +	173	76	110	46	
metronidazole d4	ESI +	176,1	128	93	8	-
metronidazole	ESI +	172	128	80	12	metronidazole d4
metronidazole	ESI +	172	82	80	26	
amoxicilline-13C6	ESI +	372	355,1	65	2	-
amoxicilline	ESI +	366,1	349,1	70	4	amoxicilline-13C6
amoxicilline	ESI +	366,1	114	100	20	
stavudine	ESI +	127	84	90	18	x
stavudine	ESI +	127	54	90	24	
sulfadiazine -13C6	ESI +	257,1	162	93	8	-
sulfadiazine	ESI +	251,1	156	110	12	sulfadiazine-13C6
sulfadiazine	ESI +	251,1	108	110	22	
sulfathiazole	ESI +	256	156	110	12	sulfaméthazine-13C6
sulfathiazole	ESI +	256	108	110	24	
sulfapyridine d4	ESI +	254,1	160	73	12	-
sulfapyridine	ESI +	250	155,9	110	14	sulfapyridine d4
sulfapyridine	ESI +	250	92	110	32	
sulfamérazine	ESI +	265,2	156	110	14	sulfaméthazine-13C6
sulfamérazine	ESI +	265,2	108	110	28	
lincomycine-d3	ESI +	410,2	129,1	105	29	-
lincomycine	ESI +	407,2	359,2	110	18	lincomycine-d3
lincomycine	ESI +	407,2	126,1	120	30	
acide pipémidique	ESI +	304,2	286,3	60	18	ofloxacine-d3
acide pipémidique	ESI +	304,2	217,3	60	20	
sulfaméthazine-13C6	ESI +	285,1	98,1	120	34	-
sulfaméthazine	ESI +	279,1	186,1	130	16	sulfaméthazine-13C6
sulfaméthazine	ESI +	279,1	92,1	120	34	
triméthoprime-13C3	ESI +	294	233,1	155	22	-
triméthoprime	ESI +	291,1	261,1	150	26	triméthoprime-13C3
triméthoprime	ESI +	291,1	230,2	140	24	
ampicilline-15N1	ESI +	351,1	107	105	21	-
ampicilline	ESI +	350,1	192	90	12	ampicilline-15N1
ampicilline	ESI +	350,1	106,1	110	20	
méthotrexate d3	ESI +	458,2	311,1	111	16	-
méthotrexate	ESI +	455,1	308,1	150	18	méthotrexate d3
méthotrexate	ESI +	455,1	175	150	42	

Molécules	Ionisation	lon précurseur	lon fils	Frag.	coll.	EI
oxytétracycline	ESI +	461,1	444,1	130	16	tétracycline-d6
oxytétracycline	ESI +	461,1	426,1	110	20	
sulfaméthizole	ESI +	271	156	100	12	sulfaméthoxazole-13C6
sulfaméthizole	ESI +	271	108	100	26	
marbofloxacin	ESI +	363,1	320,1	110	14	ofloxacin-d3
marbofloxacin	ESI +	363,1	72,1	110	22	
cefotaxime	ESI +	456,2	396,2	120	8	penicilline G-d7
cefotaxime	ESI +	456,2	324	120	10	
tétracycline-d6	ESI +	451,2	416,1	95	17	-
tétracycline	ESI +	445,1	410,1	130	18	tétracycline-d6
tétracycline	ESI +	445,1	154,1	120	28	
ofloxacin-d3	ESI +	365	321,2	102	18	-
ofloxacin	ESI +	362,1	318,1	120	18	ofloxacin-d3
ofloxacin	ESI +	362,1	261,2	90	30	
norfloxacin-d5	ESI +	325,2	281,4	110	16	-
norfloxacin	ESI +	320,2	302,2	120	18	norfloxacin-d5
norfloxacin	ESI +	320,2	276,2	120	18	
ciprofloxacin d8	ESI +	340	296,2	140	18	-
ciprofloxacin-13C3-15N	ESI +	336,1	291,2	110	18	-
ciprofloxacin	ESI +	332,1	288,2	150	18	ciprofloxacin d8
ciprofloxacin	ESI +	332,1	245,1	150	24	
enrofloxacin	ESI +	360,3	316,4	130	20	ofloxacin-d3
enrofloxacin	ESI +	360,3	245	130	28	
sulfaméthoxazole-13C6	ESI +	260,1	98,1	90	30	-
sulfaméthoxazole	ESI +	254,1	156,1	90	14	sulfaméthoxazole-13C6
sulfaméthoxazole	ESI +	254,1	92,1	100	30	
ifosfamide d4	ESI +	265,1	94	111	24	-
ifosfamide	ESI +	261,1	92,1	130	28	ifosfamide d4
ifosfamide	ESI +	261,1	63,1	130	52	
chlortétracycline	ESI +	479,1	462	120	16	tétracycline-d6
chlortétracycline	ESI +	479,1	444,1	120	22	
cyclophosphamide d4	ESI +	265,1	140	111	20	-
cyclophosphamide	ESI +	261,1	140,1	140	22	cyclophosphamide d4
cyclophosphamide	ESI +	261,1	106,1	130	18	
clindamycine	ESI +	425,3	377	110	20	lincomycine-d3
clindamycine	ESI +	425,3	126	110	30	
spiramycine	ESI +	422,4	174,2	110	20	clarithromycine-d3
spiramycine	ESI +	422,4	101	110	16	
azithromycine	ESI +	375,4	158,3	70	22	clarithromycine-d3
azithromycine	ESI +	375,4	116,3	70	24	
doxycycline	ESI +	445,2	428,1	130	18	tétracycline-d6
doxycycline	ESI +	445,2	410,1	120	26	
acide oxolinique	ESI +	262,1	244,1	90	18	ofloxacin-d3
acide oxolinique	ESI +	262,1	216,1	90	32	
sulfadiméthoxine-d6	ESI +	317,1	162,2	150	22	-
sulfadiméthoxine	ESI +	311,1	156	100	18	sulfadiméthoxine-d6
sulfadiméthoxine	ESI +	311,1	108	100	26	
ceftiofur	ESI +	524	241,1	140	16	ampicilline-15N1
ceftiofur	ESI +	524	125,9	130	46	
doxorubicine	ESI +	544,1	396,9	100	9	x
doxorubicine	ESI +	544,1	361	90	28	
épirubicine	ESI +	544,1	396,9	100	9	x
épirubicine	ESI +	544,1	130,1	90	14	
bacitracine	ESI +	475	199	111	28	x
bacitracine	ESI +	475	86,1	111	38	

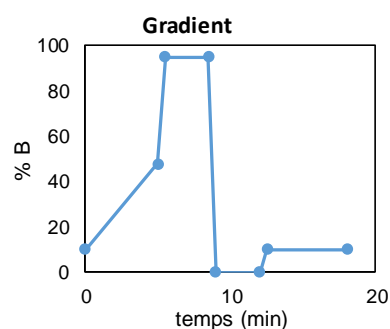


Molécules	Ionisation	Ion précurseur	Ion fils	Frag.	coll.	EI
érythromycine-13C2	ESI +	736,4	159,9	130	34	-
érythromycine	ESI +	734,5	576,3	150	18	érythromycine-13C2
érythromycine	ESI +	734,5	157,9	150	36	
daunorubicine	ESI +	528,1	363,1	90	10	x
daunorubicine	ESI +	528,1	321,1	90	30	
fluméquine 13C3	ESI +	265,2	247	108	12	-
fluméquine	ESI +	262,1	244,1	90	18	fluméquine 13C3
fluméquine	ESI +	262,1	202,1	90	36	
tylosine	ESI +	916,5	772,4	170	30	clarithromycine-d3
tylosine	ESI +	916,5	174	170	42	
clarithromycine-d3	ESI +	751,5	161,1	105	29	-
clarithromycine	ESI +	748,5	590,3	150	18	clarithromycine-d3
clarithromycine	ESI +	748,5	157,9	150	30	
cefpodoxime	ESI +	558,1	410,1	120	14	ampicilline-15N1
cefpodoxime	ESI +	558,1	241,1	150	20	
virginiamycine	ESI +	526,2	508,1	90	12	x
virginiamycine	ESI +	526,2	355,1	90	14	
roxithromycine	ESI +	837,5	679,3	140	22	clarithromycine-d3
roxithromycine	ESI +	837,5	157,9	130	38	
josamycine	ESI +	828,4	173,8	160	34	clarithromycine-d3
josamycine	ESI +	828,4	109	160	46	
docetaxel	ESI +	808,3	327,1	90	22	x
docetaxel	ESI +	527,1	105	90	46	
rifampicine	ESI +	823,4	791,3	160	18	x
rifampicine	ESI +	823,4	399	160	20	
tamoxifen-d5	ESI +	377,2	72	170	24	-
tamoxifen	ESI +	372,2	129	150	26	tamoxifen-d5
tamoxifen	ESI +	372,2	72,1	150	26	
salinomycine	ESI +	773,4	531,3	270	54	x
salinomycine	ESI +	773,4	431,1	270	60	
monensine	ESI +	693,3	675,3	250	46	x
monensine	ESI +	693,3	461,2	250	62	
danofloxacine	ESI +	528,1	321,1	90	30	ofloxacine-d3
danofloxacine	ESI +	528,1	363,1	90	10	
sarafloxacine	ESI +	386,13	368,2	380	20	ofloxacine-d3
sarafloxacine	ESI +	386,13	342,1	380	20	

## CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE :

### Rapid Resolution LC 1200 - Agilent Technologies

**Voie A :** eau MilliQ  
**Voie B :** acétonitrile  
**Injection :** 5 µl  
**Débit :** 0,6 ml.min<sup>-1</sup>  
**Colonne :** Zorbax SB-C18 2,1\*50 mm, 1,8µm



## SPECTROMETRIE DE MASSE :

### 6410 Triple quadripole - Agilent Technologies

**Acquisition :** MRM  
**T° gaz :** 300°C  
**Débit gaz séchant :** 8 L.min<sup>-1</sup>

**Pression nebulizer :** 30 psi  
**T° gaz fourreau :** 400 °C  
**Débit gaz fourreau :** 11 L.min<sup>-1</sup>  
**Tension de capillaire :** 3000 V

### Transitions :

Molécules	Q-MRMa		Ion fils	Frag.	coll.	EI
	Ionisation	Ion précurseur				
5-fluorouracil-15N2	ESI -	131	43	90	16	-
5-fluorouracil	ESI -	129	42	380	24	5-fluorouracil-15N2
5-fluorouracil	ESI -	129	58,9	380	24	
zidovudine d3	ESI -	269,1	225,8	78	4	-
thiamphénicole	ESI -	354	290,2	130	10	chloramphénicol-d5
thiamphénicole	ESI -	354	185	130	20	
cefalexin	ESI -	346,2	268,1	70	10	penicilline G-d7
cefalexin	ESI -	346,2	233	70	8	
cefuroxime	ESI -	423	318	70	4	penicilline G-d7
cefuroxime	ESI -	423	207	70	8	
chloramphenicol-d5	ESI -	326	157	110	14	-
chloramphénicole	ESI -	321	257	170	6	chloramphenicol-d5
chloramphénicole	ESI -	321	152	170	12	
penicilline G d7	ESI -	340	199,1	85	2	-
oxacilline	ESI -	400	356,1	70	2	penicilline G-d7
oxacilline	ESI -	400	259,1	100	10	
cloxacilline	ESI -	434	293	90	8	penicilline G-d7
cloxacilline	ESI -	434	257	90	12	
dicloxacilline	ESI -	468	424	80	4	penicilline G-d7
dicloxacilline	ESI -	468	327	80	8	
acide fusidique	ESI -	515,4	455,5	150	18	x
acide fusidique	ESI -	515,4	393,3	150	24	

## Groupe analytique n° 5

### CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE :

#### LC 1290 Infinity - Agilent Technologies

Voie A : eau EDS-Pack + 0,1 % acide formique

Voie B : acétonitrile 0,1 % acide formique

Injection : 100 µl

Débit : 0,4 ml.min<sup>-1</sup>

Colonne : Kinetex C18, 2,1\*100 mm, 1,7µm

### SPECTROMETRIE DE MASSE :

#### 6490 Triple quadripole - Agilent Technologies

Acquisition : MRM

T° gaz : 290°C

Débit gaz séchant : 15 L.min<sup>-1</sup>

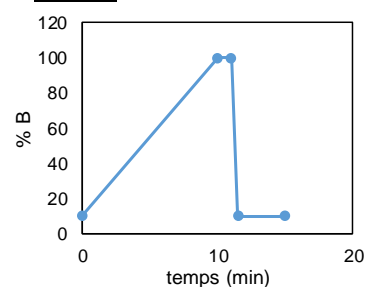
Pression nebulizer : 30 psi

T° gaz fourreau : 400 °C

Débit gaz fourreau : 12 L.min<sup>-1</sup>

Tension de capillaire : 3000 V

#### Gradient



#### Transitions

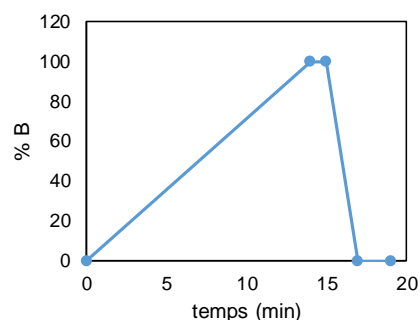
Molécules	Ionisation	Q-MRMa	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	C-MRMB	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	-
Apixaban	ESI+	460,2>2443	380	24	460,2>199	380	40	AD
Dabigatran	ESI+	472,21>289,1	380	20	472,21>144,1	380	64	AD
Rivaroxaban	ESI+	436,08>145,1	380	36	436,08>72,9	380	80	AD

## Groupe analytique n° 6

### CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE :

#### LC 1290 Infinity - Agilent Technologies

Voie A : eau MilliQ + 5 mM d'acétate d'ammonium +  
0,1% acide acétique  
Voie B : méthanol  
Injection : 5 µl  
Débit : 0,5 ml.min<sup>-1</sup>  
Colonne : Kinetex C18 2,1\*100 mm, 1,7 µm



### SPECTROMETRIE DE MASSE :

#### 6460 Triple quadripole - Agilent Technologies

Acquisition : MRM  
T° gaz : 300°C  
Débit gaz séchant : 8 L.min<sup>-1</sup>  
Pression nebulizer : 30 psi  
T° gaz fourreau : 400 °C  
Débit gaz fourreau : 11 L.min<sup>-1</sup>  
Tension de capillaire : 2500 V

#### Transitions :

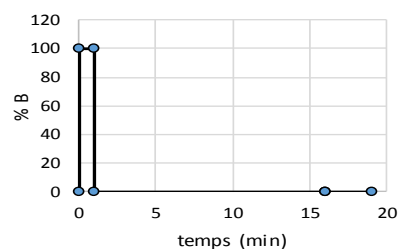
Molécules	Ionisation	Q-MRMa	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	C-MRMb	Coll. <sup>d</sup>	EI
124 DCPU	ESI +	205,0 -> 127,0	93	28	205,0 -> 161,9	8	diuron-d6
134 DCPU	ESI +	205,0 -> 127,0	93	28	205,0 -> 161,9	8	diuron-d6
alachlore	ESI +	270,1 -> 238,0	83	4	270,1 -> 162,1	12	métolachlore-d6
carbofuran-d3	ESI +	225,1 -> 165,1	82	4	-	-	-
dichlorvos	ESI +	221,0 -> 109,0	89	16	223,0 -> 109,0	28	simazine-d10
diuron-d6	ESI +	239,1 -> 78,0	109	24	-	-	-
métolachlore-d6	ESI +	290,2 -> 258,1	84	8	-	-	métolachlore-d6
métolachlore OA	ESI +	280,2 -> 248,1	92	8	280,2 -> 146,1	20	métolachlore-d6
propiconazole	ESI +	342,1 -> 158,9	134	20	342,1 -> 69,0	32	carbofuran-d3
simazine	ESI +	202,1 -> 68,0	108	32	202,1 -> 103,9	24	simazine-d10
simazine-d10	ESI +	212,1 -> 104,9	121	24	-	-	simazine-d10
1343 DCPMU	ESI +	219,0 -> 127,0	103	24	219,0 -> 161,9	8	diuron-d6
acétochlore ESA	ESI +	270,1 -> 148,1	108	16	270,1 -> 120,1	28	simazine-d10
atrazine	ESI +	216,1 -> 174,0	109	12	216,1 -> 68,0	40	atrazine-d5
atrazine-d5	ESI +	221,1 -> 179,0	116	16	-	-	atrazine-d5
azoxystrobine	ESI +	404,1 -> 372,1	102	8	404,1 -> 344,1	24	carbofuran-d3
carbendazime	ESI +	192,1 -> 160,0	102	12	192,1 -> 105,0	40	carbendazime-d3
carbendazime-d3	ESI +	195,1 -> 160,1	99	16	-	-	carbendazime-d3
carbofuran-d3	ESI +	225,1 -> 165,1	82	4	-	-	carbofuran-d3
chlortoluron	ESI +	213,1 -> 72,0	98	16	213,1 -> 46,1	12	chlortoluron-d6
chlortoluron-d6	ESI +	219,1 -> 78,1	94	24	-	-	chlortoluron-d6
DEA	ESI +	188,1 -> 146,0	103	12	188,1 -> 43,1	40	DEA-d7
DEA-d7	ESI +	195,1 -> 146,9	104	12	-	-	DEA-d7
DIA	ESI +	174,1 -> 68,0	119	32	174,1 -> 96,0	16	DIA-d5
DIA-d5	ESI +	179,1 -> 101,0	119	16	-	-	DIA-d5
diflufenican	ESI +	395,1 -> 266,0	156	24	395,1 -> 246,0	40	carbofuran-d3
dimétachlore	ESI +	256,1 -> 224,0	93	8	256,1 -> 148,1	20	terbutylazine-d5
diuron	ESI +	233,0 -> 72,0	114	16	233,0 -> 46,1	12	diuron-d6
diuron-d6	ESI +	239,1 -> 78,0	109	24	-	-	diuron-d6
DMSA	ESI +	201,1 -> 92,1	77	12	201,1 -> 65,1	36	carbofuran-d3
DMST	ESI +	215,1 -> 106,1	72	8	215,1 -> 77,1	48	carbofuran-d3
flazasulfuron	ESI +	408,1 -> 182,0	104	16	408,1 -> 83,0	50	carbofuran-d3

Molécules	Ionisation	Q-MRMA	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	C-MRMB	Coll. <sup>d</sup>	EI
hexazinone	ESI +	253,2 -> 171,0	103	8	253,2 -> 71,0	32	hexazinone-d6
hexazinone-d6	ESI +	259,2 -> 177,1	114	12	-	-	hexazinone-d6
hydroxyatrazine	ESI +	198,1 -> 156,0	132	12	198,1 -> 86,0	20	hydroxyatrazine-d5
hydroxyatrazine-d5	ESI +	203,2 -> 161,1	136	16	-	-	hydroxyatrazine-d5
hydroxysimazine	ESI +	184,1 -> 114,0	127	16	184,1 -> 69,0	32	atrazine-d5
imidaclopride	ESI +	256,0 -> 175,0	92	12	256,0 -> 209,0	12	imidaclopride-d4
imidaclopride-d4	ESI +	260,1 -> 213,1	62	12	-	-	imidaclopride-d4
isoproturon	ESI +	207,2 -> 72,0	103	12	207,2 -> 46,1	12	isoproturon-d6
isoproturon-d6	ESI +	213,2 -> 78,0	114	20	-	-	isoproturon-d6
linuron	ESI +	249,0 -> 159,9	99	12	249,0 -> 182,0	12	linuron-d6
linuron-d6	ESI +	255,1 -> 160,0	89	16	-	-	linuron-d6
métolachlore	ESI +	284,1 -> 252,0	97	12	284,1 -> 176,1	24	métolachlore-d6
métolachlore ESA	ESI +	352,1 -> 230,1	124	12	352,1 -> 208,1	12	métolachlore-d6
metolachlore-d6	ESI +	290,2 -> 258,1	84	8	-	-	métolachlore-d6
ométhoate	ESI +	214,0 -> 124,9	82	20	214,0 -> 182,9	4	métolachlore-d6
ométhoate-d6	ESI +	220,1 -> 130,9	87	20	-	-	ométhoate-d6
simazine-d10	ESI +	212,1 -> 104,9	121	24	-	-	simazine-d10
spiroxamine	ESI +	298,3 -> 144,0	114	16	298,3 -> 100,0	32	métolachlore-d6
terbutryne	ESI +	242,2 -> 186,0	84	12	242,2 -> 68,0	44	terbutryne-d5
terbutryne-d5	ESI +	247,2 -> 191,1	104	12	-	-	terbutryne-d5
terbutylazine	ESI +	230,1 -> 174,0	103	12	230,1 -> 68,0	40	terbutylazine-d5
terbutylazine-d5	ESI +	235,0 -> 179,0	108	12	-	-	terbutylazine-d5
terbutylazine désethyl	ESI +	202,1 -> 145,9	93	12	202,1 -> 43,1	44	terbutylazine désethyl-d9
terbutylazine désethyl-d9	ESI +	211,1 -> 147,0	89	12	-	-	terbutylazine désethyl-d9
trifloxystrobine	ESI +	409,1 -> 186,0	99	12	409,1 -> 145,0	52	carbofuran-d3
acétochlore	ESI +	270,1 -> 224,0	83	4	270,1 -> 148,1	4	thiamétoxam-d3
acétochlore OA	ESI +	270,1 -> 148,1	108	16	270,1 -> 120,1	28	simazine-d10
hydroxyatrazine	ESI +	198,1 -> 156,0	132	12	198,1 -> 86,0	20	atrazine-d5
carbendazime	ESI +	192,1 -> 160,0	102	12	192,1 -> 105,0	40	atrazine-d5
irgarol	ESI +	25432 -> 198,0	131	16	254,2 -> 83,0	28	irgarol-d9
irgarol-d9	ESI +	199,2 -> 124,0	263	16	-	-	irgarol-d9
thiamétoxam	ESI +	292 -> 211	77	4	292 -> 181	20	thiamétoxam-d3
thiamétoxam-d3	ESI +	295 -> 216	77	4	-	-	thiamétoxam-d3

## Groupe analytique n° 6-a

### SPE EN LIGNE

Préparation échantillons : 1 ml d'échantillon + 0.1 % ac formique  
 Voie A : eau milli-Q  
 Voie B : acétonitrile  
 Débit : 1 mL.min<sup>-1</sup>  
 Volume injecté : 900 µl  
 Cartouche : Be-online SPE PLEXA (2.1\*12.5 mm\_3/pk)

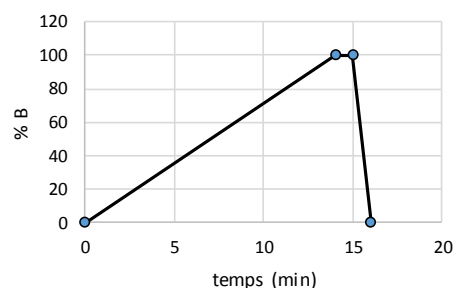


### CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE :

#### LC 1290 Infinity - Agilent Technologies

Voie A : eau MilliQ + 5 mM d'acétate d'ammonium + 0,1% acide acétique  
 Voie B : méthanol  
 Débit : 0,3 mL.min<sup>-1</sup>  
 Colonne : Poroshell 120-SB C18 2,1\*100 mm; 1,7µm

#### Gradient :



### SPECTROMETRIE DE MASSE :

#### 6490 Triple quadripole - Agilent Technologies

Acquisition : MRM  
 T° gaz : 200°C  
 Débit gaz séchant : 8 L.min<sup>-1</sup>  
 Pression nebulizer : 40 psi  
 T° gaz fourreau : 350 °C  
 Débit gaz fourreau : 11 L.min<sup>-1</sup>  
 Tension de capillaire : 3000 V

#### Transitions :

Molécules	Ionisation	Q-MRMa	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	C-MRMb	Coll. <sup>d</sup>	EI
carbofuran-d3	ESI +	225,1 -> 165,1	82	4	-	-	-
diuron-d6	ESI +	239,1 -> 78,0	109	24	-	-	-
métolachlore-d6	ESI +	290,2 -> 258,1	84	8	-	-	métolachlore-d6
métolachlore OA	ESI +	280,2 -> 248,1	92	8	280,2 -> 146,1	20	métolachlore-d6
propiconazole	ESI +	342,1 -> 158,9	134	20	342,1 -> 69,0	32	carbofuran-d3
simazine-d10	ESI +	212,1 -> 104,9	121	24	-	-	simazine-d10
atrazine	ESI +	216,1 -> 174,0	109	12	216,1 -> 68,0	40	atrazine-d5
atrazine-d5	ESI +	221,1 -> 179,0	116	16	-	-	atrazine-d5
carbendazime-d3	ESI +	195,1 -> 160,1	99	16	-	-	carbendazime-d3
carbofuran-d3	ESI +	225,1 -> 165,1	82	4	-	-	carbofuran-d3
DEA	ESI +	188,1 -> 146,0	103	12	188,1 -> 43,1	40	DEA-d7
DEA-d7	ESI +	195,1 -> 146,9	104	12	-	-	DEA-d7
DIA	ESI +	174,1 -> 68,0	119	32	174,1 -> 96,0	16	DIA-d5
DIA-d5	ESI +	179,1 -> 101,0	119	16	-	-	DIA-d5
diuron	ESI +	233,0 -> 72,0	114	16	233,0 -> 46,1	12	diuron-d6
diuron-d6	ESI +	239,1 -> 78,0	109	24	-	-	diuron-d6
hydroxyatrazine	ESI +	198,1 -> 156,0	132	12	198,1 -> 86,0	20	hydroxyatrazine-d5
hydroxyatrazine-d5	ESI +	203,2 -> 161,1	136	16	-	-	hydroxyatrazine-d5
imidaclopride	ESI +	256,0 -> 175,0	92	12	256,0 -> 209,0	12	imidaclopride-d4
imidaclopride-d4	ESI +	260,1 -> 213,1	62	12	-	-	imidaclopride-d4
isoproturon	ESI +	207,2 -> 72,0	103	12	207,2 -> 46,1	12	isoproturon-d6
isoproturon-d6	ESI +	213,2 -> 78,0	114	20	-	-	isoproturon-d6
métolachlore	ESI +	284,1 -> 252,0	97	12	284,1 -> 176,1	24	métolachlore-d6
métolachlore ESA	ESI +	352,1 -> 230,1	124	12	352,1 -> 208,1	12	métolachlore-d6
métolachlore-d6	ESI +	290,2 -> 258,1	84	8	-	-	métolachlore-d6
terbutryne	ESI +	242,2 -> 186,0	84	12	242,2 -> 68,0	44	terbutryne-d5
terbutryne-d5	ESI +	247,2 -> 191,1	104	12	-	-	terbutryne-d5

## Groupe analytique n° 7

### CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE :

#### LC 1290 Infinity - Agilent Technologies

Voie A : Eau milliQ

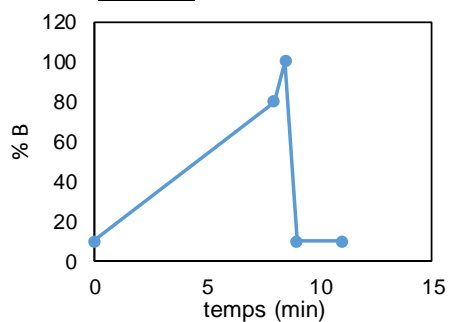
Voie B : acétonitrile

Injection : 120 µL

Débit : 0,5 ml.min<sup>-1</sup>

Colonne : Agilent ZORBAX Eclipse plus C18 (2.1\*50mm ;1.8µm)

#### Gradient



### SPECTROMETRIE DE MASSE :

#### 6460 Triple quadropole - Agilent Technologies

Acquisition : MRM

T° gaz : 250°C

Débit gaz séchant : 12 L.min<sup>-1</sup>

Pression nebulizer : 40 psi

T° gaz fourreau : 300 °C

Débit gaz fourreau : 11 L.min<sup>-1</sup>

Tension de capillaire : 3500 V

#### Transitions

Molécules	Ionisation	Q-MRMa	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	C-MRMb	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	EI
triclocarban	ESI-	313>159,7	380	8	313>34,9	380	44	triclocarban d4
triclosan	ESI-	289>34,9	380	20	286,9>34,8	380	8	triclosan d3
triclocarban d4	ESI-	317>159,7	380	18	-	-	-	-
triclosan d3	ESI-	290>34,9	380	12	-	-	-	-

## Groupe analytique n° 8

Extraction SPME	
Fibre	PDMS-DVB - 65 µm
Mode extraction	immersion dans l'échantillon
Température d'incubation	50°C
Vitesse d'agitation	250 rpm
Durée d'agitation	5 min
Durée d'extraction	60 min
Durée de désorption	10 min
Température de désorption	250°C
Injection	pulse splitless
Temps de pulse	1,5 min
Pression de pulse	25 psi

Chaîne chromatographique GC 7890 - Agilent Technologies	
Gaz vecteur	Hélium 6.0
Débit gaz vecteur	1,3 mL.min <sup>-1</sup>
Colonne	HP 5 MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) 5% phénylméthylsiloxane Agilent Technologies - 2 min à 70°C
Gradient	- rampe de 10°C.min <sup>-1</sup> jusqu'à 300°C - 10 min à 300°C

Spectromètre de masse 7000 C Triple quadripole - Agilent	
Mode d'ionisation	Impact électronique - 70 eV
Température de la source	230°C
Température du QQQ	150°C
Débit du gaz	2,5 mL.min <sup>-1</sup>
Acquisition	MRM

Transitions						
Molécules	Ionisation	Q-MRMa	Coll. <sup>d</sup>	C-MRMb	Coll. <sup>d</sup>	EI
fipronil	EI	367,0 -> 213,0	25	367,0 -> 255,0	25	fipronil 15N 13C
fipronil desulfinyl	EI	388,0 -> 333,0	10	388,0 -> 281,0	25	fipronil 15N 13C
fipronil sulfide	EI	351,0 -> 255,0	15	351,0 -> 288,0	35	fipronil 15N 13C
fipronil sulfone	EI	213,0 -> 178,0	15	383,0 -> 255,0	25	fipronil 15N 13C
fipronil 15N 13C	EI	371,0 -> 213,0	30	-	-	-



## Groupe analytique n° 9

### CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE :

#### LC 1290 Infinity - Agilent Technologies

**Voie A :** Eau ultrapure 5 mM d'acétate d'ammonium ajustée à pH9 avec hydroxyde d'ammonium

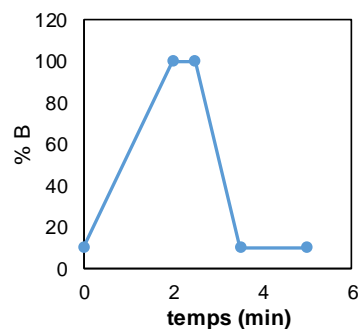
**Voie B :** acétonitrile

**Injection :** 10 µl

**Débit :** 0,6 ml.min<sup>-1</sup>

**Colonne :** BEH C18 1,7 µm, 50 mm, diam 2,1 mm - Aquity

#### Gradient



### SPECTROMETRIE DE MASSE :

#### 6460 Triple quadripole - Agilent Technologies

**Acquisition :** MRM

**T° gaz :** 300°C

**Débit gaz séchant :** 8 L.min<sup>-1</sup>

**Pression nebulizer :** 30 psi

**T° gaz fourreau :** 400 °C

**Débit gaz fourreau :** 11 L.min<sup>-1</sup>

**Tension de capillaire :** 2500 V

#### Transitions

Molécules	Ionisation	Q-MRMa	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	C-MRMb	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	EI
glyphosate acide		392.1 > 88.0	94	20	334.1 > 155.9	94	4	glyphosate 13C2 15N
aminométhylphosphonique (AMPA)		334.1 > 179.0	82	16	292.1 > 179.0	82	24	AMPA 13C 15N
AMPA 13C15N		336.1 > 179.0	82	20	-	-	-	-
glyphosate 13C215N		392.1 > 88.0	94	24	-	-	-	-

## Groupe analytique n° 10

### CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE :

#### LC 1290 Infinity - Agilent Technologies

Voie A : eau EDS-Pack + 0,1 % acide formique

Voie B : acétonitrile 0,1 % acide formique

Injection : 5 µl

Débit : 0,4 ml.min<sup>-1</sup>

Colonne : Poroshell 120 SB -C18, 2,1X 100 mm ; 2,7µm

isocratique : 70 % voie B

### SPECTROMETRIE DE MASSE :

#### 6490 Triple quadripole - Agilent Technologies

Acquisition : MRM

T° gaz : 225°C

Débit gaz séchant : 20 L.min<sup>-1</sup>

Pression nebulizer : 20 psi

T° gaz fourreau : 400 °C

Débit gaz fourreau : 12 L.min<sup>-1</sup>

Tension de capillaire : 3000 V

#### Transitions

Molécules	Ionisation	Q-MRMa	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	C-MRMb	Cone / Frag. <sup>c</sup>	Coll. <sup>d</sup>	EI
oxybenzone	ESI+	229,09->151	380	24	229,09->76,9	380	40	oxybenzone D5
avobenzone	ESI+	311,17->160,9	380	24	311,17->134,9	380	20	DHP d4
2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate	ESI+	291,2->178,9	380	4	291,2->160,9	380	16	oxybenzone D5
octyl-dimethyl-PABA	ESI+	255,18->76,8	380	20	255,18->43	380	22	oxybenzone D5
3-(4-Methylbenzylidene)camphor	ESI+	362,1->250	380	32	362,1->231,9	380	40	oxybenzone D5
octocrylène	ESI+	278,21->166	380	4	278,21->151	380	20	Octocrylène d15
DHP d4	ESI+	339,25->152,9	380	8	-	-	-	-
oxybenzone D5	ESI+	234,12->150,9	380	20	-	-	-	-
octocrylene d15	ESI+	377,31->251	380	8	-	-	-	-

## Annexe 5 : Performances analytiques

Composés	abb	CAS	Etalon interne	LQP (ng/L)	Rendement
2-hydroxy-ibuprofène	-	51146-55-5	hydroxy ibuprofene d6	30,67	91 ± 2
abacavir	-	188062-50-2	abacavir d4	3,64	94 ± 4
ac. 4-chlorobenzoïque	-	74-11-3	diclofenac d4	23,64	40 ± 56
ac. clofibrrique	-	882-09-7	acide clofibrrique d4	2,67	88 ± 10
ac. fénofibrrique	-	42017-89-0	acide fenofibrrique d6	1,14	101 ± 6
acébutolol	-	34381-68-5	propranolol d7	2,13	86 ± 14
alprazolam	-	28981-97-7	diazepam d5	0,59	120 ± 51
amitriptyline	-	549-18-8	amitriptyline d6	1,67	107 ± 17
aténolol	-	29122-68-7	atenolol d7	1,70	102 ± 13
atorvastatine	-	134523-03-8	atorvastatine d5	3,63	99 ± 20
bezafibrate	-	41859-67-0	bezafibrate d6	0,78	94 ± 9
bisoprolol	-	104344-23-2	propranolol d7	0,31	100 ± 27
bromazepam	-	1812-30-2	bromazepam d4	4,67	94 ± 8
caféine	-	58-08-2	caféine d9	2,96	112 ± 12
carbamazépine	-	298-46-4	carbamazépine d10	0,48	120 ± 8
cétirizine	-	83881-52-1	cétirizine d8	0,85	91 ± 4
clenbutérol	-	21898-19-1	diazepam d5	0,86	80 ± 10
clonazepam	-	120202-66-6	diazepam d5	1,54	70 ± 23
clopidogrel	-	144457-28-3	diazepam d5	0,35	77 ± 22
diazepam	-	439-14-5	diazepam d5	1,47	97 ± 9
diclofénac	-	15307-79-6	diclofenac d4	3,31	120 ± 11
disopyramide	-	3737 - 09-5	diazepam d5	0,13	175 ± 135
doxépine	-	1229-29-4	amitriptyline d6	1,96	86 ± 15
fluoxétine	-	56296-78-7	fluoxétine d5	0,84	90 ± 15
gabapentine	-	60142-96-3	gabapentine d4	8,21	98 ± 12
gemfibrozil	-	25812-30-0	gemfibrozil d6	1,08	92 ± 4
ibuprofène	-	15687-27-1	ibuprofene d3	5,07	115 ± 5
imipramine	-	113-52-0	imipramine d4	0,53	95 ± 9
indinavir	-	180683-37-8	indinavir d6	0,46	97 ± 9
ketoprofène	-	22071-15-4	ketoprofene d3	6,32	96 ± 4
lamivudine	-	134678-17-4	lamivudine 15N 13C	3,99	88 ± 9
lorazepam	-	846-49-1	diazepam d5	4,48	109 ± 2
losartan	-	114798-26-4	diazepam d5	0,18	48 ± 23
méprobamate	-	57-53-4	méprobamate d3	3,64	104 ± 14
métoprolol	-	56392-17-7	propranolol d7	1,19	95 ± 21
naproxène	-	22204-53-1	naproxene d3	1,51	93 ± 19
nelfinavir	-	159989-65-8	indinavir d6	0,38	154 ± 135
névirapine	-	129618-40-2	nevirapine d3	1,55	100 ± 3
nordiazepam	-	1088-11-5	nordiazepam d5	0,27	120 ± 33
oméprazole	-	73590-58-6	diazepam d5	0,15	21 ± 1
oxazepam	-	604-75-1	oxazepam d5	2,46	100 ± 10
paracétamol	-	103-90-2	paracétamol d4	46,03	205 ± 157
pravastatine	-	81131-70-6	pravastatine d3	4,44	88 ± 55
primidone	-	125-33-7	primidone d5	6,25	70 ± 25
propranolol	-	318-98-9	propranolol d7	3,04	85 ± 14
ranitidine	-	66357-59-3	diazepam d5	2,87	28 ± 15
ritonavir	-	155213-67-5	nevirapine d3	3,24	100 ± 37
salbutamol	-	18559-94-9	salbutamol d3	1,59	99 ± 12
saquinavir	-	149845-06-7	indinavir d6	0,83	82 ± 55
sildenafil	-	171599-83-0	sildenafil d3	1,59	116 ± 27
sotalol	-	959-24-0	sotalol d7	4,52	102 ± 2
terbutaline	-	23031-32-5	diazepam d5	1,93	36 ± 20
théophylline	-	58-55-9	caféine d9	7,37	98 ± 31
timolol	-	26921-17-5	propranolol d7	0,35	75 ± 32
zidovudine	-	30516-87-1	zidovudine d3	3,94	87 ± 15
asprine	-	50-78-2	aspirine d4	4,20	80 ± 22
acide salicylique	-	69-72-7	acide salicylique d6	5,00	75 ± 13

Composés	abb	CAS	Etalon interne	LQP (ng/L)	Rendement
10,11-Dihydro carbamazépine	-	3564-73-6	carbamazépine 13C15N	3,01	107 ± 4
2-Hydroxy Carbamazépine	-	68011-66-5	carbamazépine d10	2,91	107 ± 8
3-Hydroxy Carbamazépine	-	68011-67-6	carbamazépine d10	2,19	101 ± 5
Trans 10,11 dihydro-10,11-dihydroxy carbamazépine	-	58955-93-4	carbamazépine d10	4,67	96 ± 9
5-fluorouracil	-	51-21-8	fluorouracil-15N2	3,00	0,00
ac. fusidique	-	751-94-0	EE	4,00	73 ± 22
ac. oxolinique	-	14698-29-4	ofloxacin-d3	9,62	113 ± 36
ac. pipémidique	-	51940-44-4	-	10,00	35 ± 23
amoxicilline	-	26787-78-0	amoxicilline-13C6	1,00	104 ± 10
ampicilline	-	69-53-4	ampicilline-15N1	4,96	91 ± 13
azithromycine	-	83905-01-5	clarithromycine-d3	2,05	39 ± 16
bacitracine	-	1405-87-4	EE	10,00	30 ± 11
cefalexine	-	15686-71-2	penicilline G-d7	2,30	122 ± 16
cefotaxime	-	63385-93-4	ampicilline-15N1	7,46	193 ± 16
cefepoxime	-	87239-81-4	ampicilline-15N1	6,54	102 ± 86
ceftiofur	-	80370-57-6	ampicilline-15N1	14,36	91 ± 36
chloramphénicole	-	56-75-7	chloramphénicol-d5	10,03	141 ± 26
chlortétracycline	-	64-72-2	tétracycline-d6	6,00	129 ± 26
ciprofloxacine	-	85721-33-1	ciprofloxacine 13C2-15N	58,40	97 ± 9
clarithromycine	-	81103-11-9	clarithromycine-d3	1,30	95 ± 16
clindamycine	-	21462-39-5	lincomycine-d3	1,07	122 ± 56
cloxacilline	-	7081-44-9	penicilline G-d7	3,47	105 ± 16
cyclophosphamide	-	50-18-0	cyclophosphamide d4	7,78	93 ± 16
danofloxacine	-	112398-08-0	ofloxacin-d3	44,11	88 ± 12
daunorubicine	-	23541-50-6	EE	5,08	56 ± 11
dicloxacilline	-	13412-64-1	penicilline G-d7	2,60	103 ± 36
docetaxel	-	114977-28-5	EE	3,40	33 ± 12
doxorubicine	-	25316-40-9	EE	10,53	14 ± 7
doxycycline	-	10592-13-9	tétracycline-d6	9,08	124 ± 34
enrofloxacine	-	93106-60-6	ofloxacin-d3	4,60	102 ± 30
épirubicine	-	56390-09-1	EE	18,52	12 ± 6
érythromycine	-	114-07-8	erythromicine 13C2	2,37	121 ± 36
fluméquine	-	42835-25-6	fluméquine 13C13	2,37	99 ± 26
gemcitabine	-	122111-03-9	EE	x	5 ± 6
ifosfamide	-	3778-73-2	ifosfamide d4	2,69	89 ± 16
josamycine	-	16846-24-5	clarithromycine-d3	2,73	73 ± 26
lincomycine	-	859-18-7	lincomycine-d3	4,11	103 ± 26
marbofloxacine	-	115550-35-1	ofloxacin-d3	1,10	89 ± 11
methotrexate	-	59-05-2	méthotrexate d3	3,89	84 ± 8
métronidazole	-	443-48-1	métronidazole d4	2,40	100 ± 26
monensine	-	22373-78-0	EE	2,66	90 ± 12
norfloxacine	-	70458-96-7	norfloxacine-d5	4,11	107 ± 10
ofloxacine	-	82419-36-1	ofloxacin-d3	2,29	110 ± 26
oxacilline	-	7240-38-2	penicilline G-d7	3,95	85 ± 13
oxytétracycline	-	6153-64-6	tétracycline-d6	18,71	70 ± 15
pénicilline G	-	69-57-8	penicilline G-d7	5,36	86 ± 16
pénicilline V	-	132-98-9	penicilline G-d7	4,74	108 ± 16
rifampicine	-	13292-46-1	EE	2,89	43 ± 21
roxithromycine	-	80214-83-1	clarithromycine-d3	8,49	86 ± 16
salinomycine	-	55721-31-8	EE	5,40	145 ± 12
sarafloxacine	-	91296-87-6	ofloxacin-d3	16,75	86 ± 22
spiramycine	-	8025-81-8	clarithromycine-d3	0,90	48 ± 36

Composés	abb	CAS	Etalon interne	LQP (ng/L)	Rendement
stavudine	-	3056-17-5	EE	5,30	68 ± 6
sulfadiazine	-	68-35-9	sulfadiazine-13C6	2,13	90 ± 66
sulfadiméthoxine	-	122-11-2	sulfadiméthoxine-d6	0,55	95 ± 26
sulfamérazine	-	127-79-7	sulfaméthazine-13C6	1,59	89 ± 16
sulfaméthazine	-	57-68-1	sulfaméthazine-13C6	1,09	97 ± 16
sulfaméthizole	-	144-82-1	sulfaméthazine-13C6	2,35	81 ± 16
sulfaméthoxazole	-	723-46-6	sulfaméthoxazole-13C6	1,54	91 ± 16
sulfanilamide	-	63-74-1	sulfaméthazine-13C6	9,33	30 ± 36
sulfapyridine	-	144-83-2	Sulfapyridine d4	1,13	89 ± 16
sulfathiazole	-	72-14-0	sulfaméthazine-13C6	5,52	84 ± 16
tamoxifen	-	10540-29-1	tamoxifen-d5	2,71	79 ± 26
tétracycline	-	64-75-5	tétracycline-d6	8,28	102 ± 4
thiamphénicol	-	15318-45-3	chloramphénicol-d5	10,04	104 ± 26
triméthoprim	-	738-70-5	triméthoprim-13C3	3,72	88 ± 76
tylosine	-	74610-55-2	clarithromycine-d3	16,75	90 ± 86
virginiamycine	-	21411-53-0	EE	24,11	11 ± 8
Apixaban	-	503612-47-3	AD	0,37	110 ± 6
Dabigatran	-	211915-06-9	AD	2,01	105 ± 3
Rivaroxaban	-	366789-02-8	AD	0,23	98 ± 7
1(2,4 dichlorodiphenyl)urea	-	5428-50-2	diuron d6	0,16	103 ± 6
1(3,4 dichlorodiphenyl)urea	-	2327- 02-8	diuron d6	1,36	99 ± 13
Desmethyl diuron	1343 DCPMU	3567-62-2	diuron d6	3,39	106 ± 6
acetochlor	-	34256-82-1	alachlor d13	0,39	96 ± 5
acetochlor ESA	-	947601-84-5	alachlor d13	1,71	126 ± 14
acetochlor OA	-	194992-44-4	alachlor d13	1,82	109 ± 15
alachlor	-	15972-60-8	alachlor d13	3,27	100 ± 7
amethryn	-	834-12-8	terbuthylazine d5	0,07	101 ± 8
atrazine	-	1912-24-9	atrazine d5	0,69	99 ± 3
atrazine 2 hydroxy	-	2163-68-0	atrazine 2 hydroxy d5	0,16	94 ± 3
azoxystrobine	-	131860-33-8	carbofuran d3	0,07	82 ± 4
bentazone	-	82657-04-3	bentazone d7	17,00	75 ± 5
carbendazime	-	10650-21-7	carbendazime d3	0,71	118 ± 2
carbetamide	-	16118-49-3	carbetamide d5	0,07	99 ± 3
carbofuran	-	1563-66-2	Carbofuran d3	0,08	148 ± 2
carbosulfan	-	55285-14-8	simazine d10	10,00	0 ± 0
chlorotoluron	-	15545-48-9	chlorotoluron d6	0,13	99 ± 1
chlorsulfuron	-	64902-72-3	diuron d6	1,93	99 ± 8
cyanazine	-	21725-46-2	hexazinone d6	0,12	88 ± 13
cyromazine	-	66215-27-8	simazine d10	0,14	3 ± 1
atrazine desethyl	DEA	6190-65-4	DIA d5	0,75	97 ± 3
atrazine desisopropyle	DIA	1007-28-9	DIA d5	2,36	95 ± 2
diffufenican	-	83164-33-4	carbofuran d3	0,13	78 ± 8
dimetachlor	-	50563-36-5	terbutryn D5	0,25	101 ± 6
diuron	-	330-54-1	diuron d6	0,37	103 ± 4
Dimethylaminosulfanilide	DMSA	4710-17-2	carbofuran d3	0,06	96 ± 3
N,N-diméthyle-N'-p-tolylsulfamide	DMST	731-27-1	carbofuran d3	0,07	96 ± 3
flazasulfuron	-	104040-78-0	carbofuran d3	1,28	84 ± 6
fluazifop-p-butyl	-	79241-46-6	carbofuran d3	0,07	66 ± 3
flusilazole	-	85509-19-9	carbofuran d3	0,22	98 ± 4
hexazinone	-	51235-04-2	hexazinone d6	0,10	102 ± 3
hydroxy simazine	-	2599-11-3	atrazine d5	0,04	23 ± 3
imidaclopride	-	138261-41-3	imidacloprid d4	0,17	95 ± 5
irgarol	-	28159-98-0	irgarol d9	0,02	101 ± 1
isoproturon	-	34123-59-6	isoproturon D6	0,07	102 ± 1

Composés	abb	CAS	Etalon interne	LQP (ng/L)	Rendement
linuron	-	330-55-2	linuron d6	0,44	106 ± 2
metazachlor	-	67129-08-2	terbutryn D5	0,07	111 ± 5
methiocarb	-	2032-65-7	carbofuran d3	0,14	80 ± 7
metolachlor	-	51218-45-2	métolachlore d6	0,11	101 ± 1
metolachlor ESA	-	947601-85-6	carbofuran d3	4,50	111 ± 12
metolachlor OA	-	152019-73-3	carbofuran d3	0,28	68 ± 10
metoxuron	-	19937-59-8	metoxuron d6	0,03	100 ± 2
metsulfuron-methyl	-	74223-64-6	metsulfuron-methyl d3	0,25	109 ± 32
nicosulfuron	-	111991-09-4	nicosulfuron d6	0,77	90 ± 2
promethryn	-	7287-19-6	promethryn d14	0,06	99 ± 3
propachlor	-	1918-1617	terbutylazine d5	0,22	104 ± 8
propazine	-	139-40-2	propazine D14	0,41	104 ± 4
propiconazole	-	60207-90-1	carbofuran d3	0,61	99 ± 4
prosulfuron	-	94125-34-5	carbofuran d3	0,99	88 ± 12
pymethrozine	-	123312-89-0	terbutylazine d5	0,12	8 ± 2
quizalofop-ethyl	-	100646-51-3	quizalofop-ethyl d3	1,02	95 ± 2
quizalofop-p-tefuryl	-	200509-41-7	carbofuran d3	0,27	57 ± 9
simazine	-	122-34-9	simazine d10	1,53	95 ± 3
terbutryn	-	886-50-0	terbutryn D5	0,03	98 ± 1
terbutylazine	-	5915-41-3	terbutylazine d5	0,22	99 ± 3
terbutylazine desethyl	-	30125-63-4	terbutylazine desethyl d9	0,21	100 ± 5
thiamethoxan	-	153719-23-4	thiamethoxan d3	0,44	102 ± 4
triclocarban	-	101-20-2	triclocarban d4	0,19	94 ± 13
triclosan	-	3380-34-5	triclosan d3	1,35	87 ± 7
fipronil	-	120068-37-3	fipronil 15N 13C	0,05	109 ± 7
fipronil desulfanyl	-	205650-65-3	fipronil 15N 13C	0,01	100 ± 5
fipronil sulfide	-	120067-83-6	fipronil 15N 13C	0,12	104 ± 5
fipronil sulfone	-	120068-36-2	fipronil 15N 13C	0,26	101 ± 6
glyphosate	-	1071-83-6	glyphosate 13C2 15N	1,72	115 ± 10
Acide aminométhylphosphonique	AMPA	1066-51-9	AMPA 13C 15N	33,25	103 ± 12
oxybenzone	-	131-57-7	oxybenzone D5	0,43	102 ± 6
avobenzone	-	70356-09-1	DHP d4	2,72	169 ± 8
2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate	EHMC	5466-77-3	oxybenzone D5	0,17	103 ± 8
octyl-diméthyl-PABA	OD-PABA	21245-02-3	oxybenzone D5	0,11	185 ± 10
3-(4-Méthylbenzylidène)camphor	4-MBC	36861-47-9	oxybenzone D5	18,88	134 ± 38
octocrylène	-	6197-30-4	Octocrylène d15	12,34	74 ± 2

## Annexe 6 : Données brutes : Caractérisation des apports en Seine ( CRAPPSE 1)

	POSES						Effluent STEU ROUEN					
	P0514	P0714	P0914	P1114	P0115	P0315	ES0514	ES0714	ES0914	ES1114	ES0115	ES0315
	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l
124 DCPU	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
134 DCPU	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
1343 DCPMU	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
acétochlore	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
acétochlore ESA	<LQ	<LQ	<LQ	3,46	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD
acétochlore OA	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD
alachlore	<LQ	10,67	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LQ	11,45	13,46	<LD	<LD	<LD
amethryn	0,19	0,31	0,17	<LQ	<LD	<LQ	<LD	0,80	0,64	<LD	<LD	0,32
atrazine	13,82	17,24	13,02	8,63	7,96	6,79	17,13	36,76	28,78	14,62	23,68	88,95
hydroxyatrazine	21,31	18,61	17,36	12,90	12,46	13,06	15,86	12,26	18,68	8,41	11,80	14,57
azoxystrobine	7,86	3,44	2,08	0,99	4,07	2,61	13,38	12,90	13,85	19,25	8,09	6,26
bentazone	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
carbendazime	5,35	9,09	5,35	3,33	1,84	2,07	10,54	7,64	4,22	2,87	<LD	3,63
carbétamide	0,57	1,35	<LD	1,60	2,84	0,66	0,58	0,67	1,09	<LD	<LD	2,76
carbofuran	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	0,36	<LD	<LD	<LD	0,18	0,58
carbosulfan	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
chlorotoluron	17,67	4,90	2,06	78,90	25,11	9,75	2,75	6,90	11,04	13,10	55,16	13,03
chlorsulfuron	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
cyanazine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
cyromazine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
DEA	39,56	60,06	39,03	20,24	22,85	25,91	20,05	33,52	38,11	35,45	40,19	52,23
DIA	<LQ	7,11	5,87	<LQ	<LD	<LQ	11,16	10,77	12,42	9,98	7,19	11,01
diflufénican	20,28	9,19	2,81	2,93	4,48	3,83	21,02	16,85	12,38	9,22	6,87	16,43
dimétachlore	<LQ	1,08	10,12	5,34	5,64	4,09	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
diuron	31,45	39,92	14,88	18,62	6,18	5,01	142,58	155,81	76,61	43,67	179,87	135,27
DMSA	2,23	3,49	2,14	0,83	1,00	0,66	11,02	13,66	29,33	11,91	8,83	8,74
DMST	<LD	1,25	0,69	<LD	<LD	<LD	2,56	5,26	8,36	4,06	<LD	2,78
fliazasulfuron	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
fluazifop-p-butyl	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
flusilazole	<LQ	0,68	0,34	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
hexazinone	1,94	1,84	1,54	0,96	1,15	1,52	<LQ	<LQ	3,82	1,02	1,04	1,14
hydroxysimazine	0,86	1,03	<LD	<LD	<LD	0,00	5,23	2,74	6,04	5,46	2,93	2,78
imidaclopride	35,99	5,14	5,09	12,12	11,65	8,91	35,15	34,16	70,13	182,60	48,38	46,43
irgarol	0,09	0,26	0,17	<LD	<LD	0,00	0,09	0,14	0,07	<LD	<LD	<LD
isoproturon	24,10	2,76	1,45	336,32	19,67	25,33	7,12	10,71	52,64	50,93	24,67	30,34
linuron	<LD	<LD	<LD	0,00	<LD	0,00	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
métazachlore	6,14	2,01	25,99	18,20	15,01	8,88	0,40	<LQ	0,39	0,86	0,72	0,56
methiocarb	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,00	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
métolachlore	209,02	13,82	2,85	2,87	3,47	2,36	9,59	2,34	0,42	<LD	<LD	<LD
métolachlore ESA	37,98	20,22	25,14	24,63	27,34	24,11	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
métolachlore OA	25,13	13,75	17,60	6,40	10,91	7,49	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
metoxuron	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
metasulfuron-methyl	2,85	12,19	14,14	13,51	<LD	<LD	27,64	15,57	6,01	<LD	<LD	0,42
nicosulfuron	<LD	3,77	2,65	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
promethryn	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
propachlore	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
propazine	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	1,16	1,83	1,39	<LD	<LD	<LD
propiconazole	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	39,29	30,01	17,42
prosulfuron	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
pymethrozine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
quizalofop-ethyl	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
quizalofop-p-tefuryl	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
simazine	3,38	3,82	2,73	<LQ	<LD	<LD	12,52	7,82	26,19	6,92	29,51	15,34
terbutryn	4,49	5,13	2,93	2,83	1,04	0,98	29,77	57,93	49,34	25,02	26,93	33,75
terbutylazine	1,55	1,49	1,91	0,77	1,59	0,83	2,36	1,60	2,79	0,84	8,44	3,13
terbutylazine desethyl	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
thiamethoxan	11,45	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	23,43	2,69	1,13	16,66	<LD
glyphosate	58	87	48	34	17	<LD	348	221	920	444	774	983
AMPA	206	584	497	248	132	98	1089	608	290	105	361	396
fipronil	2,58	1,12	1,00	1,01	0,53	0,42	13,07	12,46	23,45	27,20	13,10	18,38
fipronil désulfinylyl	0,43	0,68	0,61	<LD	<LD	<LD	<LD	0,32	0,58	0,25	<LQ	<LQ
fipronil sulfide	0,53	0,16	0,17	0,18	0,13	<LQ	1,09	1,13	2,77	15,44	2,63	5,79
fipronil sulfone	1,31	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,23	1,26	2,16	2,77	1,26	1,43

	POSES						Effluent STEU ROUEN					
	P0514	P0714	P0914	P1114	P0115	P0315	ES0514	ES0714	ES0914	ES1114	ES0115	ES0315
	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l
gabapentine	639,49	777,15	607,19	340,73	181,50	143,57	3497,47	4968,30	6513,95	4675,17	4624,04	4882,44
abacavir	5,01	<LD	<LD	24,07	8,43	10,15	40,10	59,06	17,40	<LD	<LD	<LD
indinavir	8,02	2,85	<LD	<LD	<LD	<LD	23,37	3,66	<LD	<LD	<LD	<LD
lamivudine	8,79	11,06	7,11	<LQ	4,48	3,69	82,87	39,23	53,52	18,78	18,81	14,56
néfinavir	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
névirapine	4,12	6,77	6,29	2,68	1,87	<LQ	13,62	11,07	14,42	12,93	16,79	13,00
ritonavir	19,60	<LQ	1,68	2,11	<LQ	7,85	70,40	35,76	50,79	23,60	20,52	15,89
saquinavir	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	5,41	<LD	4,69	2,49	<LQ	<LQ
bromazépam	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	7,38	5,56	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
nordiazépam	2,16	2,96	1,72	1,28	<LQ	<LD	26,90	23,74	33,60	23,75	27,34	21,17
alprazolam	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	3,42	4,51	5,81	4,25	4,73	3,66
diazépam	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	3,87	3,11	5,11	5,22	6,48	5,02
oxazépam	67,94	82,60	56,26	36,49	25,68	28,74	2051,82	1742,35	1817,28	1879,81	2334,33	1807,63
lorazépam	8,02	4,42	<LQ	<LD	<LD	<LD	66,92	57,86	24,13	48,11	82,29	63,72
clonazépam	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
méprobamate	1,76	2,71	<LQ	<LD	<LD	<LD	21,87	4,52	8,69	8,28	40,43	31,31
paracétamol	70,45	<LD	<LQ	144,92	99,08	102,38	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
bezafibrate	36,57	19,55	9,45	12,80	9,94	12,40	248,46	61,82	257,83	74,53	75,96	58,82
aténolol	95,67	65,88	45,21	74,08	35,89	36,74	1104,38	330,33	1032,72	443,90	426,23	330,06
bisoprolol	13,62	8,75	9,41	8,90	6,06	5,65	208,77	139,33	323,77	179,59	236,21	182,92
métoprolol	12,04	10,64	12,00	7,03	4,98	4,74	132,60	86,29	145,48	113,77	157,00	121,58
propranolol	12,47	11,00	13,16	13,87	9,19	10,39	252,30	240,36	444,72	362,54	436,74	338,20
sotalol	63,79	76,98	60,74	53,48	39,01	39,08	1064,99	935,57	1180,41	1036,57	1107,32	857,47
timolol	0,55	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	7,79	4,15	7,35	3,59	8,28	6,41
acébutolol	37,28	31,47	23,05	24,89	10,37	10,95	596,11	86,12	265,22	78,78	50,83	39,33
imipramine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
doxépine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
amitriptyline	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	58,36	56,66	44,17	56,67	43,88
fluoxétine	1,20	1,11	<LD	<LD	<LD	<LD	27,74	29,52	29,94	22,44	18,65	14,44
primidone	3,34	6,56	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	53,48	44,70	92,95	105,63	86,25	66,79
carbamazépine	41,42	66,76	54,21	35,50	19,57	25,87	431,42	386,42	613,79	533,23	632,25	489,60
cétirizine	41,12	60,80	44,47	29,01	15,96	18,09	486,04	428,02	510,23	491,74	589,40	456,41
ranitidine	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LQ	1,58	1,10	8,82	45,76	43,87	35,38	27,40
clenbutérol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
caféine	378,80	486,92	<LQ	311,14	<LQ	<LD	5824,30	82,70	2183,66	<LQ	<LD	<LD
théophylline	298,57	233,64	<LQ	981,77	<LQ	87,34	6574,47	117,16	8611,43	<LQ	<LQ	<LQ
sildénafil	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LQ	7,61	4,82	6,54	6,03	6,72	5,20
losartan	12,32	6,18	8,17	7,65	4,58	6,06	53,95	15,33	87,85	21,49	9,51	7,36
salbutamol	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	24,62	11,83	20,13	22,06	19,41	15,03
clopidogrel	2,10	1,85	1,18	1,10	0,68	0,63	18,30	25,67	33,88	22,36	27,03	20,93
terbutaline	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	5,06	8,98	8,78	6,98	5,41
disopyramide	12,79	7,49	7,75	5,01	2,94	5,12	39,19	45,63	46,09	35,75	36,71	28,43
oméprazole	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
zidovudine	12,27	22,12	12,64	<LD	<LD	18,25	12,72	0,00	52,80	47,09	47,95	35,03
kétoprofène	14,54	32,18	15,37	15,59	<LQ	11,32	441,62	143,38	443,07	100,09	172,99	239,98
naproxène	35,35	22,07	18,17	43,41	9,61	14,64	732,23	71,40	524,94	65,92	28,92	419,62
diclofénac	112,68	34,23	38,47	71,74	45,46	<LQ	743,71	701,88	669,70	605,57	616,93	464,05
ibuprofène	33,28	32,16	8,29	48,31	9,65	8,61	1082,05	17,25	695,62	6,12	13,06	504,10
hydroxy-ibuprofène	78,76	90,43	31,33	133,68	34,51	32,66	1730,64	89,15	987,47	55,75	45,32	731,55
gemfibrozil	12,06	9,28	5,84	5,11	2,61	115,52	95,84	21,36	106,92	24,70	29,63	436,17
ac 4-chlorobenzoïque	51,16	19,01	<LD	<LD	<LD	1,67	<LD	42,66	<LD	<LD	<LD	3,69
acide fénofibrique	1,44	<LD	<LD	37,87	26,28	<LQ	1403,71	387,85	2090,11	425,18	413,08	1322,52
acide clofibrique	4,85	5,81	<LD	<LD	<LD	2,97	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,86
pravastatine	11,29	7,06	8,18	<LD	<LD	<LD	154,50	14,42	140,89	<LD	<LD	138,02
atorvastatine	<LD	<LD	<LD	<LD	42,81	87,34	30,51	<LQ	79,86	8,82	<LD	69,63
10,11 dihydroCBZ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,00
2-hydroxy CBZ	22,21	10,60	10,92	10,48	6,91	6,87	115,55	117,97	170,16	157,26	113,37	124,29
3-hydroxy CBZ	9,67	2,93	8,04	7,57	5,82	5,60	105,86	122,54	181,48	162,04	113,97	147,93
rans-10,11 Dihydro-10-hydroxy-CBZ	164,00	85,55	187,90	124,35	67,90	74,80	1231,92	1390,37	1800,95	1931,58	1439,90	1950,52
triclocarban	0,19	0,04	0,31	0,04	0,20	0,02	0,26	0,39	0,21	0,13	1,56	0,12
triclosan	1,35	0,89	1,25	1,99	1,70	0,50	12,47	13,35	11,20	13,24	40,14	9,57
apixaban	0,1	0,1	0,4	0,9	0,2	0,2	1,6	0,4	4,9	1,9	1,3	0,7
dabigatran	24,1	34,3	32,6	21,8	15,4	14,9	145,5	510,0	487,2	458,0	356,8	356,3
rivaroxaban	1,1	1,3	0,8	1,0	0,6	0,7	11,9	11,2	20,6	19,7	12,8	11,0



	POSES						Effluent STEU ROUEN					
	P0514	P0714	P0914	P1114	P0115	P0315	ES0514	ES0714	ES0914	ES1114	ES0115	ES0315
	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l
4MBC	29,4	33,11	19,23	62,70	13,61	12,48	36,98	477,49	54,80	65,86	152,73	126,09
avobenzone	24,4	28,78	20,06	10,21	2,11	1,91	13,88	30,78	4,58	31,94	2,16	-0,05
EHMC	4,0	4,46	7,54	7,18	0,99	<LQ	365,55	26,58	23,71	76,01	19,93	30,66
octocrylène	119,7	17,49	48,85	31,19	<LQ	<LQ	440,74	39,08	24,13	62,59	45,71	19,54
OD-PABA	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
oxybenzone	35,7	40,22	2,98	2,98	<LQ	<LQ	25,43	13,29	15,89	7,62	26,23	26,88
5-fluorouracil	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
acide fusidique	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
acide oxolinique	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
acide pipémidique	25,63	5,68	<LD	<LD	<LD	<LD	46,83	26,27	<LD	<LD	<LD	<LD
amoxicilline	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
ampicilline	0,00	0,00	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
azithromycine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	352,21	617,91	663,68	1499,31	1115,42	1431,75
bacitracine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
cefalexine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
cefotaxime	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LD	20,15	64,44	22,24
cefepodoxime	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	10,25	<LQ
ceftiofur	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
cefuroxime	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	16,00	124,31	65,99
chloramphénicole	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
chlortétracycline	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
ciprofloxacine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	167,72	131,38	242,41	267,13	287,39	218,94
clarithromycine	22,37	21,13	6,10	13,38	10,38	15,82	317,40	245,51	222,78	338,43	610,34	419,23
clindamycine	<LQ	<LQ	<LQ	2,42	<LQ	<LD	20,39	19,67	44,60	22,48	20,55	19,34
cloxacilline	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	41,52	12,16
cyclophosphamide	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LD	<LQ	<LD	11,14
daunorubicine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
dicloxacilline	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
docetaxel	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
doxorubicine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
doxycycline	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	60,67	<LQ	59,16	49,56	164,89	150,97
enrofloxacin	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD
épirubicine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
érythromycine	31,19	51,71	42,47	34,44	85,31	139,56	391,98	354,38	960,19	819,53	522,27	449,10
fluméquine	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	10,33	6,07	15,10	15,24
gemcitabine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
ifosfamide	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LD	<LQ	<LQ	<LQ
josamycine	4,14	1,18	<LD	<LD	<LD	<LD	33,21	19,84	4,83	14,10	27,20	33,37
lincomycine	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	<LQ	12,88	<LQ	12,18	3,60	<LQ	123,30
marbofloxacine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,82	1,02	<LD	<LQ	<LQ	<LQ
methotrexate	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
métronidazole	<LQ	<LQ	5,48	24,84	12,02	12,56	138,24	53,74	55,86	103,30	166,50	169,39
monensine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
norfloxacine	0,00	0,00	<LD	<LD	<LD	<LD	65,47	26,46	52,72	80,79	95,06	97,20
ofloxacine	6,31	5,31	6,14	8,77	8,32	8,31	177,86	115,65	204,59	195,37	300,20	288,31
oxacilline	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
oxytétracycline	0,00	2,26	<LD	<LD	<LD	<LD	14,66	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
pénicilline G	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
pénicilline V	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
rifampicine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
roxithromycine	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	10,69	85,92	79,80	75,49	122,83	164,25	166,64
salinomycine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
spiramycine	6,25	5,48	2,35	<LQ	<LD	6,34	227,96	158,11	92,07	72,11	215,27	222,76
stavudine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
sulfadiazine	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	6,94	<LQ	4,13	66,07	11,82	13,10
sulfadiméthoxine	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	48,69	<LQ	<LQ
sulfamérazine	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
sulfaméthazine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
sulfaméthizole	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
sulfaméthoxazole	81,48	60,39	44,78	27,07	10,58	20,50	241,62	134,08	293,33	306,22	272,32	248,55
sulfanilamide	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
sulfapyridine	7,98	4,26	5,57	3,93	2,68	5,07	114,73	91,50	141,83	167,82	146,55	180,60
sulfathiazole	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
tamoxifen	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
tétracycline	0,00	0,00	<LD	<LD	<LD	<LD	57,58	26,66	36,82	62,63	71,13	59,02
thiamphénicol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
triméthoprime	<LD	<LD	7,13	<LD	<LD	4,51	112,56	48,89	<LD	<LD	48,95	<LD
tylosine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
virginiamycine	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
sarafloxacin	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
danofloxacin	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
[NQO] µM	0,21	0,20	0,23	0,10	0,02	0,00	0,31	0,42	0,58	0,62	0,46	0,59
[B(a)P] µM	0,23	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	1,11	1,09	0,69	0,23	0,60	1,00
E2-EQ (ng/L)	0,43	0,28	0,21	0,21	0,35	0,00	1,10	0,42	0,71	0,92	0,42	1,56
Dex-EQ (µg/L)	0,01	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,18	0,24	0,67	1,15	0,25	0,20
BaP-EQ (µg/L)	1,32	2,46	0,36	0,39	0,61	0,62	1,29	0,82	0,85	0,16	0,26	0,80

## Annexe 7 : Données brutes : Cycles de marée, Campagnes MOSAIC

### Campagne d'avril 2015

CODE ECHANTILLON	PR	Concentration (ng/L)																	
		CBZ	OXA	ATE	SOT	GAB	DIC	IBU-OH	IBU	A	A-OH	DEA	DIU	ISO	MET	MET-ESA	MET-OA	IMI	PRO
MOSAIC-DYN-1-HT1	surface	Flacon endommagé																	
MOSAIC-DYN-1-HT5	surface	18,7	17,4	<lq	<lq	270,7	8,8	17,5	<ld	5,8	7,1	26,9	4,6	16,3	4,2	19,8	5,2	n.d	1,7
MOSAIC-DYN-1-HT7	surface	12,0	13,9	9,2	12,1	86,9	8,6	4,5	<ld	3,1	2,7	7,2	1,8	7,9	1,2	8,2	1,6	n.d	3,0
MOSAIC-DYN-1-FT4	surface	28,2	26,3	42,0	41,3	258,4	14,2	23,0	2,2	9,5	8,0	26,2	6,8	14,3	11,8	19,1	4,7	1,2	2,2
MOSAIC-DYN-1-FT7	surface	28,2	26,3	42,0	41,3	245,2	12,0	20,8	1,6	6,8	6,8	18,4	5,8	11,0	8,7	26,2	7,1	n.d	0,7
MOSAIC-DYN-1-FT12	surface	19,1	20,5	<lq	30,4	193,1	8,8	19,9	2,2	5,3	5,3	13,6	4,6	10,2	6,8	15,1	4,0	n.d	1,4
MOSAIC-DYN-1-TT3	surface	26,0	33,1	36,6	41,4	241,3	11,2	14,5	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MOSAIC-DYN-1-TT6	surface	9,5	13,5	<lq	7,2	119,9	8,3	7,9	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MOSAIC-DYN-1-TT11	surface	27,4	20,5	4,4	13,7	335,3	10,0	23,7	5,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MOSAIC-DYN-1-CT1	surface	31,4	20,2	6,6	20,4	315,8	7,7	23,6	4,2	8,5	9,6	37,7	8,5	9,6	6,5	20,2	6,5	1,3	2,8
MOSAIC-DYN-1-CT3	surface	25,8	20,7	6,0	15,9	315,1	16,3	28,6	5,1	8,4	10,4	31,2	8,8	9,6	6,0	20,0	5,7	1,2	3,2
MOSAIC-DYN-1-CT6	surface	11,7	10,9	3,5	6,1	158,8	9,8	9,4	3,1	2,8	4,1	12,3	3,7	4,2	3,9	8,0	1,8	0,5	2,1
MOSAIC-DYN-1-HT1	mi-fond	18,8	22,2	<ld	<lq	119,0	8,4	11,8	<lq	4,1	4,9	9,8	4,0	10,6	5,8	15,5	4,0	1,0	1,2
MOSAIC-DYN-1-HT5	mi-fond	5,9	7,6	<lq	<lq	64,2	3,5	<lq	<lq	1,9	2,0	2,9	1,2	4,5	1,8	7,6	1,7	n.d	0,6
MOSAIC-DYN-1-HT7	mi-fond	10,1	9,6	15,5	9,7	92,5	5,6	7,5	<lq	2,7	1,9	4,0	1,3	5,1	1,2	6,2	1,1	n.d	0,8
MOSAIC-DYN-1-FT4	mi-fond	25,7	25,6	37,0	45,1	262,6	11,9	20,8	1,4	10,2	7,8	27,7	7,0	15,7	10,2	22,0	4,8	1,8	2,3
MOSAIC-DYN-1-FT7	mi-fond	20,8	21,0	<ld	20,0	320,2	11,9	24,4	2,7	6,8	7,7	12,2	6,1	12,9	8,7	30,5	8,9	n.d	0,8
MOSAIC-DYN-1-FT12	mi-fond	16,8	19,7	<lq	27,5	126,8	7,5	22,0	1,8	3,8	3,3	7,1	2,8	6,7	4,2	9,0	2,1	n.d	1,2
MOSAIC-DYN-1-TT3	mi-fond	22,8	20,0	35,3	<lq	270,6	10,3	17,2	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MOSAIC-DYN-1-TT6	mi-fond	18,7	25,9	<ld	21,2	180,3	9,4	12,1	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MOSAIC-DYN-1-TT11	mi-fond	23,2	21,3	7,3	17,3	256,0	8,9	17,3	5,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MOSAIC-DYN-1-CT1	mi-fond	30,2	23,9	6,0	15,5	376,9	10,7	25,9	5,8	8,1	10,3	29,0	8,3	9,8	6,7	21,8	7,1	0,9	2,9
MOSAIC-DYN-1-CT3	mi-fond	27,3	19,4	5,7	14,0	311,8	12,1	25,8	5,6	7,1	9,7	25,4	7,6	8,9	5,6	16,2	5,0	1,2	2,9
MOSAIC-DYN-1-CT6	mi-fond	12,4	8,6	2,5	6,2	169,1	6,6	11,0	3,4	3,0	4,8	10,2	3,1	5,0	4,2	10,0	2,7	0,7	2,5
MOSAIC-DYN-1-HT1	fond	25,8	24,7	35,7	23,5	199,7	9,5	13,4	<lq	5,3	7,0	16,8	4,7	15,7	6,2	23,3	5,5	1,4	1,7
MOSAIC-DYN-1-HT5	fond	5,6	6,6	<ld	<lq	65,7	4,5	<lq	<lq	1,7	2,1	4,0	1,3	4,6	1,5	7,7	2,3	n.d	1,1
MOSAIC-DYN-1-HT7	fond	8,0	8,4	8,0	11,8	62,9	6,4	3,8	<ld	3,1	2,7	7,2	1,8	7,9	1,2	8,2	1,6	n.d	3,0
MOSAIC-DYN-1-FT4	fond	24,1	21,4	29,2	38,4	185,0	10,6	15,9	1,2	7,3	6,5	24,4	6,8	13,1	6,5	16,4	3,7	1,5	1,9
MOSAIC-DYN-1-FT7	fond	19,0	20,7	40,9	16,3	260,3	10,3	17,5	1,7	4,3	5,2	11,7	4,0	9,1	4,9	18,6	7,2	n.d	0,6
MOSAIC-DYN-1-FT12	fond	5,8	7,4	<lq	<lq	67,6	3,2	<ld	<lq	1,5	1,9	4,5	1,2	4,2	1,6	5,2	1,3	n.d	0,8
MOSAIC-DYN-1-TT3	fond	17,9	22,6	22,4	26,9	171,6	15,2	15,7	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MOSAIC-DYN-1-TT6	fond	28,1	30,2	31,3	24,9	259,8	11,8	15,7	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MOSAIC-DYN-1-TT11	fond	30,3	21,5	6,4	18,8	328,6	9,3	26,2	7,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MOSAIC-DYN-1-CT1	fond	33,2	25,4	9,3	22,6	349,8	8,9	23,9	5,3	9,3	9,2	33,7	8,5	9,8	6,1	21,9	6,4	1,0	2,9
MOSAIC-DYN-1-CT3	fond	38,0	28,6	9,5	21,4	362,3	9,8	24,3	5,5	7,4	10,1	33,6	7,7	9,3	6,2	22,5	6,5	1,4	2,8
MOSAIC-DYN-1-CT6	fond	31,8	19,1	5,8	17,4	342,9	12,3	27,8	7,0	4,5	6,2	20,6	4,4	6,7	4,4	12,3	3,9	0,9	2,6

CBZ: carbamazépine, OXA: oxazépam, ATE: aténolol, SOT: sotalol, GAB: gabapentine, DIC: diclofénac, IBU-OH: hydroxy-ibuproène, IBU: ibuprofène, A: atrazine, A-OH: hydroxyatrazine, DEA: déséthylatrazine, DIU: diuron, ISO: isoproturon, MET: métolachlore, MET-ESA: métolachlore ESA, MET-OA: métolachlore OA, IMI: imidaclopride, PRO: propiconazole, n.d: non détecté, - : analyse non réalisée

## Campagne de septembre 2015

CODE ECHANTILLON	PR	Concentration (ng/L)																	
		CBZ	OXA	ATE	SOT	GAB	DIC	IBU-OH	IBU	A	A-OH	DEA	DIU	ISO	MET	MET-ESA	MET-OA	IMI	PRO
MOSAIC-DYN-2-HT1	surface	17,5	14,9	<ld	13,7	142,6	3,6	<ld	<ld	5,7	5,5	12,6	5,3	0,5	0,5	4,4	2,2	15,3	1,6
MOSAIC-DYN-2-HT4	surface	43,2	27,6	<ld	<ld	295,3	4,7	4,0	<ld	5,5	7,9	18,7	6,8	0,8	1,8	5,7	1,9	29,4	2,4
MOSAIC-DYN-2-HT7	surface	9,0	8,7	<ld	<ld	174,9	1,9	<ld	nd	3,0	2,3	6,1	3,1	0,3	0,1	4,0	5,4	13,1	1,2
MOSAIC-DYN-2-FT1	surface	21,1	21,4	<ld	<ld	97,8	5,8	<ld	<ld	7,9	7,3	21,7	6,9	0,9	0,6	7,0	5,9	38,2	2,3
MOSAIC-DYN-2-FT5	surface	5,5	4,6	<ld	<ld	121,3	2,3	<ld	<ld	2,6	3,1	7,3	2,7	0,3	0,1	3,1	3,0	20,7	1,0
MOSAIC-DYN-2-FT10	surface	63,7	43,0	45,4	77,5	546,2	6,9	9,3	<ld	12,4	13,2	57,2	13,5	1,8	3,2	11,9	5,8	52,4	4,0
MOSAIC-DYN-2-TT1	surface	61,6	34,6	12,7	31,6	514,1	11,2	45,3	<ld	9,5	10,9	42,7	18,4	1,6	2,4	8,8	1,7	23,0	4,5
MOSAIC-DYN-2-TT4	surface	23,9	28,5	<ld	<ld	210,0	3,1	<ld	<ld	5,2	7,3	11,9	6,4	0,8	2,0	5,0	2,2	18,7	1,7
MOSAIC-DYN-2-TT11	surface	60,9	42,9	34,8	75,6	544,9	6,1	11,6	<ld	6,7	8,4	31,0	8,6	1,2	2,3	7,9	2,1	57,6	2,7
MOSAIC-DYN-2-CT1	surface	59,1	39,9	6,5	24,1	472,2	7,6	191,6	20,6	8,1	12,1	39,3	35,6	1,9	2,9	11,3	1,8	22,5	8,5
MOSAIC-DYN-2-CT3	surface	45,1	32,6	10,0	27,1	397,4	6,1	104,0	10,3	6,7	8,4	27,3	21,5	1,3	2,3	7,9	1,5	28,3	6,2
MOSAIC-DYN-2-CT7	surface	62,9	31,7	8,8	20,8	516,8	9,9	79,9	5,1	11,4	13,4	48,5	22,8	1,8	3,0	10,8	2,5	31,2	6,2
MOSAIC-DYN-2-HT1	mi-fond	11,3	11,0	<ld	<ld	117,7	4,9	<ld	<ld	5,3	3,9	5,3	3,8	0,5	0,4	3,6	3,1	23,8	1,5
MOSAIC-DYN-2-HT4	mi-fond	26,7	35,4	<ld	<ld	270,3	3,2	4,2	<ld	6,0	9,3	34,2	7,3	1,1	1,9	5,8	4,3	23,2	4,1
MOSAIC-DYN-2-HT7	mi-fond	8,0	7,0	<ld	<ld	118,1	2,5	<ld	nd	1,6	3,6	34,0	3,2	0,5	0,1	5,0	3,9	19,7	2,4
MOSAIC-DYN-2-FT1	mi-fond	15,2	14,0	<ld	<ld	87,3	2,7	<ld	<ld	5,5	4,5	7,3	5,0	0,6	0,5	4,2	4,8	19,3	2,0
MOSAIC-DYN-2-FT5	mi-fond	9,9	8,1	<ld	<ld	88,0	2,2	<ld	<ld	3,4	2,7	5,7	2,9	0,3	0,1	2,9	4,2	21,8	1,0
MOSAIC-DYN-2-FT10	mi-fond	40,3	31,7	30,5	37,1	347,2	4,8	5,2	<ld	11,6	12,6	79,8	14,3	1,7	3,3	12,2	3,0	48,0	4,4
MOSAIC-DYN-2-TT1	mi-fond	38,4	26,3	5,3	12,8	310,4	6,6	28,6	<ld	7,4	6,9	24,7	12,2	0,9	1,7	5,2	1,5	17,7	3,4
MOSAIC-DYN-2-TT4	mi-fond	37,7	29,7	<ld	<ld	331,4	3,1	<ld	<ld	5,0	7,6	18,3	5,7	0,9	2,6	6,5	2,6	17,6	1,9
MOSAIC-DYN-2-TT11	mi-fond	53,2	46,8	37,2	67,4	539,0	9,9	14,5	<ld	9,5	11,2	46,0	11,3	1,7	2,2	10,5	2,8	83,4	3,3
MOSAIC-DYN-2-CT1	mi-fond	57,4	36,1	12,9	34,4	436,4	6,5	164,1	19,1	9,3	13,3	42,8	35,4	1,9	2,8	9,3	1,6	26,7	8,3
MOSAIC-DYN-2-CT3	mi-fond	57,5	34,1	14,5	33,8	415,3	5,4	131,7	13,0	6,0	8,1	22,5	18,2	1,1	1,9	6,2	1,2	29,1	4,8
MOSAIC-DYN-2-CT7	mi-fond	62,0	33,2	7,4	22,8	515,3	13,1	100,8	6,3	8,2	8,5	34,0	17,2	1,3	2,2	8,0	1,5	17,5	3,8
MOSAIC-DYN-2-HT1	fond	18,7	15,0	<ld	13,5	141,3	7,0	<ld	<ld	3,0	3,6	16,5	3,9	0,4	0,3	2,9	2,4	15,7	1,4
MOSAIC-DYN-2-HT4	fond	57,4	49,1	34,2	51,6	401,3	3,8	6,7	<ld	5,6	7,6	16,3	5,8	0,8	2,1	5,4	3,6	9,5	3,4
MOSAIC-DYN-2-HT7	fond	14,5	11,3	<ld	<ld	31,7	1,3	<ld	nd	1,0	1,0	1,8	0,9	0,1	0,0	1,9	2,1	11,2	0,2
MOSAIC-DYN-2-FT1	fond	21,5	16,6	<ld	24,1	157,1	4,7	<ld	<ld	3,7	3,0	10,1	3,6	0,4	0,2	3,1	2,8	19,1	1,3
MOSAIC-DYN-2-FT5	fond	10,9	9,4	<ld	<ld	90,9	2,2	<ld	<ld	3,6	3,7	21,0	3,7	0,5	0,1	3,8	2,6	24,3	3,4
MOSAIC-DYN-2-FT10	fond	54,4	45,2	35,8	28,0	516,1	5,2	7,0	<ld	9,9	9,7	37,4	9,9	1,5	2,3	9,3	2,6	51,7	3,1
MOSAIC-DYN-2-TT1	fond	65,8	31,7	7,5	24,7	500,9	10,2	46,2	<ld	11,5	12,3	52,1	19,3	1,6	2,6	10,1	1,6	43,2	4,2
MOSAIC-DYN-2-TT4	fond	32,6	34,9	<ld	<ld	213,1	3,1	<ld	<ld	8,4	10,8	20,6	7,1	1,3	2,8	7,2	3,5	38,7	2,1
MOSAIC-DYN-2-TT11	fond	55,6	42,3	34,7	46,3	389,0	9,2	5,3	<ld	7,7	9,3	48,5	10,3	1,3	2,6	8,1	2,3	71,7	2,5
MOSAIC-DYN-2-CT1	fond	69,2	37,5	9,9	20,9	503,5	6,6	146,6	14,5	4,9	6,4	36,0	19,9	1,1	1,6	6,6	1,1	25,4	4,7
MOSAIC-DYN-2-CT3	fond	56,6	59,9	16,4	39,8	509,7	8,2	161,0	14,3	11,7	12,9	54,3	36,9	2,2	2,9	14,0	2,3	38,5	10,2
MOSAIC-DYN-2-CT7	fond	52,2	29,9	10,2	27,6	375,6	10,3	64,5	5,1	6,6	7,2	26,5	15,8	1,0	1,7	4,7	1,4	21,0	3,2

CBZ: carbamazépine, OXA: oxazépam, ATE: aténolol, SOT: sotalol, GAB: gabapentine, DIC: diclofénac, IBU-OH: hydroxy-ibuproène, IBU: ibuprofène, A: atrazine, A-OH: hydroxyatrazine, DEA: déséthylatrazine, DIU: diuron, ISO: isoproturon, MET: métolachlore, MET-ESA: métolachlore ESA, MET-OA: métolachlore OA, IMI: imidaclopride, PRO: propiconazole, n.d: non détecté, - : analyse non réalisée

## Campagne d'avril 2016

CODE ECHANTILLON	PR	Concentration (ng/L)																	
		CBZ	OXA	ATE	SOT	GAB	DIC	IBU-OH	IBU	A	A-OH	DEA	DIU	ISO	MET	MET-ESA	MET-OA	IMI	PRO
La Carosse 1	surface	2,3	2,3	3,0	2,1	18,9	32,9	<Ld	<Ld	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La Carosse 3	surface	1,1	0,5	1,0	0,6	8,8	15,6	<Ld	<Ld	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La Carosse 6	surface	2,3	1,0	2,9	1,8	17,4	2,0	<Ld	<Ld	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Honfleur 1	surface	18,9	14,5	26,8	25,3	174,3	14,9	33,5	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Honfleur 5	surface	30,2	22,4	50,6	43,6	284,0	16,7	38,8	7,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Honfleur 7	surface	9,7	7,4	10,9	9,9	71,8	13,4	17,2	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fatouville 1	surface	26,3	20,0	42,7	37,8	254,6	16,9	23,7	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fatouville 4	surface	14,1	10,9	16,7	16,0	96,2	10,4	17,7	<lq	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fatouville 10	surface	23,5	20,0	35,2	34,3	206,9	15,3	37,9	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tancarville 3	surface	27,3	21,1	37,1	40,6	328,5	15,9	21,2	5,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tancarville 6	surface	24,4	20,6	33,1	35,1	282,6	20,2	42,8	8,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tancarville 10	surface	18,8	17,5	26,5	28,0	294,7	18,1	25,4	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tans-1 (Caud 100)	surface	24,0	19,1	33,2	37,3	299,4	20,4	23,3	6,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tans-7 (Dauc)	surface	22,6	17,3	31,6	30,4	307,8	19,6	21,3	6,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trans 14 (Rouen 100)	surface	21,0	16,3	32,9	29,3	249,8	23,8	17,7	4,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La Carosse 1	mi-fond	2,5	1,4	2,7	1,9	17,6	13,6	<Ld	<Ld	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La Carosse 3	mi-fond	1,6	1,4	1,7	1,0	11,1	3,0	<Ld	<Ld	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La Carosse 6	mi-fond	1,5	1,9	1,5	1,1	8,4	1,5	<Ld	<Ld	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Honfleur 1	mi-fond	18,8	15,1	21,8	20,6	164,6	13,7	28,2	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Honfleur 5	mi-fond	24,6	19,5	43,5	37,4	318,3	18,3	48,1	8,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Honfleur 7	mi-fond	8,7	7,9	13,2	12,3	83,0	18,5	25,5	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fatouville 1	mi-fond	25,9	20,5	47,8	37,3	276,3	18,6	37,5	8,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fatouville 4	mi-fond	21,8	15,6	34,0	33,4	198,8	13,9	42,4	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fatouville 10	mi-fond	25,4	18,4	35,2	34,2	232,8	16,1	35,9	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tancarville 3	mi-fond	23,4	17,3	31,2	30,9	271,5	19,3	25,7	5,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tancarville 6	mi-fond	28,7	21,5	35,2	37,2	302,7	15,7	24,5	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tancarville 10	mi-fond	27,0	18,2	33,3	35,6	273,9	20,0	24,9	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tans-7 (Dauc)	mi-fond	20,5	17,4	31,0	29,8	285,6	21,8	21,0	6,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trans 14 (Rouen 100)	mi-fond	17,6	13,7	28,0	23,8	214,5	19,0	15,4	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La Carosse 1	fond	1,5	1,3	1,6	1,1	11,2	14,4	<Ld	<Ld	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La Carosse 3	fond	1,5	1,3	1,3	0,7	7,7	2,2	<Ld	<Ld	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La Carosse 6	fond	1,5	1,6	2,3	1,3	13,3	1,9	<Ld	<Ld	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Honfleur 1	fond	21,3	16,1	30,6	29,4	186,1	18,0	40,7	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Honfleur 5	fond	18,6	15,2	34,0	28,9	240,1	18,1	42,8	8,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Honfleur 7	fond	6,7	5,3	9,1	8,2	50,9	12,7	16,8	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fatouville 1	fond	24,2	18,7	39,7	33,7	281,3	18,4	43,4	8,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fatouville 4	fond	19,3	14,9	22,5	20,0	147,8	11,8	20,7	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fatouville 10	fond	19,9	15,2	22,6	21,8	143,2	16,0	26,8	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tancarville 3	fond	24,0	22,0	34,2	34,7	315,1	17,2	21,3	4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tancarville 6	fond	23,6	17,1	30,1	30,8	265,6	19,2	25,0	4,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tancarville 10	fond	19,3	16,3	24,6	26,7	228,4	16,9	24,9	3,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tans-1 (Caud 100)	fond	22,8	18,3	32,8	35,0	294,8	19,6	20,8	5,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tans-7 (Dauc)	fond	28,1	20,0	41,0	43,0	299,3	25,4	26,1	6,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trans 14 (Rouen 100)	fond	18,6	15,1	29,0	26,2	218,9	18,2	15,6	4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CBZ: carbamazépine, OXA: oxazépam, ATE: aténolol, SOT: sotalol, GAB: gabapentine, DIC: diclofénac, IBU-OH: hydroxy-ibuproène, IBU: ibuprofène, A: atrazine, A-OH: hydroxyatrazine, DEA: déséthylatrazine, DIU: diuron, ISO: isoproturon, MET: métolachlore, MET-ESA: métolachlore ESA, MET-OA: métolachlore OA, IMI: imidaclopride, PRO: propiconazole, n.d: non détecté, - : analyse non réalisée

## Annexe 8 : Données brutes : Campagnes CRAPPSE-2 (Oissel, La Bouille, Caudebec)

### Prélèvements ponctuels

Composés	OISSEL						LA BOUILLE						CAUDEBEC					
	OIS 12	OIS 01	OIS 02	OIS 03	OIS 04	OIS 05	LaB 12	LaB 01	LaB 02	LaB 03	LaB 04	LaB 05	Caud 12	Caud 01	Caud 02	Caud 03	Caud 04	Caud 05
atrazine	6,31	9,42	8,21	5,17	7,04	10,50	7,52	10,91	5,93	9,73	7,54	10,88	7,73	9,76	7,94	5,14	7,70	9,02
hydroxyatrazine	9,58	9,52	12,40	11,49	7,44	9,72	9,63	9,46	12,01	10,97	9,77	9,98	11,41	8,84	10,68	14,71	8,92	9,62
DEA	13,92	16,27	13,17	6,99	7,54	15,78	13,77	20,59	8,60	16,39	13,18	14,63	11,23	17,70	16,24	8,91	12,04	12,40
diuron	3,02	6,52	3,98	3,40	4,64	5,82	3,52	4,21	4,52	5,30	6,70	4,71	3,69	4,96	9,14	4,73	4,55	5,05
isoproturon	43,30	12,74	11,53	13,33	14,25	1,90	47,80	13,72	13,89	9,63	12,03	1,84	94,49	16,52	9,10	17,01	9,11	6,13
métolachlore	2,89	2,59	3,92	3,42	2,05	12,65	3,70	2,58	4,71	3,46	3,09	11,24	4,12	2,84	3,56	5,35	8,04	11,43
métolachlore ESA	22,88	20,38	42,23	49,92	21,45	22,93	24,22	22,26	63,18	37,37	21,36	19,97	30,56	21,60	37,62	75,55	32,62	22,10
métolachlore OA	1,01	0,93	1,17	1,40	0,94	<LQ	0,94	1,02	1,30	1,76	1,09	0,61	1,22	0,89	0,76	1,59	1,05	0,79
imidaclopride	6,65	5,93	7,31	10,33	3,81	3,32	7,65	6,44	11,49	5,73	4,69	3,29	8,61	5,70	5,64	16,52	4,15	3,46
propiconazole	1,78	2,79	2,80	2,22	1,71	4,27	1,93	2,40	2,62	3,23	2,30	3,79	2,16	2,35	4,24	3,00	2,62	3,28
fipronil	1,02	1,86	1,73	0,41	0,58	0,79	2,34	3,32	1,45	0,65	0,81	0,96	3,46	2,36	1,92	0,61	0,77	0,87
fipronil desulfinyl	0,04	0,07	0,05	<LQ	0,10	0,21	0,07	0,08	0,06	0,03	0,10	0,27	2,92	0,08	0,08	0,04	0,13	0,40
fipronil sulfide	0,54	0,57	1,46	0,16	0,25	0,58	2,50	5,67	1,49	0,52	0,86	1,20	5,86	4,47	1,65	0,60	0,96	1,43
fipronil sulfone	0,11	0,22	0,48	0,06	0,09	0,17	0,57	1,14	0,40	0,13	0,13	0,18	1,94	0,63	0,46	0,13	0,14	0,18
aténolol	25,10	25,79	14,92	21,37	40,22	46,04	30,56	42,37	14,51	23,27	27,29	27,75	39,55	28,30	28,30	14,39	15,77	32,17
carbamazépine	31,16	32,02	18,53	26,54	49,94	57,16	37,94	52,61	18,01	28,90	33,89	34,46	49,10	35,14	35,14	17,86	19,58	39,94
gabapentine	447,17	524,11	293,98	359,71	603,56	802,27	585,60	725,14	258,11	448,76	419,91	430,47	678,85	483,38	483,38	271,74	234,10	476,02
oxazépam	64,02	59,05	30,79	36,12	65,02	97,08	70,57	98,66	34,29	52,80	53,05	53,89	86,39	53,34	53,34	29,53	29,84	60,41
sotalol	72,38	70,43	40,18	43,22	69,61	116,73	78,03	132,70	39,63	72,02	56,04	57,43	104,09	61,04	61,04	34,11	33,32	53,70
diclofenac	38,90	29,43	61,39	25,22	22,20	34,55	38,06	40,01	33,17	36,72	38,67	39,42	32,88	42,24	60,35	26,25	40,28	26,38
hydroxy-ibuprofène	69,66	46,19	34,59	64,04	166,10	37,37	80,21	41,89	45,76	37,43	44,03	63,77	90,32	0,00	92,49	35,72	<LQ	<LQ
ibuprofène	12,64	18,02	0,00	15,90	64,22	13,12	26,90	0,00	12,50	9,10	10,56	<LQ	23,38	30,77	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

### Prélèvements par POCIS

temps dimersion (jours)	OISSEL						LA BOUILLE						CAUDEBEC					
	OIS 12	OIS 01	OIS 02	OIS 03	OIS 04	OIS 05	LaB 12	LaB 01	LaB 02	LaB 03	LaB 04	LaB 05	Caud 12	Caud 01	Caud 02	Caud 03	Caud 04	Caud 05
	24	x	24	x	22	x	24	32	24	34	22	28	24	32	24	34	22	28
atrazine	130,79		159,81		108,07		123,88	184,86	178,26	103,40	88,84	269,11	111,8	53,0	287,6	206,1	239,2	285,6
hydroxyatrazine	157,09		169,54		165,55		135,06	194,71	167,79	142,93	134,25	231,10	142,6	41,4	155,8	193,2	117,2	154,3
DEA	76,49		105,22		68,89		71,92	91,62	107,33	60,88	51,65	144,96	82,6	32,1	190,9	136,0	141,0	168,4
diuron	50,01		72,84		47,95		55,27	88,34	84,27	62,38	35,65	90,75	68,8	27,0	126,0	122,0	93,3	121,1
isoproturon	2492,34		449,13		385,59		2278,54	1183,37	474,26	344,52	280,50	413,59	1991,3	453,7	753,3	653,2	456,8	545,4
métolachlore	53,69		44,72		48,12		51,43	43,62	44,25	44,82	43,32	195,93	43,3	14,4	66,0	78,1	153,3	179,9
métolachlore ESA	119,58		115,90		190,01		102,61	83,56	111,32	254,20	200,91	161,72	111,9	93,1	117,4	260,1	113,4	133,1
métolachlore OA	24,27		17,72		18,33		20,62	18,15	17,14	21,98	16,47	30,78	21,1	4,8	25,3	35,3	28,6	33,6
imidaclopride	130,66		92,41		101,83		126,53	128,07	98,20	116,85	87,95	111,30	131,5	42,2	145,1	200,4	95,1	126,5
propiconazole	55,78		91,59		62,93		65,96	90,91	97,35	76,73	52,24	142,86	73,2	21,7	182,7	153,8	143,6	186,4
fipronil	22,36	pb	31,15	pb	13,94	pb	37,92	72,74	49,49	21,31	12,50	34,17	28,9	23,8	81,1	37,5	22,9	36,2
fipronil desulfinyl	0,45	intégrité POCIS	0,51	intégrité POCIS	0,54	intégrité POCIS	0,38	1,14	0,84	0,58	0,34	3,74	0,6	0,5	1,3	0,9	0,9	5,0
fipronil sulfide	2,97		7,33		2,15		9,48	32,64	18,79	6,95	3,41	12,59	8,5	12,2	31,1	11,4	6,0	14,8
fipronil sulfone	2,46		5,37		2,21		3,81	16,24	9,52	6,47	1,94	8,47	3,6	5,1	16,2	10,9	4,0	10,9
aténolol	300,80		0,00		535,63		274,85	497,04	515,73	297,25	179,98	366,88	199,3	47,4	754,7	436,1	238,3	315,8
carbamazépine	641,53		25,61		778,03		552,73	965,04	894,21	494,20	391,32	1364,55	535,5	295,4	1387,5	928,0	666,3	1179,1
gabapentine	<LQ		<LQ		<LQ		<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
oxazépam	880,56		60,42		1095,15		866,19	1530,48	1463,57	713,08	568,28	1702,08	755,7	397,0	2125,1	1231,9	832,5	1616,9
sotalol	752,76		11,94		1013,09		562,57	1200,78	1161,43	584,90	378,37	760,29	611,4	223,2	1891,6	990,5	505,6	906,0
diclofenac	1063,52		76,36		1347,66		997,51	1592,64	1487,68	803,73	646,88	754,57	829,4	538,8	1736,8	1292,3	847,6	566,2
hydroxy-ibuprofène	91,07		31,11		152,35		93,76	202,17	190,85	143,97	65,08	50,45	31,0	<LQ	139,3	102,0	45,8	19,9
ibuprofène	234,86		<LQ		625,81		194,87	496,99	667,50	396,87	157,82	328,57	273,1	116,0	999,3	611,7	256,1	175,6

## Annexe 9 : Données brutes-Photodégradation d'un effluent de STEU

Temps d'irradiation	0 min	200 min	400 min	1440 min
unité	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L
fipronil	17,39	14,98	11,86	3,61
fipronil desulfinyl	<LQ	0,71	1,17	1,57
fipronil sulfide	9,29	5,07	3,84	1,36
fipronil sulfone	0,85	0,58	<LQ	<LQ
diazépam	3,73	3,84	7,08	5,01
méprobamate	4,20	5,36	0,00	0,00
sildenafil	5,43	0,00	0,00	0,00
névirapine	17,53	16,58	14,39	17,86
fluméquine	7,90	7,76	6,99	4,79
sildénafil	10,74	8,31	1,02	1,78
timolol	11,82	7,13	8,65	3,15
sulfanilamide	12,13	18,64	14,16	<LQ
salbutamol	15,79	15,00	11,93	11,38
névirapine	19,89	14,63	17,59	19,05
ifosfamide	16,66	6,39	3,08	4,41
fluoxétine	16,84	<LQ	<LQ	<LQ
tétracycline	22,48	8,82	<LQ	<LQ
clopidogrel	24,81	21,51	18,11	11,16
clindamycine	25,24	22,18	17,72	9,31
nordiazépam	27,64	19,77	20,27	31,26
amitriptyline	38,07	7,04	9,61	<LQ
roxithromycine	48,44	30,49	22,24	3,81
bézafrate	56,56	47,70	46,27	55,31
norfloxacine	71,61	<LQ	<LQ	<LQ
azithromycine	100,93	96,78	61,98	9,08
métronidazole	102,96	81,67	56,36	5,11
doxycycline	109,62	<LQ	<LQ	<LQ
acébutolol	114,13	75,62	86,47	67,32
ranitidine	118,72	42,47	19,79	8,97
ritonavir	130,72	53,73	70,93	23,16
sulfapyridine	152,59	144,07	125,30	67,18
ofloxacine	173,70	178,99	144,25	21,34
métoprolol	178,55	163,85	214,92	158,19
clarithromycine	181,18	142,85	106,00	32,98
bisoprolol	280,73	234,69	282,27	216,90
érythromycine	346,88	221,68	159,49	62,57
ciprofloxacine	448,58	<LQ	<LQ	<LQ
carbamazépine	448,66	484,11	497,84	514,01
cétirizine	517,09	506,08	479,03	565,56
propranolol	698,29	593,52	574,72	234,83
aténolol	741,02	656,93	906,96	835,66
paracétamol	1045,24	1193,31	576,36	681,73
sotalol	1761,97	1646,38	1758,33	496,37
oxazépam	2134,78	1747,41	1738,47	2131,04
gabapentine	1942,98	1806,90	1706,40	1621,91
atrazine	8,72	9,72	6,69	7,31
diuron	129,77	137,01	134,24	137,94
isoproturon	47,85	44,10	34,03	29,18
métolachlore	1,08	1,36	1,35	1,98
imidaclopride	119,63	121,21	95,75	39,98
propiconazole	32,91	28,84	23,05	14,09
triclosan	9,71	4,61	2,74	1,11
apixaban	10,36	4,44	1,08	1,48
dabigatran	426,99	421,96	400,48	394,96
rivaroxaban	24,64	16,27	11,02	9,85

## Annexe 10 : Données brutes Incubation Seine

Temps d'incubation (jours)	LSS					HgCl2					HSS					MSS					HSAL					
	0	7	14	17	21	0	7	14	17	21	0	7	14	17	21	0	7	14	17	21	0	7	14	17	21	
	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	
acébutolol	13,3	9,7	11,0	10,6	9,1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	11,8	15,8	6,7	2,9	1,1	13,2	6,4	3,9	2,5	1,9	10,6	13,1	9,0	4,0	2,7	
aténolol	204,8	169,2	65,6	26,1	26,5	234,0	179,2	145,8	44,3	31,7	194,6	201,9	14,2	<LQ	<LQ	226,2	87,4	44,8	10,9	15,0	157,8	129,3	59,2	19,1	16,6	
béazafibrate	15,2	6,2	<LQ	<LQ	<LQ	12,4	12,3	9,9	11,4	13,8	11,8	10,7	0,0	<LQ	<LQ	10,1	4,6	<LQ	<LQ	<LQ	13,1	5,6	<LQ	<LQ	<LQ	
bisoprolol	57,9	42,5	42,9	29,3	31,6	37,9	37,9	38,3	43,6	27,3	50,5	43,2	6,4	0,5	<LQ	57,4	27,6	12,7	5,2	9,5	40,0	42,7	34,1	16,8	22,2	
carbamazépine	73,5	68,1	74,2	69,6	70,7	73,2	71,1	71,8	71,8	71,4	81,2	83,9	77,6	76,7	81,5	67,5	61,4	60,2	67,7	64,6	70,7	73,4	69,5	74,4	73,4	
caféine	155,5	79,2	95,6	<LQ	<LQ	102,9	139,5	72,4	171,9	97,3	132,1	66,6	40,3	24,7	49,8	63,4	0,0	0,0	0,0	0,0	179,8	76,9	57,0	<LQ	<LQ	
cétirizine	318,7	289,3	294,9	269,0	314,4	251,1	238,9	250,3	256,7	254,9	274,7	255,3	227,4	291,8	178,0	383,6	343,7	361,6	291,5	262,0	325,3	331,1	331,8	333,0	308,2	
clopidogrel	6,7	3,4	0,9	1,5	<LQ	6,0	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	5,8	5,6	2,9	2,1	1,8	6,9	1,5	1,3	<LQ	<LQ	7,3	2,6	0,6	<LQ	<LQ	
disopyramide	6,7	4,3	6,8	4,6	5,6	4,4	3,8	3,6	3,4	3,5	5,1	5,3	3,9	3,4	3,8	7,6	5,8	4,3	5,7	3,1	7,1	7,4	4,1	2,9	2,8	
lorazépalol	35,4	21,2	36,9	28,5	32,7	36,0	28,7	27,8	29,4	32,5	30,6	26,2	28,7	7,9	13,3	55,5	24,1	24,1	32,5	13,1	41,9	33,0	12,3	17,4	<LQ	
métoprolol	32,0	16,1	19,0	17,9	23,9	22,8	17,5	17,2	21,8	18,3	28,7	29,7	6,9	0,0	0,0	27,6	12,8	11,8	4,5	4,3	30,4	26,1	16,8	7,1	5,9	
névirapine	5,2	4,1	9,9	4,2	9,4	nd	nd	nd	nd	nd	10,3	14,4	9,8	9,1	8,4	7,4	6,4	7,9	7,0	7,7	5,0	6,3	4,9	4,3	4,5	
nordiazépalol	7,2	3,6	8,2	5,2	3,9	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	8,9	9,3	5,7	3,7	6,4	4,8	5,9	6,3	4,9	7,6	6,1	10,3	7,9	5,5	5,4	
oxazépalol	378,7	322,9	283,7	298,6	221,3	216,3	159,7	120,6	101,3	75,5	473,3	396,4	336,3	432,6	326,0	434,0	300,6	331,3	318,7	246,0	435,0	443,1	401,6	297,0	286,0	
propranolol	157,6	111,2	105,9	97,6	90,2	78,7	62,5	45,7	49,5	43,8	131,9	74,3	9,7	0,0	0,0	186,9	53,9	15,3	15,4	16,2	115,1	110,8	59,2	29,5	33,8	
salbutamol	5,1	2,9	6,2	4,4	7,2	3,7	4,7	2,7	4,1	2,7	6,2	8,0	0,7	<LQ	<LQ	6,0	1,9	1,0	0,6	1,1	6,6	4,7	4,3	1,4	0,9	
sotalol	326,0	298,4	356,7	267,8	243,9	244,0	238,3	207,9	258,8	200,6	390,4	292,1	192,3	94,6	7,2	343,9	246,3	324,0	218,2	138,1	292,1	295,2	281,4	212,0	161,6	
kétoprofène	76,5	54,6	50,2	42,2	36,1	74,3	75,8	70,2	67,0	74,3	86,4	75,9	70,7	67,8	51,1	87,5	67,2	60,8	61,3	58,5	97,3	79,2	61,2	53,3	52,6	
naproxène	7,7	4,5	7,0	5,2	5,2	6,3	6,8	8,7	6,4	7,9	8,1	8,0	5,5	4,7	1,4	8,5	4,4	4,5	4,7	2,7	7,2	4,0	3,5	3,4	2,1	
diclofénac	435,9	263,8	285,1	267,9	220,6	352,7	329,6	298,3	205,5	245,2	391,4	365,5	320,0	178,1	99,5	365,5	262,4	241,8	326,5	292,0	377,7	350,0	263,3	253,5	256,9	
ibuprofène	29,3	22,3	27,2	27,2	23,7	11,7	9,5	10,6	7,1	10,1	67,1	51,3	58,1	24,7	25,1	25,7	20,7	28,6	26,2	10,2	36,0	36,7	31,6	37,4	36,1	
acide fénofibrique	14,3	8,5	6,5	2,5	1,0	13,6	18,2	12,0	11,9	13,9	18,0	14,9	1,4	<LQ	<LQ	17,3	4,8	0,9	<LQ	<LQ	14,3	11,0	3,6	1,0	<LQ	
AMPA	504,3	323,1	48,2	42,1	48,3	307,3	213,5	158,8	129,4	94,2	185,9	137,5	31,6	38,5	38,9	156,9	140,4	74,7	106,2	97,4	149,6	78,3	24,3	<LQ	<LQ	
glyphosate	127,4	44,2	24,3	24,2	25,0	71,0	46,3	53,7	30,4	17,5	26,1	33,7	17,2	15,6	11,7	17,7	33,6	16,6	24,6	18,8	26,8	24,5	<LQ	<LQ	<LQ	
fipronil	6,7	6,8	4,9	3,6	3,7	5,1	2,7	2,6	2,5	1,0	5,8	3,9	2,8	2,7	2,0	4,5	4,5	3,1	2,2	1,5	5,7	2,4	2,9	2,9	1,6	
fipronil désulfuryl	0,6	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
fipronil sulfure	21,4	13,4	9,4	7,5	8,6	17,5	3,8	5,0	5,5	2,5	16,1	7,6	5,2	6,0	4,7	14,3	9,4	5,9	4,2	3,0	18,6	5,2	7,1	5,4	3,4	
fipronil sulfone	<LQ	0,6	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
124 DCPU	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
134 DCPU	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	38,2	40,4	26,5	nd	nd	25,1	35,8	21,6	nd	nd	3,3	7,3	5,8	
1343 DCPMU	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8,5	nd	nd	nd	nd	5,0	nd	nd	nd	nd	2,7	nd	nd	nd	
atrazine	18,6	17,0	16,2	13,8	14,4	18,9	16,3	14,4	17,5	16,5	17,5	16,3	18,8	18,4	18,8	19,2	15,0	15,7	16,2	15,6	18,8	19,9	15,3	15,8	15,7	
hydroxyatrazine	18,0	16,1	12,0	9,1	9,1	nd	nd	nd	nd	nd	9,7	11,2	16,8	14,7	12,7	10,2	11,1	10,3	12,1	7,3	10,2	9,0	10,2	10,7	9,9	
azoxystrobine	3,9	3,1	2,9	1,6	1,3	3,8	2,7	2,4	2,5	2,5	3,2	2,3	1,8	1,4	1,4	4,8	1,6	1,3	1,4	0,9	3,4	1,8	1,1	1,2	1,4	
carbendazime	6,5	8,2	8,0	7,4	7,0	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	9,0	6,6	7,2	6,5	4,5	11,6	8,0	7,6	8,8	7,7	8,6	4,2	4,7	6,1	5,1	
chlorotoluron	58,4	67,6	58,1	47,0	36,6	53,9	58,7	53,5	69,2	55,9	53,1	45,3	2,2	0,0	0,0	57,8	47,9	7,6	2,5	1,2	60,3	39,0	38,6	30,5	26,9	
DEA	39,1	57,0	34,4	30,8	27,4	37,6	30,2	41,0	42,3	32,9	43,1	36,0	49,8	42,2	40,0	31,7	36,7	37,5	41,8	29,4	45,0	25,2	31,7	31,2	26,8	
DIA	8,0	6,4	4,4	4,6	2,0	9,6	8,1	5,6	7,4	6,8	8,9	3,2	10,7	5,5	5,9	5,6	2,4	3,8	6,0	5,4	7,4	2,8	5,3	3,9	5,6	
diflufenican	2,5	0,6	<LQ	0,7	0,5	2,6	1,3	0,7	1,3	1,3	2,0	3,6	4,2	3,3	4,3	4,8	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,9	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
diuron	34,6	41,1	38,6	36,8	32,5	33,8	29,6	37,8	41,2	38,1	34,3	27,5	<LQ	<LQ	<LQ	34,4	27,9	1,2	<LQ	<LQ	36,1	31,6	27,4	24,5	22,8	
DMSA	2,1	3,5	1,9	6,8	4,7	1,7	1,7	6,5	2,5	2,2	2,7	6,3	7,1	7,6	6,2	4,6	4,8	6,9	7,1	4,8	2,6	1,8	6,0	7,1	6,6	
hexazinone	0,8	1,3	1,5	1,2	1,0	1,3	0,9	1,3	1,3	1,1	1,2	1,2	1,5	1,3	1,2	1,2	0,8	1,0	1,2	0,8	1,4	0,7	1,0	0,8	0,6	
hydroxy-simazine	1,9	1,3	<LQ	1,7	1,8	nd	nd	nd	nd	nd	1,4	2,3	3,3	2,7	1,9	1,7	1,3	1,8	2,0	1,6	2,1	1,0	1,9	0,8	1,2	
imidaclopride	23,6	25,8	20,7	21,0	20,3	21,9	23,6	25,5	27,4	21,4	23,4	20,5	27,1	29,4	22,9	27,8	21,8	22,7	27,9	17,1	23,2	13,6	17,2	19,0	15,7	
isoproturon	6,4	7,9	6,7	7,0	5,3	7,0	6,0	7,2	7,8	6,9	6,8	6,5	5,1	2,4	1,1	6,9	6,1	5,4	5,3	3,7	7,5	4,8	5,8	5,0	5,1	
linuron	17,8	16,6	14,9	12,5	8,2	17,4	17,9	17,6	15,2	12,3	18,3	16,3	18,4	16,0	12,8	17,2	12,5	12,5	12,6	10,3	18,9	10,0	11,8	12,0	9,0	
métalaxyl	1,6	1,5	1,0	1,4	1,0	1,4	1,2	1,5	1,5	1,6	1,4	1,2	1,2	1,3	1,4	1,7	1,2	1,1	1,5	1,2	1,5	0,7	1,3	1,2	1,1	
métazachlore	1,4	1,2	1,7	1,3	1,3	1,4	1,3	1,5	1,5	1,4	1,6	1,5	2,0	1,7	1,5	1,5	1,5	1,2	1,3	0,9	1,5	0,9	1,1	1,3	1,3	
métolachlore	4,7	4,3	3,8	3,3	2,7	5,1	5,4	5,4	5,9	5,7	5,5	5,2	6,0	5,6	5,4	4,8	2,9	2,9	3,1	2,2	4,7	3,2	3,0	2,9	2,8	
norflurazon	1,8	1,1	2,5	<LQ	<LQ	4,3	2,4	0,6	1,6	2,4	1,0	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,1	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1,1	0,9	<LQ	<LQ	<LQ	
propiconazole	29,0	14,0	8,2	5,7	4,7	24,5	11,6	6,9	7,3	7,5	22,1	10,4	9,6	8,0	6,5	20,2	8,7	5,0	4,9	3,0	25,5	11,7	4,6	5,2	5,3	
simazine	6,9	7,3	8,7	8,7	6,5	15,9	12,0	8,7	12,5	10,2	9,0	8,7	9,5	9,5	8,7	7,7	6,7	7,8	7,2	6,4	7,9	5,7	6,1	7,8	6,0	
terbutryn	14,0	6,1	6,3	3,5	2,9																					

## Annexe 11 : Données brutes Incubation Garonne

Temps d'incubation (jours)	LSS					HgCl2					HSS					MSS					HSAL					
	0	7	14	17	21	0	7	14	17	21	0	7	14	17	21	0	7	14	17	21	0	7	14	17	21	
	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	
acébutolol	14,6	12,3	11,5	12,7	10,4	3,3	nd	nd	nd	nd	12,6	11,3	2,4	4,4	2,7	25,0	9,4	7,0	8,1	5,7	16,3	12,2	10,5	9,2	9,4	
aténolol	121,9	87,7	72,5	70,0	66,2	73,4	31,3	22,6	25,8	21,3	117,7	0,0	0,0	0,0	0,0	131,2	10,0	0,0	0,0	0,0	108,9	32,7	5,0	5,8	1,7	
bézaflibrate	6,2	4,6	4,4	3,2	2,0	5,2	5,3	4,0	3,7	3,8	5,1	2,5	0,7	0,0	0,0	4,3	3,0	1,9	2,2	0,7	5,9	4,0	2,7	3,0	2,4	
bisoprolol	87,3	57,2	40,6	46,5	44,7	45,3	43,8	22,5	20,2	21,2	70,1	20,1	2,2	0,4	0,4	111,0	23,5	7,9	13,3	5,4	65,4	30,1	13,0	8,8	5,2	
carbamazépine	85,1	87,2	100,1	110,0	110,3	99,1	87,0	72,2	72,5	75,3	73,3	93,2	85,1	82,2	80,7	77,7	60,5	93,4	86,8	71,2	92,3	94,8	91,5	82,9	86,6	
cétirizine	126,2	166,5	162,2	134,4	158,2	102,5	87,5	87,1	72,9	83,8	100,3	111,4	76,8	65,5	60,5	127,9	77,8	118,6	104,1	129,3	116,8	115,9	157,2	121,8	116,1	
clopidogrel	7,0	4,0	3,1	3,8	2,5	5,1	1,9	0,6	0,6	0,6	4,5	2,0	2,0	2,0	1,3	4,7	1,2	2,1	1,9	1,9	5,6	2,3	2,4	1,6	1,9	
disopyramide	10,2	12,7	10,2	11,3	12,0	2,3	3,2	0,5	1,3	0,4	6,2	5,2	1,4	4,3	2,0	9,8	5,3	8,0	10,2	8,7	15,7	10,4	11,0	9,6	8,5	
lorazépam	14,4	17,6	15,3	16,7	17,2	10,0	5,8	4,1	5,0	7,0	11,6	12,6	7,3	6,3	4,8	16,3	9,6	13,0	12,5	7,4	12,9	12,2	12,8	8,9	12,8	
métoprolol	32,5	30,3	26,8	27,5	21,4	21,0	18,9	18,3	16,6	18,2	44,6	10,5	1,6	0,0	0,0	73,7	16,8	6,3	6,9	3,9	32,7	21,1	9,2	8,7	5,8	
névirapine	4,5	4,6	5,5	4,9	6,4	nd	nd	nd	nd	nd	3,5	4,9	4,6	4,1	3,7	5,1	4,2	5,0	4,6	4,7	3,9	5,1	5,8	3,9	4,9	
nordiazépam	5,2	6,4	6,8	7,4	8,5	3,4	3,1	3,1	3,2	3,1	7,4	7,7	5,9	6,0	8,0	5,0	3,9	5,6	7,0	4,4	4,9	5,5	5,2	6,0	5,3	
Oxazépam	433,6	357,7	347,7	308,5	317,7	58,9	52,4	48,0	41,9	45,2	329,3	298,7	307,6	268,9	192,3	338,3	245,3	325,1	345,8	321,7	299,7	283,7	292,2	300,0	281,6	
propafénone	161,6	134,4	129,9	133,8	102,4	62,3	28,8	20,2	21,8	19,0	107,5	14,7	5,3	3,9	2,8	115,4	27,6	25,2	16,2	10,6	134,3	64,8	28,9	30,3	25,0	
sotalol	289,1	314,4	313,0	284,4	284,9	78,1	78,7	53,5	50,2	50,4	277,0	167,2	49,2	26,0	35,6	258,1	138,9	162,5	158,4	120,1	310,2	235,3	180,3	191,5	135,5	
ketoprofène	65,9	62,8	64,5	51,1	44,1	59,9	61,3	58,3	64,3	37,6	63,1	49,5	59,7	44,4	40,9	69,0	67,6	58,2	41,0	44,3	64,2	51,9	50,5	53,4	41,9	
naproxène	5,0	5,0	5,1	4,2	4,1	5,0	6,2	4,7	4,8	4,5	4,2	0,5	0,0	0,0	0,0	4,9	2,2	0,0	0,0	0,0	6,8	2,0	0,0	0,0	0,0	
diclofénac	300,9	333,5	377,3	339,1	339,5	312,4	310,8	306,4	317,8	314,2	329,4	310,3	221,5	172,2	148,4	377,8	305,9	295,3	311,9	278,9	337,4	276,8	288,6	263,3	252,1	
ibuprofène	48,9	59,0	57,6	67,4	48,7	10,7	8,3	5,2	6,4	5,6	44,3	32,8	45,1	47,3	40,2	48,7	34,1	35,8	34,0	33,3	74,9	61,9	57,1	51,7	47,3	
acide fénilfrique	11,0	8,6	1,5	1,5	0,0	12,2	13,8	11,7	10,8	11,6	13,5	1,5	1,2	0,0	0,0	13,3	4,7	1,3	1,2	0,0	11,4	7,1	1,8	1,8	0,8	
AMPA	302,8	311,8	324,9	376,1	300,1	42,6	55,7	62,2	53,7	56,0	181,9	292,8	275,3	274,1	259,7	340,8	338,7	316,8	266,2	185,0	332,9	302,2	270,9	374,2	340,1	
glyphosate	80,4	45,8	76,5	70,7	45,9	30,8	26,4	25,8	32,6	19,0	8,1	0,0	0,0	0,0	0,0	38,1	26,6	0,0	0,0	0,0	25,9	21,5	15,3	20,7	13,9	
fipronil	14,0	11,0	12,7	11,6	11,5	6,5	2,4	2,2	1,8	3,3	12,3	5,4	7,9	5,7	6,6	13,0	9,2	7,8	9,0	8,9	11,4	4,3	3,6	4,2	3,7	
fipronil désulfinyl	0,5	0,3	0,5	0,4	0,4	0,4	0,2	0,1	0,2	0,4	0,4	0,2	0,3	0,2	0,3	0,4	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	
fipronil sulfide	27,2	23,3	26,0	20,4	20,6	8,9	2,8	3,5	3,3	5,3	29,8	10,7	15,8	10,5	12,2	31,2	11,9	14,3	16,6	16,3	28,8	6,2	6,7	6,7	6,7	
fipronil sulfone	1,9	0,8	0,8	0,6	0,6	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,9	0,3	0,6	0,4	0,4	0,8	0,5	0,5	0,6	0,6	0,9	0,1	0,2	0,2	0,3	
124 DCPU	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
134 DCPU	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1343 DCPMU	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
atrazine	12,5	-	14,3	11,6	11,4	10,7	11,2	8,1	10,0	8,3	11,8	12,0	13,3	9,0	10,5	12,6	13,2	10,5	8,7	10,2	9,3	10,9	10,6	10,8	9,4	
hydroxyatrazine	7,3	-	8,1	6,3	5,8	6,0	nd	nd	nd	nd	10,3	6,4	7,2	6,0	5,2	6,9	8,5	9,0	5,9	6,8	4,8	6,8	7,1	6,4	6,0	
azoxystrobine	2,6	-	2,0	1,3	1,3	2,4	1,7	1,4	1,3	1,1	2,1	1,7	1,3	1,0	1,1	2,0	1,8	1,3	1,2	1,0	2,0	1,4	1,3	1,2	1,1	
carbendazime	3,4	-	4,2	5,5	5,4	nd	nd	nd	nd	nd	1,6	2,7	2,3	4,2	4,0	5,6	3,5	3,6	3,7	4,5	2,2	3,7	3,3	5,2	3,8	
chlorotoluron	53,1	-	42,2	36,8	18,9	45,3	43,6	43,4	39,9	38,5	51,7	46,3	44,4	31,9	31,5	47,3	49,4	40,5	34,4	38,2	34,8	43,8	44,3	42,5	28,9	
DEA	13,7	-	15,5	12,0	14,1	10,5	6,9	6,2	9,0	8,1	13,7	14,2	15,8	14,3	14,7	13,4	16,0	16,2	12,4	14,1	7,2	13,8	14,2	12,0	13,2	
difluénican	2,4	-	0,9	0,6	0,4	1,6	0,6	0,6	0,3	0,3	1,6	1,0	0,7	0,7	0,5	1,5	0,2	0,3	0,3	0,3	1,2	0,3	0,4	0,3	0,2	
diuron	28,4	-	26,5	27,9	24,4	24,3	23,9	24,6	23,2	21,8	28,3	25,8	24,1	20,6	21,5	29,1	25,3	26,1	20,6	22,8	19,5	26,6	24,2	24,2	19,9	
DMSA	5,1	-	4,9	4,6	4,6	5,1	4,5	4,0	4,7	6,2	5,3	4,8	4,4	4,3	5,8	3,7	4,5	4,3	5,5	5,4	3,7	4,9	4,2	4,4	5,0	
DMST	1,1	-	1,0	0,9	0,8	1,0	0,9	0,7	0,7	1,1	1,1	1,1	1,2	0,8	0,8	1,0	1,1	0,8	1,0	0,8	1,0	1,0	0,8	0,8	0,8	
hydroxy-simazine	1,6	-	2,2	2,0	2,1	nd	nd	nd	nd	nd	1,3	2,4	1,6	1,4	1,2	1,7	1,6	1,2	1,5	2,1	1,4	2,9	2,5	1,8	1,2	
imidaclopride	20,1	-	18,5	17,2	18,1	16,6	17,4	17,4	18,1	14,8	19,2	18,8	20,3	16,5	15,0	16,5	20,4	18,6	15,5	22,2	11,3	20,2	17,2	17,4	14,8	
isoprothuron	6,1	-	5,7	5,0	4,8	5,0	4,9	5,0	4,9	4,3	5,4	5,2	5,1	4,3	4,3	5,4	5,8	5,0	4,5	4,4	4,1	5,3	4,8	4,4	4,0	
linuron	2,7	-	13,5	13,0	12,2	12,4	10,1	12,3	12,3	10,0	15,4	12,2	11,1	9,1	9,9	3,0	14,3	14,5	11,7	11,0	10,8	13,7	11,8	1,8	9,7	
métalaxyl	3,1	-	2,8	2,5	2,5	3,0	2,9	2,7	2,5	3,1	3,0	2,9	3,0	2,4	2,4	3,3	3,0	2,6	2,5	2,5	2,4	3,0	2,6	2,5	2,3	
métazachlore	2,8	-	3,1	2,0	1,9	3,1	3,3	2,7	2,1	2,2	2,3	2,1	2,1	1,7	1,7	2,5	2,8	2,4	2,3	2,0	1,9	2,6	2,1	2,1	1,9	
métolachlore	7,3	-	6,1	5,4	4,5	6,3	6,3	6,9	6,1	5,9	7,0	6,2	6,1	4,8	4,7	6,6	6,3	5,4	4,5	5,3	6,5	6,6	5,6	5,2	4,1	
métolachlore ESA	36,6	-	26,6	30,7	40,6	32,9	26,7	27,9	24,8	48,4	35,8	50,1	36,7	35,9	32,7	24,1	44,9	31,4	38,9	39,0	40,5	33,3	38,1	35,9	31,2	
métolachlore OA	6,0	-	20,5	12,5	9,7	10,1	11,7	10,5	9,6	10,5	12,2	9,4	10,7	9,3	9,4	10,0	9,5	11,2	11,0	10,2	7,8	10,0	13,3	11,8	9,2	
propiconazole	18,8	-	8,7	7,3	6,5	14,8	8,8	6,3	6,5	6,7	16,7	10,0	7,0	6,2	5,7	13,7	7,7	6,3	4,9	5,5	16,0	8,6	6,5	5,5	4,2	
simazine	3,6	-	3,8	2,8	3,9	4,6	2,0	3,3	3,5	3,3	4,4	4,4	4,7	4,1	3,5	5,1	2,6	4,5	3,1	3,0	3,1	3,8	4,7	5,3	3,7	
terbutryn	11,4	-	6,9	6,3	5,0	7,9	6,7	6,0	5,4	4,9	9,9	6,5	5,0	3,9	3,6	9,2	5,7	4,1	3,1	4,5	9,4	6,8	5,3	4,9	2,8	
terbutylazine	0,8	-	1,2	1,0	1,1	1,6	1,1	1,3	1,3	0,9	1,4	0,8	1,1	1,0	0,9	1,0	0,8	0,9	1,1	1,1	1,0	1,2	0,8	1,2	1,0	
déséthyl-terbutylazine	2,0	-	1,1	1,6	1,7	1,0	1,2	1,2	1,1	1,0	1,5	1,4	1,8	1,1	1,4	1,1	1,5	1,7	1,1	1,1	0,9	1,2	1,6	1,6	1,1	



## **Annexe 12 : Liste des publications et des communications**

### **Articles publiés**

Aminot, Y., Fuster, L., Pardon, P., Menach, K. Le, Budzinski Sci. Total Environ (2018). 612, 39–48. Suspended solids moderate the degradation and sorption of waste water-derived pharmaceuticals in estuarine waters.

Yassine, M., Fuster, L., Dévier, M.-H., Geneste, E., Pardon, P., Grélard, A., Dufourc, E., Al Iskandarani, M., Aït-Aïssa, S., Garric, J., Budzinski, H., Mazellier, P., Trivella, A.S., 2018. Chemosphere 193, 329–336. Photodegradation of novel oral anticoagulants under sunlight irradiation in aqueous matrices.

### **Publications en cours de préparation**

Fuster L., Pardon P., Le Menach K., Dévier M.H., Mazellier P., Budzinski H. Occurrence of polar pesticides in the Seine estuary (Seine).

Fuster L., Togola A., Lardy-Fontan S., Van Bui H., Pardon P., Le Menach K., Dévier M.H., Mazellier P., Budzinski H. Pharmaceuticals in the Seine estuary: 15 years of survey (2002-2017).

Fuster L., Pardon P., Le Menach K., Dévier M.H., Mazellier P., Budzinski H.1 Priorization of polar pesticides and pharmaceuticals with taking account into their persistence in dissolved phase: Case of the Seine estuary.

Fuster L., Mazéas L., Le Menach K., Guenne A., Dévier MH. , Creusot N., Rouillac L., Mazellier P., Dévier MH., Aït Aïssa S., Budzinski H. Landfill leachates: a source of estrogenic compounds Investigations by Effect-Directed Analysis (EDA)

### **Communications par affiche :**

L. Fuster, L. Mazéas, K. Le Menach, A. Guenne, MH.Dévier, N. Creusot, L.Rouillac, P Mazellier, S. Aït Aïssa, H. Budzinski. Evaluation de l'œstrogénicité de lixiviats de stockage de déchets non dangereux et recherche des composés responsables par un approche dirigée par les effets (EDA : Effect-Directed analysis). SEFA, Juin 2015, Bordeaux

### **Communications orales :**

L. Fuster, H. Budzinski, E. Parlanti, P. Mazellier, A. Trivella, K. Le Menach, P. Pardon, MH. Dévier, E. Geneste, S. Aït-Aïssa, J. Garric, H. Queau, A. Sapin, J. Couteau, G. Loppion. Contamination et RéActivité de Pesticides et de Pharmaceutiques dans l'estuaire de SeinE (CRAPPSE). Séminaire scientifique du GIP Sein aval, décembre 2014, Rouen.

L. Fuster, L. Mazéas, K. Le Menach, A. Guenne, MH.Dévier, N. Creusot, L.Rouillac, P Mazellier, S. Aït Aïssa, H. Budzinski. Major contribution of bisphenol A to estrogenic activity in landfill leachate as revealed by effect-directed analysis. SETAC Europe, Mai 2015, Barcelone.

L. Fuster, L. Mazéas, K. Le Menach, A. Guenne, MH.Dévier, N. Creusot, L.Rouillac, P Mazellier, S. Aït Aïssa, H. Budzinski. Estrogenic activity of different treatment stage landfill leachate: Investigations by effect-directed analysis. EDA-Emerge, 29 juin- 01 juillet 2015, Leipzig (Allemagne).

L. Fuster, L. Mazéas, K. Le Menach, A. Guenne, MH.Dévier, N. Creusot, L.Rouillac, P Mazellier, S. Aït Aïssa, H. Budzinski. Démonstration de la contribution majeure du bisphénol A à l'activité œstrogénique d'un lixiviat de décharge par la mise en œuvre d'une méthodologie dirigée par les effets. ARET, 16-17 juin 2016, Rovaltain.

L. Fuster, N. Creusot, S. Aït Aïssa, J. Couteau, J. Garric, MH. Dévier, P. Mazellier, H. Budzinski. Présence et devenir de contaminants polaires en estuaire de Seine : approche bioanalytique. SEFA, 29-30 Juin 2016, Reims.

L. Fuster, H. Budzinski, E. Parlanti, P. Mazellier, A. Trivella, K. Le Menach, P. Pardon, MH. Dévier, E. Geneste, S. Aït-Aïssa, J. Garric, H. Queau, A. Sapin, J. Couteau, G. Loppion. Contaminants organiques en estuaire de Seine. Séminaire scientifique du GIP Sein aval, mai 2017, Rouen.

### **Rapports Scientifiques**

L. Mazéas, H. Budzinski, J. Frayret, L. Fuster, A. Guenne, I. Le Hécho, K. Le Menach, N. Derlet, L. Rouillac, M. Potin-Gautier, N. Pourette. 2015. Evaluation de la toxicité des lixiviats d'installation de stockage de déchets non dangereux et identification des agents chimiques responsables – Rapport final. 2015. ADEME. 63 pages.

A. Huguet, A. Thibault, C. Roose-Amsaleg, E., H. Budzinski, L. Fuster, A. Laverman, E. Viollier, Dynamique de la Matière Organique dans le bouchon vaseux de l'estuaire de Seine en lien avec les nutriments et les Contaminants organiques (MOSAIC)-Rapport final, Seine Aval (SA5). 2017. 53 pages.

H. Budzinski, L. Fuster, E. Parlanti, P. Mazellier, A. Trivella, K. Le Menach, P. Pardon, MH. Dévier, E. Geneste, S. Aït-Aïssa, J. Garric, H. Queau, A. Sapin, J. Couteau, G. Loppion. Contamination et Réactivité de Pesticides et de Pharmaceutiques dans l'estuaire de Seine (CRAPPSE)-Rapport final, Seine Aval (SA5). 2017. 52 pages.



## Bibliographie

- ACD Software, n.d. calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2016 ACD/Labs).
- Acena, J., Heuett, N., Gardinali, P., Pérez, S., 2016. Suspect screening of pharmaceuticals and related boactive compounds, their metabolites and their transformation products in the aquatic environment, biota and humans using LC-HR-MS techniques, in: Applications of Time-of-Flight and Orbitrap Mass Spectrometry in Environmental, Food, Doping Ans Forensic Analysis.
- Achran, A.N.D.M.C.E., Hea, D.A.S., Odnar, W.A.B., Uthrie, E.L.G., Ichols, N., 2016. Pharmaceutical occurence in groundwater and surface water in forests land-applied with municipal wastewater. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 898–905. doi:10.1002/etc.3216
- Adeogun, A.O., Ibor, O.R., Adeduntan, S.D., Arukwe, A., 2016. Intersex and alterations in reproductive development of a cichlid , *Tilapia guineensis* , from a municipal domestic water supply lake ( Eleyele ) in Southwestern Nigeria. *Sci. Total Environ.* 541, 372–382. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.061
- Agence Française de sécurité sanitaire des aliments, 2008. Hierarchisation des résidus de médicaments d'intérêt pour l'analyse des ressources et des eaux traitées.
- Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé, 2014. Analyse des ventes de médicaments en France en 2013.
- Agüera, A., Jesús, M., Bueno, M., 2013. New trends in the analytical determination of emerging contaminants and their transformation products in environmental waters. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 3496–3515. doi:10.1007/s11356-013-1586-0
- Ait-aïssa, S., 2009. Outils bio-analytiques in vitro : principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique.
- Aït-Aïssa, S., Brion, F., Creusot, N., Sanchez, W., 2014. "Etude prospective 2012 : Apport des outils biologiques (bioessais et biomarqueurs) pour le diagnostic de la contamination des milieux aquatiques." Rapport final DRC-14-127339-06620A.
- Aït-Aïssa, S., Creusot, N., 2014. Validation de la mesure de l'activité oestrogénique dans les matrices environnementales - Revue bibliographique. *Rapp. AQUAREF DRC-15-136927-12327A*, 30.
- Alder, L., Greulich, K., Gunther, K., Vieth, B., 2006. Residue analysis of 500 high priority pesticides better by GC-MS or LC-MS ? *Wiley Intersci.* 25, 838–865. doi:10.1002/mas
- Amiard, J., Amiard-triquet, C., 2015. *Environmental Contaminants, Aquatic Ecotoxicology*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800949-9.00002-4
- Aminot, Y., 2013. Etude de l'impact des effluents urbains sur la qualité des eaux de la Garonne : application aux composés pharmaceutiques et aux filtres UV, N°4961. Université de Bordeaux.
- Aminot, Y., Litrico, X., Chambolle, M., Arnaud, C., Pardon, P., Budzindki, H., 2015. Development and application of a multi-residue method for the determination of 53 pharmaceuticals in water , sediment , and suspended solids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 8585–8604. doi:10.1007/s00216-015-9017-3
- Aminot, Y., Le Menach, K., Pardon, P., Etcheber, H., Budzinski, H., 2016. Inputs and seasonal removal of pharmaceuticals in the estuarine Garonne River. *Mar. Chem.* 185, 3–11. doi:10.1016/j.marchem.2016.05.010
- Aminot, Y., Fuster, L., Pardon, P., Menach, K. Le, Budzinski, H., 2018. Suspended solids moderate the degradation and sorption of waste water-derived pharmaceuticals in estuarine waters. *Sci. Total Environ.* 612, 39–48. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.162
- Andreozzi, R., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50, 1319–1330.

- ANSM, 2012. Les anticoagulants en France en 2012: Etat des lieux et surveillance. [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/901e9c291a545dff52c0b41365c0d6e2.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/901e9c291a545dff52c0b41365c0d6e2.pdf).
- Anses, 2017. AGRITOX [WWW Document]. URL <http://www.agritox.anses.fr/php/donnees-essentielles.php>
- Asakura, H., Matsuto, T., Tanaka, N., 2004. Behavior of endocrine-disrupting chemicals in leachate from MSW landfill sites in Japan. *Waste Manag.* 24, 613–622. doi:10.1016/j.wasman.2004.02.004
- Aymerich, I., Acuña, V., Barceló, D., García, M.J., Petrovic, M., Poch, M., Rodriguez-Mozaz, S., Rodríguez-Roda, I., Sabater, S., von Schiller, D., Corominas, L., 2016. Attenuation of pharmaceuticals and their transformation products in a wastewater treatment plant and its receiving river ecosystem. *Water Res.* 100, 126–136. doi:10.1016/j.watres.2016.04.022
- Bade, R., Causanilles, A., Emke, E., Bijlsma, L., Sancho, J. V., Hernandez, F., Voogt, P., 2016. Facilitating high resolution mass spectrometry data processing for screening of environmental water samples: An evaluation of two deconvolution tools. *Sci. Total Environ.* 570, 434–441. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.06.162
- 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.* 591, 643–654. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.015
- Baker, D.R., Kasprzyk-hordern, B., 2011. Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography – positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 1620–1631. doi:10.1016/j.chroma.2011.01.060
- Balaguer, P., Franc, F., Boussioux, A., Pons, M., Nicolas, J., Casellas, C., 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total Environ.* 233, 47–56.
- Balaguer, P., Boussioux, a M., Demirpence, E., Nicolas, J.C., 2001. Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands. *Luminescence* 16, 153–8. doi:10.1002/bio.630
- Balmer, M.E., Buser, H., Mu, M.D., Poiger, T., Faw, A., Federal, S., 2005. Occurrence of Some Organic UV Filters in Wastewater, in Surface Waters, and in Fish from Swiss Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 39, 953–962.
- Baquero, F., Martinez, J.L., Canto, R., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Biotechnology* 19, 260–265. doi:10.1016/j.copbio.2008.05.006
- Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B., 2008. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — I) Groundwater. *Sci. Total Environ.* 402, 192–200. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.04.028
- Batchu, R.S., Venkata, R., O’Shea, K.E.O., Gardinali, P.R., 2014. Photodegradation of antibiotics under simulated solar radiation: Implications for their environmental fate. *Sci. Total Environ.* 470–471, 299–310. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.09.057
- Bayen, S., Zhang, H., Manish, M., Keat, S., Kelly, B.C., 2013. Occurrence and distribution of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds in Singapore’s marine environment: Influence of hydrodynamics and physical e chemical properties. *Environ. Pollut.* 182, 1–8. doi:10.1016/j.envpol.2013.06.028
- Behnisch, P. a., Fujii, K., Shiozaki, K., Kawakami, I., Sakai, S.I., 2001. Estrogenic and dioxin-like potency in each step of a controlled landfill leachate treatment plant in Japan. *Chemosphere* 43, 977–984. doi:10.1016/S0045-6535(00)00458-6
- Behrens, D., Rouxel, J., Burgeot, T., Akcha, F., 2016. Comparative embryotoxicity and genotoxicity of the herbicide diuron and its metabolites in early life stages of *Crassostrea gigas*: Implication of reactive oxygen species production. *Aquat. Toxicol.* 175, 249–259. doi:10.1016/j.aquatox.2016.04.003

- Belgiorno, V., Rizzo, L., 2012. Emerging compounds into the environment: contamination pathways and risk assessment, in: *Emerging Contaminants into the Environment: Pathways and Control*. p. 162.
- Belles, A., 2012. Développement et applications environnementales des échantillonneurs passifs pour la surveillance des écosystèmes aquatiques, n°4723. Université de Bordeaux.
- Belles, A., Pardon, P., Budzinski, H., 2014a. Development of an adapted version of polar organic chemical integrative samplers (POCIS-Nylon). *Anal Bioanal Chem* 1099–1110. doi:10.1007/s00216-013-7286-2
- Belles, A., Tapie, N., Pardon, P., 2014b. Development of the performance reference compound approach for the calibration of “ polar organic chemical integrative sampler ” (POCIS). *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 1131–1140. doi:10.1007/s00216-013-7297-z
- Bellet, V., Hernandez-raquet, G., Dagnino, S., Seree, L., Pardon, P., Bancon-Montiny, C., Fenet, H., Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Cavailles, V., Budzinski, H., Antignac, J.P., Balaguer, P., 2012. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Res.* 6, 1912–1922. doi:10.1016/j.watres.2012.01.013
- Benotti, M.J., Brownawell, B.J., 2007. Distributions of pharmaceuticals in an urban estuary during both dry- and wet-weather conditions. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5795–5802.
- Benotti, M.J., Brownawell, B.J., 2009. Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. *Environ. Pollut.* 157, 994–1002. doi:10.1016/j.envpol.2008.10.009
- Besse, J., Garric, J., 2008. Human pharmaceuticals in surface waters : Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicol. Lett.* 176, 104–123. doi:10.1016/j.toxlet.2007.10.012
- Beyer-Westendorf, J., Gelbricht, V., Förster, K., Ebertz, F., Röllig, D., Schreier, T., Tittl, L., Thieme, C., Hänsel, U., Köhler, C., Werth, S., Kuhlisch, E., Stange, T., Röder, I., Weiss, N., 2014. Safety of switching from vitamin K antagonists to dabigatran or rivaroxaban in daily care--results from the Dresden NOAC registry. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 78, 908–17.
- Białk-Bielinska, A., Caban, M., Pieczynska, A., Stepnowski, P., Stolte, S., 2017. Mixture toxicity of six sulfonamides and their two transformation products to green algae *Scenedesmus vacuolatus* and duckweed *Lemna minor*. *Chemosphere* 173, 542–550. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.01.035
- Blanchoud, H., Moreau-guigon, E., Farrugia, F., Chevreuril, M., Mouchel, J.M., 2007. Contribution by urban and agricultural pesticide uses to water contamination at the scale of the Marne watershed. *Sci. Total Environ.* 375, 168–179. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.12.009
- Blanchoud, H., Barriuso, E., Chevreuril, M., Guery, B., Moreau-Guigon, E., Schott, C., Théry, S., Tournebize, J., 2011. Les pesticides dans le bassin de la Seine. Program. PIREN-SEINE 67.
- Bletsou, A.A., Jeon, J., Hollender, J., Archontaki, E., Thomaidis, N.S., 2015. Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. *Trends Anal. Chem.* 66, 32–44. doi:10.1016/j.trac.2014.11.009
- Bobe, A., Meallier, P., Coste, C.M., 1998. Kinetics and Mechanisms of Abiotic Degradation of Fipronil (Hydrolysis and Photolysis). *J. Agric. Food Chem.* 46, 2834–2839.
- Boig, F.S., Costa, G.W., Osvar, I., 1953. Ultraviolet Absorption Spectra in the Thiophene Series. Halogen and Nitro Derivatives. *J. Org. Chem.* 18, 775–778.
- Boix, C., Ibanez, M., Sancho, J., Parsons, J., De Voogt, P., Hernandez, F., 2015. Biotransformation of pharmaceuticals in surface water and during waste water treatment: identification and occurrence of transformation products. *J. Hazard. Mater.* 302, 175–187. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.09.053
- Booij, K., Smedes, F., van Weerlee, E.M., 2002. Spiking of performance reference compounds in low density polyethylene and silicone passive water samplers. *Chemosphere* 46, 1157–61.
- Booij, P., Vethaak, A.D., Leonards, P.E.G., Sjollem, S.B., Kool, J., Voogt, P. De, Lamoree, M.H., 2014. Identification of photosynthesis inhibitors of pelagic marine algae using 96-well plate microfractionation for enhanced throughput in Effect-Directed Analysis. *Environ. Sci. Technol.* 48,

8003–8011.

- Botta, F., Lavisson, G., Couturier, G., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Fauchon, N., Guery, B., Chevreuil, M., Blanchoud, H., 2009. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. *Chemosphere* 77, 133–139. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.05.008
- Botta, F., Dulio, V., 2014. Résultats de l'étude prospective 2012 sur les contaminants émergents dans les eaux de surface continentales de la métropole et des DOM, Rapport final DRC-13-136939-12927A.
- Botta, F., Dulio, V., 2012. Etude sur les contaminants émergents dans les eaux françaises Résultats de l'étude prospective 2012 sur les contaminants émergents dans les eaux de surface continentales de la métropole et des DOM. ONEMA.
- Brack, W., 2003. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 397–407. doi:10.1007/s00216-003-2139-z
- Brack, W., 2011. *Effect-Directed Analysis of Complex Environmental Contamination*, Springer. ed, *The Handbook of Environmental Chemistry*.
- Brack, W., Govender, S., Schulze, T., Krauss, M., Hu, M., Muz, M., Hollender, J., Schirmer, K., Schollee, J., Hidasi, A., Slobodnik, J., Rabova, Z., Ait-aïssa, S., Sonavane, M., Carere, M., Lamoree, M., Leonards, P., Tufi, S., Ouyang, X., Schriks, M., Thomas, K., Almeida, A.C. De, Froment, J., Hammers-wirtz, M., Ahel, M., Koprivica, S., Hollert, H., Seiler, T., Di Paolo, C., Tindall, A., Spirhanzlova, P., 2013. EDA-EMERGE: an FP7 initial training network to equip the next generation of young scientists with the skills to address the complexity of environmental contamination with emerging pollutants. *Environ. Sci. Eur.* 25, 1–7.
- Brack, W., Ait-aïssa, S., Burgess, R.M., Busch, W., Creusot, N., Di, C., Escher, B.I., Hewitt, L.M., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Jonker, W., Kool, J., Lamoree, M., Muschket, M., Neumann, S., Rostkowski, P., Ruttkies, C., Schollee, J., Schymanski, E.L., Schulze, T., Seiler, T., Tindall, A.J., Aragão, G. De, Vrana, B., Krauss, M., 2016. Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments — An in-depth overview. *Sci. Total Environ.* 544, 1073–1118. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.102
- Brack, W., Dulio, V., Ågerstrand, M., Allan, I., Altenburger, R., Brinkmann, M., Bunke, D., Burgess, R.M., Cousins, I., Escher, B.I., Hernández, F.J., Hewitt, L.M., Hilscherová, K., Hollender, J., Hollert, H., Kase, R., Klauer, B., Lindim, C., López, D., Miège, C., Munthe, J., Toole, S.O., Posthuma, L., Rüdél, H., Schäfer, R.B., Sengl, M., Smedes, F., Meent, D. Van De, Brink, P.J. Van Den, Gils, J. Van, Wezel, A.P. Van, Vethaak, A.D., Vermeirssen, E., Ohe, P.C. Von Der, Vrana, B., 2017. Towards the review of the European Union Water Framework management of chemical contamination in European surface water resources. *Sci. Total Environ.* 576, 720–737. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.104
- Brenon, I., Le Hir, P., 1999. Modelling the turbidity maximum in the Seine Estuary (France): Identification of formation. *Estuarine, Coastal Shelf Sci.* 49, 525–544.
- Brieudes, V., Lardy-Fontan, S., Lalere, B., Vaslin-reimann, S., Budzinski, H., 2016. Validation and uncertainties evaluation of an isotope dilution-SPE-LC – MS/MS for the quantification of drug residues in surface waters. *Talanta* 146, 138–147. doi:10.1016/j.talanta.2015.06.073
- Brownawell, B.J., 2007. Distributions of pharmaceuticals in an urban estuary during both dry- and wet-weather conditions. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5795–5802.
- Bu, Q., Shi, X., Yu, G., Huang, J., Wang, B., 2016. Assessing the persistence of pharmaceuticals in the aquatic environment: Challenges and needs. *Emerg. Contam.* 2, 145–147. doi:10.1016/j.emcon.2016.05.003
- Budzinski, H., Forget-Leray, J., Aït-Aïssa, 2012. Etude de la contamination par les médicaments de l'estuaire de Seine (MEDSEINE).
- Budzinski, H., Forget-Leray, J., Aït-Aïssa, S., 2014. MEDSEINE, étude de la contamination par les médicaments de l'estuaire de Seine. Application des capteurs passifs à un meilleur diagnostic de leur présence, flux, et impact toxique. *Rapp. Seine-Aval*.

- Bueno-Martínez, M., Ulaszewska, M.M., Gomez, M.J., Hernando, M.D., Fernández-alba, A.R., 2012. Simultaneous measurement in mass and mass / mass mode for accurate qualitative and quantitative screening analysis of pharmaceuticals in river water. *J. Chromatogr. A* 1256, 80–88. doi:10.1016/j.chroma.2012.07.038
- Bueno-Martínez, M.J.M., Herrera, S., Munaron, D., 2014. POCIS passive samplers as a monitoring tool for pharmaceutical residues and their transformation products in marine environment. *environ. Sci. Pollut. Res.* doi:10.1007/s11356-014-3796-5
- Busch, J., Ahrens, L., Sturm, R., Ebinghaus, R., 2010. Polyfluoroalkyl compounds in landfill leachates. *Environ. Pollut.* 158, 1467–1471. doi:10.1016/j.envpol.2009.12.031
- Busch, W., Schmidt, S., Kühne, R., Schulze, T., Krauss, M., Altenburger, R., 2016. Micropollutants in European Rivers: A Mode of Action survey to support the development of Effect-Based Tools for water monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1887–1899. doi:10.1002/etc.3460
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Menach, K. Le, Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary ( Normandy , France ). *Aquat. Toxicol.* 79, 257–267. doi:10.1016/j.aquatox.2006.06.014
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., Lemenach, K., Budzinski, H., 2007a. Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* ( Calanoïd , copepoda ). Part 1 : PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270–280. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.05.095
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Lardy-fontan, S., Augagneur, S., Budzinski, H., 2007b. Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* ( Calanoïd , copepod ). Part 2 : Alkylphenol-polyethoxylates. *Chemosphere* 70, 281–287. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.06.012
- Cailleaud, K., Forget-leray, J., Peluhet, L., Lemenach, K., Souissi, S., Budzinski, H., 2009. Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environ. Pollut.* 157, 64–71. doi:10.1016/j.envpol.2008.07.026
- Calisto, V., Domingues, M., Esteves, V.I., 2011. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments: Kinetics and photodegradation products. *Water Res.* 5, 1–10. doi:10.1016/j.watres.2011.09.008
- Calza, P., Medana, C., Carbone, F., Giancotti, V., Baiocchi, C., 2008. Characterization of intermediate compounds formed upon photoinduced degradation of quinolones by high-performance liquid chromatography / high-resolution multiple-stage mass spectrometry. *Rapid communications mass Spectrom.* 22, 1533–1552. doi:10.1002/rcm
- Campos-manas, M.C., Plaza-bolanos, P., Sánchez-pérez, J.A., Malato, S., Agüera, A., 2017. Fast determination of pesticides and other contaminants of emerging concern in treated wastewater using direct injection coupled to highly sensitive ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1507, 84–94. doi:10.1016/j.chroma.2017.05.053
- Capdeville, M.J., 2011. Etudes des cycles biogéochimiques des contaminants organiques dits “émérgents” dans les systèmes aquatiques, n°4303. Thèse. Université de Bordeaux.
- Caracciolo, A.B., Patrolecco, L., Lenola, M. Di, Grenni, P., 2012. Degradation of Emerging Pollutants in Aquatic Ecosystems. *Chem. Eng. Trans.* 28, 37–42.
- Carbajo, J.B., Petre, A.L., Rosal, R., Herrera, S., Letón, P., García-calvo, E., Fernández-alba, A.R., Perdigón-melón, J.A., 2015. Continuous ozonation treatment of ofloxacin: Transformation products , water matrix effect and aquatic toxicity. *J. Hazard. Mater.* 292, 34–43. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.02.075
- Carere, M., Polesello, S., Sollazzo, C., 2012. Foreword chemical monitoring and emerging pollutants in the common implementation strategy of the Water Framework Directive. *Trends Anal. Chem.* 36, 12–14. doi:10.1016/j.trac.2012.04.008



- Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-souali, A., Tamisier-karolak, S., Levi, Y., 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci. Total Environ.* 324, 55–66. doi:10.1016/j.scitotenv.2003.10.035
- Carlson, C.A., Del Giorgio, P.A., Herndl, G.J., 2007. Microbes and the dissipation of energy and respiration: from cells to ecosystems. *Oceanography* 20, 89–100. doi:http://dx.doi.org/10.5670/oceanog.2007.52
- 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.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D., Zuccato, E., 2006. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environ. Sci. Technol.* 40, 357–363. doi:10.1021/es050991m
- Castillo, M., Barceló, D., 1999. Identification of polar toxicants in industrial wastewaters using toxicity-based fractionation with liquid chromatography / mass spectrometry. *Anal. Chem.* 71, 3769–3776. doi:10.1021/ac990364d
- Challis, J.K., Hanson, M.L., Friesen, K.J., Wong, C.S., 2014. A critical assessment of the photodegradation of pharmaceuticals in aquatic environments : defining our current understanding and identifying knowledge gaps. *Environ. Sci. Process. impacts* 16, 672–696. doi:10.1039/c3em00615h
- Chibwe, L., Titaley, I.A., Hoh, E., Simonich, S.L.M., 2016. Integrated framework for identifying toxic transformation products in complex environmental mixtures. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 4, 32–43. doi:10.1021/acs.estlett.6b00455
- Chong, N., 2009. Modeling the acclimation of activated sludge to a xenobiotic. *Bioresour. Technol.* 100, 5750–5756. doi:10.1016/j.biortech.2009.06.071
- Choubert, J.M., Ruel, S.M., Esperanza, M., Budzinski, H., Mie, C., Lagarrigue, C., Coquery, M., 2011. Limiting the emissions of micropollutants : what efficiency can we expect from wastewater treatment plants ? *Water Sci. Technol.* 57–65. doi:10.2166/wst.2011.009
- Choubert, J.M., Pomies, M., Ruel, S.M., Budzinski, H. S., Wisniewski, M., Coquery, 2012. Élimination des micropolluants par les stations d'épuration domestiques. *Sci. Eaux Territ.* 9, 6–15.
- Clarke, B.O., Anumol, T., Barlaz, M., Snyder, S.A., 2015. Investigating landfill leachate as a source of trace organic pollutants. *Chemosphere* 127, 269–75. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.02.030
- Comber, S.D.W., 1999. Abiotic persistence of atrazine and simazine in water. *Pestic. Sci.* 702, 696–702.
- Coors, A., Jones, P.D., Giesy, J.P., Ratte, H.T., 2003. Removal of estrogenic activity from municipal waste landfill leachate assessed with a bioassay based on reporter gene expression. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3430–3434. doi:10.1021/es0300158
- Creusot, N., 2011. Contribution de l'approche effect direct analysis à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques. Université de Brdeaux.
- Creusot, N., Budzinski, H., Balaguer, P., Kinani, S., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S., 2013a. Effect-directed analysis of endocrine-disrupting compounds in multi-contaminated sediment: identification of novel ligands of estrogen and pregnane X receptors. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 2553–2566. doi:10.1007/s00216-013-6708-5
- Creusot, N., Tapie, N., Piccini, B., Balaguer, P., Porcher, J., 2013b. Distribution of steroid- and dioxin-like activities between sediments , POCIS and SPMD in a French river subject to mixed pressures. *ecotoxicology Environ. Toxicol.* 20, 2784–2794. doi:10.1007/s11356-012-1452-5
- Creusot, N., Tapie, N., Pardon, P., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J., Budzinski, 2014. Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. *Environ. Sci. Technol.* 48, 6549–3657. doi:dx.doi.org/10.1021/es405313r |

- Cruz, J.M., 2016. Etude de la contamination par les pesticides des milieux eau , air et sols : developpement de nouveaux outils et application à l'estuaire de la Gironde. Université de Bordeaux.
- Cruzeiro, C., Rocha, E., Angelo, M., Jo, M., 2016. Seasonal-spatial survey of pesticides in the most signifi cant estuary of the Iberian Peninsula e the Tagus River estuary. *J. Clean. Prod.* 126, 419–427. doi:10.1016/j.jclepro.2016.03.005
- Cruzeiro, C., Rocha, E., João, M., 2017. Determination of 54 pesticides in waters of the Iberian Douro River estuary and risk assessment of environmentally relevant mixtures using theoretical approaches and *Artemia salina* and *Daphnia magna* bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 126–134. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.07.010
- Cullington, J.E., Walker, A., 1999. Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biol. Biochem.* 31, 677–686.
- Cwiertny, D.M., Snyder, S.A., Schlenk, D., Kolodziej, E.P., 2014. Environmental Designer Drugs: When Transformation May Not Eliminate Risk. *Environ. Sci. Technol.* 48, 11737–11745.
- Daginnus, K., Gottardo, S., Payá-pérez, A., Whitehouse, P., Wilkinson, H., Zalivar, J.M., 2011. A Model-based prioritisation exercise for the European Water Framework Directive. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 435–455. doi:10.3390/ijerph8020435
- Dauvin, J., Ruellet, T., 2009. The estuarine quality paradox : Is it possible to define an ecological quality status for specific modified and naturally stressed estuarine ecosystems ? *Mar. Pollut. Bull.* 59, 38–47. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.11.008
- Deeb, A.A., Stephan, S., Schmitz, O.J., Schmidt, T.C., 2017. Suspect screening of micropollutants and their transformation products in advanced wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 602, 1247–1253. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.271
- Delfosse, V., Grimaldi, M., Pons, J., Boulahtouf, A., Cavailles, V., 2012. Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. doi:10.1073/pnas.1203574109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1203574109
- Dévier, M.-H., Mazellier, P., Ait-Aïssa, S., Budzinski, H., 2011. New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures. *Comptes Rendus Chim.* 14, 766–779. doi:10.1016/j.crci.2011.04.006
- Dévier, M., Le Ménach, K., Viglino, L., Di, L., Lachassagne, P., Budzinski, H., 2013. Ultra-trace analysis of hormones , pharmaceutical substances , alkylphenols and phthalates in two French natural mineral waters. *Sci. Total Environ.* 443, 621–632. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.10.015
- Diamond, J.M., Latimer, H.A., Munkittrick, K.R., Thornton, K.W., Bartell, S.M., Kidd, K.A., 2011. Prioritizing contaminants of emerging concern for ecological screening assessments. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2385–2394. doi:10.1002/etc.667
- Di Nica, V., Menaballi, L., Azimonti, G., Finizio, A., 2015. RANKVET : A new ranking method for comparing and prioritizing the environmental risk of veterinary pharmaceuticals. *Ecol. Indic.* 52, 270–276. doi:10.1016/j.ecolind.2014.12.021
- Directive 98/8/EC, 2015. Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market.
- Drewes, J.E., Letzel, T., 2016. Chemicals of emerging concern and their transformation products in the aqueous environment.
- Dufour, V., 2017. Etude de la contamination chimique des ressources en eau en lien avec la pression urbaine et les changements globaux - Application à l'agglomération Bordelaise. Université de Bordeaux.
- Dulio, V., Andres, S., 2012. Référentiel méthodologique pour la priorisation des micropolluants des milieux aquatiques-rapport ONEMA.

- Dulio, V., Andres, S., Dulio, V., 2013. Recommandations du Comité Experts Priorisation auprès du MEDDE pour la sélection des substances pertinentes à surveiller dans les milieux aquatiques pour le second cycle de la DCE (2016-2021), Rapport SQUAREF 2013.
- Dulio, V., Von der Ohe, P. carsten, 2013. NORMAN prioritisation framework for emerging substances.
- Dulio, V., Slobodnik, J., 2015. In response: the NORMAN perspectives on prioritization of emerging pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 2181–2187. doi:10.1002/etc.3046
- Dupont, C.J., Dupont, A.J., Guézennec, L., Lafite, R., Hir, P. Le, Lesueur, P., Brenon, C.I., Jacinto, R.S., Ficht, A., Lesourd, S., Mouchel, J., 2009. Matériaux fins : le cheminement des particules en suspension, Programme Seine aval.
- Ebele, J.A., Abdallah, M.A., Harrad, S., 2017. Pharmaceuticals and personal care products ( PPCPs ) in the freshwater aquatic environment. *Emerg. Contam.* 1–16. doi:10.1016/j.emcon.2016.12.004
- Eggen, R.I.L., Hollender, J., Joss, A., Scha, M., 2014. Reducing the discharge of micropollutants in the aquatic environment: The Benefits of upgrading Wastewater Treatment Plants. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7683–7689.
- Eggen, T., Moeder, M., Arukwe, A., 2010. Municipal landfill leachates: A significant source for new and emerging pollutants. *Sci. Total Environ.* 408, 5147–5157. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.07.049
- El-Helou, N., Al-Hajje, A., Ajrouche, R., Awada, S., Rachidi, S., Zein, S., Salameh, P., 2013. Adverse drug events associated with vitamin K antagonists: factors of therapeutic imbalance. *Vasc. Heal. Risk Manag.* 9, 81–8.
- Englert, D., Zubrod, J.P., Schulz, R., Bundschuh, M., 2015. Variability in ecosystem structure and functioning in a low order stream : Implications of land use and season. *Sci. Total Environ.* 538, 341–349. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.08.058
- Escher, B.I., Baumgartner, R., Lienert, J., Fenner, K., 2009. Predicting the ecotoxicological effects of transformation products. *Hdb Env. Chem.* 2, 205–244.
- Escher, B.I., Fenner, K., 2011. Recent advances in environmental risk assessment of transformation products. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3835–3847. doi:DOI: 10.1021/es1030799
- Escher, B.I., Allinson, M., Altenburger, R., Bain, P.A., Balaguer, P., Busch, W., Crago, J., Denslow, N.D., Dopp, E., Hilscherova, K., Humpage, A.R., Kumar, A., Grimaldi, M., Jayasinghe, B.S., Jarosova, B., Jia, A., Makarov, S., Maruya, K.A., Medvedev, A., Mehinto, A.C., Mendez, J.E., Poulsen, A., Prochazka, E., Richard, J., Schi, A., Schlenk, D., Scholz, S., Shiraiishi, F., Snyder, S., Su, G., Tang, J.Y.M., Burg, B. Van Der, Linden, S.C. Van Der, Werner, I., Westerheide, S.D., Wong, C.K.C., Yang, M., Yeung, B.H.Y., Zhang, X., Leusch, F.D.L., 2014. Benchmarking Organic Micropollutants in Wastewater, Recycled Water and Drinking Water with In Vitro Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1940–1956.
- Etcheber, H., Taillez, A., Abril, G., Garnier, J., Servais, P., Moatar, F., Commarieu, M.V., 2007. Particulate organic carbon in the estuarine turbidity maxima of the Gironde , Loire and Seine estuaries : origin and lability. *Hydrobiologia* 588, 245–259. doi:10.1007/s10750-007-0667-9
- Etcheber, H., Servais, P., Garnier, J., Billen, G., 2008. Organic matter dynamics and budgets in the turbidity maximum zone of the Seine Estuary (France). *Estuarine, Coastal Shelf Sci.* 77, 150–162. doi:10.1016/j.ecss.2007.09.019
- European Commission, 1998. Directive 98/8/EC.
- European Commission, 2016. EU Pesticides database [WWW Document].
- European Environment Agency, 2012. European waters — assessment of status and pressures.
- European Parliament, 2016. Setting criteria on endocrine disruptors Follow-up to the General Court judgment.
- Eurostat, 2014. Pesticide sales statistics [WWW Document].

- Even, S., Thouvenin, B., Bacq, N., Billen, G., Garnier, J., Guezennec, L., Blanc, S., Ficht, A., Le Hir, P., 2007. An integrated modelling approach to forecast the impact of human pressure in the Seine estuary. *Hydrobiologia* 588, 13–29. doi:10.1007/s10750-007-0649-yeVidal, 2017. data bank [online]. www.eVidal.fr.
- Fatta-Kassinos, D., Meric, S., Nikolaou, A., 2011. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal Bioanal Chem* 399, 251–275. doi:10.1007/s00216-010-4300-9
- Fatta-Kassinos, D., Vasquez, M.I., Kümmerer, K., 2011. Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes – Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere* 85, 693–709. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.06.082
- Fauvelle, V., Feret, T., Madarassou, K., Mazzella, N., 2015. Evaluation of titanium dioxide as a binding phase for the Passive Sampling of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in an aquatic environment. *Anal. Chem.* 87, 6004–6009. doi:10.1021/acs.analchem.5b00194
- Fenet, H., Gomez, E., Pillon, A., Rosain, D., Nicolas, J., Casellas, C., Balaguer, P., Avenue, D.P., Flahault, C., 2003. Estrogenic Activity in Water and Sediments of a French River: Contribution of Alkylphenols. *Environ. Contam. Toxicol.* 6, 1–6. doi:10.1007/s00244-002-1198-z
- Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L., Elsner, M., 2013. Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. *Science* (80- ). 341, 752. doi:10.1126/science.1236281
- Fent, K., Kunz, P.Y., Zenker, A., Rapp, M., 2010. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters. *Mar. Environ. Res.* 69, S4–S6. doi:10.1016/j.marenvres.2009.10.010
- Fitzhugh, R., Lovett, G., Vanterea, R., 2003. Biotic and abiotic immobilization of ammonium, nitrite, and nitrate in soils developed under different tree species in the Catskill Mountains, New York, USA. *Global Chang. Biol.* 9, 1591–1601. doi:10.1046/j.1529-8817.2003.00694.x
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S., Wallace, E., 2012. Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *J. Environ. Manage.* 104, 19–34. doi:10.1016/j.jenvman.2012.03.021
- Fol, V. Le, Selim, A., Cabaton, N., Dolo, L., Grimaldi, M., Balaguer, P., Perdu, E., Debrauwer, L., Zalko, D., 2015. Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-S in Zebrafish and Human in vitro models used for toxicity and estrogenicity screening. *Environ. Sci. Technol.* 49, 3860–3868. doi:10.1021/es505302c
- Fram, M.S., Belitz, K., 2011. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. *Sci. Total Environ.* 409, 3409–3417. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.05.053
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., Wenzel, A., 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36, 1429–1438. doi:10.1016/S0043-1354(01)00367-0
- Frost, C., Wang, J., Nepal, S., Schuster, A., Barrett, Y.C., Mosqueda-Garcia, R., Reeves, R.A., LaCreta, F., 2013. Apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor: single dose safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and food effect in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75, 476–87.
- Funke, J., Prasse, C., Ternes, T.A., 2016. Identification of transformation products of antiviral drugs formed during biological wastewater treatment and their occurrence in the urban water cycle. *Water Res.* 98, 75–83. doi:10.1016/j.watres.2016.03.045
- Gago-ferrero, P., Díaz-cruz, M.S., Barceló, D., 2015. UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. *Sci. Total Environ.* 518–519, 518–525. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.026
- Gago-Ferrero, P., Schymanski, E.L., Hollender, J., Thomaidis, N., 2016. Nontarget analysis of environmental samples based on liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS), *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/bs.coac.2016.01.012

- Garcia, F.P., Ascencio, S.Y.C., Oyarzun, J.C.G., Hernandez, A.C., Alavarado, P.V., 2012. Pesticides : classification , uses and toxicity . Measures of exposure and genotoxic risks. *J. Res. Environ. Sci. Toxicol.* 1, 279–293.
- Gardia-Parège, C., 2015. Développement et applications de l'approche dirigée par les effets pour la recherche et l'identification de contaminants à risque pour les écosystèmes aquatiques. Thèse.
- Gaspéri, J., Moreau-guigon, E., Labadie, P., Alliot, F., Desportes, A., Bourges, C., Chevreuil, M., Cladière, M., Lorgeoux, C., Miège, C., Bados, P., Coquery, M., Oziol, L., Bimbot, M., Huteau, V., Karolak, S., Levi, Y., 2010. Contamination de la Seine par les micropolluants organiques : évolution selon les conditions hydriques et l'urbanisation-PIREN-SEINE (Phase 5).
- Ge, L., Na, G., Zhang, S., Li, K., Zhang, P., Ren, H., Yao, Z., 2015. New insights into the aquatic photochemistry of fluoroquinolone antibiotics : Direct photodegradation , hydroxyl-radical oxidation , and antibacterial activity changes. *Sci. Total Environ.* 527–528, 12–17. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.04.099
- Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., Ploeg, M. Van Der, Zee, S.E.A.T.M. Van De, Ritsema, C.J., 2015. Emerging pollutants in the environment : A challenge for water resource management. *Int. Soil Water Conserv. Res.* 3, 57–65. doi:10.1016/j.iswcr.2015.03.002
- Ghosh, P., Shekhar Thakur, I., Kaushik, A., 2017. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 141, 259–270. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.03.023
- Giacomazzi, S., Cochet, N., 2004. Environmental impact of diuron transformation : a review. *Chemosphere* 56, 1021–1032. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.04.061
- Giesy, J.P., Hilscherova, K., Jones, P.D., Kannan, K., Machala, M., 2002. Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 3–16. doi:10.1016/S0025-326X(02)00097-8
- Glausiusz, B.Y.J., 2014. The plastics puzzle. *Nature* 508, 7–9.
- Gong, Y., Tian, H., Wang, L., Yu, S., Ru, S., 2014. An integrated approach combining chemical analysis and an in vivo bioassay to assess the estrogenic potency of a municipal solid waste landfill leachate in Qingdao. *PLoS One* 9, e95597. doi:10.1371/journal.pone.0095597
- Goñi-Urriza, M.S., Point, D., Amouroux, D., Guyoneaud, R., Donard, O.F.X., Caumette, P., Duran, R., 2007. Bacterial community structure along the Adour estuary (French Atlantic coast): Influence of salinity gradient versus metal contamination. *Aquat. Microb. Ecol.* 49, 47–56. doi:10.3354/ame01128
- Gonzalez-Rey, M., Tapie, N., Le, K., Dévier, M., Budzinski, H., João, M., 2015. Occurrence of pharmaceutical compounds and pesticides in aquatic systems. *Mar. Pollut. Bull.* 96, 384–400. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.04.029
- Gorga, M., Petrovic, M., Barceló, D., 2013. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1295, 57–66.
- Götz, C.W., Stamm, C., Fenner, K., Singe, H., Schärer, M., Hollender, J., 2010. Targeting aquatic microcontaminants for monitoring : exposure categorization and application to the Swiss situation. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 17, 341–354. doi:10.1007/s11356-009-0167-8
- Gou, N., Yuan, S., Lan, J., Gao, C., Alshawabkeh, A.N., Gu, A.Z., 2014. A quantitative toxicogenomics assay reveals the evolution and nature of toxicity during the transformation of environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8855–8863.
- Grenni, P., Patrolecco, L., Ademollo, N., Tolomei, A., Barra, A., 2013. Degradation of Gemfibrozil and Naproxen in a river water ecosystem. *Microchem. J.* 107, 158–164. doi:10.1016/j.microc.2012.06.008
- Grignard, E., Lapenna, S., Bremer, S., 2012. Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicol. Vitro.* 26, 727–731. doi:10.1016/j.tiv.2012.03.013

- Grindlay, A.L., Zamorano, M., Rodríguez, M.I., Molero, E., Urrea, M.A., 2011. Implementation of the European Water Framework Directive: Integration of hydrological and regional planning at the Segura River Basin, southeast Spain. *Land use policy* 28, 242–256. doi:10.1016/j.landusepol.2010.06.005
- Gros, M., Cruz-morato, C., Marco-urrea, E., 2014. Biodegradation of the X-ray contrast agent iopromide and the fluoroquinolone antibiotic ofloxacin by the white rot fungus *Trametes versicolor* in hospital wastewaters and identification of degradation products. *Water Res.* 60, 228–241. doi:10.1016/j.watres.2014.04.042
- Gros, M., Williams, M., Llorca, M., Rodriguez-mozaz, S., Barceló, D., Kookana, R.S., 2015. Photolysis of the antidepressants amisulpride and desipramine in wastewaters: Identification of transformation products formed and their fate. *Sci. Total Environ.* 530–531, 434–444. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.05.135
- Grung, M., Lichtenthaler, R., Ahel, M., Tollefsen, K.-E., Langford, K., Thomas, K. V., 2007. Effects-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia. *Chemosphere* 67, 108–120. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.09.021
- Guibal, R., Lissalde, S., Leblanc, J., Cleries, K., Charriau, A., Poulier, G., Mazzella, N., Rebillard, J., Brizard, Y., Guibaud, G., 2017. Two sampling strategies for an overview of pesticide contamination in an agriculture-extensive headwater stream. *Environ. Sci. Pollut. Res.* doi:10.1007/s11356-017-9883-7
- Guillén, D., Ginebreda, A., Farré, M., Darbra, R.M., Petrovic, M., Gros, M., Barceló, D., 2012. Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment: Analytical, modeling and regulatory perspective. *Sci. Total Environ.* 440, 236–252. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.06.064
- Gulseth, M.P., Michaud, J., Nutescu, E., 2008. Rivaroxaban: an oral direct inhibitor of factor Xa. *Am. J. Heal. Syst. Pharm.* 65, 1520–9.
- Hansen, A.M., Kraus, T.E.C., Pellerin, B.A., Fleck, J.A., Downing, B.D., Bergamaschi, B.A., 2016. Optical properties of dissolved organic matter (DOM): Effects of biological and photolytic degradation. *Limnol. Oceanogr.* 61, 1015–1032. doi:10.1002/lno.10270
- Hanslik, T., Prinseau, J., 2004. The use of vitamin K in patients on anticoagulant therapy: a practical guide. *Am. J. Cardiovasc. Drug.* 4, 43–55.
- Hartnik, T., Norli, H.R., Eggen, T., Breedveld, G.D., 2007. Bioassay-directed identification of toxic organic compounds in creosote-contaminated groundwater. *Chemosphere* 66, 435–43. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.06.031
- Hernández, F., Ibá, M., Portolés, T., Cervera, M.I., Sancho, J. V, López, F.J., 2015. Advancing towards universal screening for organic pollutants in waters. *J. Hazard. Mater.* 282, 86–95.
- Holcapek, M., Jirásko, R., Lísa, M., 2012. Recent developments in liquid chromatography – mass spectrometry and related techniques. *J. Chromatogr. A* 1259, 3–15.
- Hubicka, U., Pawe, Ž., Barbara, Ž., Krzek, J., 2013. Photodegradation assessment of ciprofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin and ofloxacin in the presence of excipients from tablets by UPLC-MS / MS and DSC. *Chem. Cent. J.* 7, 1–12.
- Hubicka, U., Ruomska-Witek, B., Zmudski, P., Stanislawski, M., Krzek, J., 2014. Analytical Methods evaluation of the degradation process and spectrometry. *Anal. Methods* 6, 2490–2498. doi:10.1039/c3ay42300j
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Lebo, J. a, Almeida, F. V, Booij, K., Alvarez, D.A., Cranor, W.L., Clark, R.C., Mogensen, B.B., 2002. Development of the permeability/performance reference compound approach for in situ calibration of semipermeable membrane devices. *Environ. Sci. Technol.* 36, 85–91.
- Hug, C., Ulrich, N., Schulze, T., Brack, W., Krauss, M., 2014. Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. *Environ. Pollut.* 184, 25–32. doi:10.1016/j.envpol.2013.07.048

- Hughes, S.R., Kay, P., Brown, L.E., 2013. Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from River systems. *Environ. Sci. Technol.* 47, 661–677.
- Huguet, A., Vacher, L., Relexans, S., Saubusse, S., Froidefond, J.M., Parlanti, E., 2009. Organic Geochemistry Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Org. Geochem.* 40, 706–719. doi:10.1016/j.orggeochem.2009.03.002
- Huguet, A., Thibault, A., Roose-Amsaleg, C., Parlanti, E., Budzinski, H., Fuster, L., Laverman, A., 2017. Dynamique de la Matière Organique dans le bouchon vaseux de l'estuaire de Seine en lien avec les nutriments et les Contaminants organiques.
- Ibanez, M., Sancho, J. V., Mcmillan, D., Rao, R., Hernandez, F., 2008. Rapid non-target screening of organic pollutants in water by ultraperformance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.* 27, 481–489. doi:10.1016/j.trac.2008.03.007
- Iglesias, A., Nebot, C., Vázquez, B.I., Coronel-olivares, C., 2014. Monitoring the presence of 13 active compounds in surface water collected from rural areas in northwestern Spain. *Int. J. Environ. Heal.* 5251–5272. doi:10.3390/ijerph110505251
- INERIS, 2017. INERIS chemical portal [WWW Document]. URL <http://www.ineris.fr/substances/fr/>
- Jálová, V., Jaro, B., Bláha, L., Giesy, J.P., Ocelka, T., Grabic, R., Jur, J., Vrana, B., Hilscherová, K., 2013. Estrogen-, androgen- and aryl hydrocarbon receptor mediated activities in passive and composite samples from municipal waste and surface waters. *Environ. Int.* 59, 372–383. doi:10.1016/j.envint.2013.06.024
- Janecko, N., Pokludova, L., Blahova, J., Svobodova, Z., Literak, I., 2016. Implications of fluoroquinolones contamination for the aquatic environment—a review. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 2647–2656. doi:10.1002/etc.3552
- Janssen, C., Roose, P., 2011. Monitoring Chemical Pollution in Europe's Seas.
- Jarošová, B., Bláha, L., Giesy, J.P., Hilscherová, K., 2014. What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal waste waters can be considered as safe? *Environ. Int.* 64, 98–109.
- Jean, J., Perrodin, Y., Pivot, C., Trepo, D., Perraud, M., Droguet, J., Tissot-guerraz, F., Locher, F., 2012. Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. *J. Environ. Manage.* 103, 113–121. doi:10.1016/j.jenvman.2012.03.005
- Jia, A., Escher, B.I., Leusch, F.D.L., Tang, J.Y.M., Prochazka, E., Dong, B., Snyder, E.M., Snyder, S.A., 2016. In vitro bioassays to evaluate complex chemical mixtures in recycled water. *Water Res.* 1–11. doi:10.1016/j.watres.2015.05.020
- Jin, H., Zhu, L., 2016. Occurrence and partitioning of bisphenol analogues in water and sediment from Liaohe River Basin and Taihu Lake, China. *Water Res.* 103, 343–351. doi:10.1016/j.watres.2016.07.059
- Jongh, C.M. De, Kooij, P.J.F., Voogt, P. De, Laak, T.L., 2012. Screening and human health risk assessment of pharmaceuticals and their transformation products in Dutch surface waters and drinking water. *Sci. Total Environ.* 427–428, 70–77. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.04.010
- Jugan, M.L., Oziol, L., Bimbot, M., Huteau, V., Tamisier-Karolak, S., Blondeau, J.P., Lévi, Y., 2009. In vitro assessment of thyroid and estrogenic endocrine disruptors in wastewater treatment plants, rivers and drinking water supplies in the greater Paris area (France). *Sci. Total Environ.* 407, 3579–3587. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.01.027
- Kaartokallio, H., Asmala, E., Autio, R., Thomas, D.N., 2016. Bacterial production, abundance and cell properties in boreal estuaries: relation to dissolved organic matter quantity and quality. *Aquat. Sci.* 78, 525–540. doi:10.1007/s00027-015-0449-9
- Kang, J., Aasi, D., Katayama, Y., Kang, J., 2015. Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 8444. doi:10.1080/10408440701493103

- Kasad, P.A., 2013. Photolytic-Thermal degradation study And method development of Rivaroxaban by RP-HPLC. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 5, 1254.
- Kawagoshi, Y., Fujita, Y., Kishi, I., Fukunaga, I., 2003. Estrogenic chemicals and estrogenic activity in leachate from municipal waste landfill determined by yeast two-hybrid assay. *J. Environ. Monit.* 5, 269–74. doi:10.1039/b210962j
- Keller, A.A., Coleman, H.M., 2011. Chemical introductions to estuarine and coastal systems : Biodegradable organic chemicals, *Treatise on Estuarine and Coastal Science*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-374711-2.00804-4
- Kern, S., Fenner, K., Singer, H.P., Schwarzenbach, R., Hollender, J., 2009. Identification of transformation products of organic contaminants in natural waters by computer-aided prediction and high-resolution mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7039–7046.
- Khadra, A., Pinelli, E., Lacroix, M.Z., Bousquet-melou, A., Hamdi, H., Merlina, G., Guiresse, M., Hafidi, M., 2012. Ecotoxicology and environmental safety assessment of the genotoxicity of quinolone and fluoroquinolones contaminated soil with the *Vicia faba* micronucleus test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76, 187–192. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.10.012
- Khoo, C.W., Lip, G.Y., 2010. Insights from the dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation (RE-LY) trial. *Expert. Opin. Pharmacother.* 11, 685–7.
- Kinani, S., Bouchonnet, S., Creusot, N., Bourcier, S., Balaguer, P., Porcher, J., Ait-aïssa, S., 2010. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environ. Pollut.* 158, 74–83. doi:10.1016/j.envpol.2009.07.041
- Kinani, S., Soussi, Y., Kinani, A., Vujovic, S., Ait-aïssa, S., Bouchonnet, S., 2016. Photodegradation of fluorene in aqueous solution : Identification and biological activity testing of degradation products. *J. Chromatogr. A* 1442, 118–128. doi:10.1016/j.chroma.2016.03.012
- Klosterhaus, S.L., Grace, R., Hamilton, M.C., Yee, D., 2013. Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals , personal care products , and alkylphenols in surface waters , sediments , and mussels in an urban estuary. *Environ. Int.* 54, 92–99. doi:10.1016/j.envint.2013.01.009
- Köning, M., Escher, B.I., Neale, P.A., Krauss, M., Hilscherova, K., Novak, J., Teodorovic, I., Schulze, T., Seidensticker, S., Hashmi, M.A.K., Ahlheim, J., Brack, W., 2017. Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of in vitro bioassays and chemical analysis \* k f , Ivana Teodorovi. *Environ. Pollut.* 220, 1220–1230. doi:10.1016/j.envpol.2016.11.011
- Körner, W., Bolz, U., Süßmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V., Hagenmaier, H., 2000. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* 40, 1131–1142. doi:10.1016/S0045-6535(99)00362-8
- Koumaki, E., Mamais, D., Noutsopoulos, C., 2017. Environmental fate of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water / sediment systems. *J. Hazard. Mater.* 323, 233–241.
- Krauss, M., Singer, H., Hollender, J., 2010. LC – high resolution MS in environmental analysis : from target screening to the identification of unknowns 943–951. doi:10.1007/s00216-010-3608-9
- Kunkel, U., Radke, M., 2011. Reactive tracer test to evaluate the fate of pharmaceuticals in rivers. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6296–6302.
- Kunkel, U., Radke, M., 2012. Fate of pharmaceuticals in rivers : Deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions. *Water Res.* 46, 5551–5565. doi:10.1016/j.watres.2012.07.033
- Kunz, P.Y., Kienle, C., Carere, M., Homazava, N., Kase, R., 2015. In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *J. Pharm. Biomed. Anal.* doi:10.1016/j.jpba.2014.11.018
- Kurmi, M., Sahu, A., Singh, S., 2017. Stability behaviour of antiretroviral drugs and their combinations . 5: Characterization of novel degradation products of abacavir sulfate by mass and nuclear magnetic resonance spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 134, 372–384.



- Kusari, S., Prabhakaran, D., Lamshoft, M., Spitteller, M., 2009. In vitro residual anti-bacterial activity of difloxacin, sarafloxacin and their photoproducts after photolysis in water. *Environ. Pollut.* 157, 2722–2730. doi:10.1016/j.envpol.2009.04.033
- Kuzmanovi, M., Ginebreda, A., Petrovi, M., Barceló, D., 2014. Risk assessment based prioritization of 200 organic micropollutants in 4 Iberian rivers. *Sci. Total Environ.* 289–299. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.056
- Lanoux, A., 2013. Caractérisation et rôle respectif des apports organiques amont et locaux sur l'oxygénation des eaux de la Garonne estuariennes.
- Lanoux, A., Etcheber, H., Schmidt, S., Sottolichio, A., Richard, M., 2013. Factors contributing to hypoxia in a highly turbid, macrotidal estuary. *Environ. Sci. Process. Impacts* 15, 585–595. doi:10.1039/c2em30874f
- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environ. Pollut.* 163, 287–303. doi:10.1016/j.envpol.2011.12.034
- Lara-martín, P.A., González-mazo, E., Brownawell, B.J., 2011. Multi-residue method for the analysis of synthetic surfactants and their degradation metabolites in aquatic systems by liquid chromatography – time-of-flight-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 4799–4807. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.031
- Lara-Martín, P.A., González-Mazo, E., Petrovic, M., Barceló, D., Brownawell, B.J., 2014. Occurrence, distribution and partitioning of nonionic surfactants and pharmaceuticals in the urbanized Long Island Sound Estuary ( NY ). *Mar. Pollut. Bull.* 85, 710–719. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.01.022
- Le Coadou, L., Le Ménach, K., Labadie, P., Dévier, M., Pardon, P., Augagneur, S., Budzinski, H., 2016. Quality survey of natural mineral water and spring water sold in France: Monitoring of hormones, pharmaceuticals, pesticides, perfluoroalkyl substances, phthalates, and alkylphenols at the ultra-trace level. *Sci. Total Environ.* 1–12. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.11.174
- Lee, S., Liao, C., Song, G., Ra, K., Kannan, K., Moon, H., 2015. Emission of bisphenol analogues including bisphenol A and bisphenol F from wastewater treatment plants in Korea. *Chemosphere* 119, 1000–1006. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.09.011
- Legler, J., van Velzen, M., Cenijn, P.H., Houtman, C.J., Lamoree, M.H., Wegener, J.W., 2011. Effect-directed analysis of municipal landfill soil reveals novel developmental toxicants in the zebrafish *Danio rerio*. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8552–8. doi:10.1021/es201099s
- Lei, L., Aoyama, I., 2010. Effect-directed investigation and interactive effect of organic toxicants in landfill leachates combining Microtox test with RP-HPLC fractionation and GC / MS analysis. *Ecotoxicology* 19, 1268–1276. doi:10.1007/s10646-010-0511-2
- Lemoine, J.P., Verney, R., 2015. Fonctionnement hydro-sédimentaire de l'estuaire de Seine.
- Lesourd, S., Lesueur, O., Fisson, C., Dauvin, J.C., 2016. Sediment evolution in the mouth of the Seine estuary ( France ): A long-term monitoring during the last 150 years. *C.R. Geosci.* 348, 442–450.
- Letzel, T., Bayer, A., Schulz, W., Heermann, A., Lucke, T., Greco, G., Grosse, S., Schüssler, W., Sengl, M., Letzel, M., 2015. LC – MS screening techniques for wastewater analysis and analytical data handling strategies: Sartans and their transformation products as an example. *Chemosphere* 137, 198–206. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.06.083
- Leusch, F.D.L., Khan, S.J., Laingam, S., Prochazka, E., Froscio, S., Trinh, T., Chapman, H.F., Humpage, A., 2013. Assessment of the application of bioanalytical tools as surrogate measure of chemical contaminants in recycled water. *Water Res.* 49, 300–315. doi:10.1016/j.watres.2013.11.030
- Li, H., Helm, P., Metcalfe, C., 2010. Sampling in the great lakes for pharmaceuticals, personal care products, and endocrine-disrupting substances using the passive polar organic chemical integrative sampler. *Environ. Chem.* 29, 751–762. doi:10.1002/etc.104

- Li, Z., Sobek, A., Radke, M., 2016. Fate of pharmaceuticals and their transformation products in four small European Rivers receiving treated wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5614–5621. doi:10.1021/acs.est.5b06327
- Liang, C., Zhao, H., Deng, M., Quan, X., Chen, S., Wang, H., 2015. Impact of dissolved organic matter on the photolysis of the ionizable antibiotic norfloxacin. *J. Environ. Sci.* 27, 115–123.
- Liang, X., Chen, B., Nie, X., Shi, Z., Huang, X., Li, X., 2013. The distribution and partitioning of common antibiotics in water and sediment of the Pearl River Estuary, South China. *Chemosphere* 92, 1410–1416. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.044
- Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V.D., Mohd, M.A., Moon, H., Nakata, H., Kannan, K., 2012a. Bisphenol S in Urine from the United States and seven Asian countries: Occurrence and human exposures. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6860–6866.
- Liao, C., Liu, F., Kannan, K., 2012b. Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues.
- Liao, C., Liu, F., Moon, H., Yamashita, N., Yun, S., Kannan, K., 2012c. Bisphenol analogues in sediments from industrialized areas in the United States, Japan, and Korea: Spatial and temporal distributions.
- Liao, C., Kannan, K., 2014. A Survey of alkylphenols, bisphenols, and triclosan in Personal Care Products from China and the United States 50–59. doi:10.1007/s00244-014-0016-8
- Liscio, C., Abdul-sada, A., Al-salhi, R., Ramsey, M.H., Hill, E.M., 2014. Methodology for profiling anti-androgen mixtures in river water using multiple passive samplers and bioassay-directed analyses. *Water Res.* 57, 258–269. doi:10.1016/j.watres.2014.03.039
- Liu, Z., Zhou, X., Zhang, H., 2011. An integrated method for degradation products detection and characterization using hybrid ion trap / time-of-flight mass spectrometry and data processing techniques: Application to study of the degradation products of danofloxacin under stressed conditions. *Anal Bioanal Chem* 399, 2475–2486. doi:10.1007/s00216-010-4629-0
- Llorca, M., Badia-Fabregat, M., Rodriguez-Mozaz, Caminal, G., Vicent, T., Barceló, D., 2017. Fungal treatment for the removal of endocrine disrupting compounds from reverse osmosis concentrate: Identification and monitoring of transformation products of benzotriazoles. *Chemosphere* 184, 1054–1070. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.06.053
- Long, M., Strand, J., Lassen, P., Kru, T., Bossi, R., Larsen, M.M., Dahllo, I., Wiberg-larsen, P., 2014. Endocrine-disrupting effects of compounds in Danish streams. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 1–18. doi:10.1007/s00244-013-9959-4
- López-serna, R., Petrovi, 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. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.06.027
- Lopez, B., Laurent, A., 2013. Campagne exceptionnelle d'analyse des substances présentes dans les eaux souterraines de métropole. Rapport final. BRGM/RP-61853-FR.
- Louiz, I., Kinani, S., Gouze, M.-E., Ben-Attia, M., Menif, D., Bouchonnet, S., Porcher, J.M., Ben-Hassine, O.K., Aït-Aïssa, S., 2008. Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Sci. Total Environ.* 402, 318–329. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.05.005
- Luo, Y., Guo, W., Hao, H., Duc, L., Ibney, F., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473–474, 619–641. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.065
- Mack, J., Bolton, R.B., 1999. Photochemistry of nitrite and nitrate in aqueous solution: a review. *J. Photochem. Photobiol. A.* 128, 1–13.

- Madureira, V.T., Barreiro, C.J., Rocha, J.M., Rocha, E., Cass, B.Q., Tiritan, E.M., 2010. Spatio-temporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal). *Sci. Total Environ.* 408, 5513–5520. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.07.069
- Mailler, R., Gasperi, J., Vuillet, E., Buleté, A., Azimi, S., Rocher, V., 2017. Évaluation de l’empreinte en résidus pharmaceutiques et autres polluants émergents des rejets de STEP de l’agglomération parisienne. *L’Eau, L’Industrie, Les Nuisances*, Johanet.
- Malaj, E., Ohe, P.C. Von Der, Grote, M., Kühne, R., Mondy, C.P., Usseglio-polatera, P., 2014. Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. *PNAS* 111, 9546–9554. doi:10.1073/pnas.1321082111
- Mandarić, L., Celic, M., Marce, R., Petrovic, M., 2015. Introduction on emerging contaminants in rivers and their environmental risk, in: *Emerging Contaminants in River Ecosystems*. pp. 3–25. doi:10.1007/698
- Martínez Bueno, M.J., Herrera, S., Munaron, D., Boillot, C., Fenet, H., Chiron, S., Gomez, 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. doi:10.1007/s11356-014-3796-5
- Masiá, A., Campo, J., Blasco, C., Picó, Y., 2014. Ultra-high performance liquid chromatography – quadrupole time-of-flight mass spectrometry to identify contaminants in water: An insight on environmental forensics & J. Chromatogr. A 1345, 86–97. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.017
- Masoner, J.R., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Cozzarelli, I.M., Gray, J.L., Schwab, E.A., 2014. Contaminants of emerging concern in fresh leachate from landfills in the conterminous United States. *Environ. Sci. Process. Impacts* 16, 2335–54. doi:10.1039/c4em00124a
- Matamoros, V., Duhec, A., Abaiges, J., Bayona, J.M., 2009. Photodegradation of carbamazepine, ibuprofen, ketoprofen and 17  $\alpha$ -Ethinylestradiol in fresh and seawater. *Water air soil Pollut.* 196, 161–168. doi:10.1007/s11270-008-9765-1
- Mazzella, N., Dubernet, J.-F., Delmas, F., 2007. Determination of kinetic and equilibrium regimes in the operation of polar organic chemical integrative samplers. *J. Chromatogr. A* 1154, 42–51.
- Mazzella, N., Lassalde, S., Moreira, S., Delmas, F., Mazellier, P., Huckins, N.J., 2010. Evaluation of the use of Performance Reference Compounds in an Oasis-HLB adsorbent based passive sampler for improving water concentration estimates of polar herbicides in freshwater. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1713–1719.
- Mazzella, N., Coquery, M., Miège, C., Berho, C., Ghestern, J., Togola, A., Gonzalez, J., Tixier, C., Lardyfontan, S., 2011. Applicabilité des échantillonneurs passifs dans le cadre de la DCE. *Irstea*.
- Mery, J., Mendes, M., Mazeas, L., Touze-foltz, N., 2014. Evaluating the environmental impact of leachate leakage from landfills through aged geosynthetic barrier materials: A focus on phenolic compounds of holes at the end of geomembrane installation with 24, 401–413.
- Metre, P.C. Van, Alvarez, D.A., Mahler, B.J., Nowell, L., Sandstrom, M., Moran, P., 2017. Complex mixtures of Pesticides in Midwest U.S. streams indicated by POCIS time-integrating samplers. *Environ. Pollut. J.* 220, 431–440. doi:10.1016/j.envpol.2016.09.085
- Michel, N., Freese, M., Brinkmann, M., Pohlmann, J., Hollert, H., Kammann, U., Haarich, M., Theobald, N., Gerwinski, W., Rotard, W., Hanel, R., 2016. Fipronil and two of its transformation products in water and European eel from the river Elbe. *Sci. Total Environ.* 568, 171–179. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.210
- Mills, L.J., Chichester, C., 2005. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Sci. Total Environ.* 343, 1–34. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.12.070
- Minguez, L., Pédelucq, J., Farcy, E., Ballandonne, C., Budzinski, H., 2016. Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. *environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4992–5001. doi:10.1007/s11356-014-3662-5

- Ministère de l'Écologie et du Développement durable et de l'Énergie, 2013. Contamination des cours d'eau par les pesticides en 2011. *Commis. Général au Développement Durable* 436, 7.
- Mnif, W., Pillon, A., Balaguer, P., Bartegi, A., 2006. Les perturbateurs endocriniens xénoœstrogéniques : mécanismes moléculaires et méthodes de détection. *Thérapie* 61, 313–323. doi:DOI: 10.2515/therapie:2007062
- Mnif, W., Ibn, A., Hassine, H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., 2011. Effect of endocrine disruptor pesticides : A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* 8, 2265–2303. doi:10.3390/ijerph8062265
- Montes-grajales, D., Fennix-agudelo, M., Miranda-castro, W., 2017. Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources : A review. *Sci. Total Environ.* 595, 601–614. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.286
- Morin, N., Arp, H.P.H., Hale, S.E., 2015. Bisphenol A in solid waste materials, leachate water, and air particles from Norwegian waste-handling facilities: presence and partitioning behavior. *Environ. Sci. Technol.* 49, 7675–7683. doi:10.1021/acs.est.5b01307
- Moschet, C., Wittmer, I., Simovic, J., Junghans, M., Piazzoli, A., Singer, H., Stamm, C., Leu, C., Hollender, J., 2014. How a complete pesticide screening changes the assessment of surface water quality. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5423–5432.
- Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. A new approach to data evaluation in the non-target screening of organic trace substances in water analysis. *Chemosphere* 85, 1211–1219. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.009
- 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, 1649–1658. doi:10.1897/07-519
- Munz, N.A., Burdon, F.J., Zwart, D. De, Junghans, M., Melo, L., Singer, H.P., Spycher, B., Reyes, M., Sch, U., Stamm, C., Hollender, J., 2017. Pesticides drive risk of micropollutants in wastewater-impacted streams during low flow conditions. *Water Res.* 110, 366–377. doi:10.1016/j.watres.2016.11.001
- Nakata, H., Kannan, K., Jones, P.D., Giesy, J.P., 2005. Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater effluents by liquid chromatography – mass spectrometry and fluorescence detection. *Chemosphere* 58, 759–766. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.08.097
- Nakatani, N., Hashimoto, N., Shindo, H., Yamamoto, M., Kikkawa, M., Sakugawa, H., 2007. Determination of photof ormation rates and scavenging rate constants of hydroxyl radicals in natural waters using an automatic light irradiation and injection system. *Anal. Chim. Acta.* 581, 206–267.
- Namiesnik, J., Wolska, L., Czernych, R., Galezowska, G., Cieszynska, M., 2014. Classifying the transformation products (TPs) of emerging contaminants (ECs) for prioritizing research into their impact on the environment and human health, in: *Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment: Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks.*
- Nassar, R., 2014. Transformation de résidus médicaments par chloration ou ou photoréaction en solution aqueuse.
- Neale, P.A., Munz, N.A., Selim, A., Altenburger, R., Brion, F., Busch, W., Escher, B.I., Hilscherová, K., Kienle, C., Seiler, T., Shao, Y., Stamm, C., Hollender, J., 2017. Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. *Sci. Total Environ.* 576, 785–795. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.141
- Noaksson, E., Linderöth, M., Bosveld, A.T.C., Norrgren, L., Zebühr, Y., Balk, L., 2003. Endocrine disruption in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to leachate from a public refuse dump. *Sci. Total Environ.* 305, 87–103. doi:10.1016/S0048-9697(02)00503-X
- Nödler, K., Voutsas, D., Licha, T., 2014. Polar organic micropollutants in the coastal environment of different marine systems. *Mar. Pollut. Bull.* 85, 50–59. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.06.024

- Noguera-oviedo, K., Aga, D.S., 2016. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. *J. Hazard. Mater.* 316, 242–251. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.04.058
- Norrish, R.G.W., Bamford, C.H., 1937. Photo-decomposition of Aldehydes and Ketones. *Nature* 140, 195–196.
- Obinson, A.P.A.R., Elden, J.A.B.B., Ydy, M.I.J.L., 2005. Toxicity of fluoroquinolones antibiotics to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 423–430.
- Ohno, T., 2002. Fluorescence Inner-Filtering Correction for Determining the Humification Index of Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 36, 742–746.
- Ojogoro, J.O., Chaudhary, A.J., Campo, P., Sumpter, J.P., Scrimshaw, M.D., 2017. Progesterone potentially degrades to potent androgens in surface waters. *Sci. Total Environ.* 579, 1876–1884. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.11.176
- Orenzo, M.A.E.D.E.L., Cott, G.E.I.S., Oss, P.H.E.R., 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 84–98.
- Orlikowska, A., Fisch, K., Schulz-Bull, D.E., 2015. Organic polar pollutants in surface waters of inland seas. *Mar. Pollut. Bull.* 101, 860–866. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.11.018
- Osinska, A., Harnisz, M., Korzeniewska, E., 2016. Prevalence of plasmid-mediated multidrug resistance determinants in fluoroquinolone-resistant bacteria isolated from sewage and surface water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 11, 10818–31. doi:10.1007/s11356-016-6221-4
- Paíga, P., Santos, L.H.M.L.M., Ramos, S., Jorge, S., Gabriel, J., Delerue-matos, C., 2016. Presence of pharmaceuticals in the Lis river ( Portugal ): Sources , fate and seasonal variation. *Sci. Total Environ.* 573, 164–177. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.08.089
- Panditi, V.R., Batchu, S.R., 2013. Online solid-phase extraction – liquid chromatography – electrospray – tandem mass spectrometry determination of multiple classes of antibiotics in environmental and treated waters. *Anal Bioanal Chem* 405, 5953–5964. doi:10.1007/s00216-013-6863-8
- Parot, J., 2017. Développement méthodologique du fractionnement par couplage flux / force ( AF4 ) et spectroscopie optique pour l ' étude de la matière organique dissoute aquatique : application aux estuaires de Seine et de Gironde, HAL Id : tel-0159. Bordeaux.
- Paul, T., Dodd, M.C., Strathmann, T.J., 2010. Photolytic and photocatalytic decomposition of aqueous ciprofloxacin : Transformation products and residual antibacterial activity. *Water Res.* 44, 3121–3132. doi:10.1016/j.watres.2010.03.002
- Pédelucq, J., 2016. Etude de la présence, du devenir et de l'impact des psychotropes dans la Garonne estuarienne(France) et le fleuve Saint Laurent (Québec, Canada).
- Peng, X., Ou, W., Wang, C., Wang, Z., Huang, Q., Jin, J., Tan, J., 2014. Occurrence and ecological potential of pharmaceuticals and personal care products in groundwater and reservoirs in the vicinity of municipal landfills in China. *Sci. Total Environ.* 490, 889–898. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.068
- Pereira, A.M.P.T., Silva, L.J.G., Laranjeiro, C.S.M., Meisel, L.M., Lino, C.M., Pena, A., 2017. Human pharmaceuticals in Portuguese rivers : The impact of water scarcity in the environmental risk. *Sci. Total Environ.* 609, 1182–1191. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.07.200
- Perez-Fernandez, V., Mainero-Rocca, L., Tomai, P., Fanali, S., Gentili, A., 2017. Recent advancements and future trends in environmental analysis : Sample preparation , liquid chromatography and mass spectrometry rez-Fern a. *Anal. Chim. Acta* 983, 9–41. doi:10.1016/j.aca.2017.06.029
- Pesce, S., Martin-laurent, F., Rouard, N., Robin, A., Montuelle, B., 2010. Evidence for adaptation of riverine sediment microbial communities to diuron mineralization : incidence of runoff and soil erosion. *J soils Sediments* 10, 698–707. doi:10.1007/s11368-010-0202-x
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-hordern, B., 2014. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment : Current knowledge , understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 72, 3–27.

- Petrovic, M., Barcelo, D., 2007. LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment. *Trends Anal. Chem.* 26. doi:10.1016/j.trac.2007.02.010
- Petrovic, M., Farré, M., Lopez, M., Alda, D., Perez, S., Postigo, C., Köck, M., Radjenovic, J., Gros, M., Barcelo, D., 2010. Recent trends in the liquid chromatography – mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. *J. Chromatogr. A* 1217, 4004–4017. doi:10.1016/j.chroma.2010.02.059
- Phillips, P.J., Wall, G.R., Thurman, E.M., Eckhardt, D.A., Vanhoesen, J., 1999. Metolachlor and its metabolites in tile drain and stream runoff in the canajoharie creek watershed. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3531–3537. doi:10.1021/es9811997
- Picó, Y., Barceló, D., 2015. Transformation products of emerging contaminants in the environment and high-resolution mass spectrometry: a new horizon. *Anal Bioanal Chem* 407, 6257–6273. doi:10.1007/s00216-015-8739-6
- Pillon, A., Servant, N., Vignon, F., Balaguer, P., Nicolas, J., 2005. In vivo bioluminescence imaging to evaluate estrogenic activities of endocrine disrupters. *Anal. Biochem.* 340, 295–302. doi:10.1016/j.ab.2005.02.032
- Pivnenko, K., Pedersen, G.A., Eriksson, E., Astrup, T.F., 2015. Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper. *Waste Manag.* 44, 39–47. doi:10.1016/j.wasman.2015.07.017
- Pollack, C.V., Reilly, P.A., Eikelboom, J., Glund, S., Verhamme, P., Bernstein, R.A., Dubiel, R., Huisman, M.V., Hylek, E.M., Kamphuisen, P.W., Kreuzer, J., Levy, J.H., Sellke, F.W., Stangier, J., Steiner, T., Wang, B., Kam, C.-W., Weitz, J.I., 2015. Idarucizumab for Dabigatran Reversal. *N. Engl. J. Med.* 373, 511–520.
- Poulier, G., Lissalde, S., Charriau, A., Buzier, R., Delmas, F., Gery, K., Moreira, A., Guibaud, G., Mazzella, N., 2014. Can POCIS be used in Water Framework Directive (2000 / 60 / EC) monitoring networks ? A study focusing on pesticides in a French agricultural watershed. *Sci. Total Environ.* 497–498, 282–292. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.001
- Poulier, G., Lissalde, S., Charriau, A., Buzier, R., Cleries, K., Delmas, F., Mazzella, N., Guibaud, G., 2015. Estimates of pesticide concentrations and fluxes in two rivers of an extensive French multi-agricultural watershed: application of the passive sampling strategy. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 8044–8057. doi:10.1007/s11356-014-2814-y
- Poulsen, A., Chapman, H., Leusch, F., 2011. Application of bioanalytical tools for water quality assessment urban water security research alliance technical.
- Prabhakaran, D., Sukul, P., Lamshöft, M., Maheswari, M.A., Zühlke, S., Spiteller, M., 2009. Photolysis of difloxacin and sarafloxacin in aqueous systems. *Chemosphere* 77, 739–746. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.08.031
- Prasse, C., Wenk, J., Jasper, J.T., Ternes, T.A., Sedlak, D.L., 2015. Co-occurrence of photochemical and microbiological transformation processes in open-water unit process wetlands. *Environ. Sci. Technol.* 49, 14136–14145. doi:10.1021/acs.est.5b03783
- Quillardet, P., Hofnung, M., 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res.* 147, 65–78.
- Radke, M., Maier, M.P., 2014. Lessons learned from water / sediment-testing of pharmaceuticals. *Water Res.* 55, 63–73. doi:10.1016/j.watres.2014.02.012
- Ramakrishnan, A., Blaney, L., Kao, J., Tyagi, R.D., Zhang, T.C., Surampalli, R.Y., 2014. Emerging contaminants in landfill leachate and their sustainable management. *Environ. Earth Sci.* 73, 1357–1368. doi:10.1007/s12665-014-3489-x
- Ramisetti, N.R., Kuntamukkala, R., 2014. Development and validation of a stability indicating LC-PDA-MS/MS method for separation, identification and characterization of process related and stress degradation products of rivaroxaban. *RSC Adv* 4.
- Ramos, S., Homem, V., Alves, A., Santos, L., 2016. A review of organic UV- fi lters in wastewater treatment plants. *Environ. Int.* 86, 24–44. doi:10.1016/j.envint.2015.10.004

- Raveton, M., Aajouud, A., Willison, J., Aouadi, H., Tissut, M., Ravanel, P., 2006. Phototransformation of the Insecticide Fipronil : Identification of Novel Photoproducts and Evidence for an Alternative Pathway of Photodegradation. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4151–4157.
- Regueiro, J., Matamoros, V., Thibaut, R., Porte, C., Bayona, J.M., 2013. Use of effect-directed analysis for the identification of organic toxicants in surface flow constructed wetland sediments. *Chemosphere* 91, 1165–1175. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.023
- Renou, S., Givaudan, J.G., Poulain, S., Dirassouyan, F., Moulin, P., 2008. Landfill leachate treatment: Review and opportunity. *J. Hazard. Mater.* 150, 468–493. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.09.077
- Richardson, S.D., 2012. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 747–778.
- Richardson, S.D., Kimura, S.Y., 2016. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 546–582. doi:10.1021/acs.analchem.5b04493
- Riu, A., Balaguer, P., Perdu, E., Pandelova, M., Piccinelli, R., Gustafsson, J.A., Leclercq, C., Schramm, K.W., Dagnino, S., Debrauwer, L., Cravedi, J.P., Zalko, D., 2008. Characterisation of bioactive compounds in infant formulas using immobilised recombinant estrogen receptor-alpha affinity columns. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3268–3278. doi:10.1016/j.fct.2008.07.009
- Robles-molina, J., Lara-ortega, F.J., Gilbert-lópez, B., García-reyes, J.F., Molina-díaz, A., 2014. Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1350, 30–43.
- Rochester, J.R., Bolden, A.L., 2015. Review bisphenol S and F : A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes 123, 643–650.
- Romero, E., Le Gendre, R., Garnier, J., Billen, G., Fisson, C., Silvestre, M., Riou, P., 2016. Long-term water quality in the lower Seine : Lessons learned over 4 decades of monitoring. *Environ. Sci. Policy* 58, 141–154. doi:10.1016/j.envsci.2016.01.016
- Rousis, N.I., Bade, R., Bijlsma, L., Zuccato, E., Sancho, J. V, Hernandez, F., Castiglioni, S., 2017. Monitoring a large number of pesticides and transformation products in water samples from Spain and Italy. *Environ. Res.* 156, 31–38. doi:10.1016/j.envres.2017.03.013
- Ruan, T., Liang, D., Song, S., Song, M., Wang, H., Jiang, G., 2015. Evaluation of the in vitro estrogenicity of emerging bisphenol analogs and their respective estrogenic contributions in municipal sewage sludge in China. *Chemosphere* 124, 150–155. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.12.017
- Ruttkies, C., Schymanski, E.L., Wolf, S., Hollender, J., Neumann, S., 2016. MetFrag relaunched : incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *J. Cheminform.* 1–16. doi:10.1186/s13321-016-0115-9
- Safarik, I., Ptackova, L., Koneracka, M., Safarikova, M., Timko, M., Kopcansky, P., 2002. Determination of selected xenobiotics with ferrofluid-modified trypsin. *Biotechnol. Lett.* 24, 355–358.
- Safe, S., Wang, F., Porter, W., Duan, R., McDougal, a., 1998. Ah receptor agonists as endocrine disruptors: Antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol. Lett.* 102–103, 343–347. doi:10.1016/S0378-4274(98)00331-2
- Sandner, M.R., Hedaya, E., Trecker, D.J., 1968. Mechanistic studies of the photo-fries reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 7249–7254.
- Sangster, J.L., Ali, J.M., Snow, D.D., Kolok, A.S., Bartelt-hunt, S.L., 2016. bioavailability and fate of sediment-associated progesterone in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* 50, 4027–4036. doi:10.1021/acs.est.5b06082
- Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., Lichtensteiger, W., 2001. In vitro and in vivo estrogenicity of UV Screens. *Environ. Health Perspect.* 109, 239–244.

- Schollée, J.E., Schymanski, E.L., Avak, S.E., Loos, M., Hollender, J., 2015. Prioritizing unknown transformation products from biologically- treated wastewater using high-resolution mass spectrometry, multivariate statistics, and metabolic Logic. *Anal. Chem.* 81, 12121–12129. doi:10.1021/acs.analchem.5b02905
- Schollée, J.E., Schymanski, E.L., Hollender, J., 2016. Statistical approaches for LC-HRMS data to characterize, prioritize, and identify transformation products from water treatment processes, in: *Assessing Transformation Products of Chemicals by Non-Target and Suspect Screening – Strategies and Workflows*. pp. 45–65. doi:10.1021/bk-2016-1241.ch004
- Schulze, T., Weiss, S., Schymanski, E., Carsten, P., Ohe, V. Der, Schmitt-jansen, M., Altenburger, R., Streck, G., Brack, W., 2010. Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis. *Environ. Pollut.* 158, 1461–1466. doi:10.1016/j.envpol.2009.12.032
- Schymanski, E.L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ru, M., Singer, H.P., Hollender, J., 2014a. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. *Environ. Sci. Technol.* 2097–2098.
- Schymanski, E.L., Singer, H.P., Longre, P., Loos, M., Ru, M., Stravs, M.A., Ripolle, C., 2014b. Strategies to characterize polar organic contamination in wastewater: Exploring the capability of High Resolution Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1811–1818.
- Schymanski, E.L., Singer, H.P., Slobodnik, J., Ipolyi, I.M., Oswald, P., Krauss, M., Schulze, T., Haglund, P., Letzel, T., Grosse, S., Thomaidis, N.S., Bletsou, A., Zwiener, C., Ibáñez, M., Portolés, T., Boer, R. De, Reid, M.J., Onghena, M., 2015. Non-target screening with high-resolution mass spectrometry : critical review using a collaborative trial on water analysis. *Anal Bioanal Chem* 407, 6237–6255. doi:10.1007/s00216-015-8681-7
- Secrétan, P.-H., Sadou-Yayé, H., Aymes-Chodur, C., Bernard, M., Solgadi, A., Amrani, F., Yagoubia, N., Do, B., 2015. A comprehensive study of apixaban's degradation pathways under stress conditions using liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry. *RCS Adv.* 5.
- Seine Aval, G.I.P., 2008. Contextes climatique, morphologique & hydro-sédimentaire : Apports en eau douce à l'estuaire de la Seine.
- Seiwert, B., Weidauer, C., Hirte, K., Reemtsma, T., 2016. Lab-Based approaches to Support the screening and identification of transformation products by LC-HRMS, in: *Assessing Transformation Products of Chemicals by Non-Target and Suspect Screening*. pp. 68–84.
- Silva, E., Cerejeira, M.J., 2015. Concentration addition-based approach for aquatic risk assessment of realistic pesticide mixtures in Portuguese river basins. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 6756–6765. doi:10.1007/s11356-014-3857-9
- Simon, E., Velzen, M. Van, Brandsma, S.H., Lie, E., Løken, K., Boer, J. De, Bytingsvik, J., Jenssen, B.M., Aars, J., Hamers, T., Lamoree, M.H., 2013. Effect-Directed Analysis to explore the polar bear exposome: identification of thyroid hormone disrupting compounds in plasma. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8902–8912.
- Sinclair, C.J., Boxall, A.B., 2009. Ecotoxicity of transformation products, in: *Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment: Chemicals in the Environment*. p. 257.
- Singh, S., Dash, P., Silwal, S., Feng, G., Adeli, A., Moorhead, R.J., 2017. Influence of land use and land cover on the spatial variability of dissolved organic matter in multiple aquatic environments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 14124–14141. doi:10.1007/s11356-017-8917-5
- Slobodnik, J., Dulio, V., 2014. A network approach to scientific collaboration on emerging contaminants and their transformation products in Europe, in: *Transformation Products of Synthetic Chemicals in the Environment*. pp. 903–916.
- Song, S., Song, M., Zeng, L., Wang, T., Liu, R., Ruan, T., 2014. Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China. *Environ. Pollut.* 186, 14–19. doi:10.1016/j.envpol.2013.11.023



- Soulier, C., Coureau, C., Togola, A., 2016. Environmental forensics in groundwater coupling passive sampling and high resolution mass spectrometry for screening. *Sci. Total Environ.* 1–10. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.056
- Soussi, Y., Kinani, S., Bouchonnet, S., Bourcier, S., Malosse, C., Sablier, M., Creusot, N., Mombelli, E., Aït-aïssa, S., 2014. Photolysis of estrone generates estrogenic photoproducts with higher activity than the parent compound. *Endocrinology* 21, 7818–7827. doi:10.1007/s11356-014-2722-1
- Stalter, D., Magdeburg, A., Weil, M., Knacker, T., 2010. Toxication or detoxication? In vivo toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout. *Water Res.* 44, 439–448. doi:10.1016/j.watres.2009.07.025
- Stasinakis, A.S., Kotsifa, S., Gatidou, G., Mamais, D., 2009. Diuron biodegradation in activated sludge batch reactors under aerobic and anoxic conditions. *Water Res.* 43, 1471–1479. doi:10.1016/j.watres.2008.12.040
- Steen, R.J.C.A., Hattum, V., Th, U.A., 2000. A study on the behaviour of pesticides and their transformation products in the Scheldt estuary using liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry. *R. Soc. Chem.* 2, 597–602. doi:10.1039/b004734l
- Stewart, M., Northcott, G., Gaw, S., Tremblay, L., 2016. An update on emerging organic contaminants of concern for new Zealand with guidance on monitoring approaches for councils.
- Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Pretali, L., Nora, E., Profumo, A., 2015. Sunlight-induced degradation of fluoroquinolones in wastewater effluent : Photoproducts identification and toxicity. *Chemosphere* 134, 313–318. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.04.081
- Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Pretali, L., Profumo, A., Fasani, E., Albini, A., Migliavacca, R., Nucleo, E., 2012a. Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts. *Water Res.* 46, 5575–5582. doi:10.1016/j.watres.2012.07.043
- Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Profumo, A., Pretali, L., Irastorza, E.A., Fasani, E., Albini, A., 2012b. Photolytic and photocatalytic degradation of fluoroquinolones in untreated river water under natural sunlight. *Appl. Catal. B, Environ.* 119–120, 32–39. doi:10.1016/j.apcatb.2012.02.008
- Svenson, A., Sjöholm, S., Allard, A.-S., Kaj, L., 2011. Antiestrogenicity and estrogenicity in leachates from solid waste deposits. *Environ. Toxicol.* 26, 233–239. doi:10.1002/tox
- Swain, D., Patel, P.N., Nagaraj, G., Srinivas, K.S., Sharma, M., Garg, P., Samanthula, G., 2016. Liquid Chromatographic Method Development for Forced Degradation Products of Dabigatran Etxilate: Characterisation and In Silico Toxicity Evaluation. *Chromatographia.* 79, 169–178.
- Swati, Ghosh, P., Das, M.T., Thakur, I.S., 2014. In vitro toxicity evaluation of organic extract of landfill soil and its detoxification by indigenous pyrene-degrading *Bacillus* sp . ISTPY1. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 90, 145–151. doi:10.1016/j.ibiod.2014.03.001
- Szabo, R.K., Megyeri, C., Illes, E., Gajda-Schranz, K., Mazellier, P., Dombi, A., 2011. Phototransformation of ibuprofen and ketoprofen in aqueous solutions. *Chemosphere.* 84, 1658–1663.
- Tamtam, F., Mercier, F., Le, B., Eurin, J., Tuc, Q., Clément, M., Chevreuil, M., Pierre, U., Ephe, C., Sisyphe, U.M.R., Cedex, P., 2007. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Sci. Total Environ.* 93, 0–11. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.12.009
- Tan, B.L.L., Hawker, D.W., Müller, J.F., Leusch, F.D.L., Tremblay, L. a, Chapman, H.F., 2007. Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. *Environ. Int.* 33, 654–69. doi:10.1016/j.envint.2007.01.008
- Tantawy, M.A., El-Ragehy, N.A., Hassan, N.Y., Abdelkawy, M., 2016. Stability-indicating spectrophotometric methods for determination of the anticoagulant drug apixaban in the presence of its hydrolytic degradation product. *Spectrochim. Acta A.* 13–20.

- Tapie, N., Devier, M.H., Soulier, C., Creusot, N., Menach, K. Le, Vrana, B., Budzinski, H., 2011. Passive samplers for chemical substance monitoring and associated toxicity assessment in water. *Water Sci. Technol.* 63, 2418–2427. doi:10.2166/wst.2011.129
- Tay, K.S., Madehi, N., 2015. Ozonation of ofloxacin in water : By-products , degradation pathway and ecotoxicity assessment. *Sci. Total Environ.* 520, 23–31. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.033
- Ter Laak, T.L., Van der Aa, M., Houtman, C.J., Stoks, P.G., Van Wezel, A., 2010. Relating environmental concentrations of pharmaceuticals to consumption : A mass balance approach for the river Rhine. *Environ. Int.* 36, 403–409. doi:10.1016/j.envint.2010.02.009
- Tercero Espinoza, L.A., Neamtu, M., Frimmel, F.H., 2007. The effect of nitrate, Fe(III) and bicarbonate on the degradation of bisphenol A by simulated solar UV-irradiation. *Water Res.* 4479–4487.
- Thibaut, R., Porte, C., 2008. Effects of fibrates , anti-inflammatory drugs and antidepressants in the fish hepatoma cell line PLHC-1 : Cytotoxicity and interactions with cytochrome P450 1A. *Toxicol. Vitr.* 22, 1128–1135. doi:10.1016/j.tiv.2008.02.020
- Tixier, L.T., Sancelme, M., Bonnemoy, F., Cuer, A., Veschambre, H., 2001. Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: synthesis, ecotoxicity and biotransformation. *Environ. chemisty* 20, 1381–1389.
- Togola, A., 2006. Présence et devenir des substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques.
- Togola, A., Budzinski, H., 2007a. Development of Polar Organic Integrative Samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems. *Anal. Chem.* 79, 6734–6741.
- Togola, A., Budzinski, H., 2007b. Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC – MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 627–635. doi:10.1007/s00216-007-1251-x
- Togola, A., Budzinski, H., 2008. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 1177, 150–158. doi:10.1016/j.chroma.2007.10.105
- Togola, A., Lardy-fontan, S., Soulier, C., 2015. Rapport de positionnement sur l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution pour le criblage environnemental. *Program. d'activité AQUAREF BRGM/RP-65*, 65.
- Tousova, Z., Oswald, P., Slobodnik, J., Blaha, L., Muz, M., Hu, M., Brack, W., Krauss, M., Di, C., Tarcai, Z., Seiler, T., Hollert, H., Koprivica, S., Ahel, M., Schollée, J.E., Hollender, J., Suter, M.J., Hidas, A.O., Schirmer, K., Sonavane, M., Ait-aissa, S., Creusot, N., Brion, F., Froment, J., Catarina, A., Thomas, K., Erik, K., Tu, S., Ouyang, X., Leonards, P., Lamoree, M., Osorio, V., Kolkman, A., Schriks, M., Spiranzlova, P., Tindall, A., Schulze, T., 2017. European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants in European surface waters. *Sci. Total Environ.* 602, 1849–1868. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.032
- Trasande, L., Zoeller, R.T., Hass, U., Kortenkamp, A., Grandjean, P., Myers, J.P., Digangi, J., Bellanger, M., Hauser, R., Legler, J., Skakkebaek, N.E., Heindel, J.J., 2017. Estimating burden and disease costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 1245–1255. doi:10.1210/jc.2014-4324
- Tsaboula, A., Papadakis, E., Vryzas, Z., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Papadopoulou-mourkidou, E., 2016. Environmental and human risk hierarchy of pesticides : A prioritization method , based on monitoring , hazard assessment and environmental fate. *Environ. Int.* 91, 78–93. doi:10.1016/j.envint.2016.02.008
- Tsakiris, G., 2015. The Status of the European Waters in 2015 : a Review. *Environ. Process.* 2, 543–557. doi:10.1007/s40710-015-0079-1
- Tsui, M.M.P., Leung, H.W., Wai, T., Yamashita, N., Taniyasu, S., Liu, W., 2014. Occurrence , distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. *Water Res.* 7, 0–10. doi:10.1016/j.watres.2014.09.013

- Turner, A., Millward, G.E., 2002. Suspended Particles : their Role in estuarine biogeochemical cycles 857–883. doi:10.1006/ecss.2002.1033
- Usman, A., Ahmad, M., 2016. From BPA to its analogues : Is it a safe journey ? Chemosphere 158. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.05.070
- Van Der Osst, R., Sileno, G., Janse, T., Nguyen, M.T., Besselink, H., Brouwer, A., 2017a. Simoni (Smart Integrated Monitoring) as a Novel Bioanalytical Strategy for Water Quality Assessment: Part II-field Feasibility Survey. Environ. Toxicol. Chem. doi:10.1002/etc.
- Van Der Osst, R., Sileno, G., Suarez-Munoz, M., Nguyen, M.T., Besselink, H., Brouwer, A., 2017b. Simoni (Smart Integrated Monitoring) as a Novel Bioanalytical Strategy for Water Quality Assessment: Part I – model design and effect based. Environ. Toxicol. 1–15. doi:10.1002/etc.3836
- Vandenberg, L.N., Luthi, D., Quinerly, D.A., 2017. Plastic bodies in a plastic world : multi-disciplinary approaches to study endocrine disrupting chemicals. J. Clean. Prod. 140, 373–385. doi:10.1016/j.jclepro.2015.01.071
- Vasquez, M.I., Garcia-käufer, M., Hapeshi, E., Menz, J., Kostarelos, K., 2013. Chronic ecotoxic effects to *Pseudomonas putida* and *Vibrio fischeri*, and cytostatic and genotoxic effects to the hepatoma cell line (HepG2) of ofloxacin photo (catalytically) treated solutions. Sci. Total Environ. 450–451, 356–365. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.05.096
- Verlicchi, P., Aukidy, M. Al, 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. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.04.028
- Vermeirssen, E.L.M., Hollender, J., Bramaz, N., Van Der Voet, J., Escher, B.I., 2010. Linking toxicity in algal and bacterial assays with chemical analysis in passive samplers deployed in 21 treated sewage effluents. Environ. Toxicol. Chem. 29, 2575–2582. doi:10.1002/etc.311
- Vincent-Hubert, F., Heas-moisan, K., Munsch, C., Tronczynski, J., 2012. Mutagenicity and genotoxicity of suspended particulate matter in the Seine river estuary. Mutat. Res. 741, 7–12.
- Von der Ohe, P., Carsten, Dulio, V., Slobodnik, J., Deckere, E. De, Kühne, R., Ebert, R., Ginebreda, A., Cooman, W. De, Schürmann, G., Brack, W., 2011. A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. Sci. Total Environ. 409, 2064–2077. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.01.054
- Vrana, B., Mills, G.A., Allan, I.J., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J., Morrison, G., Greenwood, R., 2005a. Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. Trends Anal. Chem. 24. doi:10.1016/j.trac.2005.06.006
- Vrana, B., Mills, G., Greenwood, R., Knutsson, J., Svensson, K., Morrison, G., Building, K.H., Sciences, B., Road, W.S., Transport, W.E., 2005b. Performance optimisation of a passive sampler for monitoring hydrophobic organic pollutants in water. J. Environ. Monit 7, 612–620.
- Vrana, B., Vermeirssen, E.L.M., Allan, J., Kohoutek, J., Kennedy, K., Mills, G.A., Greenwood, R., 2009. Passive sampling of emerging pollutants in the aquatic environment : state of the art and perspectives- Position Paper-NORMAN.
- Vrana, B., Smedes, F., Rusina, T., Okonski, K., Allan, I., Grung, M., Hilscherova, K., Tarábek, P., Slobodník, J., 2015. Passive sampling : chemical analysis and toxicological profiling, in Joint Danube Survey 3. Int. Comm. Prot. Danube River.
- Vrana, B., Smedes, F., Mazzella, N., Miege, C., Budzinski, H., Vermeirssen, E., Ocelka, T., Gravell, A., Kaserzon, S., 2016. NORMAN interlaboratory study ( ILS ) on passive sampling of emerging pollutants on passive sampling of emerging.
- Wagner, M., Vermeirssen, E.L.M., Buchinger, S., Behr, M., Magdeburg, A., Oehlmann, J., 2013. Deriving bio-equivalents from in vitro bioassays: assessment of existing uncertainties and strategies to improve accuracy and reporting. Environ. Toxicol. Chem. 32, 1906–17. doi:10.1002/etc.2256

- Wales, S., Kasprzyk-hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2008. The occurrence of pharmaceuticals , personal care products , endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in. *Water Res.* 42, 3498–3518. doi:10.1016/j.watres.2008.04.026
- Walse, S.S., Morgan, S.L., Kong, L., Ferry, J.L., 2004. Role of Dissolved Organic Matter, Nitrate, and Bicarbonate in the Photolysis of Aqueous Fipronil. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3908–3915.
- Wanat, M.A., 2013. Novel oral anticoagulants: a review of new agents. *Postgrad. Med.* 125, 103–114.
- Wenk, J., Von Gunten, U., Canonica, S., 2011. Effect of Dissolved Organic Matter on the Transformation of Contaminants Induced by Excited Triplet States and the Hydroxyl Radical. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1334–1340.
- Wernersson, A., Carere, M., Maggi, C., Tusil, P., Soldan, P., James, A., Sanchez, W., Dulio, V., Broeg, K., Reifferscheid, G., Buchinger, S., Maas, H., Grinten, E. Van Der, Toole, S.O., Ausili, A., Manfra, L., Marziali, L., Polesello, S., Lacchetti, I., Mancini, L., Lilja, K., Linderoth, M., Lundeberg, T., Fjällborg, B., Porsbring, T., 2015. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environ. Sci. Eur.* 27, 1–11. doi:10.1186/s12302-015-0039-4
- Wilson, V.S., Bobseine, K., Lambricht, C.R., Gray, L.E., 2002. A Novel Cell Line , MDA-kb2 , That Stably Expresses an Androgen- and Glucocorticoid-Responsive Reporter for the Detection of Hormone Receptor Agonists and Antagonists. *Toxicol. Sci.* 81, 69–81.
- Wingert, N.R., Dos Santosa, N.O., Nunes, M.A.G., Gomes, P., Müller, E.I., Flores, E.M.M., Steppe, M., 2016. Characterization of three main degradation products from novel oral anticoagulant rivaroxaban under stress conditions by UPLC-Q-TOF-MS/MS. *Pharm. Biomed.* 123, 10–15.
- Witters, H., Freyberger, A., Smits, K., Vangenechten, C., Lofink, W., Weimer, M., Bremer, S., Ahr, P.H.-J., Berckmans, P., 2010. The assessment of estrogenic or anti-estrogenic activity of chemicals by the human stably transfected estrogen sensitive MELN cell line: results of test performance and transferability. *Reprod. Toxicol.* 30, 60–72. doi:10.1016/j.reprotox.2010.02.008
- Wittmer, I.K., Bader, H., Scheidegger, R., Singer, H., Lu, A., Hanke, I., 2010. Significance of urban and agricultural land use for biocide and pesticide dynamics in surface waters. *Water Res.* 44, 2850–2862. doi:10.1016/j.watres.2010.01.030
- Wode, F., Baar, P. Van, Du, U., Hecht, F., Taute, T., Jekel, M., Reemtsma, T., 2014. Search for over 2000 current and legacy micropollutants on a wastewater infiltration site with a UPLC-high resolution MS target screening method. *Water Res.* 9, 3–12. doi:10.1016/j.watres.2014.11.034
- Writer, J.H., Ferrer, I., Barber, L.B., Thurman, E.M., 2013. Widespread occurrence of neuro-active pharmaceuticals and metabolites in 24 Minnesota rivers and wastewaters. *Sci. Total Environ.* 462, 519–527. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.099
- Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., 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. doi:10.1016/j.watres.2008.10.039
- Yamazaki, E., Yamashita, N., Taniyasu, S., Lam, J., Lam, P.K.S., 2015. Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan , China , Korea and India. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122, 565–572. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.09.029
- Yan, C., Yang, Y., Zhou, J., Liu, M., Nie, M., Shi, H., Gu, L., 2013. Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary : Occurrence , distribution and risk assessment. *Environ. Pollut.* 175, 22–29. doi:10.1016/j.envpol.2012.12.008
- Yang, Y., Fu, J., Peng, H., Hou, L., Liu, M., Zhou, J.L., 2011. Occurrence and phase distribution of selected pharmaceuticals in the Yangtze Estuary and its coastal zone 190, 588–596. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.03.092
- Yang, Y., Lu, L., Zhang, J., Yang, Y., Wu, Y., Shao, B., 2014. Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1328, 26–34. doi:10.1016/j.chroma.2013.12.074

- Yassine, M., 2016. Photodégradation et chloration de résidus de médicaments (trois antibiotiques et trois anticoagulants) en solution aqueuse.
- Yin, L., Wang, B., Yuan, H., Deng, S., Huang, J., Wang, Y., 2017. Pay special attention to the transformation products of PPCPs in environment. *Emerg. Contam.* 1–7. doi:10.1016/j.emcon.2017.04.001
- Yu, J.T., Bouwer, E.J., Coelhan, M., 2006. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage. *Agric. water Manag.* 86, 72–80. doi:10.1016/j.agwat.2006.06.015
- Yu, X., Xue, J., Yao, H., Wu, Q., Venkatesan, A.K., Halden, R.U., Kannan, K., 2015. Occurrence and estrogenic potency of eight bisphenol analogs in sewage sludge from the U . S . EPA targeted national sewage sludge survey. *J. Hazard. Mater.* 299, 733–739. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.07.012
- Zgadżaj, A., Skrzypczak, A., Welenc, I., Ługowska, A., Parzonko, A., Siedlecka, E., Sommer, S., Sikorska, K., Nałe, G., 2015. Evaluation of photodegradation , phototoxicity and photogenotoxicity of ofloxacin in ointments with sunscreens and in solutions. *J. Photochem. photobiology* 144, 76–84. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.01.015
- Zhang, Y.-N., Xie, Q., Sun, G., Yang, K., Song, S., Chen, J., Zhou, C., Li, Y., 2016. Effects of dissolved organic matter on phototransformation rates and dioxin products of triclosan and 2'-HO-BDE-28 in estuarine water. *Environ. Sci. Process. Impacts.* 18, 1177–1184.
- Zhang, R., Yang, Y., Huang, C.H., Li, N., Liu, H., Zhao, L., Sun, P., 2016. UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/PDS Treatment of Trimethoprim and Sulfamethoxazole in synthetic human urine: transformation products and toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 50, 2573–2583.
- Zhang, T., Xue, J., Gao, C., Qiu, R., Li, Y., Li, X., Huang, M., Kannan, K., 2016. Urinary concentrations of bisphenols and their association with biomarkers of oxidative stress in people living near - waste recycling facilities in China. doi:10.1021/acs.est.6b00032
- Zhang, Z., Troldborg, M., Yates, K., Osprey, M., Kerr, C., Hallett, P.D., Baggaley, N., Rhind, S.M., Dawson, J.J.C., Hough, R.L., 2016. Evaluation of spot and passive sampling for monitoring , flux estimation and risk assessment of pesticides within the constraints of a typical regulatory monitoring scheme. *Sci. Total Environ.* 569–570, 1369–1379. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.06.219
- Zhao, H., Cao, Z., Liu, X., Zhan, Y., Zhang, J., Xiao, X., Yang, Y., Zhou, J., 2017. Seasonal variation , flux estimation , and source analysis of dissolved emerging organic contaminants in the Yangtze Estuary , China. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1016/j.marpolbul.2017.08.034
- Zhao, H., Zhou, J.L., Zhang, J., 2015. Tidal impact on the dynamic behavior of dissolved pharmaceuticals in the Yangtze Estuary , China. *Sci. Total Environ.* 536, 946–954. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.055
- Zivanovic, L., Zigic, G., Zecevic, M., 2006. Investigation of chromatographic conditions for the separation of ofloxacin and its degradation products. *J. Chromatogr. A* 1119, 224–230. doi:10.1016/j.chroma.2006.02.029
- Zonja, B., Acena, J., Jelic, A., Petrovic, M., Perez Solsona, S., Barceló, D., 2014. Transformation products of emerging contaminants : analytical challenges and future needs, in: *Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment: Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks.* pp. 303–324.