



HAL
open science

Approche moléculaire pour quantifier la biodégradation des micropolluants en aval des stations d'épuration. Evaluation des outils de fractionnements isotopique et énantiomérique

Marine Souchier

► **To cite this version:**

Marine Souchier. Approche moléculaire pour quantifier la biodégradation des micropolluants en aval des stations d'épuration. Evaluation des outils de fractionnements isotopique et énantiomérique. Ingénierie de l'environnement. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONTTS128 . tel-01985534

HAL Id: tel-01985534

<https://theses.hal.science/tel-01985534v1>

Submitted on 18 Jan 2019

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

Université de Montpellier



Ecole doctorale Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydro sciences,
Environnement

Par **Marine SOUCHIER**

Pour obtenir le grade de Docteur

SPECIALITE : Sciences de l'eau dans l'environnement continental

Approche moléculaire pour quantifier la biodégradation des micropolluants en aval des stations d'épuration

Evaluation des outils de fractionnements isotopique et énantiomérique

Directeurs de recherche :

Serge CHIRON

Claude CASELLAS

Soutenue le : 11 décembre 2015

Jury

M BARCELO, Damià, Professeur, Directeur de l'Institut Català de Recerca de l'Aigua, Rapporteur
Mme BENALI-RACLOT, Dalel, Ingénieur de Recherche, Veolia Recherche et Innovation, Examineur
M BOUCHONNET, Stéphane, Ingénieur de Recherche, École Polytechnique, Rapporteur
Mme CASELLAS, Claude, Professeur, Université de Montpellier, Directeur de thèse
M CHIRON, Serge, Directeur de Recherche, Institut de Recherche pour le Développement, Directeur
de thèse
Mme GORAL, Brigitte, Directeur Technique, Veolia Eau zone Méditerranée, Examineur
Mme PICHON, Valérie, Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Examineur
M SANCHEZ, Wilfried, Directeur Général, Fondation Roaltain, Examineur



*Cette thèse a été effectuée au sein de l'UMR HydroSciences Montpellier
et de Veolia Recherche et Innovation dans le cadre du contrat CIFRE n°
2012/1126.*

La présence avérée de produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPSP) dans le milieu aquatique est principalement due à leur élimination incomplète dans les stations d'épuration (STEP). Ces molécules sont susceptibles de générer des effets néfastes sur les organismes vivants du milieu naturel. Une évaluation préalable des risques qui peuvent être engendrés par les PPSP est nécessaire pour qu'ils puissent être gérés correctement et sûrement par les principaux acteurs du cycle de l'eau tels que les pouvoirs publics et les grandes entreprises de l'environnement, dont fait partie Veolia. La démarche d'évaluation des risques nécessite d'avoir accès à des données sur les processus de biodégradation des PPSP dans l'environnement. Actuellement, les données disponibles sont qualitatives ou semi-quantitatives en raison de l'absence d'outils de mesure quantitatifs adéquats. L'objectif de ce travail de thèse a ainsi consisté à développer des outils pour quantifier spécifiquement les processus de biodégradation des PPSP *in situ* à des concentrations environnementales. Deux outils complémentaires ont été sélectionnés pour être évalués : le fractionnement énantiomérique, dans le but de quantifier la biodégradation des PPSP chiraux, et le fractionnement isotopique, limité à celui du chlore, dans le but de mesurer la biodégradation des PPSP chlorés. Pour évaluer ces outils, des analyses d'occurrence sur le terrain et des études cinétiques et mécanistiques en laboratoire ont été réalisées sur cinq molécules modèles : deux produits pharmaceutiques chiraux (un bêtabloquant, le métoprolol et un antidépresseur, la venlafaxine) et trois PPSP chlorés (deux biocides, le triclocarban et le triclosan, et un anti-inflammatoire non stéroïdien, le diclofénac). Nos travaux ont démontré que l'utilisation du fractionnement isotopique du chlore seul est peu adaptée à l'étude quantitative de la biodégradation des PPSP chlorés. Une approche isotopique multiéléments serait plus propice pour quantifier les processus de biodégradation. Par ailleurs, les expériences réalisées ont permis d'approfondir l'état des connaissances sur les voies et mécanismes de biodégradation des PPSP étudiés. La déchloration du triclosan dans les sédiments en aval des STEP a été mise en évidence pour la première fois. Concernant le triclocarban, cette réaction était déjà connue mais les mécanismes réactionnels de déchloration sous-jacents ont été élucidés en milieux aérobie et anaérobie. Les résultats obtenus sur l'outil énantiomérique sont très encourageants. Ils démontrent, à l'aide du métoprolol, l'existence d'une relation linéaire entre biodégradation et variations énantiomériques à la fois en conditions contrôlées et dans les STEP. Le fractionnement énantiomérique constitue donc un bon outil quantitatif de la biodégradation du métoprolol. Des études supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour étendre ces résultats à d'autres molécules. D'autre part, l'analyse des concentrations et de la stéréochimie des produits de transformation du métoprolol a confirmé que ce composé se biodégrade stéréosélectivement en métoprolol acide et un mécanisme réactionnel a été proposé pour expliquer ces observations. Les cinétiques associées aux réactions de dégradation des PPSP étudiés doivent être mesurées *in situ* pour évaluer la capacité du milieu naturel à éliminer ces composés, d'où l'importance de rendre opérationnels les indicateurs quantitatifs étudiés au cours de la thèse. Croisées avec des données d'écotoxicité, les informations quantitatives sur la biodégradation peuvent aider les pouvoirs publics à cibler les PPSP qui nécessitent d'être régulés en priorité. Elles peuvent également aider les opérateurs privés à orienter leurs stratégies de réduction d'émission à la source et l'optimisation des procédés de traitement des eaux afin que ces derniers éliminent en priorité les micropolluants les plus à risque.

Mots-clés : Biodégradation, fractionnement isotopique, fractionnement énantiomérique, produits pharmaceutiques et de soins personnels

Abstract

The widespread occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCP) in surface waters, due to their incomplete removal in wastewater treatment plants (WWTP), is of concern since these compounds may be harmful to living organisms. Environmental risks associated with the presence of PPCP in aquatic environment have to be evaluated in order to help the main actors involved in the water cycle such as public authorities and environmental companies, including Veolia, to manage them properly. Quantitative and qualitative assessment of *in situ* biodegradation of PPCP is a major need in the context of risk assessment. Quantitative information remains scarcely available due the lack of appropriate methods. The objective of this work was then to develop tools able to quantify specifically *in situ* biodegradation of PPCP at trace levels. Two different tools have been selected to be evaluated, namely enantiomeric fractionation dedicated to chiral compounds and isotopic fractionation limited to chlorine-isotope analysis dedicated to chlorinated PPCP. To evaluate these tools, environmental occurrence studies and *in vitro* mechanistic and kinetic studies were together performed using five probe compounds : two chiral PPCP (a beta-blocker, the metoprolol and an antidepressant, the venlafaxine) and three chlorinated PPCP (two biocides, the triclocarban and the triclosan, and a nonsteroidal anti-inflammatory drug, the diclofenac). These experiments demonstrated that chlorine isotope fractionation can hardly provide quantitative information on *in situ* biodegradation of chlorinated PPCP. Multi-dimensional isotopic fractionation might be better adapted to quantify biodegradation. Furthermore, through the experiments, new insights on biodegradation pathways and mechanisms of the studied compounds have also been gained. Dechlorination of triclosan within sediment has been evidenced for the first time. Concerning triclocarban, dechlorination of this compound in environment had already been reported in previous studies but aerobic and anaerobic dechlorination mechanisms have been elucidated in the present study. Results obtained on enantiomeric fractionation demonstrated that this tool is very promising. Experiments using metoprolol as probe compound showed existence of a linear relationship between enantiomeric enrichment and the extent of biodegradation both under controlled conditions and within WWTP. Enantiomeric enrichment might then constitute a good indicator of *in situ* biodegradation of metoprolol. Supplementary studies are needed to extrapolate these results to other micropollutants. In addition, stereoselective degradation of metoprolol in acid metoprolol within WWTP and under controlled conditions has been observed similarly to other studies and one degradation mechanism has been proposed to explain the reaction stereochemistry. *In situ* kinetics associated with degradation pathways of the studied PPSPs have to be measured to assess the ability of the environment to eliminate these compounds, hence the importance of making operational the quantitative indicators studied in this thesis. Crossed with ecotoxicity data, quantitative information on biodegradation can help public authorities to target PPCPs that need to be regulated first. They can also help private operators to direct their source reduction strategies and their water treatment process optimization so that they eliminate in priority the most risked micropollutants.

Keywords : Biodegradation, isotopic fractionation, enantiomeric fractionation, pharmaceutical and personal care products

Remerciements

Ce manuscrit de thèse est le résultat de la contribution d'une multitude de personnes que je souhaite ici remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour le temps et l'attention qu'ils ont consacrés à ce travail et les échanges constructifs lors de la soutenance. Merci à M. Stéphane Bouchonnet (École Polytechnique) et à M. Damià Barcelo (Institut Català de Recerca de l'Aigua) d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Merci à Mme Brigitte Goral (Veolia Eau zone Méditerranée) et à M. Wilfried Sanchez (Fondation Rovaltain) d'avoir participé à ce jury en tant qu'examineurs. Enfin merci à Mme Valérie Pichon d'avoir présidé le jury lors de la soutenance.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Claude Casellas et Serge Chiron qui ont dirigé cette thèse.

Merci Claude de m'avoir accueillie si chaleureusement au sein de votre laboratoire. Malgré votre emploi du temps de ministre, vous avez toujours su trouver du temps pour m'écouter et me prodiguer des conseils pertinents tout au long de ces trois années. Merci d'avoir ponctué ma thèse de petits gâteaux libanais délicieux! Et merci infiniment pour tous les moyens matériels dont j'ai pu bénéficier au sein du laboratoire de Montpellier et de m'avoir permis de participer au congrès international EMCON aux Etats Unis en 2014, expérience qui fut si formatrice à mes yeux.

Merci Serge pour tout ce que tu as apporté scientifiquement à cette thèse que ce soit dans la sélection des pistes d'étude, puisque c'est ton intuition et ton recul scientifique qui nous ont conduits à étudier les outils de fractionnements isotopique et énantiomérique, ou dans l'interprétation des résultats. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir poussée à aller toujours plus loin dans la compréhension et merci pour ta disponibilité qui nous a permis de nombreux échanges enrichissants. J'ai beaucoup appris à tes côtés y compris dans des domaines qui m'étaient inconnus ; d'ailleurs si l'on m'avait dit que je publierais un jour un article orienté « chimie mécanistique » je n'y aurais sûrement pas cru.

Un grand merci également à mes encadrants industriels de Veolia Recherche et Innovation, Valérie Ingrand, Dalel Benali-Raclot et David Benanou.

Merci Valérie de m'avoir accueillie dans ton pôle, d'avoir suivi ce projet de thèse de si près durant ces trois ans et pour tes conseils pertinents lors de la relecture de mes divers rapports, articles ou manuscrit.

Merci Dalel pour ton investissement et ton soutien dans ce projet de thèse. Tu as toujours su répondre présente pour me rassurer et m'épauler dans les difficultés rencontrées. Tu as également largement participé à mon intégration au sein de VERI grâce à ton grand sens du relationnel. D'un point de vue plus personnel, merci de m'avoir accueillie si gentiment chez toi et pour ces bons moments partagés ensemble (avec un souvenir spécial pour ce footing sous la pluie en pleine nuit dans la forêt de Triel).

David, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et pour tes conseils scientifiques. J'espère que tu ne me considères désormais plus comme une « ringarde » des animations power point et je peux aujourd'hui te l'avouer : tout le monde a beaucoup apprécié l'effet « pacman » dans ma présentation de soutenance.

Merci également à tous les membres du laboratoire de Montpellier de m'avoir permis de passer trois merveilleuses années parmi vous. Je sais que David déteste être remercié mais je vais déroger à cette règle pour une fois alors merci David et Abdel pour votre joie de vivre constante et de m'avoir aidé dans la gestion des problèmes logistiques ou scientifiques rencontrés. Ne comptez pas m'oublier si vite, je repasserai profiter des thés à la menthe concoctés par Abdel à mes heures perdues! Merci Mireille pour ta gestion parfaite de l'administratif et pour nos grandes discussions existentielles. Merci Aurélie pour ton soutien, ton écoute et de m'avoir sauvé la vie le jour de mon rendu de manuscrit. Merci Elena et Hélène pour vos conseils précieux tout au long de ces trois ans et merci Fred pour ton expertise analytique qui fut d'une grande aide. Merci à mes copains de bureau, Moussa le pro de l'HPLC-UV, Lauren ma copine de galère, Coline ma coéquipière de footing spécialiste incontestée des GIF, Simon qui assure la relève de goinfre aux pauses cafés, Alix spécialiste des bounty faits-maison, et Benilde qui m'a si gentiment soutenue tard un soir de fin de rédaction de thèse. Merci aussi Nicolas, Myriam, Marina pour ces moments partagés lors des pauses café et pour votre gentillesse. Plein de courage à Marina et Benilde pour vos thèses respectives, vous allez assurer! Merci à mes deux stagiaires adorables, Rosita et Julie, qui m'ont beaucoup aidé et permis de gagner un temps précieux. Une chose est sûre, le labo va me manquer!

Merci à tous mes collègues de VERI qui ont contribué de près ou de loin à cette thèse et qui m'ont permis d'apprécier mes séjours sur Paris. Merci à l'équipe SAE de m'avoir intégrée les bras ouverts, un merci spécial à Véronique qui m'a initié à la validation des méthodes analytiques et à Faten pour ton précieux soutien lors de cette dernière année de thèse. Merci Delphine et Mathilde pour votre investissement lors du transfert de compétences. Merci Luis, Damien, Armelle, Sofiane, Gaëlle et j'en oublie pour vos conseils tout au long de cette thèse. Merci à toute la bande, Seb, Phil, Cécile, Anne-So, Pierre, Flora, Jérémy, Aurélie et j'en passe de m'avoir initiée aux soirées RockOut ce qui m'a permis d'apprécier pleinement mes séjours parisiens. Un demi-merci à Chris et Seb qui ont failli m'achever lors d'un footing dans les bois de Maisons-Laffitte!

Enfin, sur un plan plus personnel, merci à mes amis.

Merci à mes amis rencontrés à Montpellier pour tous ces moments géniaux partagés ensemble qui m'ont permis maintes fois de décompresser. Les années passent mais je constate avec une certaine émotion combien l'on reste heureux de se retrouver autour d'un verre au Foch, d'une rando au Pic Saint Loup, d'une baignade aux mille gouttes, d'un Seven Wonders, d'une sortie escalade au Torac, d'une virée surf à Palavas... Un merci spécial à mes anciens colocs si chers à mes yeux, Mémel (ma cappuccinofriend), Mimi Lapin et Yanou. Merci JC et Charles pour tous ces déjeuners partagés à l'agro qui m'ont permis de décrocher pendant quelques instants de la thèse, merci à mes confidents torturés Guigui et Tib, mes martiniquais JB et Dédé pour ce super voyage en 2014 et merci à tous mes autres amis, agro ou non, rencontrés sur le chemin : Zouz, Tib, Sophia, Nina, Balkis, Doud, Xav Sanka, Brice, Flora, Cam Boloss, Pti Flo, Marlène, Nico, AG, Lavalette, Maud, Sandrine, Vivi, Chacha et Rom, Dim, et j'en oublie surement...

Merci à toute la bande des « vieux », fanfarons ou non, pour ces weekends de dingue passés à Montpel, Six Four, dans les Cévennes ou les Alpilles... Une pensée spéciale pour Bouchon et Léo mes deux anges gardiens mais aussi bien évidemment Juju, Kaskiki, Karim, Nanou, Clo, Lizoub, Sev, Romrom (t'as réservé le concept finalement?), Marion, Kéké, Marie, Nico, AnneLo, Clemclem, Tom, Tiou, Jeanne, sans oublier Kiki le rescapé de Malaisia Airlines...

Merci à mon Papou du triathlon, alias José la menace, pour ce coaching sportif de haute qualité!

Peut-être que vous ne vous en êtes pas rendus compte mais vous m'avez tous, chacun à votre manière, permis de ne pas oublier qu'il y a une vie après la thèse et vous m'avez ainsi aidé à aller jusqu'au bout de cette aventure le plus sereinement possible alors MERCI MILLE FOIS!

Merci à mes copines de Prépa topissimes, Barb, Wafwaf, Célinette et Bibounette pour ces weekends «100% filles» qui, même s'ils sont rares de par notre éloignement géographique, m'ont permis de me requinquer à chaque fois!

Et puis, quel que soit le chemin que l'on choisisse d'emprunter, il ne faut pas oublier ses racines. Les miennes sont solidement ancrées au pied des montagnes de Haute Savoie que j'affectionne tant. Alors merci à mes amis hauts savoyards pour votre soutien sans faille malgré la distance, pour votre disponibilité lors de mes rares retours et votre gentillesse et bienveillance. Merci Ana et Audrey mes amies depuis toujours et pour toujours, mes deux petits chamois, Flav et Foine pour ce que vous êtes tout simplement, Renaud, Didi et ceux rencontrés depuis grâce aux premiers cités, Steph, Julie, Anaïs, Natou...

Merci Marc, mon ancien entraîneur d'aviron, pour ces valeurs de persévérance et de rigueur que tu m'as transmises à travers le sport et qui m'ont été d'une grande aide aux cours de ces trois ans.

Et surtout, merci à ma famille, je mesure la chance que j'ai de vous avoir à mes côtés. Mes parents pour tout ce que vous m'avez transmis, merci d'avoir su répondre présents toujours au bon moment même depuis l'autre bout de la France, de m'avoir reboostée quand j'en avais besoin et de m'accepter telle que je suis. Merci à mes grands-parents, vrais modèles de vie à mes yeux à qui je dédie cette thèse. Vous avez placé la barre très haute et j'espère être aussi dynamique que vous à vos âges respectifs! Un merci spécial à mes grands-parents maternels pour votre accueil si chaleureux sur Paris lors de mes déplacements chez Veolia et à mon grand-père paternel qui a relu ma thèse en entier et qui m'a envoyé 10 pages de recommandations du haut de ses 87 ans! Merci à Fafa, Flo et Rémi de m'avoir également permis de supers séjours parisiens, vous êtes top! Merci à mes cousins et autres oncles et tantes pour vos encouragements respectifs.

Enfin une pensée toute spéciale pour ma sœur et Yves. Merci Laurette de t'être improvisée tour à tour coach sportif de triathlon, médecin à domicile et coach mental. Merci pour ces moments de dingue vécus ensemble notamment lorsque nous avons franchi main dans la main à deux reprises la ligne d'arrivée à bout de souffle après les triathlons du Salagou et d'Annecy, merci pour ton soutien inconditionnel malgré nos caractères quelques fois divergents. Merci de croire en moi comme tu le fais!

Et merci Yves pour avoir partagé cette aventure au quotidien à mes côtés, pour m'avoir soutenue et aidée à relativiser beaucoup de choses durant ces trois ans et merci pour cet humour qui te caractérise tant et qui rend la vie plus légère!

Sommaire

Introduction générale.....	25
Chapitre 1 : Contexte et état de l'art	29
1. Pourquoi quantifier la biodégradation des PPSP en aval des STEP ?	30
1.1. Evaluation des risques et atténuation naturelle des PPSP dans le milieu aquatique	30
1.2. Les mécanismes d'atténuation naturelle	32
1.2.1. La volatilisation	32
1.2.2. La sorption.....	33
1.2.3. Les réactions de dégradation abiotiques.....	35
1.2.4. La biodégradation.....	36
1.3. Nécessité de quantifier spécifiquement les processus de biodégradation.....	37
2. Quantification de la biodégradation des micropolluants organiques : pourquoi les approches classiques sont-elles insatisfaisantes ?	39
2.1. Etude de la biodégradation en conditions contrôlées : écart entre les données prédites et celles du terrain	39
2.2. Etude de la biodégradation en conditions réelles : difficulté d'obtention de données quantitatives fiables	40
2.2.1. Approche géochimique	40
2.2.2. Mesure des ratios produits de transformation/molécules mères.....	42
2.2.3. Méthodes de biologie moléculaire.....	43
2.2.4. Méthode traceur	43
2.2.4.1. Concept de la méthode et limites	43
2.2.4.2. Quantification de la biodégradation selon la méthode traceur : prise en compte des variations des concentrations en sortie de STEP	44
2.2.4.2.1. Echantillonnage selon la méthode Lagrangian	44
2.2.4.2.2. Echantillonnage automatique et mesure de débits.....	45
2.2.4.2.3. Prélèvements à l'aide d'échantillonneurs passifs	46
2.3. Conclusions et objectifs d'étude.....	47
3. Le fractionnement isotopique	50
3.1. Concept de l'application du fractionnement isotopique à l'étude de la biodégradation de polluants organiques	50
3.1.1. Définition du fractionnement isotopique	50
3.1.2. Origine du fractionnement isotopique lors de la dégradation d'un composé organique.....	51

3.1.3.	Influence des mécanismes d'atténuation naturelle sur le fractionnement isotopique	52
3.1.4.	Utilisation du fractionnement isotopique pour quantifier spécifiquement les processus de biodégradation	53
3.1.5.	Utilisation du fractionnement isotopique pour élucider les mécanismes réactionnels de biodégradation	54
3.1.5.1.	Définition des effets isotopiques cinétiques (KIE).....	54
3.1.5.2.	Intérêt de mesurer les KIE lors de la biodégradation d'une molécule	55
3.1.5.3.	Calcul des KIE à partir des facteurs d'enrichissement isotopique.....	57
3.2.	Comment mesurer le fractionnement isotopique d'un composé organique ?	60
3.2.1.	Description des méthodes d'analyse des ratios isotopiques	60
3.2.2.	Comment obtenir des mesures de ratios isotopiques précises et exactes à l'aide des méthodes d'analyse en continu des rapports isotopiques ?	62
3.2.3.	Mesure du fractionnement isotopique du chlore avec un spectromètre de masse conventionnel	65
3.3.	Historique des applications du fractionnement isotopique à l'étude de la biodégradation de contaminants organiques	67
3.3.1.	Identification des sources de contamination	67
3.3.2.	Etude des processus de biodégradation en aval de rejets contaminés	67
3.3.2.1.	Identification qualitative des processus de biodégradation	68
3.3.2.2.	Quantification des processus de biodégradation	68
3.3.2.3.	Elucidation des mécanismes réactionnels de biodégradation.....	69
3.4.	Limites lors de l'application du fractionnement isotopique à la quantification de la biodégradation <i>in situ</i>	72
3.4.1.	Difficultés concernant le choix du facteur d'enrichissement isotopique	72
3.4.1.1.	Impact des conditions redox sur l'enrichissement isotopique	72
3.4.1.2.	Impact des cinétiques de biodégradation sur l'enrichissement isotopique	73
3.4.2.	Situations limitantes.....	73
3.5.	Conclusion sur le fractionnement isotopique.....	73
4.	Le fractionnement énantiomérique.....	75
4.1.	Concept de l'application du fractionnement isotopique à l'étude de la biodégradation de micropolluants organiques	75
4.1.1.	Définition de l'énantiométrie.....	75
4.1.2.	Propriétés biologiques différentes des deux énantiomères d'une molécule ..	76

4.1.3. Le fractionnement énantiomérique, un outil d'étude des processus de biodégradation.....	76
4.1.4. Le fractionnement énantiomérique, un outil pour quantifier les processus de biodégradation ?.....	77
4.2. Comment mesurer le fractionnement énantiomérique d'un composé organique? ..	79
4.2.1. Principe des analyses chirales.....	79
4.2.2. Phases stationnaires chirales utilisées.....	81
4.2.3. Influence de différents paramètres sur la séparation chromatographique chirale	84
4.2.3.1. Nature des phases stationnaires et mobiles.....	84
4.2.3.2. Température, pH et débit appliqués lors des analyses	84
4.2.3.3. Paramètres utilisés pour la préparation d'échantillon	85
4.2.4. Application de la chromatographie chirale aux études environnementales ..	85
4.3. Historique des applications du fractionnement énantiomérique à l'étude de la biodégradation de micropolluants organiques	86
4.3.1. Identification qualitative des processus de biodégradation.....	86
4.3.2. Quantification des processus de biodégradation.....	87
4.3.2.1. Conditions nécessaires à l'obtention d'une relation linéaire lorsque l'équation de Rayleigh est appliquée	87
4.3.2.2. Choix du facteur d'enrichissement énantiomérique à appliquer sur le terrain	89
4.3.3. Fractionnement énantiomérique et mécanismes réactionnels de biodégradation.....	89
4.3.4. Identification des sources de contamination	90
4.4. Limites lors de l'application du fractionnement énantiomérique à la quantification de la biodégradation <i>in situ</i>	91
4.4.1. Inversion chirale	91
4.4.2. Superposition des voies de dégradation dans l'environnement.....	92
4.5. Conclusion sur le fractionnement énantiomérique.....	92
Objectifs de thèse.....	93
Chapitre 2 : Evaluation du fractionnement isotopique du chlore comme indicateur quantitatif de la biodégradation des PPSP chlorés dans les sédiments en aval de STEP	97
1. Choix méthodologiques	98
1.1. Sélection des molécules d'étude.....	98
1.1.1. Le triclocarban.....	98

1.1.1.1.	Critère 1 : PPSP micropolluant chloré	98
1.1.1.2.	Critère 2 : présence environnementale	99
1.1.1.3.	Critère 3 : déchloration dans l'environnement	100
1.1.2.	Le diclofénac	101
1.1.2.1.	Critère 1 : PPSP micropolluant chloré	101
1.1.2.2.	Critère 2 : présence environnementale	101
1.1.2.3.	Critère 3 : déchloration dans l'environnement	101
1.1.3.	Le triclosan	102
1.1.3.1.	Critère 1 : PPSP micropolluant chloré	102
1.1.3.2.	Critère 2 : présence environnementale	103
1.1.3.3.	Critère 3 : déchloration dans l'environnement	103
1.1.4.	Recherche par masse exacte d'autres molécules d'étude potentielles.....	104
1.2.	Stratégie d'étude du fractionnement isotopique du chlore.....	108
1.2.1.	Etude des réactions de déchloration réductive des PPSP chlorés sélectionnés dans les sédiments en aval de STEP	108
1.2.1.1.	Nature des métabolites déchlorés étudiés dans les échantillons réels ..	108
1.2.1.2.	Matrices d'étude analysées.....	109
1.2.1.3.	Choix des sites d'étude et échantillonnage	110
1.2.1.3.1.	Choix des sites d'étude.....	110
1.2.1.3.2.	Prélèvements des échantillons environnementaux	112
1.2.1.4.	Préparation des échantillons	113
1.2.1.4.1.	Extraction des sédiments.....	113
1.2.1.4.2.	Extraction des effluents	114
1.2.1.5.	Instruments LC-MS utilisés	114
1.2.1.6.	Validation des méthodes d'analyse	116
1.2.1.6.1.	Linéarité	116
1.2.1.6.2.	Rendements d'extraction absolus.....	116
1.2.1.6.3.	Limites de quantification et de détection	117
1.2.1.6.4.	Fidélité.....	118
1.2.2.	Elucidation des mécanismes réactionnels de déchloration réductive des PPSP chlorés sélectionnés.....	118
1.2.2.1.	Etat des connaissances sur les mécanismes de déchloration réductive des molécules aromatiques chlorés	118
1.2.2.1.1.	Substitution nucléophile en conditions anaérobies.....	119
1.2.2.1.2.	Addition nucléophile d'un hydrure en conditions anaérobies.....	121
1.2.2.1.3.	Addition ou substitution nucléophiles en conditions aérobies.....	122

1.2.2.2.	Mode opératoire appliqué pour étudier les mécanismes réactionnels ...	124
1.2.2.2.1.	Identification du chlore partant dans les échantillons environnementaux	124
1.2.2.2.2.	Analyse des mécanismes réactionnels en conditions contrôlées	125
1.2.3.	Mesure du fractionnement isotopique du chlore lors de la déchloration réductive des PPSP étudiés et application de l'équation de Rayleigh en conditions contrôlées	126
2.	Evaluation du fractionnement isotopique du chlore à l'aide du triclocarban (TCC) ...	128
2.1.	Publication n°1 : Déchloration réductive du triclocarban dans les sédiments en aval de STEP	128
2.2.	Déchloration réductive du triclocarban dans les effluents de STEP.....	151
2.2.1.	Description de la méthode d'analyse du TCC dans les effluents de STEP.	151
2.2.2.	Validation de la méthode d'analyse du TCC dans les effluents de STEP ...	151
2.2.3.	Résultats d'occurrence obtenus.....	152
2.3.	Publication n°2 : Etude des mécanismes réactionnels de déchloration réductive du TCC.....	154
2.4.	Conclusions sur le triclocarban	181
3.	Evaluation du fractionnement isotopique du chlore à l'aide du diclofenac (DCF).....	182
3.1.	Description des méthodes d'analyse du DCF dans les sédiments et les effluents de STEP	182
3.1.1.	Préparation des échantillons.....	182
3.1.2.	Paramètres de la méthode d'analyse LC-HRMS.....	182
3.2.	Validation des méthodes d'analyse du DCF dans les sédiments et les effluents de STEP	183
3.3.	Résultats d'occurrence obtenus et conclusions sur le DCF.....	186
4.	Evaluation du fractionnement isotopique du chlore à l'aide du triclosan (TCS)	188
4.1.	Déchloration réductive du triclosan dans les sédiments en aval de STEP.....	188
4.1.1.	Description des méthodes d'analyse du TCS dans les sédiments et les effluents de STEP	188
4.1.2.	Validation des méthodes d'analyse du TCS dans les sédiments et les effluents de STEP.....	188
4.1.3.	Résultats d'occurrence obtenus.....	189
4.2.	Etude des mécanismes réactionnels de déchloration réductive du TCS	193
4.2.1.	Mode opératoire appliqué <i>in vitro</i>	193
4.2.2.	Résultats des expériences mécanistiques <i>in vitro</i>	195

4.3.	Mesure du fractionnement isotopique du chlore lors de la déchloration réductive du TCS.....	198
4.3.1.	Mode opératoire appliqué pour mesurer le fractionnement isotopique du chlore	198
4.3.1.1.	Méthode d'analyse utilisée pour les mesures isotopiques	198
4.3.1.2.	Paramètres de la méthode d'analyse GC-MS	199
4.3.1.3.	Fidélité et exactitude des mesures isotopiques	200
4.3.2.	Résultats issus des mesures isotopiques	203
4.3.2.1.	Fidélité et exactitude des mesures isotopiques réalisées en GC-MS	203
4.3.2.2.	Fractionnement isotopique du chlore lors de la déchloration du TCS	203
4.4.	Conclusions sur le TCS	203
5.	Mécanismes réactionnels de déchloration réductive et fractionnement isotopique du chlore : cas des molécules aromatiques	205
5.1.	Mode opératoire appliqué <i>in vitro</i> pour étudier le lien entre mécanismes réactionnels et fractionnement isotopique du chlore	205
5.2.	Résultats issus de l'application de Rayleigh aux cinétiques de déchloration du TCC et du DCF	208
Chapitre 3 : Evaluation du fractionnement énantiomérique comme indicateur quantitatif de la biodégradation des PPSP chiraux en aval des STEP		211
1.	Choix méthodologiques	212
1.1.	Sélection des molécules d'étude.....	212
1.1.1.	La venlafaxine	212
1.1.1.1.	Critère 1 : micropolluant PPSP chiral commercialisé sous forme racémique	212
1.1.1.2.	Critère 2 : devenir de la molécule <i>in vivo</i> chez l'homme	214
1.1.1.3.	Critère 3 : présence environnementale	215
1.1.1.4.	Critère 4 : biodégradation énantiosélective dans l'environnement.....	215
1.1.2.	Le métoprolol.....	216
1.1.2.1.	Critère 1 : micropolluant PPSP chiral commercialisé sous forme racémique	216
1.1.2.2.	Critère 2 : devenir de la molécule <i>in vivo</i> chez l'homme	216
1.1.2.3.	Critère 3 : présence environnementale	217
1.1.2.4.	Critère 4 : biodégradation énantiosélective dans l'environnement.....	217
1.2.	Stratégie d'étude du fractionnement énantiomérique	218
1.2.1.	Développement d'une méthode chirale adaptée	218
1.2.1.1.	Molécules incluses dans la méthode.....	218

1.2.1.2. Extraction des matrices aqueuses.....	219
1.2.1.1. Instruments LC-MS utilisés	221
1.2.2. Etude du fractionnement énantiomérique dans des microcosmes	221
1.2.3. Etude du fractionnement énantiomérique dans des STEP	223
2. Publication n°3 : Evaluation du fractionnement énantiomérique à l'aide du métoprolol (MTP)	225
3. Evaluation du fractionnement énantiomérique à l'aide de la venlafaxine (VEN)	264
3.1. Description de la méthode d'analyse chirale de la VEN dans les matrices aqueuses	264
3.2. Etude du fractionnement énantiomérique de la VEN dans les STEP	266
3.3. Etude du fractionnement énantiomérique de la VEN dans des microcosmes....	268
3.4. Conclusions sur la VEN	269
Chapitre 4 : Discussion générale	271
1. Avantages et limites des deux outils évalués pour quantifier la biodégradation des PPSP en aval des STEP.....	272
2. Placer les résultats issus de la thèse dans une politique globale d'évaluation et gestion des risques liés à la présence des PPSP en aval des STEP	281
2.1. Evaluation de la capacité du milieu naturel à éliminer les PPSP et calibration des modèles de prédiction d'exposition via la quantification des processus de biodégradation	281
2.2. Vérification du fait que les processus de biodégradation conduisent à la formation de sous-produits moins toxiques que les molécules mères via l'identification des sous-produits de biodégradation	283
Conclusions et perspectives	285
Références bibliographiques	291

Liste des abréviations

AKIE : effets isotopiques cinétiques apparents
 α_E : facteur de fractionnement isotopique de l'élément E
 α -HMTP : alpha-hydroxymétoprolol
CF : facteur de concentration de la méthode d'extraction
CSIA : Compound Specific Isotope Analysis
DCC : dichlorocarbanilide
DCF: diclofénac
DCS : diclosan
 δ : notation delta pour les mesures isotopiques
 E° : potentiel redox
EMQ : eau milli-Q
EF : fraction énantiomérique
ER : ratio énantiomérique
 hE : isotope lourd d'un élément chimique E
 lE : isotope léger d'un élément chimique E
 ϵ_E : facteur d'enrichissement isotopique de l'élément E
f : taux de biodégradation (%)
GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GC/C-IRMS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à rapport isotopique via une interface de combustion/pyrolyse
GST : glutathion-S-transférase
H : constante de Henry
HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCD : Higher Energy Collision Dissociation
HLB : hydrophilic-lipophilic balance
HRP : peroxydase de Raifort
ICP-MS : spectromètre de masse couplé à un plasma inductif
IDL : limites de détection instrumentales
IQL : limites de quantification instrumentales
K : constante de réaction
KIE : effets isotopiques cinétiques
 K_M : constante de saturation de Michaelis-Menten
Koc : Constante de partage matière organique/eau
Kow : Constante de partage octanol/eau
LC-HRMS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution
LC-MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

MCC : monochlorocarbanilide
MDL : limites de détection de la méthode
MQL : limites de quantification de la méthode
MTP : métoprolol
MTPA : métoprolol acide
m/z : ratio masse/charge
NaBH₄ : tétrahydruoborate de sodium
NCC : carbanilide
O-DMTP : O-desmethyImétoprolol
ODV : O-desmethylvenlafaxine
ONDV : O,N-desmethylvenlafaxine
PCB : polychlorobiphényles
PCP : pentachlorophénol
POCIS : Polar Organic Chemical Integrative Sampler
PPSP : Produits Pharmaceutiques et de Soins Personnels
PTFE : polytétrafluoroéthylène
R² : coefficient de détermination
R_{Cl} : ratio isotopique du chlore
REA : rendement d'extraction absolu
Rs : taux d'échantillonnage dans le cas des POCIS
Rs : résolution chromatographique
SIM : Selected Ion Monitoring
SMOC : Standard Mean Ocean Chloride
SPE : extraction en phase solide
SPME : microextraction en phase solide
SRM : Selected Ion Monitoring
STEP : stations d'épuration
TCC : triclocarban
TCE : trichloréthylène
TCS : triclosan
TP : produit de transformation
VEN : venlafaxine
VPDB : Vienna Pee Dee Belemnite

Liste des figures

Figure 1. Mécanismes d'atténuation naturelle des concentrations des micropolluants dans les eaux de rivière.	32
Figure 2. Concentrations relatives en diclofénac, un anti-inflammatoire, et en lithium (élément traceur) mesurées en sortie d'une colonne de sol de laboratoire, suite à leur dopage simultané en entrée de colonne (Scheytt et al. 2004).	35
Figure 3. Prévion du sens d'une réaction de dégradation en utilisant la règle du gamma...41	
Figure 4. Echelle des couples accepteurs d'électrons utilisés par les microorganismes pour dégrader les polluants (modifié d'après R. W. Miller, 1981).	41
Figure 5. Superposition des concentrations en ng/L (à gauche) ou des charges massiques en g/j (à droite) d'un médicament persistant, l'acide clofibrique, et des débits (m^3/s) mesurés aux deux extrémités d'un tronçon de rivière (amont = graphiques du haut et aval = graphiques du bas) (Radke et al. 2010).	46
Figure 6. Evolution de la composition isotopique d'un composé en isotopes lourds (hE) et légers (lE) lors de sa dégradation (Kuder 2012).	51
Figure 7. Schéma simplifié qui illustre la relation linéaire obtenue entre le pourcentage de biodégradation d'une molécule et les variations isotopiques associées lors de l'application de l'équation de Rayleigh (Hayes 2004).	54
Figure 8. Illustration des différences d'énergie d'activation observées entre les isotopologues lourd et léger d'une molécule lors de l'étape cinétiquement limitante d'une réaction de biodégradation (Elsner 2010).	56
Figure 9. Schéma explicatif des KIE primaires et secondaires du chlore observés lorsque le TCE subit une déchloration réductive via 1) un mécanisme de substitution nucléophile et 2) un mécanisme d'addition nucléophile (Kuder et al. 2013).	58
Figure 10. Principe d'analyse en continu des rapports isotopiques des composés organiques (CSIA) (Elsner et al. 2012).	61
Figure 11. Analyse de la composition isotopique du chlore à partir des aires chromatographiques GC-MS des isotopologues d'une molécule qui contient 5 chlores (Aeppli et al. 2010).	66
Figure 12. Concept 2D-CSIA : corrélation linéaire entre les fractionnements isotopiques des éléments E et E' (Kuder et al., 2013). Chaque point de la droite correspond à un point de la cinétique de biodégradation de la molécule étudiée.	71
Figure 13. Schéma récapitulatif des applications possibles du fractionnement isotopique à l'étude de la biodégradation sur le terrain.	74

Figure 14. Relations entre énantiomères et diastéréoisomères : exemple du 3-chloropentan-2-ol.	75
Figure 15. Extrapolation de l'équation de Rayleigh au fractionnement énantiomérique, en s'appuyant sur l'approche isotopique, pour quantifier la biodégradation.	79
Figure 16. Séparation des énantiomères de la venlafaxine et de ses métabolites sur colonne chirale (Li et al. 2013).	80
Figure 17. Chromatogrammes GC-MS correspondant à l'analyse des énantiomères du mécoprop dans des échantillons d'eau souterraine prélevés en aval d'une zone contaminée (Zipper et al. 1998).	86
Figure 18. Concentrations et ratios énantiomériques de la MDA en entrée et sortie de trois STEP (WWTP 1, WWTP 2, WWTP 3) (Kasprzyk-Hordern and Baker 2012).	91
Figure 19. Voie de déchloration réductive du TCC décrite dans des sédiments en aval de STEP (Miller et al., 2008a; Venkatesan et al., 2012).	100
Figure 20. Déchloration réductive du DCF observée lors d'incubations menées en présence des enzymes HRP et GST (Boerma et al., 2014).	102
Figure 21. Déchloration réductive du TCS observée lors d'incubations menées en présence d'une culture algale <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (Wang et al., 2013a).	104
Figure 22. a) Chromatogramme d'un échantillon de sédiment (analysé au cours de la thèse) reconstruit à partir de l'ion de rapport m/z 252,981 ([M-H] ⁻ du diclosan), avec une précision de ± 5 ppm ; b) Massif isotopique du chlore du diclosan dans l'échantillon sédimentaire (ratio relatif de 100/57/11 entre les trois pics isotopiques du chlore détectés) ; c) Massif isotopique théorique du chlore du diclosan (ratio relatif de 100/63/10 entre les trois pics isotopiques du chlore détectés).	106
Figure 23. Localisation des trois sites sélectionnés en France pour l'étude du fractionnement isotopique du chlore (Google Earth).	111
Figure 24. Structure chimique de la cobalamine.	119
Figure 25. Mécanismes réactionnels de déchloration réductive anaérobies des solvants chlorés en présence de cobalamine (LCo) à savoir 1) une addition nucléophile, 2) une substitution nucléophile et 3) un transfert dissociatif d'électron (Kuder et al., 2013).	120
Figure 26. Mécanisme de substitution nucléophile proposé pour expliquer la déchloration réductive des chlorophénols (ArX) via le processus d'halorespiration en présence de cobalamine (B ₁₂ Co) (Smith, 1993).	121
Figure 27. Mécanisme d'addition nucléophile d'un hydrure, décrit pour le chlorobenzène, qui conduit à une déchloration réductive de la molécule (Sadowsky et al., 2014).	122
Figure 28. Mécanismes de déchloration réductive aérobie décrits dans la littérature pour a) le diclofénac (DF) qui se dégrade via un mécanisme de substitution nucléophile du	

chlore par le glutathion après arrachement d'un électron de la molécule (Boerma et al., 2014); b) la dichloroaniline qui se dégrade via un mécanisme d'addition nucléophile du glutathion en ipso suivi d'une élimination du chlore après arrachement initial de deux électrons (Zhang et al., 2011).....	123
Figure 29. Déchloration réductive du TCC et formation possible de deux isomères de DCC, le 3,4'-DCC et le 4,4'-DCC.	125
Figure 30. Positions moléculaires au niveau desquelles un chlore peut être éliminé lors de la déchloration du TCS.....	125
Figure 31. Schéma qui illustre la relation de Rayleigh appliquée au fractionnement isotopique du chlore.	127
Figure 32. Chromatogrammes LC-ESI ⁻ -HRMS correspondant à l'analyse du TCC (312,971), du DCC (279,009) et du NCC (211,087) dans un échantillon d'effluents de la STEP 2.....	153
Figure 33. Chromatogrammes LC-ESI ⁻ -HRMS correspondant à l'analyse du DCF (294,008) dans un échantillon d'effluents de la STEP 3 et un échantillon de sédiments prélevé en aval de cette STEP.....	186
Figure 34. a) Chromatogrammes LC-ESI ⁻ -HRMS correspondant à l'analyse du TCS (286,943) et du DCS (252,981) dans un échantillon d'effluents de la STEP 3 et un échantillon de sédiments prélevé en aval de cette STEP, b) profile isotopique du DCS dans l'échantillon de sédiments et c) profile isotopique théorique du DCS.	191
Figure 35. a) Chromatogrammes LC-ESI ⁻ -HRMS montrant la polymérisation du TCS (286,943) en TCS-TCS (572,878) en présence de GST et HRP ; b) Profile isotopique du TCS-TCS dans l'échantillon et c) profile isotopique théorique du TCS-TCS.	195
Figure 36. Chromatogrammes LC-ESI ⁻ -HRMS (acquis en balayage complet et dans lequel les masses du TCS et du DCS ont été extraites) montrant la déchloration du TCS (286,943) en DCS (252,981) après 6 jours d'incubation en présence de cobalamine et de tétrahydruroborate de sodium.....	196
Figure 37. Illustration de la méthode de mesure du $\delta^{37}\text{Cl}$ du PCP Supelco à partir de la valeur absolue de $\delta^{37}\text{Cl}$ du PCP Aldrich.	201
Figure 38. Application de Raleigh au fractionnement isotopique du chlore généré par différents mécanismes de déchloration réductive : une AN du glutathion sur le DCF suivie d'une substitution nucléophile en conditions aérobies (étoiles) ; un mécanisme radicalaire lors de la déchloration aérobie du TCC (triangles) et une AN d'un hydrure lors de la déchloration anaérobie du TCC (ronds).....	209
Figure 39. Devenir métabolique de la venlafaxine in vivo (Ereshefsky and Dugan, 2000). .	214
Figure 40. Devenir métabolique du métoprolol in vivo.	217

Figure 41. Conditions expérimentales appliquées en microcosmes pour vérifier l'existence d'une relation linéaire entre le fractionnement énantiomérique et l'ampleur de la biodégradation lors de l'application de l'équation de Rayleigh.	222
Figure 42. Localisation des trois STEP sélectionnées pour l'étude du fractionnement énantiomérique (Google Earth).	223
Figure 43. Fractions énantiomériques du métoprolol mesurées dans les entrées et sorties des STEP 4 et 5.	262
Figure 44. Application de l'équation de Rayleigh aux mesures des concentrations et des ratios énantiomériques du MTP réalisées dans les 5 STEP étudiées.	262
Figure 45. Chromatogrammes LC-MS correspondants aux analyses de la VEN (278,211) dans a) un échantillon étalon de VEN (50 µg/L) ; b) les entrées de la STEP 1 ; c) les effluents de la STEP 1.	266
Figure 46. a) Concentrations (somme des deux énantiomères) et b) fractions énantiomériques de la VEN dans les influents et effluents des 3 STEP étudiées. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types mesurés sur un triplicata de mesures.	267
Figure 47. Evolution des concentrations des énantiomères de la venlafaxine (µg/L) dans les microcosmes incubés a) dans le noir et b) à la lumière.	268
Figure 48. Evolution des fractions énantiomériques de la venlafaxine dans les différents microcosmes.	269
Figure 49. Mécanisme de transfert d'électron proposé pour expliquer la déchloration réductive des composés aromatiques chlorés en présence de cobalamine (Cooper et al., 2015).	277
Figure 50. Contribution des outils de fractionnements isotopique et énantiomérique dans l'évaluation des risques engendrés par les PPSP en aval des STEP.	282
Figure 51. Bilans de masse réalisés pour le TCC, le TCS et le MeTCS dans les phases liquides (kg/j) et les boues (kg/j) d'une STEP. Chaque valeur représente une moyenne de 5 mesures (Lozano et al., 2013b).	287
Figure 52. Fonctions des outils quantitatifs de biodégradation dans l'évaluation et la gestion des risques liés à la présence des PPSP au sein et en aval des STEP.	289

Liste des tableaux

Tableau 1. Constantes de Henry de divers PPSP (Lahti 2012).....	33
Tableau 2. Log K_{ow} et log K_{oc} de divers PPSP (Lahti 2012).	34
Tableau 3. Temps de demi-vie biologiques mesurés pour divers bêtabloquants dans des microcosmes eau de rivière/sédiment (Ramil et al. 2010).....	39
Tableau 4. Présentation des avantages et limites des outils et méthodes utilisés pour étudier les processus de biodégradation des micropolluants organiques.	48
Tableau 5. Ratio isotopique naturel (%) des isotopes stables des éléments chimiques qui constituent principalement les composés organiques (Hofstetter and Berg, 2011).	50
Tableau 6. KIE du carbone calculés lors de la biodégradation du méthyl tert-butyl éther en conditions aérobies et anaérobies.	57
Tableau 7. Proposition d'une rationalisation de la validation des méthodes CSIA (Hunkeler et al. 2008).	64
Tableau 8. Listes des principales phases stationnaires chirales utilisées pour l'analyse des PPSP chiraux.	82
Tableau 9. Propriétés physico-chimiques des PPSP chlorés sélectionnés pour étudier le fractionnement isotopique du chlore.	99
Tableau 10. Molécules d'étude potentielles recherchées par masse exacte dans les échantillons environnementaux analysés durant la thèse.	107
Tableau 11. Caractéristiques des sites et des STEP étudiés (données 2014).	112
Tableau 12. Paramètres de validation de la méthode d'analyse LC-ESI ⁻ -HRMS du TCC et de ses métabolites déchlorés, le DCC et le NCC, dans les effluents de STEP.	152
Tableau 13. Concentrations en TCC, DCC et NCC mesurées dans les effluents des 3 STEP étudiées.....	152
Tableau 14. Conditions chromatographiques appliquées pour l'analyse du DCF et de ses métabolites déchlorés dans les sédiments et les effluents de STEP.....	182
Tableau 15. Paramètres de masse appliqués en modes positif et négatif pour l'analyse du DCF et ses métabolites déchlorés dans les sédiments et les effluents de STEP.	183
Tableau 16. Paramètres utilisés pour détecter et quantifier le DCF en LC-ESI ⁻ -HRMS.....	184
Tableau 17. Paramètres de masse utilisés pour rechercher les métabolites déchlorés du DCF dans les sédiments et les effluents de STEP en LC-ESI ⁻ -HRMS et LC-ESI ⁺ -HRMS. ...	184
Tableau 18. Paramètres de validation de la méthode d'analyse LC-ESI ⁻ -HRMS du DCF dans les sédiments et les effluents de STEP.	185
Tableau 19. Concentrations en DCF mesurées dans les effluents de STEP et les sédiments collectés sur les 3 sites d'étude.	186

Tableau 20. Paramètres utilisés pour détecter et quantifier le TCS et le DCS en LC-ESI ⁻ -HRMS.	188
Tableau 21. Paramètres de validation de la méthode d'analyse LC-ESI ⁻ -HRMS du TCS et du DCS dans les sédiments et les effluents de STEP.	189
Tableau 22. Concentrations en TCS et DCS mesurées dans les sédiments et les effluents collectés sur les 3 sites d'étude.	190
Tableau 23. Conditions expérimentales appliquées pour étudier les mécanismes de déchloration réductive du triclosan in vitro.	194
Tableau 24. Paramètres de la méthode d'analyse GC-MS appliqués pour mesurer la composition isotopique du chlore dans le TCS.	200
Tableau 25. Conditions d'analyse du PCP en GC-MS.	202
Tableau 26. Conditions d'expériences et d'analyses appliquées pour étudier le fractionnement isotopique du chlore au cours de la déchloration réductive du TCC et du DCF.	206
Tableau 27. Propriétés physico-chimiques des PPSP chiraux sélectionnés pour étudier le fractionnement énantiomérique.	213
Tableau 28. Caractéristiques des méthodes d'extraction SPE utilisées dans la littérature pour extraire le MTP, la VEN et leurs métabolites des matrices aqueuses.	220
Tableau 29. Caractéristiques des STEP sélectionnées pour l'étude du fractionnement énantiomérique (données 2014).	224
Tableau 30. Caractéristiques des 2 STEP (STEP 4 et 5) supplémentaires sélectionnées pour l'étude du fractionnement énantiomérique (données 2014).	261
Tableau 31. Concentrations des énantiomères du MTP dans les entrées et sorties des STEP 4 et 5 (ng/L).	261
Tableau 32. Paramètres utilisés pour détecter et quantifier la VEN en LC-ESI ⁺ -HRMS.	264
Tableau 33. Performances de la méthode d'analyse chirale LC-ESI ⁺ -HRMS de la VEN dans les influents et effluents de STEP.	264
Tableau 34. Caractéristiques propres aux outils de fractionnements isotopique et énantiomérique lorsque ces derniers sont appliqués à l'étude de la biodégradation de contaminants.	273

Introduction générale

La présence généralisée de produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPSP) dans le milieu aquatique est aujourd'hui avérée par les nombreuses campagnes de mesures *in situ*. Ce phénomène s'explique en grande partie par l'élimination incomplète des PPSP dans les stations d'épuration (STEP) qui conduit à leur rejet dans l'environnement aquatique. Les concentrations des PPSP rejetées dans les eaux de surface varient ainsi de quelques ng/L à quelques µg/L en fonction de divers paramètres tels que la quantité de PPSP consommée, la métabolisation de ces substances *in vivo*, le dimensionnement et les procédés des STEP.

La présence des PPSP dans le milieu aquatique est préoccupante car ces molécules sont conçues pour agir sur les systèmes biologiques et peuvent donc constituer un danger lorsqu'elles se retrouvent au contact d'un organisme vivant non ciblé. Des études écotoxicologiques ont confirmé ce danger en démontrant les effets néfastes induits par certains PPSP sélectionnés sur des organismes aquatiques tels que des perturbations du système endocrinien ou des résistances bactériennes. Les PPSP peuvent également présenter un danger pour la santé humaine car ces molécules persistantes peuvent atteindre des zones fréquentées par l'activité humaine telles que des sites de baignade ou peuvent s'accumuler dans des organismes aquatiques destinés à la consommation. Pour répondre à l'objectif de la Directive Cadre sur l'Eau, qui consiste à obtenir « un bon état écologique et chimique des eaux de surface et souterraines en Europe pour fin 2015 », il est urgent d'évaluer les risques, liés à la présence des PPSP dans l'environnement, pour pouvoir aider les pouvoirs publics en charge de la réglementation à prioriser les composés qui nécessitent d'être régulés. Ces informations peuvent également aider les opérateurs privés en charge de la gestion des réseaux d'eaux usées, tel que Veolia, à orienter leurs stratégies de réduction d'émission à la source et l'optimisation des procédés de traitement des eaux afin que ces derniers éliminent en priorité les micropolluants les plus à risque.

La démarche d'évaluation des risques consiste à étudier à la fois la toxicité des PPSP et à estimer l'exposition des écosystèmes ou des populations humaines à ces micropolluants à l'aide de modèles prédictifs. La calibration des modèles prédictifs d'exposition nécessite notamment d'avoir accès à des informations quantitatives sur les différents phénomènes d'atténuation naturelle des concentrations que peuvent subir les PPSP dans le milieu aquatique, tels que les mécanismes de biodégradation, de volatilisation, de sorption et de photodégradation. Parmi ces phénomènes, la biodégradation est souvent considérée comme le principal processus d'atténuation irréversible des PPSP. L'étude qualitative et quantitative de ce processus biologique *in situ* est primordiale pour :

- Estimer, comme expliqué précédemment, la capacité du milieu à éliminer irréversiblement les PPSP et évaluer l'exposition des organismes vivants aux PPSP.
- Vérifier que la biodégradation des PPSP conduit réellement à la formation de métabolites moins toxiques que les molécules mères.

Ces deux informations sont indissociables pour évaluer les risques. Des méthodes permettent aujourd'hui d'acquérir des informations sur les voies de dégradation et le potentiel de biodégradation des PPSP. Au contraire, l'évaluation quantitative de la biodégradation des PPSP reste grandement limitée par l'absence de méthodes de mesure adéquates.

Dans ce contexte, les objectifs de la thèse ont consisté à proposer et adapter des outils pour permettre spécifiquement l'étude quantitative de la biodégradation des PPSP en aval de STEP à des concentrations environnementales. Pour ce faire, deux outils moléculaires complémentaires ont été sélectionnés : le fractionnement énantiomérique et le fractionnement isotopique du chlore. L'objectif du fractionnement énantiomérique consiste à quantifier la biodégradation de molécules PPSP chirales à partir des mesures des variations des ratios énantiomériques. Le fractionnement isotopique du chlore a pour but de quantifier les réactions de biodégradation des PPSP chlorés. La capacité des deux outils moléculaires à caractériser spécifiquement les processus de biodégradation et à quantifier l'ampleur de ces derniers en aval des STEP a été évaluée au cours de la thèse.

Le premier chapitre du manuscrit est une synthèse bibliographique qui décrit le fonctionnement des deux outils proposés et explique pourquoi ces derniers sont susceptibles de constituer des indicateurs quantitatifs de la biodégradation *in situ* des PPSP. Les précédentes applications et les limites de ces outils sont également présentées dans ce chapitre. Les second et troisième chapitres présentent les résultats obtenus au cours de la thèse sur les fractionnements isotopique et énantiomérique, respectivement. Ces résultats s'articulent autour de trois articles scientifiques. Le quatrième chapitre a pour but de discuter les résultats obtenus et de mettre en avant les connaissances nouvelles acquises grâce à ce travail de thèse.

Chapitre 1 : Contexte et état de l'art

1. Pourquoi quantifier la biodégradation des PPSP en aval des STEP ?

1.1. Evaluation des risques et atténuation naturelle des PPSP dans le milieu aquatique

L'élimination incomplète des produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPSP) résiduels et de leurs métabolites dans les stations d'épuration conduit au rejet de ces substances dans le milieu aquatique (Daneshvar et al. 2010; Ferreira da Silva et al. 2011). Par conséquent, de nombreux PPSP sont aujourd'hui présents dans les eaux de rivière à des concentrations de l'ordre du ng-µg/L (Bagnall et al., 2012a; Bisceglia et al., 2010; Botta and Dulio, 2014; Chiaia-Hernandez et al., 2013; Halden and Paull, 2005; Heberer, 2002; Jenkins et al., 2003; Metcalfe et al., 2010; Sapkota et al., 2007; Yu and Chu, 2009; Zhao et al., 2010). La présence des PPSP dans l'environnement aquatique est préoccupante car ces molécules peuvent engendrer des effets néfastes sur les organismes vivants du milieu naturel.

Pour pouvoir gérer convenablement les risques liés à la présence des PPSP dans les eaux en aval des STEP, il faut au préalable évaluer la toxicité des substances et l'exposition des organismes vivants aux PPSP. Seul le second volet de la démarche d'évaluation des risques est étudié dans ce manuscrit. Réaliser les mesures d'exposition sur le terrain est peu envisageable en raison de la quantité de données requises et des difficultés techniques de mesure. Par conséquent, les mesures d'exposition sont souvent obtenues par modélisation, laquelle constitue alors un outil indispensable. Les modèles ont pour objectif de prédire les concentrations des PPSP en aval des STEP (PEC, *predictive environmental concentrations*) en se basant sur des estimations des quantités consommées, des taux d'élimination *in vivo* et dans les STEP, de la dilution en rivière et des taux d'atténuation *in situ*. Les modèles géo-référencés les plus utilisés sont PhAte™ (*Pharmaceutical Assessment and Transport Evaluation*) aux États-Unis (Anderson et al., 2004) et GREAT-ER (*Geography referenced Regional Exposure Assessment Tool for European Rivers*) en Europe (Feijtel et al., 1997). Ces deux modèles ont déjà été appliqués avec succès pour prédire les concentrations de micropolluants pharmaceutiques dans plusieurs rivières aux États-Unis ou en Europe (Aldekoa et al., 2013; Cunningham et al., 2009; Hannah et al., 2009). Le calage des modèles prédictifs nécessite d'avoir accès à des données quantitatives précises sur les phénomènes d'atténuation naturelle que peuvent subir les PPSP dans l'environnement, phénomènes qui seront présentés de manière détaillée dans la partie 1.2 du chapitre 1. En effet, lorsque les modèles n'appliquent pas les taux d'atténuation *in situ* adéquats, l'incertitude des

concentrations prédites augmente et ces dernières peuvent alors être erronées et peu appropriées pour une évaluation fiable des risques. Ainsi, les concentrations aquatiques en bêta-bloquants prédites par GREAT-ER (30–68 ng/L) sont apparues très supérieures aux concentrations mesurées (<10 ng/L) dans une étude réalisée en Suisse (Alder et al., 2010). Ces différences observées ont été expliquées par le fait que seuls les taux d'atténuation propres aux processus de photolyse ont été pris en compte, faute de données disponibles sur les autres mécanismes d'atténuation (Alder et al., 2010). Or, les auteurs expliquent que la biodégradation est susceptible de jouer un rôle important dans l'atténuation de ces composés pharmaceutiques.

Pour prédire les concentrations des PPSP dans les rivières, les modèles se basent certaines fois sur un taux d'atténuation *in situ* global qui englobe, sans les distinguer, l'ensemble des phénomènes d'atténuation que peuvent subir les molécules (Cunningham et al., 2009; Price et al., 2009). Or, la contribution de chaque mécanisme d'atténuation naturelle est importante à mesurer. En effet, il est essentiel d'évaluer si les concentrations aquatiques des PPSP sont atténuées dans le milieu via des processus non destructifs (hydrologiques ou physiques) qui ne diminuent pas la masse totale de molécules présente dans l'environnement ou via des processus destructifs (biodégradation) qui éliminent les composés de l'environnement. L'impact environnemental n'est alors pas le même en fonction du mécanisme considéré.

Les informations quantitatives concernant les différents phénomènes d'atténuation que peuvent subir les PPSP dans l'environnement sont donc importantes à obtenir car elles permettent :

- D'adapter les modèles prédictifs d'exposition à l'estimation des concentrations aquatiques de divers PPSP.
- D'estimer la capacité du milieu à éliminer les PPSP (processus destructifs versus processus non destructifs).

Ces informations restent limitées pour de nombreux PPSP (Fono et al. 2006; Radke et al. 2010; Writer et al. 2013a) car elles sont difficiles à acquérir, en raison de la grande diversité de substances détectées et des difficultés analytiques qu'impose le fait de travailler à des faibles concentrations dans un milieu complexe. Cette absence de données est également due au fait qu'il manque des outils de mesure pour quantifier spécifiquement les différents phénomènes d'atténuation. Les mécanismes d'atténuation naturelle méritent pourtant d'être étudiés en profondeur pour une meilleure évaluation et gestion des risques liés à la présence des PPSP en aval des STEP.

1.2. Les mécanismes d'atténuation naturelle

1.2.1. La volatilisation

Le phénomène de volatilisation est susceptible de diminuer la concentration des micropolluants dans les rivières (cf Figure 1 pour schéma récapitulatif des mécanismes d'atténuation naturelle), mais n'est jamais destructif (transformation, mais non disparition).

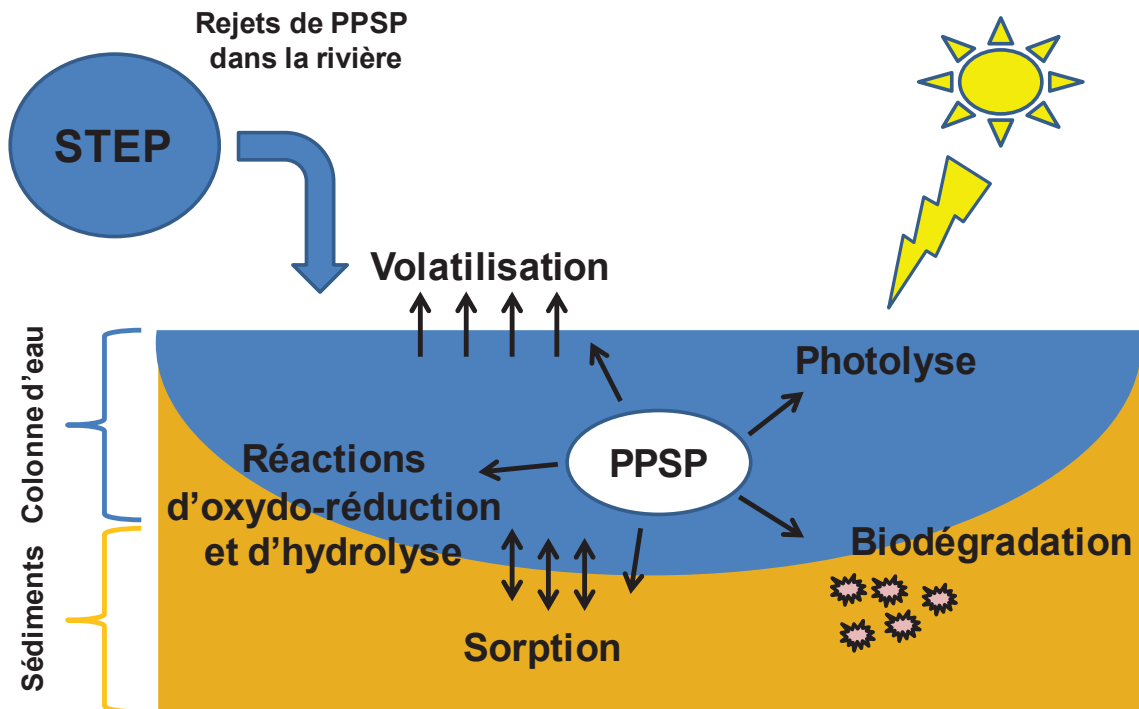


Figure 1. Mécanismes d'atténuation naturelle des concentrations des micropolluants dans les eaux de rivière.

Le partage d'une substance entre les phases gazeuses et aqueuses d'un système à l'équilibre est exprimé par la constante de Henry (H ou K_H) :

$$H = \frac{p}{C_{aq}} \quad \text{Équation. 1}$$

Avec :

- p , la pression partielle du gaz en phase vapeur (atm).
- C_{aq} , la concentration du gaz en solution (mol/m^3).

Plus la constante de Henry d'une substance est élevée, plus cette substance sera volatile dans le compartiment aqueux et aura tendance à se volatiliser dans l'environnement

(Gurr 2006). Un composé est considéré volatil lorsque sa constante de Henry est supérieure à 10^{-4} atm.m³/mol (Lahti 2012).

Les constantes de Henry des PPSP sont généralement largement inférieures à 10^{-4} atm.m³/mol (cf Tableau 1 pour exemples) car les structures organiques complexes de ces molécules réduisent leur caractère volatil. Le phénomène de volatilisation est donc souvent négligé pour les PPSP.

Tableau 1. Constantes de Henry de divers PPSP (Lahti 2012).

Composés	Constantes de Henry (atm.m ³ .mol ⁻¹)
Métoprolol	$1,40 \times 10^{-13}$
Aténolol	$1,37 \times 10^{-18}$
Propranolol	$7,98 \times 10^{-13}$
Venlafaxine	$2,04 \times 10^{-11}$
Diclofénac	$4,73 \times 10^{-12}$
Kétoprofène	$2,12 \times 10^{-11}$
Naproxène	$3,39 \times 10^{-10}$
Paracétamol	$6,42 \times 10^{-13}$
Ibuprofène	$1,50 \times 10^{-7}$

1.2.2. La sorption

Les diminutions des concentrations des PPSP observées dans les eaux de rivière sont en partie dues au phénomène de sorption de ces molécules sur/dans les particules solides en suspension ou les sédiments des rivières (Figure 1).

Les PPSP neutres peuvent interagir avec les particules organiques du milieu via la formation de liaisons hydrophobes (Besse and Garric, 2008). Dans ce cas, les calculs des logarithmes des coefficients de partage matière organique/eau ($\log K_{oc}$) ou octanol/eau ($\log K_{ow}$) permettent de prédire l'affinité des PPSP pour la matière organique des particules solides. Les valeurs de $\log K_{ow}$ et $\log K_{oc}$ varient énormément en fonction des structures chimiques des PPSP (cf Tableau 2 pour exemples). En général, le phénomène de sorption est considéré significatif lorsque les $\log K_{ow}$ et K_{oc} des composés sont supérieurs à 4,5 et 3 respectivement (Tissier et al. 2005).

Tableau 2. Log K_{ow} et log K_{oc} de divers PPSP (Lahti 2012).

Composés	log K_{ow}	log K_{oc}
Diclofénac	4,51	2,45–3,74
Naproxène	3,18	2,34
Ibuprofène	3,97	1,3–2,21
Sertraline	5,29	3,8–4,85

L'interaction des PPSP avec les particules solides ou les sédiments peut également faire intervenir des interactions électrostatiques lorsque les molécules comportent des fonctions ionisables (Kibbey et al. 2007; Schaffer et al. 2012). Dans ce dernier cas, outre le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}), le pKa des molécules et le pH du milieu sont des paramètres qui peuvent influencer sur la capacité de fixation des molécules. Les bétabloquants présentent des valeurs de pKa élevées (autour de 9) et sont donc généralement chargés positivement dans le milieu naturel (Kibbey et al. 2007). Plus le pH du milieu est faible et s'éloigne des valeurs de pKa, plus les molécules seront sous forme cationique et interagiront avec les particules anioniques des sédiments, telles que les complexes argilo-humiques ou encore les minéraux dont le point de zéro charge est faible (Kibbey et al. 2007). Pour les composés ionisables, l'affinité des PPSP pour les particules solides peut être estimée en corrigeant le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) pour prendre en compte la fraction des molécules qui est sous forme ionique à un pH donné. Le paramètre corrigé est nommé log D_{ow} (Kah and Brown, 2007). Malgré cela, la prédiction du comportement des molécules ioniques reste aujourd'hui encore imparfaite.

La sorption peut être réversible (phénomène de désorption) (Agyin-Birikorang et al. 2010; Ramil et al. 2010) et présente ainsi le risque de relarguer une partie des substances piégées. Ce phénomène de sorption/désorption a pour conséquence un retard de migration des micropolluants dans l'environnement, notamment lorsque le rejet de ces derniers est instantané. Ce phénomène de retard peut être étudié en laboratoire à l'aide de colonnes de sédiment. Lors d'une expérience réalisée au sein d'une colonne de sédiment dopée en diclofénac et en lithium (élément traceur qui ne s'adsorbe pas), l'augmentation des concentrations du diclofénac en sortie de colonne a été observée avec un retard par rapport à l'augmentation des concentrations de l'élément traceur (Figure 2) (Scheytt et al. 2004).

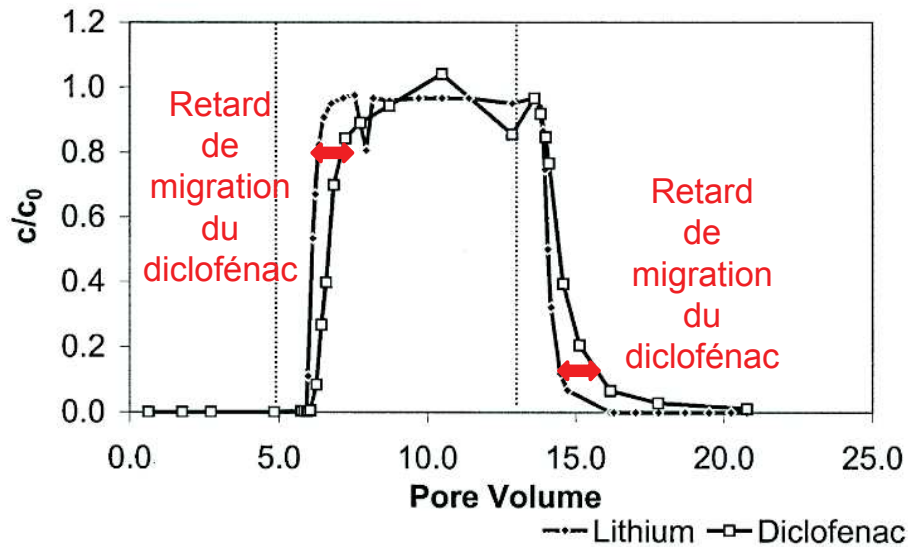


Figure 2. Concentrations relatives en diclofénac, un anti-inflammatoire, et en lithium (élément traceur) mesurées en sortie d'une colonne de sol de laboratoire, suite à leur dopage simultané en entrée de colonne (Scheytt et al. 2004).

Le diclofénac s'est adsorbé sur la matière organique du sol puis s'est désorbé ce qui a ralenti son cheminement dans la colonne de sol et explique le retard constaté.

Dans le cas des rivières situées en aval des STEP, les rejets des PPSP sont plus ou moins continus et les phénomènes de sorption sont généralement plus restreints car les concentrations adsorbées sont amenées à tendre vers l'équilibre (Kunkel and Radke 2012).

1.2.3. Les réactions de dégradation abiotiques

Les PPSP peuvent également être dégradés dans l'environnement via des mécanismes biotiques ou abiotiques. La dégradation abiotique fait appel à des processus photolytiques ou chimiques (hydrolyse, oxydation,...) (Figure 1).

La photolyse correspond à la décomposition chimique (oxydation) de substances sous l'action de la lumière. Il existe deux processus de photodégradation :

- La photolyse directe implique l'absorption de radiations UV par le micropolluant, qui passe à un état excité qui favorise sa décomposition. Dans ce cas, la transformation du composé chimique est une conséquence directe de l'absorption d'un photon.
- La photolyse indirecte implique l'absorption de la lumière par un photosensibilisateur (ex : matière organique naturelle), ce qui a pour conséquence une production d'intermédiaires réactifs (ex : radical hydroxyle). On parle de photo-transformation

indirecte lorsque ces intermédiaires générés transfèrent de l'énergie, des électrons ou des atomes d'hydrogène au micropolluant induisant alors sa dégradation (Chen et al. 2012; Wang et al. 2012).

La photodégradation du diclofénac a été étudiée *in vitro* dans des échantillons exposés à la lumière réelle (Radke et al. 2010). Les vitesses de photolyse du diclofénac ont été identiques pour les expériences conduites dans des eaux de rivière stérilisées (riches en matière organique) ou dans des eaux distillées. Ces résultats indiquent que le diclofénac est dégradé essentiellement via des processus de photolyse directe (Radke et al. 2010). Au contraire, les vitesses de photolyse mesurées pour le naproxène, au cours de la même étude, ont montré qu'il se photodégrade plus rapidement dans les eaux de rivière stérilisées que dans les eaux distillées, indiquant une contribution des processus de photolyse indirecte à la dégradation de ce composé. L'absence de sorption du diclofénac et du naproxène sur la matière organique en suspension des eaux de rivière avait été vérifiée au préalable.

Si la photodégradation peut constituer un processus d'élimination intéressant, ce mécanisme ne concerne que la partie supérieure de la colonne d'eau et n'est pas donc pas significatif dans les rivières profondes ou troubles dans lesquelles la lumière s'atténue rapidement avec la profondeur. Une étude de terrain menée sur le diclofénac, un composé connu pour ses propriétés photolabiles (Kunkel and Radke 2012), a ainsi montré que cette molécule se photodégrade totalement en 16 jours à la surface de l'eau alors qu'à 1 m de profondeur seulement 1/3 de ce composé est dégradé en 2 semaines (Bartels and von Tümpling 2007).

Les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse sont des réactions abiotiques qui peuvent avoir lieu dans la colonne d'eau et dans les sédiments en fonction des conditions physico-chimiques rencontrées dans le milieu. Par exemple, certains micropolluants peuvent être oxydés par les hydroxydes et oxydes métalliques présents dans les sédiments (Huang 2003; Tadjale and Zhang 2012).

1.2.4. La biodégradation

La dégradation biotique, dite aussi dégradation biologique ou encore biodégradation, est un mécanisme de dégradation des matières organiques par l'action des micro-organismes (bactéries, champignons) présents dans l'environnement (Figure 1). Le stade ultime de la biodégradation est la minéralisation des matières organiques en substances telles que le dioxyde de carbone (CO₂), l'eau ou les ions minéraux (ammonium, sulfate, chlorure,

phosphate, nitrite...). Avant d'atteindre la minéralisation complète, des composés intermédiaires (métabolites) peuvent se former. Les réactions successives permettant de passer de la substance organique mère aux composés intermédiaires (quand il y en a), pour donner enfin les produits finaux de dégradation prennent un certain temps, variable en fonction des conditions du milieu. La biodégradation est donc un processus destructif, ce qui est particulièrement intéressant car, contrairement aux processus physiques, elle est capable d'éliminer les PPSP de l'environnement. Ainsi, dans des microcosmes conduits en laboratoire dans des conditions proches de celles rencontrées sur le terrain, 20 à 30 % du 4-nonylphenol et du 17 β -estradiol dopés ont été minéralisés en 7 jours (Jeffrey H Writer et al., 2011). Même si ces résultats de laboratoire restent qualitatifs, ils démontrent que les processus de biodégradation sont capables d'oxyder totalement des PPSP organiques complexes en matière minérale (Writer et al. 2011a).

En aval des STEP, les microorganismes sont principalement présents dans le compartiment sédimentaire. Ainsi, les réactions de biodégradation des PPSP sont susceptibles de se dérouler en priorité dans les sédiments ou au niveau de la zone hyporhéique de la rivière (interface rivière/sédiment) (Kunkel and Radke 2008). La biodégradation de plusieurs perturbateurs endocriniens a été étudiée dans différentes matrices environnementales en laboratoire à savoir de l'eau de rivière, des biofilms en suspension dans la colonne d'eau (épilithon) et des sédiments. Les taux de biodégradation sont apparus plus élevés dans les sédiments pour l'ensemble des composés (Jeffrey H Writer et al., 2011).

Si la biodégradation permet de diminuer la pollution engendrée par les PPSP dans la plupart des cas, ce processus peut également l'accroître dans la situation où les métabolites générés seraient plus toxiques que les molécules mères. La biodégradation des nonylphénols polyéthoxylés peut ainsi générer la formation d'un perturbateur endocrinien plus toxique, le 4-nonylphenol (Writer et al. 2012). Pour pouvoir déterminer si les mécanismes de biodégradation conduisent à une atténuation réelle de la toxicité globale en aval des STEP, le croisement des études de biodégradation avec des études de toxicité des molécules mères et des sous-produits de transformation est nécessaire.

1.3. Nécessité de quantifier spécifiquement les processus de biodégradation

Les processus présentés précédemment ont la capacité de réduire naturellement l'exposition des organismes vivants aux PPSP même si, en fonction du mécanisme considéré, le degré d'atténuation et l'impact environnemental ne sont pas identiques. Ainsi, la biodégradation est

souvent présentée comme le seul mécanisme irréversible qui permet une atténuation significative des concentrations aquatiques des PPSP (Schmidt et al. 2004). Au contraire, la sorption est connue pour être réversible (Agyin-Birikorang et al. 2010; Ramil et al. 2010) et de plus faible ampleur lorsque les rejets de micropolluants sont continus (Kunkel and Radke 2012). La volatilisation est considérée comme négligeable pour les molécules organiques à poids moléculaires élevés qui incluent la plupart des PPSP (Heidler et al. 2006; Zhao et al. 2010) et la photodégradation n'est pas significative dans les rivières profondes ou troubles (Bartels and von Tümpling 2007). Enfin, les processus de dégradation abiotiques autres que la photolyse ont été étudiés en aval des STEP et les résultats montrent qu'ils sont en général négligeables pour les PPSP, notamment en raison de leurs structures organiques complexes difficiles à dégrader (Kunkel and Radke 2008, 2012; Radke et al. 2010).

La biodégradation est donc souvent décrite comme le processus principal d'atténuation irréversible des PPSP dans l'environnement (Schmidt et al. 2004). L'étude qualitative et quantitative de ce processus biologique en aval des STEP est primordiale pour :

- Mesurer les taux d'atténuation biologique *in situ* qui sont nécessaires pour évaluer la capacité du milieu à éliminer irréversiblement les PPSP et pour calibrer avec précision les modèles de prédiction d'exposition.
- Vérifier si l'atténuation des PPSP via les réactions de biodégradation conduit à la formation de sous-produits plus ou moins toxiques que les molécules mères. Pour ce faire, les sous-produits de dégradation doivent être identifiés et la toxicité des molécules mères et des sous-produits générés doit être impérativement estimée.

Ces deux étapes sont nécessaires et indissociables pour évaluer avec fiabilité les risques engendrés par les PPSP en aval des STEP. La première étape nécessite notamment d'avoir à disposition des outils ou méthodes qui permettent de quantifier les processus de biodégradation. Pour vérifier la disponibilité de ces derniers, nous nous sommes attelés à une revue critique des techniques classiques les plus utilisées pour étudier la biodégradation des micropolluants organiques.

2. Quantification de la biodégradation des micropolluants organiques : pourquoi les approches classiques sont-elles insatisfaisantes ?

2.1. Etude de la biodégradation en conditions contrôlées : écart entre les données prédites et celles du terrain

Dans la plupart des travaux réalisés jusqu'à aujourd'hui, la biodégradation des micropolluants a été étudiée en conditions contrôlées à l'échelle du laboratoire (Yu et al. 2006; Ramil et al. 2010; Gasser et al. 2012a). En plus de l'identification des sous-produits générés, ces études ont permis d'obtenir des informations sur le potentiel de biodégradation des composés analysés.

Les temps de demi-vie biologiques de divers bêtabloquants ont par exemple été mesurés dans des batchs eaux de rivière/sédiments dans une étude réalisée en Allemagne (Tableau 3) (Ramil et al. 2010). Ces résultats quantitatifs de laboratoire peuvent difficilement être extrapolés à l'échelle terrain mais ont tout de même permis d'identifier les composés susceptibles d'être biodégradés significativement *in situ*. Ainsi, d'après le Tableau 3, l'aténolol, le nadolol et le pindolol sont les trois composés bêtabloquants qui semblent les plus propices à s'atténuer rapidement via des processus de biodégradation dans l'environnement.

Tableau 3. Temps de demi-vie biologiques mesurés pour divers bêtabloquants dans des microcosmes eau de rivière/sédiment (Ramil et al. 2010).

Composé	Temps de demi-vie mesurés dans des microcosmes eau de rivière/sédiment ^a (jours)
Aténolol	3,0 ± 0,3
Acébutolol	27,7 ± 2
Bisoprolol	27,7 ± 2,9
Celiprolol	67
Métoprolol	28,9 ± 3,2
Nadolol	9
Pindolol	0,53 ± 0,08
Propranolol	33 ± 2,9
Sotalol	30 ± 2,3

^aCaractéristiques des sédiments : carbone organique total = 0,74 %, limon/argile = 10 %.

L'extrapolation des résultats quantitatifs de laboratoire à l'échelle terrain reste compliquée car d'autres facteurs interviennent *in situ* et influencent significativement la biodégradation des micropolluants tels que les paramètres morphologiques et hydrologiques de la rivière (hauteur de la colonne d'eau, vitesse d'écoulement de l'eau) (Fono et al. 2006; Kunkel and Radke 2008) ou encore les conditions météorologiques (Radke et al. 2010). Ainsi, un temps de demi-vie biologique du gemfibrozil de 5,6 jours a été calculé dans une rivière artificielle avec une vitesse d'écoulement d'environ 0,31 m/s alors qu'aucune biodégradation de ce composé n'a été observée dans cette même rivière lorsque la vitesse d'écoulement était faible (0,12 m/s) (Kunkel and Radke 2008).

A cause des limites inhérentes aux travaux de laboratoire, les études *in situ* en aval des STEP restent incontournables pour quantifier précisément la biodégradation des PPSP dans l'environnement. Pourtant, le nombre d'études réalisées à l'échelle réelle reste faible à cause des contraintes de terrain qui compliquent l'acquisition et l'interprétation des données de biodégradation. Parmi ces contraintes, nous pouvons citer la faible teneur des molécules recherchées, la variation de leurs concentrations en sortie de STEP (Writer et al. 2013b), la présence de plusieurs sources de pollution possibles et la superposition des mécanismes d'atténuation dans l'environnement. Les études réalisées *in situ* ont donc mis en place des méthodes pour tenter de surmonter ces contraintes et étudier ainsi les processus biologiques *in situ*.

2.2. Etude de la biodégradation en conditions réelles : difficulté d'obtention de données quantitatives fiables

2.2.1. Approche géochimique

L'étude indépendante des processus de biodégradation est compliquée *in situ* car les mécanismes d'atténuation naturelle se superposent dans l'environnement. Certaines méthodes ont ainsi été développées dans le but d'analyser spécifiquement la biodégradation *in situ*. L'une d'elles consiste à utiliser les accepteurs (ou les donneurs dans certains cas) d'électrons comme indicateurs de biodégradation. Les microorganismes utilisent des accepteurs d'électrons naturellement présents dans l'environnement pour dégrader les micropolluants. Chaque réaction de dégradation possède un potentiel redox propre E° . Pour qu'un composé (Red1) soit biodégradé via une réaction d'oxydation (E°_1), un accepteur d'électrons (Ox2), avec un potentiel redox E°_2 supérieur à E°_1 , doit être disponible. Cette règle dite de gamma permet de prédire les réactions de dégradation qui sont susceptibles de se dérouler dans l'environnement (Figure 3).

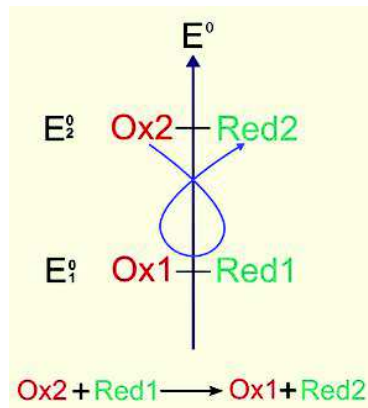


Figure 3. Prédiction du sens d'une réaction de dégradation en utilisant la règle du gamma.

L'oxygène est utilisé en priorité comme accepteur d'électrons en surface des sédiments mais, en raison de sa diminution rapide avec la profondeur, d'autres couples redox interviennent tels que ceux impliquant le nitrate, le sulfate, le fer ou le manganèse (Figure 4). Seule l'échelle du potentiel redox est représentée sur la Figure 4 car il reste difficile de lier un potentiel redox à une profondeur de sédiment étant donné que cette relation dépend fortement des paramètres du milieu (nature des sédiments, débit de la rivière). Ainsi, lorsque le débit de la rivière est faible (0,12 m/s), l'oxygène et donc le potentiel redox diminuent fortement au sein des 6 premiers centimètres de sédiments au contraire d'une rivière qui présente un débit élevé (0,31 m/s) (Kunkel and Radke 2008). Dans le cas du débit élevé, la quantité d'oxygène diminue peu au sein des 30 premiers centimètres de sédiments.

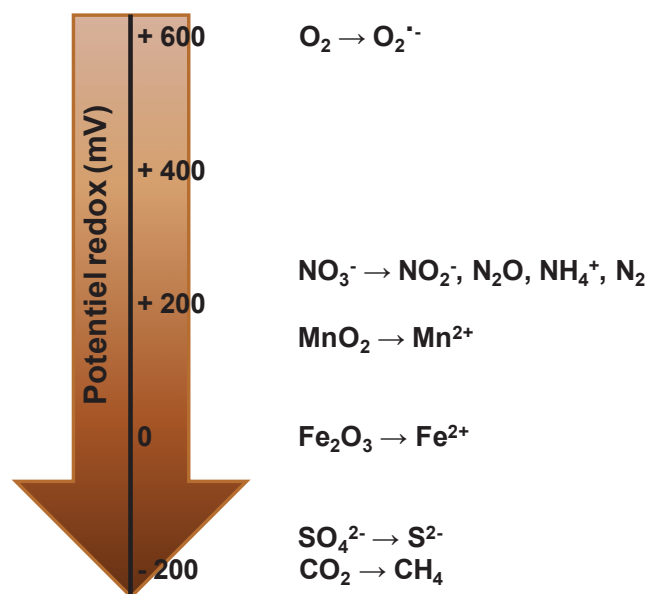


Figure 4. Echelle des couples accepteurs d'électrons utilisés par les microorganismes pour dégrader les polluants (modifié d'après R. W. Miller, 1981).

La diminution significative des concentrations en accepteurs d'électrons et l'augmentation des espèces réduites correspondantes, en aval de rejets de polluants, permet d'identifier les processus d'oxydoréduction qui se déroulent dans l'environnement et peut constituer un indicateur qualitatif de biodégradation. Par exemple, les ions Fe^{2+} et S^{2-} , issus de la réduction du Fe^{3+} et du sulfate SO_4^{2-} , ont été détectés en concentrations élevées au niveau d'un aquifère contaminé en trichloréthylène (TCE), trichloroéthane (TCA), et benzène (Richmond et al. 2001). La présence de ces deux espèces réduites, en excès, suggère que l'atténuation des contaminants mentionnés s'effectue via des processus de biodégradation anaérobies (Richmond et al. 2001).

Néanmoins, la diminution en accepteurs d'électrons mesurée reflète l'oxydation de la matière organique totale et ne permet pas de distinguer l'oxydation d'un composé en particulier. Cet outil géochimique permet surtout d'obtenir une image globale qualitative des processus de dégradation qui se déroulent sur le terrain pour des contaminants présents à des concentrations élevées (de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ ou $\mu\text{g/g}$) (Bombach et al. 2010). De plus, cette approche géochimique ne peut être appliquée que lorsque les processus de dégradation abiotiques sont négligeables par rapport aux processus biotiques sinon ces deux processus peuvent difficilement être différenciés.

2.2.2. Mesure des ratios produits de transformation/molécules mères

La biodégradation *in situ* d'un micropolluant en particulier peut être mise en évidence via l'analyse du ratio produit de transformation (TP)/molécule mère. Ainsi, le benzylsuccinate et ses homologues méthylés ont été utilisés comme marqueurs de biodégradation anaérobies du benzène et du toluène dans des études réalisées dans des aquifères contaminés (Beller et al., 1995). Via cette approche, les sous-produits de dégradation générés sont automatiquement identifiés et l'on peut ainsi prédire si les réactions de biodégradation conduisent à la formation de sous-produits plus ou moins toxiques que les molécules mères.

Le TP doit répondre à plusieurs contraintes pour être utilisé comme indicateur de biodégradation d'un micropolluant donné (Beller 2000) :

- Le TP doit être formé spécifiquement via la biodégradation du micropolluant étudié.
- Ses propriétés de partition eau/sédiment doivent être identiques à la molécule mère.
- Il ne doit pas exister d'autres sources (industrielles, naturelles ou commerciales) possibles de rejet du TP.
- Le TP doit être stable chimiquement et biologiquement.

- Une fois produit, le TP doit être excrété dans le milieu extracellulaire.

Ces conditions limitent très fortement le nombre de micropolluants qui peuvent être étudiés via cette approche. De plus, certaines substances se dégradent selon plusieurs voies de dégradation ce qui complique le système d'étude.

En raison des contraintes énoncées, l'approche TP/molécule mère peut en général difficilement être utilisée pour quantifier avec précision les processus de biodégradation. Elle permet surtout de démontrer l'existence de certains processus biologiques de dégradation.

2.2.3. Méthodes de biologie moléculaire

Les méthodes de biologie moléculaire peuvent également apporter des informations sur les processus de biodégradation. La mise en place préalable d'expériences en microcosmes, en laboratoire ou *in situ*, permet d'identifier pour des micropolluants ciblés, les microorganismes responsables de leur biodégradation (Madsen, 2005). Par la suite, l'isolement et l'identification des microorganismes présents dans des sites naturels contaminés permet de prédire qualitativement la biodégradation de tel ou tel composé en fonction de la nature des microorganismes identifiés. De même, l'occurrence de certaines réactions de biodégradation peut être prédite via l'identification *in situ* d'ADN ou d'ARN codant pour des enzymes spécifiques de dégradation, à l'aide des techniques PCR (réaction en chaîne par polymérase). Par exemple, la détection dans un aquifère contaminé du gène codant pour l'enzyme benzylsuccinate synthase, qui catalyse la dégradation anaérobie du toluène, suggère que les processus de biodégradation anaérobies contribuent à l'élimination de ce contaminant (Winderl et al., 2007).

Les techniques moléculaires sont donc capables d'estimer un potentiel de biodégradation des micropolluants et de prédire les sous-produits générés. Elles permettent aussi d'identifier les conditions géochimiques qui optimisent l'activité des microorganismes. Les informations quantitatives sur les processus de biodégradation ne peuvent cependant pas être obtenues via ces techniques moléculaires.

2.2.4. Méthode traceur

2.2.4.1. Concept de la méthode et limites

La méthode, qui peut permettre d'apporter des informations quantitatives sur la biodégradation des micropolluants organiques *in situ* entre deux points d'une rivière, fait

intervenir des molécules traceurs (Writer et al. 2011b). La diminution des concentrations en micropolluants généralement observée en aval des STEP est en grande partie due à la dilution et à la dispersion de ces substances dans le milieu. L'emploi d'une molécule traceur consiste à mesurer les concentrations d'une molécule persistante (molécule dont l'atténuation n'est due qu'aux processus hydrologiques) dans la rivière parallèlement aux concentrations des micropolluants, pour prendre en compte les effets de dilution et dispersion dans la diminution des concentrations des contaminants. Le traceur peut être ajouté dans le milieu à travers l'injection d'une solution test, telle que le bromure de sodium, (Writer et al. 2012, 2013a) ou des molécules persistantes déjà présentes dans l'environnement aquatique peuvent être suivies, telles que l'acide clofibrique (Radke et al. 2010), la carbamazépine (Kunkel and Radke 2012) ou le bore (Barber et al. 2013).

Si la molécule traceur compense la diminution des concentrations des micropolluants due aux effets de dilution et dispersion, cette approche ne permet pas de différencier la biodégradation des autres mécanismes d'atténuation naturelle tels que la sorption, la photodégradation ou la volatilisation (Kunkel and Radke 2012; Barber et al. 2013). Cette méthode peut donc seulement quantifier la biodégradation des molécules qui s'atténuent essentiellement via des processus biologiques et peut conduire à une surestimation importante de la biodégradation si d'autres mécanismes d'atténuation se superposent. En général, elle permet surtout de calculer un taux d'atténuation global des micropolluants. De plus, parce que cette méthode quantitative requiert la comparaison de concentrations absolues de micropolluants entre deux points d'une rivière, elle nécessite la mise en place de techniques d'échantillonnage complexes pour prendre en compte les variations des concentrations des composés en sortie de STEP.

2.2.4.2. Quantification de la biodégradation selon la méthode traceur : prise en compte des variations des concentrations en sortie de STEP

2.2.4.2.1. Echantillonnage selon la méthode Lagrangian

La méthode Lagrangian consiste à échantillonner la même parcelle d'eau au fur et à mesure que celle-ci se déplace le long de la rivière (Writer et al. 2012, 2013a; Barber et al. 2013). Une étape préliminaire, qui passe par l'injection d'un colorant dans l'eau de rivière, permet de mesurer le temps que met la masse d'eau pour atteindre les différents points de prélèvement. Les prélèvements sont ensuite réalisés en respectant les temps de passage prédéfinis. Une étude visant à mesurer l'atténuation de divers PPSP en aval de STEP a ainsi utilisé la rhodamine comme colorant pour estimer les temps nécessaires aux micropolluants

pour parcourir 3,6 et 7,4 km de rivière en période d'étiage (Barber et al. 2013). Les temps de transit calculés, 2,1 et 6,2 heures respectivement, ont été respectés lors de l'échantillonnage de l'eau de rivière, ce qui a permis de mesurer l'atténuation des PPSP dans le même échantillon d'eau et de s'affranchir ainsi des variations de leurs concentrations en sortie de STEP.

Néanmoins, la méthode Lagrangian ne prend pas en compte les variations importantes des vitesses d'écoulement observées, comme par exemple lors d'un épisode pluvieux, et est donc seulement appropriée pour des mesures ponctuelles d'atténuation.

2.2.4.2.2. Echantillonnage automatique et mesure de débits

Une autre méthode consiste à superposer des mesures de débit d'eau à des mesures de concentrations en micropolluants, acquises simultanément, pour s'affranchir des variations des concentrations en sortie de STEP (Radke et al. 2010). Cette démarche nécessite de placer des débitmètres et des préleveurs automatiques à deux extrémités d'un tronçon de rivière. La comparaison de l'évolution temporelle des deux hydrogrammes permet de définir des périodes, ou évènements temporels (périodes sèches ou pluvieuses), pendant lesquelles l'allure de leurs profils est similaire. Le décalage dans le temps des évènements temporels des deux hydrogrammes traduit la durée de transit nécessaire à l'eau pour parcourir le tronçon de rivière. Les mesures de concentrations des composés sont alors intégrées sur les périodes relatives à chaque évènement temporel pour les sites amont et aval de la rivière (Figure 5). Le ratio des concentrations moyennes entre les deux sites du tronçon permet de déterminer l'atténuation des composés pour chaque évènement temporel défini (Radke et al. 2010). La Figure 5 présente en grisée, sur les deux graphiques de droite, les quatre évènements temporels définis par (Radke et al. 2010) pour intégrer les concentrations de l'acide clofibrique au niveau des sites amont et aval de la rivière.

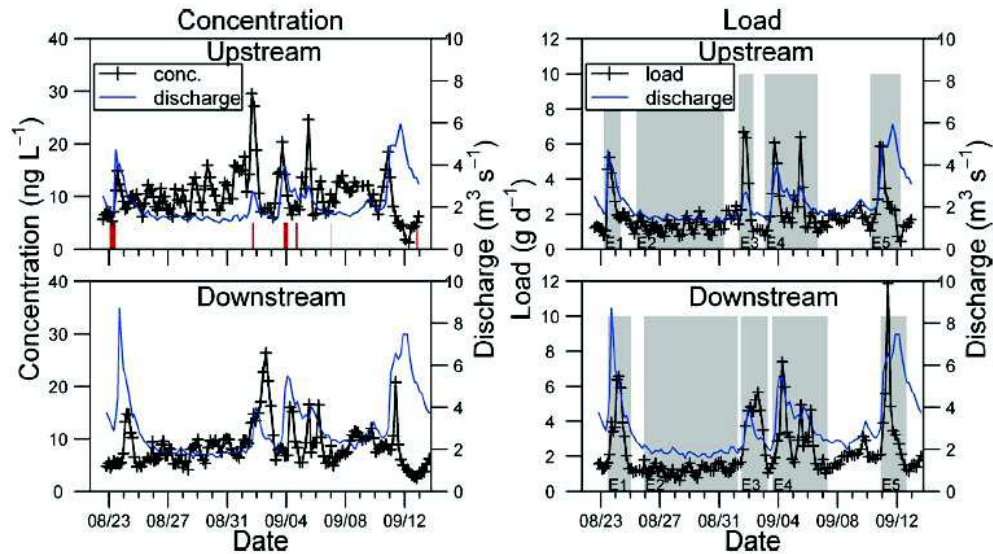


Figure 5. Superposition des concentrations en ng/L (à gauche) ou des charges massiques en g/j (à droite) d'un médicament persistant, l'acide clofibrique, et des débits (m^3/s) mesurés aux deux extrémités d'un tronçon de rivière (amont = graphiques du haut et aval = graphiques du bas) (Radke et al. 2010).

Cette méthode présente l'avantage de considérer simultanément les variations des concentrations en sortie de STEP et les fluctuations du débit de la rivière pour mesurer l'atténuation naturelle. Elle reste cependant contraignante car elle nécessite d'avoir accès à l'évolution temporelle des concentrations des composés, ce qui implique l'analyse d'un grand nombre d'échantillons (270 mesures dans le cas de l'étude de Radke et al., 2010). De plus, les échantillonneurs automatiques ne peuvent être utilisés que sur certains sites bien particuliers comme les conduites d'évacuation ou les tronçons bien brassés. D'autre part, leur coût élevé et leur besoin d'entretien les rendent souvent prohibitifs pour les programmes de surveillance de grande envergure.

2.2.4.2.3. Prélèvements à l'aide d'échantillonneurs passifs

Face aux limites des prélèvements ponctuels dues aux variabilités spatio-temporelles des micropolluants, l'échantillonnage passif se présente comme une solution intéressante. L'utilisation d'échantillonneurs passifs permet d'intégrer les concentrations des micropolluants sur une période qui peut atteindre plusieurs semaines (56 jours dans l'article d'Alvarez et al. 2004). Cette technique est basée sur le piégeage en continu des micropolluants présents dans le milieu par un échantillonneur placé dans la rivière pendant une certaine durée. Suivant la nature de la membrane et de la phase adsorbante utilisées,

différents types de composés peuvent être échantillonnés. Un échantillonneur passif particulièrement utilisé est le POCIS (*Polar Organic Chemical Integrative Sampler*). Les caractéristiques du POCIS lui permettent de cibler des molécules relativement polaires ($0 < \log K_{ow} < 3-4$) (Arditsoglou and Voutsas, 2008; Harman et al., 2011; Munaron et al., 2012). Après exposition, les échantillonneurs sont acheminés au laboratoire où ils subissent des étapes d'extraction et d'analyse qui permettent de mesurer les concentrations des micropolluants piégés. Dans certains cas, des équations spécifiques permettent d'établir un lien entre la concentration de composés mesurés dans le préleveur passif et la concentration correspondante dans le milieu échantillonné. Pour pouvoir estimer la concentration d'un composé dans l'eau, il est nécessaire de connaître son taux d'échantillonnage (Rs). Ces constantes, caractéristiques de chaque échantillonneur, de chaque molécule étudiée et des conditions expérimentales, peuvent être tirées de la littérature ou déterminées expérimentalement.

L'inconvénient majeur de cette approche intégrée concerne la mesure des taux d'échantillonnage (Rs) des échantillonneurs passifs. Ces mesures sont difficiles à réaliser étant donné qu'il existe peu de données de calibration et d'approches de calibration *in situ* des préleveurs tenant compte des conditions environnementales. Or, les Rs peuvent être affectés par les conditions environnementales du milieu (turbulence, température, pH, salinité...) (MacLeod et al. 2007). Ainsi, pour les composés acides (ibuprofène, gemfibrozil...), le taux d'échantillonnage des POCIS diminue lorsque le pH augmente (Li et al., 2011). Une amélioration de la calibration *in situ* des échantillonneurs passifs est donc nécessaire pour déterminer avec fiabilité les Rs et les concentrations environnementales des composés étudiés.

2.3. Conclusions et objectifs d'étude

Les avantages et inconvénients des différents outils et méthodes habituellement appliqués pour étudier la biodégradation des micropolluants sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Présentation des avantages et limites des outils et méthodes utilisés pour étudier les processus de biodégradation des micropolluants organiques.

Méthodes	Avantages	Inconvénients
Etudes en microcosmes <i>in vitro</i>	Expériences faciles à mettre en œuvre Informations qualitatives spécifiques aux processus de biodégradation	Transfert difficile des résultats de laboratoire à l'échelle terrain donc méthode non quantitative
Approche géochimique	Image qualitative des processus de biodégradation (ampleur et nature des processus de biodégradation)	Approche non spécifique des processus de biodégradation (sauf si les processus abiotiques sont négligeables) Réservée à des études à des concentrations élevées ($\mu\text{g/L}$) Méthode non spécifique d'un contaminant en particulier Méthode qualitative mais non quantitative
Ratio produit de transformation (TP)/molécule mère	Analyse spécifique semi-quantitative des processus de biodégradation propres à un composé en particulier	Limité aux molécules dont les voies de biodégradation ont été élucidées Limité aux molécules dont les TP répondent aux contraintes énoncées (peu de candidats) Méthode semi-quantitative mais non quantitative
Méthodes de biologie moléculaire	Informations qualitatives sur les processus de biodégradation	Absence d'amorces pour amplifier de nombreux gènes via les techniques PCR Les analyses d'ADN ne donnent pas d'informations sur l'activité microbienne Méthode qualitative mais non quantitative
Méthode traceur	Méthode quantitative des processus de biodégradation dans certains cas spécifiques	Méthode non spécifique des processus de biodégradation donc surestimation de ces derniers dans la plupart des cas Echantillonnage complexe

Les approches classiques qui permettent d'étudier spécifiquement la biodégradation des micropolluants donnent seulement accès à des informations qualitatives (détermination de la nature des sous-produits générés, potentiel de biodégradation des molécules). La seule méthode qui soit quantitative, la méthode traceur, n'est pas spécifique des processus de biodégradation et requiert la mise en place de méthodes d'échantillonnage complexes. Ainsi, les données quantitatives, relatives aux processus de biodégradation des PPSP en aval des STEP, restent aujourd'hui peu documentées bien qu'elles soient indispensables dans la démarche d'évaluation des risques.

Le développement de nouvelles méthodes, permettant de quantifier spécifiquement la biodégradation des PPSP *in situ* en aval des STEP, constitue un réel enjeu environnemental. Pour répondre à ce besoin, deux outils complémentaires ont été sélectionnés pour être évalués durant la thèse à savoir les fractionnements isotopique et énantiomérique. Le fractionnement isotopique est une approche assez récente qui a déjà été utilisée, dans plusieurs études, pour quantifier avec succès la biodégradation de contaminants à des concentrations élevées et constitue en ce sens une technique prometteuse. Le fractionnement énantiomérique repose sur un concept similaire à son homologue isotopique et pourrait également constituer un indicateur quantitatif de biodégradation des PPSP, comme l'ont suggéré les travaux pionniers de (Jammer et al., 2014).

3. Le fractionnement isotopique

Le fractionnement isotopique est un outil susceptible d'être intéressant pour quantifier la biodégradation des PPSP en aval des STEP car il a déjà été utilisé pour mesurer le degré de (bio)dégradation de contaminants organiques autres que des PPSP. Les études réalisées jusqu'à aujourd'hui se sont limitées à certaines classes de contaminants, telles que les hydrocarbures et les solvants chlorés, et à des applications à de fortes concentrations (supérieures à plusieurs $\mu\text{g/L}$, Wiegert et al., 2012a) sur le terrain au niveau de sites industriels contaminés. Le concept du fractionnement isotopique, les méthodes de mesure et ses applications jusqu'à aujourd'hui dans le domaine des contaminations environnementales sont présentées par la suite.

3.1. Concept de l'application du fractionnement isotopique à l'étude de la biodégradation de polluants organiques

3.1.1. Définition du fractionnement isotopique

Les molécules organiques, qui incluent la catégorie des PPSP, sont majoritairement composées d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'azote, d'oxygène et de chlore. Chacun de ces éléments chimiques est présent sous deux formes isotopiques stables (trois pour l'oxygène), c'est-à-dire deux formes qui ne présentent pas de radioactivité décelable (Tableau 5). Pour rappel, deux isotopes d'un élément chimique sont des atomes qui possèdent le même nombre de protons mais un nombre de neutrons différents.

Tableau 5. Ratio isotopique naturel (%) des isotopes stables des éléments chimiques qui constituent principalement les composés organiques (Hofstetter and Berg, 2011).

Système isotopique	Ratio isotopique naturel (%)
$^2\text{H}/^1\text{H}$	0,01558
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	1,123
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	0,3663
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}^*$	0,2005
$^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$	31,96
$^{81}\text{Br}/^{79}\text{Br}$	97,27

^{17}O est également un isotope stable de l'oxygène. Le ratio $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ est égal à 0,0373 % et bien inférieur au ratio $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Cet isotope n'est en général pas inclus dans les études isotopiques.

La composition isotopique des éléments chimiques d'une molécule peut varier dans l'environnement suite à l'influence de différents phénomènes naturels ou anthropiques. La mesure de ces variations, appelées fractionnements isotopiques, est à l'origine d'un nombre croissant d'applications dans de nombreux domaines comme les géosciences, le nucléaire ou les sciences du climat et de l'environnement. Par la suite, seules les applications du fractionnement isotopique qui concernent l'étude du devenir des polluants organiques en aval de rejets seront présentées.

3.1.2. Origine du fractionnement isotopique lors de la dégradation d'un composé organique

Bien que les propriétés physicochimiques des deux isotopes stables d'un élément chimique soient similaires, les liaisons chimiques covalentes formées avec l'isotope léger ont une énergie de liaison plus faible que celles qui impliquent l'isotope lourd. Lors de la dégradation d'un polluant, l'énergie d'activation nécessaire au clivage d'une liaison chimique est donc inférieure lorsque des isotopes légers participent à cette liaison réactionnelle. Ainsi, les molécules organiques d'un contaminant qui contiennent des isotopes légers au niveau des liaisons réactionnelles sont susceptibles d'être dégradées préférentiellement, comme illustré sur la Figure 6 (Meckenstock et al. 2004; Hofstetter et al. 2008; Elsner 2010). Lorsque ce phénomène se réalise, un enrichissement caractéristique du contaminant résiduel en isotopes lourds est alors observé.

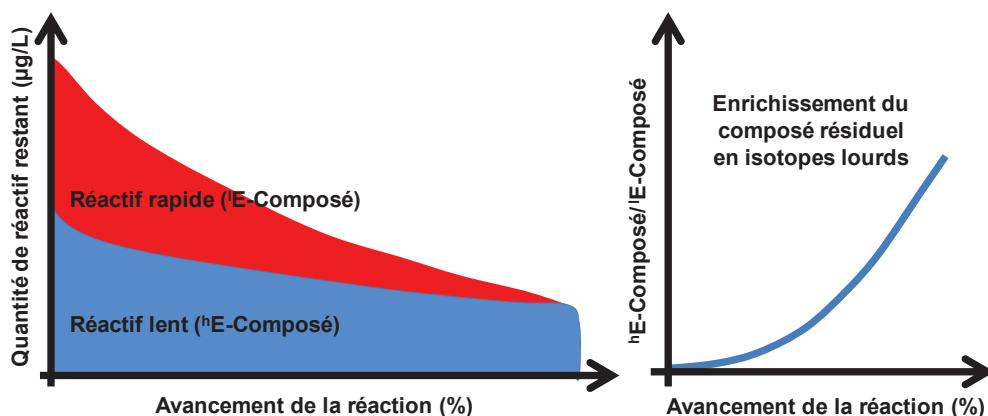


Figure 6. Evolution de la composition isotopique d'un composé en isotopes lourds (hE) et légers (lE) lors de sa dégradation (Kuder 2012).

La mesure de l'enrichissement isotopique des contaminants est donc apparue comme un outil d'étude potentiel de leur dégradation dans l'environnement. Des travaux ont alors été menés pour comprendre l'influence des différents mécanismes d'atténuation naturelle sur le fractionnement isotopique des contaminants organiques.

3.1.3. Influence des mécanismes d'atténuation naturelle sur le fractionnement isotopique

Les phénomènes de volatilisation sont connus pour conduire à un fractionnement isotopique. La volatilisation de composés purs, tels que le trichloroéthène ou le tétrachloroéthylène, produit ainsi des effets isotopiques du carbone de l'ordre de $+ 0,28 \text{ ‰} \pm 0,01 \text{ ‰}$ et de $+ 0,56 \text{ ‰} \pm 0,09 \text{ ‰}$ respectivement et du chlore de l'ordre de $-1,33 \text{ ‰} \pm 0,21 \text{ ‰}$ et $-1,00 \text{ ‰} \pm 0,001 \text{ ‰}$ respectivement à des températures comprises entre 20 to 26°C (erreurs de mesure de $\pm 0,12 \text{ ‰}$ pour le carbone et de $\pm 0,14 \text{ ‰}$ pour le chlore) (Yu et al. 2014). Cependant, les effets isotopiques observés lors de la volatilisation d'un composé sont peu importants en comparaison à ceux engendrés par les processus de dégradation. De plus, l'importance des processus de volatilisation des contaminants organiques dans l'environnement reste faible. Dans les sédiments ou les aquifères, la volatilisation est non significative en raison de l'écoulement laminaire des eaux qui réduit les turbulences et les processus de volatilisation (Meckenstock et al. 2004) et la plupart des contaminants organiques sont caractérisés par une constante de Henry faible qui minimise leur volatilisation à la surface de l'eau ($H_{\text{contaminants}} < 10^6 \ll 10^{-4} \text{ atm.m}^3/\text{mol}$, 10^{-4} étant la valeur caractéristique des molécules volatiles; Cha & Cupples, 2010). Le fractionnement isotopique généré par la volatilisation d'un contaminant organique dans l'environnement est donc généralement considéré comme négligeable (Schmidt et al. 2004).

La plupart des auteurs décrivent la sorption comme étant un mécanisme qui n'affecte pas la composition isotopique des contaminants de manière significative (Harrington et al., 1999). Dans des expériences *in vitro* portant sur le benzène et le tétrachloroéthylène, la sorption presque totale (90 %) de ces deux molécules sur du charbon actif n'a ainsi eu aucun effet sur la composition isotopique des molécules restées en solution (Slater et al., 2000). Sur le terrain, en l'absence de processus de dégradation, aucun fractionnement isotopique n'a encore été observé lors de la migration de contaminants dans des sédiments ou des aquifères (Richnow et al., 2003).

De même, le fractionnement isotopique généré par les processus abiotiques est faible notamment en aval des STEP où ces processus sont eux-mêmes de faible ampleur (Schmidt et al. 2004; Hunkeler et al. 2008).

Au contraire des processus présentés précédemment, de nombreuses études ont montré que la biodégradation conduit à un fractionnement isotopique significatif des contaminants (Meckenstock et al. 2004). Ce phénomène peut et a ainsi été utilisé comme un marqueur

spécifique des processus de biodégradation dans l'environnement (Schmidt et al. 2004; Elsner 2010). Les variations significatives des ratios isotopiques enregistrées correspondent en réalité à des fluctuations de l'ordre de quelques ‰. Ainsi, seuls des processus de biodégradation importants permettent de produire un fractionnement isotopique qui soit mesurable (Bombach et al. 2010). Le fractionnement isotopique est donc destiné à des études au niveau de zones d'activités microbiennes intenses ou de zones qui permettent un temps de résidence élevé des molécules telles que des aquifères ou des sédiments.

3.1.4. Utilisation du fractionnement isotopique pour quantifier spécifiquement les processus de biodégradation

Contrairement aux autres techniques utilisées pour étudier les processus biotiques, le fractionnement isotopique ne permet pas seulement d'identifier des processus de biodégradation, il présente l'intérêt majeur de pouvoir les quantifier. En effet, lors de la biodégradation d'un composé, l'application de l'équation de Rayleigh (Equations 2 et 3) permet d'obtenir une relation linéaire entre les variations des ratios isotopiques mesurées pour les éléments chimiques qui subissent un fractionnement isotopique et l'ampleur de la biodégradation à l'origine de ces variations (Hayes 2004) (Figure 7). Cette équation de Rayleigh a été introduite par Frederick Soddy en 1913 dans le domaine isotopique et s'appuie sur l'équation développée par John William Strutt (dit Lord Rayleigh) en 1877 pour expliquer les phénomènes de distillation.

$$\frac{({}^hE/{}^lE)_t}{({}^hE/{}^lE)_0} = f^{\alpha_E - 1} \approx f^{\varepsilon_E} \quad \text{Équation. 2}$$

$$\ln \frac{({}^hE/{}^lE)_t}{({}^hE/{}^lE)_0} = (\alpha_E - 1) \ln f \approx \varepsilon_E \ln f \quad \text{Équation. 3}$$

Avec :

- $({}^hE/{}^lE)_t$ et $({}^hE/{}^lE)_0$, les ratio isotopiques entre les isotopes lourd hE et léger lE de l'élément E dans la molécule mère à l'instant t et au temps initial de la réaction de biodégradation respectivement.
- f, le pourcentage de biodégradation défini comme le ratio des concentrations de la molécule mère à l'instant t (C_t) et au temps initial (C_0).
- α_E , le facteur de fractionnement isotopique de l'élément E qui correspond également au ratio entre la composition isotopique de l'élément E dans le métabolite généré et celle dans la molécule mère au même instant t (Equation 4).

$$\alpha_E = \frac{({}^hE/{}^lE)_{\text{produit}}}{({}^hE/{}^lE)_{\text{molécule parent}}} \quad \text{Équation. 4}$$

- ε_E ($= \alpha_E - 1$), la pente de la droite de Rayleigh appelé facteur d'enrichissement isotopique.

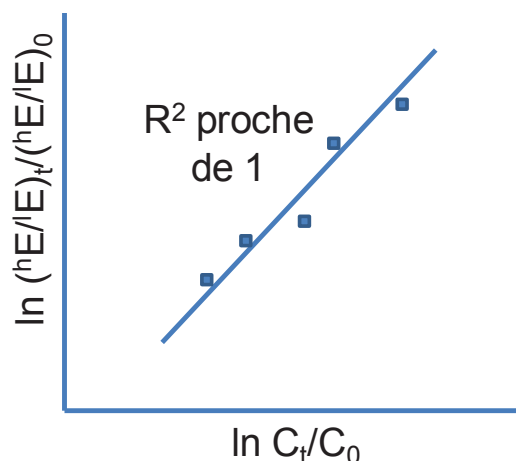


Figure 7. Schéma simplifié qui illustre la relation linéaire obtenue entre le pourcentage de biodégradation d'une molécule et les variations isotopiques associées lors de l'application de l'équation de Rayleigh (Hayes 2004).

Le facteur d'enrichissement isotopique ϵ_E doit être calculé expérimentalement en laboratoire pour un ou plusieurs éléments chimiques du composé pour pouvoir être ensuite appliqué sur des échantillons réels dans le but de quantifier la biodégradation *in situ*. Grâce à l'équation de Rayleigh, le calcul du pourcentage de biodégradation f d'une molécule ne dépend plus que des mesures isotopiques. Les concentrations du composé n'interviennent plus dans le calcul. Cette approche est de grand intérêt car elle permet de quantifier spécifiquement l'ampleur des processus de biodégradation d'un contaminant sur le terrain en s'affranchissant des mesures de concentrations absolues de la molécule mère et des métabolites, qui sont difficiles à obtenir dans certains cas à cause des variations des concentrations des contaminants dans les rejets.

3.1.5. Utilisation du fractionnement isotopique pour élucider les mécanismes réactionnels de biodégradation

3.1.5.1. Définition des effets isotopiques cinétiques (KIE)

Si l'application de l'équation de Rayleigh permet de quantifier la biodégradation d'un composé, les mesures des facteurs de fractionnement α ou d'enrichissement isotopiques ϵ ne permettent d'avoir ni accès à l'ampleur réelle du fractionnement isotopique des éléments chimiques considérés ni de connaître les positions moléculaires au niveau desquelles le fractionnement a lieu. Pour un élément chimique et une molécule donnés, ces facteurs reflètent en effet un comportement isotopique moyen de l'ensemble des atomes de cet

éléments présents dans la molécule. Or, lors de la biodégradation d'une molécule, seuls les atomes proches du site réactionnel lors de l'étape cinétiquement limitante de la réaction sont susceptibles de subir un fractionnement isotopique. Ainsi, le fractionnement isotopique généré au niveau des liaisons réactionnelles est en réalité plus élevé que celui déterminé par l'équation de Rayleigh.

Pour déterminer le fractionnement isotopique d'un atome au niveau d'un site particulier de la molécule lors d'une réaction de biodégradation, le paramètre des effets isotopiques cinétiques (KIE) est utilisé (Equation 5).

$$KIE_E = \frac{k_l}{k_h} \quad \text{Équation. 5}$$

Avec k_l et k_h , les constantes de réaction de la molécule lorsque celle-ci contient respectivement les isotopes léger (l) ou lourd (h) de l'élément E au niveau du site moléculaire considéré.

Des valeurs de KIE > 1 indiquent un enrichissement du site moléculaire étudié en isotopes lourds et les effets isotopiques sont alors dits normaux. Dans le cas contraire, les KIE sont dits inverses. Les KIE sont nuls pour les atomes qui ne subissent pas de fractionnement isotopique.

On compte deux types de KIE pour les atomes qui subissent un fractionnement isotopique. Des KIE primaires sont observés pour les atomes directement impliqués dans les liaisons réactionnelles qui sont rompues ou formées durant l'étape cinétiquement limitante de la réaction. Lorsque l'élément chimique considéré n'est pas inclus dans la liaison qui est rompue ou formée durant l'étape cinétiquement limitante de la réaction, des KIE dits secondaires peuvent également se produire pour les atomes de cet élément qui sont proches de cette liaison et ces derniers sont en général de un à deux ordres de grandeur plus faibles que les KIE primaires.

3.1.5.2. Intérêt de mesurer les KIE lors de la biodégradation d'une molécule

Le calcul des KIE permet d'identifier les positions réactionnelles dans la molécule et d'obtenir des informations précieuses sur les mécanismes réactionnels de dégradation (substitution nucléophile, addition nucléophile...) (Kuder et al. 2013). Ces informations sont difficilement accessibles à partir de l'analyse seule des métabolites générés. Pour un site moléculaire donné, les valeurs de KIE traduisent l'ampleur des différences d'énergie d'activation observées entre les isotopologues lourd et léger de la molécule (isotopologues = formes de

la molécule qui se distinguent par leurs compositions isotopiques) lors de l'étape cinétiquement limitante d'une réaction de biodégradation (qui correspond en général à la première étape de la réaction) (Figure 8) (Schmidt et al. 2004; Elsner 2010).

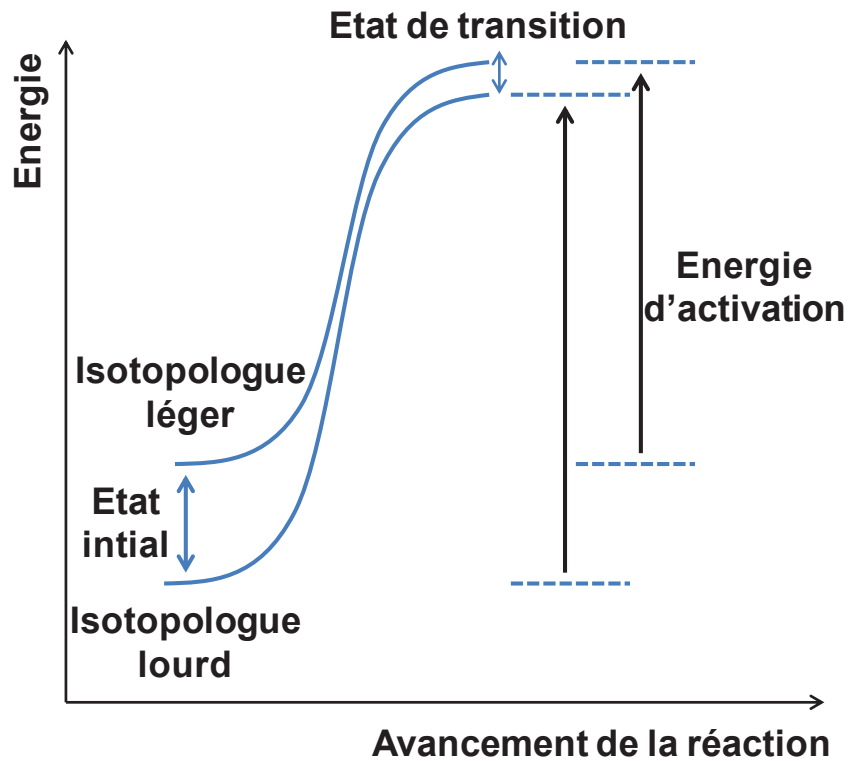


Figure 8. Illustration des différences d'énergie d'activation observées entre les isotopologues lourd et léger d'une molécule lors de l'étape cinétiquement limitante d'une réaction de biodégradation (Elsner 2010).

Pour les positions moléculaires qui subissent un fractionnement isotopique, ces différences d'énergie d'activation sont spécifiques d'un mécanisme réactionnel donné. Ainsi, le calcul des KIE peut aider à la différentiation et l'élucidation de mécanismes réactionnels. La dégradation du méthyl tert-butyl éther en conditions aérobies et anaérobies conduit à la formation du même métabolite, le tert-butanol, suggérant un mécanisme de dégradation commun. Les KIE du carbone ont été calculés pour les positions moléculaires qui subissent un fractionnement isotopique dans la molécule (cf partie 3.1.5.3 pour explication du calcul des KIE) en conditions aérobies et anaérobies (Tableau 6).

Tableau 6. KIE du carbone calculés lors de la biodégradation du méthyl tert-butyl éther en conditions aérobies et anaérobies.

Conditions expérimentales	KIE du carbone	Références
Conditions aérobies, souche bactérienne	1,010 à 1,012	(Gray et al., 2002)
Conditions aérobies, microcosme mixte	1,008 à 1,009	(Gray et al., 2002)
Conditions aérobies, souche bactérienne	1,008 à 1,009	(Hunkeler et al., 2001)
Conditions anaérobies, données de terrain et de microcosmes	1,042 à 1,048	(Kolhatkar et al., 2002)
Conditions anaérobies	1,047 à 1,054	(Kuder et al., 2005)

Des différences importantes et significatives ont été observées entre les KIE mesurés en conditions aérobies et ceux mesurés en conditions anaérobies. Ces observations ont démontré l'existence de deux mécanismes réactionnels spécifiques chacun des conditions redox du milieu à savoir une oxydation de la fonction méthyle par une monooxygénase en conditions aérobies et une substitution nucléophile de type 2 en conditions anaérobies (Zwank et al. 2005).

3.1.5.3. Calcul des KIE à partir des facteurs d'enrichissement isotopique

L'estimation des KIE des atomes présents au niveau des positions réactives de la molécule à partir des facteurs d'enrichissement isotopique implique de prendre en compte le fait que certaines positions moléculaires ne subissent pas de variations isotopiques dans la molécule. Une relation mathématique permet de relier le facteur d'enrichissement isotopique ε aux effets isotopiques cinétiques apparents (= effets isotopiques mesurés seulement sur les positions qui subissent un fractionnement isotopique) (AKIE) (Equations 6 et 7).

$$AKIE_E = \frac{1}{(1 + n \times z \times \varepsilon_E)/x} \quad \text{Équation. 6}$$

$$\varepsilon_E = \frac{\left(\frac{x}{AKIE_E} - 1\right)}{n \times z} \quad \text{Équation. 7}$$

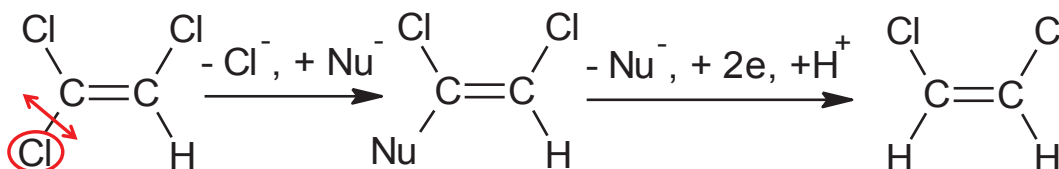
Avec :

- n, le nombre d'atomes de l'élément E dans la molécule.
- x, le nombre d'atomes de E qui subissent un fractionnement isotopique lors de l'étape cinétiquement limitante de la réaction.
- z, le nombre d'atomes de E qui subissent un fractionnement isotopique et qui sont dans des positions moléculaires similaires.

La molécule de trichloréthylène (TCE) peut subir une déchloration réductive via deux mécanismes distincts. Lorsque le TCE subit une déchloration réductive à travers un mécanisme de substitution nucléophile, une liaison C–Cl est rompue lors de l'étape limitante de la réaction ce qui génère des KIE primaires pour le chlore impliqué dans la liaison réactionnelle. Dans ce cas, $n = 3$ et $x = z = 1$ pour le chlore de la liaison réactionnelle (Figure 9). En revanche, lorsque le TCE subit une déchloration réductive par réaction d'addition nucléophile, aucune liaison C–Cl n'est rompue lors de l'étape limitante et seuls des KIE secondaires sont observés pour le chlore. Dans ce cas, $n = x = 3$ pour les chlores affectés par les effets isotopiques secondaires mais $z = 1$ car aucune position moléculaire n'est similaire la molécule étant dépourvue de centre de symétrie (Figure 9) (Kuder et al. 2013).

Deux scénarios pour la déchloration réductive du TCE :

1) Substitution nucléophile



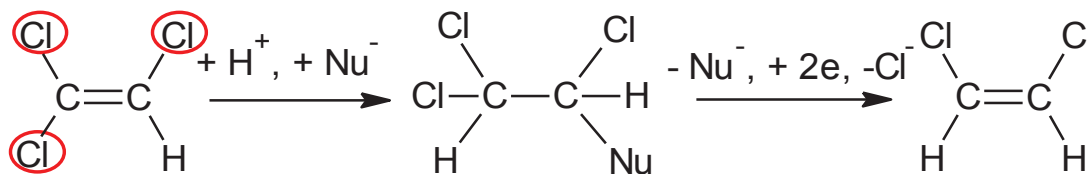
KIE primaires

Rupture de la liaison C-Cl
lors de l'étape limitante
→ KIE primaires du Cl



$n = 3$ Cl dans le TCE
 $x = z = 1$ pour le Cl qui subit un
fractionnement isotopique primaire

2) Addition nucléophile



KIE secondaires

Pas de rupture de la liaison
C-Cl lors de l'étape limitante
→ KIE secondaires des 3 Cl



$n = x = 3$ Cl dans le TCE
 $z = 1$ car il n'existe pas de
positions équivalentes

Avec Nu = Nucléophile

Figure 9. Schéma explicatif des KIE primaires et secondaires du chlore observés lorsque le TCE subit une déchloration réductive via 1) un mécanisme de substitution nucléophile et 2) un mécanisme d'addition nucléophile (Kuder et al. 2013).

Les équations 6 et 7 sont construites sur l'hypothèse que les KIE secondaires sont négligeables en présence de KIE primaires (des KIE primaires et secondaires ne peuvent être calculés simultanément).

D'après l'équation 7, plus le nombre d'atomes de l'élément E dans une molécule (n) est élevé, plus l'enrichissement isotopique mesuré pour cet élément (ϵ) sera faible. Un nombre d'atomes de 15 dans une molécule a été estimé être la limite maximale pour qu'un fractionnement isotopique puisse être mesuré (en choisissant des AKIE de 1,03 et un facteur d'enrichissement isotopique de -2 ‰) (Elsner 2010).

Le choix des valeurs de n , x , z lors de l'estimation des AKIE suppose que le mécanisme de dégradation du composé soit connu (Hofstetter et al. 2008; Elsner 2010; Kuder et al. 2013). Ainsi, plusieurs étapes doivent être respectées pour utiliser les AKIE dans le but d'identifier le mécanisme réactionnel de biodégradation d'une molécule :

- Tous les mécanismes de transformation connus et possibles de la molécule doivent être considérés.
- Pour chaque mécanisme envisagé, les AKIE doivent être estimés pour les éléments qui subissent un fractionnement isotopique à partir des facteurs d'enrichissement isotopique calculés au préalable en sélectionnant les valeurs adéquates de n , x et z .
- L'ampleur des AKIE estimée peut alors être comparée aux valeurs caractéristiques de KIE reportées dans la littérature pour chaque mécanisme et chaque élément considérés. Le mécanisme retenu comme étant le plus plausible sera celui pour lequel auront été observées des valeurs cohérentes entre celles estimées et celles répertoriées dans la littérature.

3.2. Comment mesurer le fractionnement isotopique d'un composé organique ?

3.2.1. Description des méthodes d'analyse des ratios isotopiques

Pour évaluer le fractionnement isotopique d'une molécule, il faut pouvoir mesurer les ratios isotopiques des éléments chimiques de cette molécule à un instant initial puis après sa dégradation. Les variations des ratios isotopiques étant de l'ordre de quelques ppm lors d'une réaction de biodégradation et certains isotopes étant présents en faible abondance dans l'environnement ($^2\text{H} = 0,0156 \%$ du total des hydrogènes), des appareils analytiques spécifiques sont nécessaires pour analyser précisément et exactement la composition isotopique d'une molécule.

Sachant que deux isotopes d'un élément ont une masse différente en raison de leurs nombres de neutrons distincts, ils peuvent donc être séparés et analysés à l'aide de spectromètres de masse spécifiques. Les premières analyses isotopiques ont été réalisées à l'aide de spectromètres de masse à double introduction (McKinney et al., 1950). L'utilisation de ces systèmes nécessite une purification et une combustion totale des composés étudiés en laboratoire avant analyse (Meckenstock et al. 2004). La composition isotopique des gaz générés par combustion est ensuite analysée en spectrométrie de masse. Le spectromètre possède une double ligne d'introduction dont l'une est dédiée à l'échantillon gazeux à analyser et l'autre à un gaz étalon de composition isotopique connue par rapport à un référentiel international (SI). Les résultats obtenus avec cette méthode sont réputés pour être très précis ($\pm 0,15 \%$; Clark and Fritz 1997). L'inconvénient de cette technique réside dans la préparation d'échantillon qui est longue, onéreuse et qui nécessite une quantité importante d'échantillons.

Le développement d'une méthode d'analyse en continu des rapports isotopiques des composés organiques (en anglais « *Compound Specific Isotope Analysis* », *CSIA*) dans les années 1980 a constitué une grande avancée dans les sciences environnementales. Cette dernière technique analytique a permis d'automatiser simultanément la séparation d'un composé organique d'intérêt des interférents d'une matrice environnementale complexe et l'analyse de sa composition en isotopes stables. Les instruments qui ont permis ce progrès analytique utilisent un couplage entre chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse à rapport isotopique via une interface de combustion/pyrolyse (GC/C-IRMS) (Figure 10). Les composés présents dans la matrice environnementale sont d'abord séparés par GC. Les sources d'ionisation et les détecteurs des spectromètres isotopiques ne sont pas capables d'analyser directement les composés organiques. Ainsi, le flux continu de

composés en sortie de colonne est introduit directement dans une interface de conversion chimique. Les molécules y sont transformées en un produit gazeux à faible masse moléculaire dont la composition isotopique peut être mesurée par spectrométrie de masse.

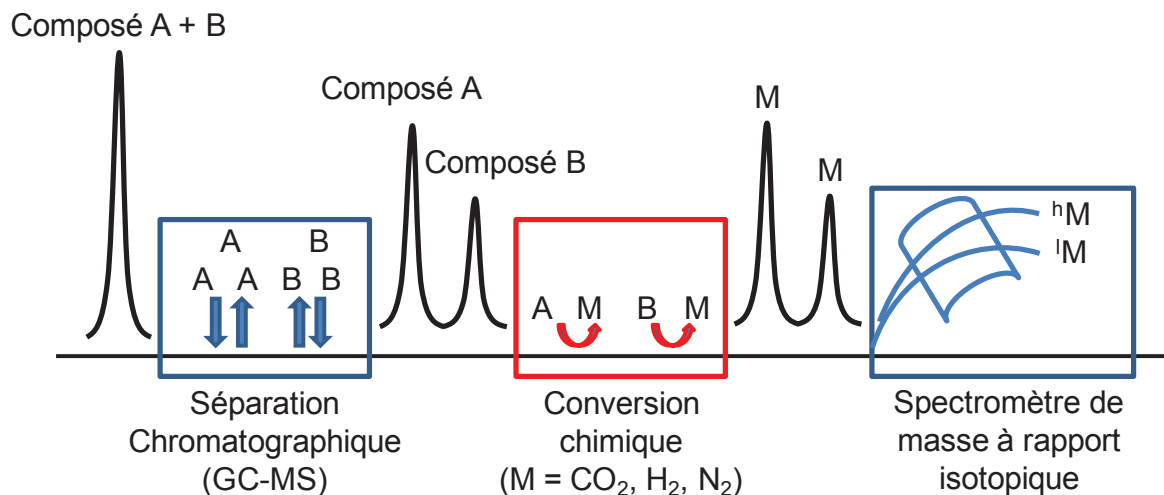


Figure 10. Principe d'analyse en continu des rapports isotopiques des composés organiques (CSIA) (Elsner et al. 2012).

Ainsi, pour l'analyse des isotopes de l'hydrogène, les molécules subissent une pyrolyse qui transforme les composés en dihydrogène H₂. Dans le cas de l'azote, deux étapes sont nécessaires. La première permet de convertir par combustion l'azote en diazote N₂ puis la deuxième étape consiste à réduire en N₂ les traces d'oxyde d'azote qui ont été générées lors de la combustion. La mesure de la composition isotopique du chlore implique soit l'utilisation d'un spectromètre de masse couplé à un plasma inductif (ICP-MS) pour générer des ions Cl⁺, soit une conversion du chlore organique en chlorure d'hydrogène HCl. Enfin, l'analyse de l'oxygène est réalisée par pyrolyse des composés qui conduit à la formation de monoxyde de carbone CO. L'ensemble des atomes d'un élément chimique dans une molécule sont pris en compte lors de la mesure du ratio isotopique de cet élément, y compris ceux qui ne subissent pas de fractionnement isotopique. Nous comprenons mieux pourquoi le calcul des facteurs de fractionnement et d'enrichissement isotopiques à partir des mesures des ratios isotopiques ne permettent ni de connaître les positions moléculaires au niveau desquelles le fractionnement isotopique a lieu ni d'avoir accès à l'ampleur réelle du fractionnement des éléments chimiques considérés.

L'analyse de tous les isotopes d'un composé avec une grande précision et exactitude constitue l'un des challenges des analyses CSIA. Ces contraintes rendent nécessaires les

étapes de préconcentration et purification des échantillons. Les échantillons sont généralement extraits et concentrés à l'aide de techniques telles que la microextraction en phase solide (SPME), l'extraction par purge et piégeage ou l'extraction liquide/liquide. La préparation d'échantillon ne doit pas engendrer de fractionnement isotopique significatif des éléments étudiés ou celui-ci doit être évalué au préalable et reproductible pendant les essais. Dans la plupart des cas, les méthodes d'extraction n'engendrent pas de variations isotopiques significatives (Slater et al. 2000; Hunkeler et al. 2008; Wiegert et al. 2012a). Mais il peut arriver, comme lors de l'extraction du méthylpropan-2-ol par SPME (Hunkeler et al., 2001), qu'un enrichissement isotopique soit observé sans que les raisons soient identifiées. Ainsi, il est important d'évaluer au préalable, pour chacun des composés étudiés, l'existence ou non de ce phénomène lors des phases de préparation d'échantillon.

3.2.2. Comment obtenir des mesures de ratios isotopiques précises et exactes à l'aide des méthodes d'analyse en continu des rapports isotopiques ?

La méthode CSIA présente les avantages d'être rapide, économique en termes de temps et capable d'analyser de plus faibles quantités d'échantillons (de l'ordre du nmol) que lorsque des spectromètres de masse à double introduction sont utilisés (Hunkeler et al. 2008). Toutefois, quelques prérequis doivent être respectés pour obtenir des résultats exactes avec une précision < 1 ‰.

Les performances chromatographiques, telles qu'une bonne séparation des composés et une intégration correcte des pics, sont cruciales pour que les mesures soient correctes. Dans l'interface de combustion, la transformation des analytes en gaz doit être quantitative. Un test préalable du procédé de conversion est requis pour chaque molécule étudiée car l'efficacité de la conversion peut dépendre de la structure organique de la molécule.

Pour contrôler les performances du spectromètre de masse et pour calibrer l'appareil, un gaz de référence (CO₂, N₂ ou H₂), de composition isotopique connue et certifiée, est injecté en début et en fin de séquence (Hunkeler et al. 2008). Cependant, ces gaz de référence sont introduits directement dans le spectromètre de masse et ne permettent pas de prendre en compte les fractionnements isotopiques potentiels des molécules d'intérêt générés durant les étapes de chromatographie ou de conversion chimique.

Pour corriger le fractionnement isotopique potentiellement engendré par les étapes de chromatographie et conversion chimique, les mesures des ratios isotopiques d'une molécule

sont toujours rapportées à celles d'un étalon de référence dont la composition isotopique est connue par rapport à un référentiel international et sont indiquées à l'aide d'une notation spécifique, appelée notation δ (delta) (Equation 8). Les résultats s'expriment en ‰ en raison des faibles variations isotopiques enregistrées.

$$\delta^h E_{comp} = \frac{(^hE/^lE)_{comp} - (^hE/^lE)_{std}}{(^hE/^lE)_{std}} \times 1000 \quad \text{Équation. 8}$$

Avec :

- $(^hE/^lE)_{comp}$, la mesure du ratio entre les isotopes lourd hE et léger lE du composé dans l'échantillon analysé.
- $(^hE/^lE)_{std}$, la mesure du ratio entre les isotopes lourd hE et léger lE de l'étalon de référence internationale.

L'étalon de référence doit avoir la même formule chimique que le composé étudié et doit être injecté à la même concentration pour obtenir des incertitudes minimales (Elsner et al. 2012). Les injections de l'étalon de référence et de l'échantillon étudié sont indépendantes. Des valeurs de delta positives indiquent un enrichissement en isotopes lourds de l'échantillon par rapport à l'étalon de référence.

Les valeurs $\delta^h E_{comp}$ relatives à l'étalon de référence sont ensuite rapportées en valeur absolue par rapport aux référentiels internationaux qui sont spécifiques à chaque élément chimique (Equation 9).

$$\delta^h E_{comp} = \delta'^h E_{comp} + \delta^h E_{std} \quad \text{Équation. 9}$$

Les ratios isotopiques du chlore et du carbone sont ainsi mesurés par rapport à des référentiels internationaux nommés SMOC (*Standard Mean Ocean Chlorine*) et VPDB (*Vienna PeeDee Belemnite*) respectivement (Kuder et al. 2013).

A partir de l'équation 9, la relation de Rayleigh (Equation 10) peut être reconstituée en utilisant la notation delta à la place des rapports isotopiques.

$$\ln \frac{(^hE/^lE)_t}{(^hE/^lE)_0} = \ln \frac{\delta^h E + 1}{\delta^h E_0 + 1} = (\alpha_E - 1) \ln f \approx \epsilon_E \ln f \quad \text{Équation. 10}$$

L'utilisation d'un étalon permet de corriger les fractionnements isotopiques engendrés lors de la séparation chromatographique ou de la conversion chimique. De plus, le fait de normaliser les résultats par rapport à une référence internationale rend possible leur comparaison entre laboratoires.

Les précisions typiquement obtenues avec la méthode CSIA, lorsque les prérequis énoncés ci-dessus sont respectés, sont élevées (typiquement < 1 ‰) excepté pour l'hydrogène pour lequel la précision mesurée est de 5 ‰ (Schmidt et al. 2004; Abe et al. 2009; Cretnik et al. 2013; Kuder et al. 2013; Wiegert et al. 2013).

Les analyses CSIA dans le domaine environnemental restent toutefois une approche récente et il manque à ce jour :

- Des procédures pour rationaliser la validation des méthodes CSIA.
- Des valeurs standards de référence à atteindre concernant les paramètres de validation des méthodes.

Un guide de bonnes pratiques a été rédigé récemment et propose une première approche pour rationaliser la validation des méthodes CSIA uniquement pour l'analyse du carbone (Hunkeler et al. 2008). Le Tableau 7 ci-dessous retranscrit les principales recommandations du guide (Hunkeler et al. 2008).

Tableau 7. Proposition d'une rationalisation de la validation des méthodes CSIA (Hunkeler et al. 2008).

Paramètre de validation	Recommandation (uniquement pour l'analyse du carbone)
Précision	La précision des mesures lorsqu'un échantillon est injecté plusieurs fois doit être typiquement $< 0,1-0,3 \text{ ‰}$.
Linéarité	En analyse isotopique, le terme « linéarité » désigne le fait que les ratios isotopiques mesurés pour une molécule sont indépendants de la quantité injectée de cette molécule. Les analyses isotopiques sont considérées « linéaires » sur la gamme de concentrations de la molécule qui permet d'obtenir des ratios isotopiques qui soient $< \pm 0,5 \text{ ‰}$ des ratios isotopiques moyens calculés*.
Limites de détection	Comme indiqué dans le guide, en dessous d'une certaine quantité injectée, la précision de mesure est $> 0,5 \text{ ‰}$. Le guide propose de définir la limite de détection comme étant la concentration du composé en dessous de laquelle la précision des valeurs obtenues est $> 0,5 \text{ ‰}$.

**Le guide précise que cette limite peut être adaptée en fonction des applications réalisées.*

3.2.3. Mesure du fractionnement isotopique du chlore avec un spectromètre de masse conventionnel

L'emploi d'instruments spécifiques de type GC/C-IRMS limite le développement du fractionnement isotopique comme outil de routine pour l'étude de la biodégradation (ITRC Environmental Molecular Diagnostics Team 2011; Elsner et al. 2012). Des équipes de recherche ont donc examiné la possibilité de mesurer un fractionnement isotopique des molécules en utilisant des appareils conventionnels de type GC-MS et LC-MS. Récemment, certains travaux (Aeppli et al. 2010) ont abouti à la mise en place d'une méthode qui permet désormais l'analyse de la composition isotopique du chlore, à l'aide d'appareils classiques de type GC-MS simple quadripôle, avec une précision assez élevée pour mesurer un fractionnement isotopique de l'ordre de quelques ‰.

Les abondances relatives des isotopes du chlore dans les molécules sont calculées à partir du ratio des aires des pics chromatographiques des isotopologues contenant respectivement zéro et un ^{37}Cl (Figure 11). Pour comprendre ce calcul, il faut considérer la probabilité P_z (Equation 11) de détecter l'isotopologue, contenant z ^{37}Cl et $(n - z)$ ^{35}Cl , d'une molécule qui contient n atomes de chlore.

$$P_z = \frac{n!}{z!(n-z)!} (X_{37\text{Cl}})^z (X_{35\text{Cl}})^{n-z} \quad \text{Équation. 11}$$

Avec $X_{37\text{Cl}}$ et $X_{35\text{Cl}}$, les abondances relatives en ^{37}Cl et ^{35}Cl respectivement.

Comme P_z est proportionnelle à l'aire A_z de l'isotopologue correspondant dans le chromatogramme, le ratio des aires des deux isotopologues contenant zéro ^{37}Cl et un ^{37}Cl conduit à l'équation 12 suivante :

$$\frac{A_1}{A_0} = n \times \frac{X_{37\text{Cl}}}{X_{35\text{Cl}}} = nR_{\text{Cl}} \quad \text{Équation. 12}$$

Avec R_{Cl} , le ratio isotopique du chlore ($^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$).

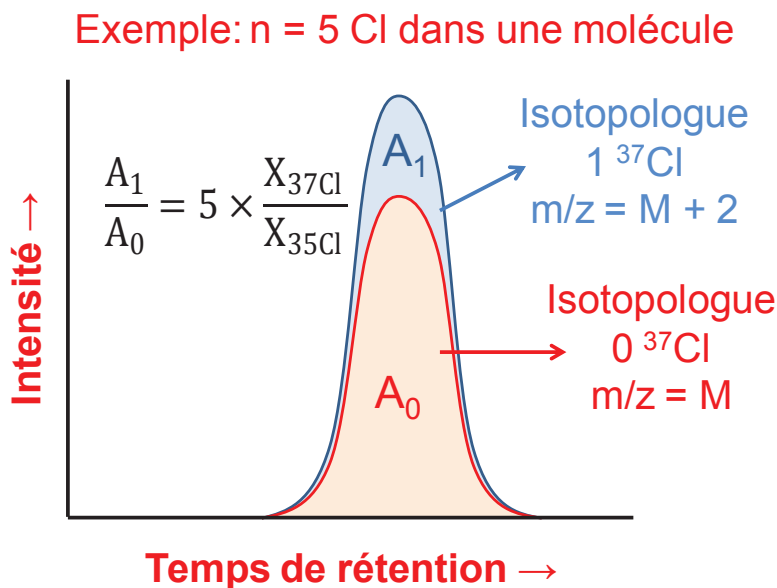


Figure 11. Analyse de la composition isotopique du chlore à partir des aires chromatographiques GC-MS des isotopologues d'une molécule qui contient 5 chlores (Aeppli et al. 2010).

Comme pour les analyses isotopiques en GC-IRMS, le ratio R_{Cl} de la molécule étudiée est rapporté à celui d'un étalon de référence internationale. Les analyseurs de masse et les détecteurs de type quadripôle sont moins stables et précis que les analyseurs à secteur magnétique et les détecteurs par multicollection propres aux spectromètres isotopiques. Pour compenser cette perte de précision, chaque injection d'échantillon doit être précédée et suivie d'une injection de l'étalon de référence et cette procédure doit être répétée plusieurs fois ($n = 3$ à 10). (Aeppli et al., 2010) soulignent également l'importance d'optimiser les paramètres de masse et l'intégration des pics chromatographiques pour minimiser les incertitudes de mesure. Les incertitudes obtenues avec un spectromètre de masse conventionnel sont sensiblement plus élevées que celles obtenues avec un IRMS mais elles sont suffisantes pour de nombreuses applications environnementales (0,6–1,3 ‰ pour le premier contre < 1 ‰ avec un IRMS) (Aeppli et al. 2010; Wiegert et al. 2013). L'application de cette méthode à d'autres éléments chimiques que le chlore est déconseillée lorsque les deux isotopes stables sont différenciés par une seule unité de masse (azote, carbone) à cause des transferts possibles d'hydrogène dans la source. Durant la thèse, nous nous sommes ainsi focalisés sur le fractionnement isotopique du chlore, puisque c'est le seul qui puisse aujourd'hui être mesuré à l'aide d'appareils analytiques conventionnels.

3.3. Historique des applications du fractionnement isotopique à l'étude de la biodégradation de contaminants organiques

3.3.1. Identification des sources de contamination

A l'origine, le fractionnement isotopique a surtout été utilisé pour identifier des sources de contamination dans l'environnement (Schmidt et al. 2004; Hofstetter et al. 2008). Le fait que la composition isotopique des composés puisse différer selon leur origine est un prérequis nécessaire à ces études. La signature isotopique d'une molécule organique synthétique dépend en effet de la composition isotopique du matériel d'origine utilisé pour produire cette molécule et du fractionnement isotopique engendré lors de sa synthèse. D'un fournisseur à un autre, les ratios isotopiques peuvent ainsi varier pour une molécule donnée. Par exemple, concernant les ratios isotopiques de l'azote du benzotriazole, des différences significatives ($-10\text{ ‰} < \delta^{15}\text{N} < -30\text{ ‰}$) ont été observées entre différents fournisseurs (Hofstetter et al. 2012).

L'analyse isotopique des contaminants a ainsi permis, dans de nombreux travaux, d'identifier les sources responsables de leur présence dans l'environnement (Elsner et al. 2012). La plupart des travaux ont concerné les hydrocarbures et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Par exemple, les HAP d'origine pyrogénique présentent une abondance en ^{13}C plus élevée que les HAP d'origine pétrogénique. L'analyse des ratios isotopiques du carbone a permis de différencier ces deux sources possibles dans plusieurs études environnementales (Walker et al., 2005).

Pour étudier les phénomènes de biodégradation en aval de rejets à l'aide du fractionnement isotopique, il faut prendre en considération le fait que les signatures isotopiques des molécules analysées à l'instant initial (avant dégradation) puissent varier au cours du temps en fonction de leur origine de production.

3.3.2. Etude des processus de biodégradation en aval de rejets contaminés

Le fractionnement isotopique a ensuite été utilisé pour étudier les processus de biodégradation de contaminants en aval de rejets contaminés. Les objectifs de ces études ont notamment consisté à :

- Différencier les processus de biodégradation des autres mécanismes d'atténuation naturelle.
- Apporter des informations quantitatives sur l'ampleur de la biodégradation.

- Identifier les mécanismes réactionnels de biodégradation.

L'utilisation du fractionnement isotopique comme marqueur spécifique de biodégradation a surtout concerné les hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène, xylène) et les solvants chlorés (tétrachloroéthylène, PCE et trichloroéthylène, TCE) car ces molécules étaient et sont toujours très répandues dans l'environnement ($> \mu\text{g-mg/L}$, (Moran et al. 2007; Wiegert et al. 2012a, 2013). Le fractionnement isotopique du carbone a été très largement analysé au contraire des autres atomes tels que l'hydrogène, l'azote, le chlore ou l'oxygène.

3.3.2.1. Identification qualitative des processus de biodégradation

Le fractionnement isotopique a tout d'abord été utilisé pour identifier *in situ* des processus de biodégradation, par superposition des mesures de concentrations aux mesures isotopiques. Une diminution des concentrations en contaminants dans l'environnement qui s'associe à une variation importante de la composition isotopique de ces molécules indique une contribution significative de la biodégradation dans l'élimination des contaminants. La suspicion de mécanismes biotiques peut alors être confirmée par l'identification des sous-produits de transformation (Wiedemeier et al. 1999; Wiegert et al. 2012a). Au contraire, une diminution des concentrations qui ne s'accompagne pas d'un fractionnement isotopique significatif est en faveur de mécanismes d'atténuation abiotiques/physiques tels que la sorption ou de processus hydrauliques tels que la dilution. Ainsi, dans une étude réalisée sur un site industriel contaminé par des solvants chlorés, l'interprétation croisée des données isotopiques et des concentrations a révélé une faible contribution de la biodégradation, les diminutions en concentrations étant essentiellement dues à une dilution des contaminants dans l'aquifère (Wiegert et al. 2012a).

3.3.2.2. Quantification des processus de biodégradation

Par la suite, le fractionnement isotopique, à travers l'application de l'équation de Rayleigh, a donné accès pour la première fois à des informations quantitatives sur la biodégradation. L'existence d'une relation linéaire entre le fractionnement isotopique et l'ampleur de la biodégradation lorsque l'équation de Rayleigh est appliquée a été confirmée au préalable au cours d'expériences réalisées en milieu contrôlé (Abe et al. 2009; Kuder et al. 2013; Wiegert et al. 2013). Les facteurs d'enrichissement isotopique, nécessaires aux mesures *in situ*, ont été calculés au cours de ces travaux de laboratoire (Meckenstock et al. 2004). Des expériences intermédiaires, utilisant des colonnes sédimentaires pour simuler un écoulement d'eau dans des sédiments, ont également permis de valider l'approche de Rayleigh dans des

conditions proches de la réalité. En effet, au cours de ces expériences, les concentrations résiduelles en contaminants estimées à l'aide de l'équation de Rayleigh sont apparues similaires à celles mesurées expérimentalement (Meckenstock et al., 2002).

Les applications de l'équation de Rayleigh pour quantifier la biodégradation *in situ* de contaminants se sont multipliées seulement cette dernière décennie. Dans des travaux réalisés sur des sites contaminés par des hydrocarbures aromatiques, la biodégradation estimée à l'aide du fractionnement isotopique a ainsi permis d'expliquer 70–99 % de l'atténuation des concentrations en contaminants (Meckenstock et al., 2002; Richnow et al., 2003). Dans d'autres travaux portant sur la contamination de sites industriels par des solvants chlorés, l'ampleur de la biodégradation est apparue plus limitée et très dépendante des conditions redox (Wiegert et al. 2012a). Ce dernier résultat illustre l'intérêt de quantifier la biodégradation *in situ* pour obtenir des informations sur les conditions physico-chimiques qui permettent une élimination optimale des composés. Si l'analyse isotopique du carbone a été privilégiée, la démocratisation plus récente de l'analyse du chlore a permis de comparer des concentrations résiduelles en contaminants calculées à partir de l'enrichissement isotopique en chlore 37 à des concentrations mesurées à partir de l'enrichissement en carbone 13. Les deux modèles isotopiques ont conduit à des valeurs de concentrations résiduelles similaires confirmant la robustesse du modèle de Rayleigh quelque soit l'élément chimique considéré (à condition que celui-ci subisse un fractionnement isotopique) (Wiegert et al. 2013).

3.3.2.3. Elucidation des mécanismes réactionnels de biodégradation

Au cours des expériences de biodégradation menées en laboratoire, des variations des facteurs d'enrichissement isotopique des molécules ont été observées entre les différents travaux réalisés. Ces variations n'ont pas été expliquées par le fait que les conditions expérimentales étaient différentes mais par le fait que l'ampleur du fractionnement isotopique est mécanisme-dépendant. L'oxydation du toluène par rupture des liaisons σ C–H engendre des variations des ratios isotopiques du carbone plus importante ($\epsilon_c = -3,3 \text{ ‰}$) que lorsqu'une liaison π du cycle aromatique est rompue ($\epsilon_c = -1,1 \text{ ‰}$) (Morasch et al., 2002) car la rupture de la liaison C–H durant l'étape cinétiquement limitante de la réaction (= effets isotopiques primaires) est observée seulement pour le premier mécanisme. En plus d'apporter des informations quantitatives sur la biodégradation, le fractionnement isotopique peut donc aider à l'élucidation des mécanismes réactionnels de dégradation.

Comme illustré dans l'exemple ci-dessus, les mesures des facteurs d'enrichissement isotopique ε peuvent permettre, dans certains cas, d'identifier les mécanismes de dégradation d'une molécule sur le terrain. Mais il peut arriver que les facteurs ε ne permettent pas de distinguer deux mécanismes différents car ils traduisent un comportement isotopique moyen de l'ensemble des atomes d'un élément dans la molécule et ne donnent pas accès à l'ampleur réelle du fractionnement isotopique généré au niveau des liaisons réactionnelles.

Dans ce cas, le calcul des effets isotopiques cinétiques apparents AKIE, qui considèrent seulement les positions moléculaires qui subissent un fractionnement isotopique, peut alors apporter des informations plus précises sur les mécanismes réactionnels. En particulier, en cas d'hésitation entre plusieurs mécanismes de dégradation, le fait d'estimer les AKIE pour chacun des mécanismes soupçonnés et de les comparer à des KIE de référence peut permettre d'élucider des mécanismes de dégradation. Dans une étude portant sur les mécanismes d'oxydation du chlorure de vinyle et du dichloroéthylène, les AKIE estimés pour le chlore ont été en faveur de KIE secondaires par comparaison avec les KIE obtenus lors d'une rupture C–Cl, suggérant une dégradation des deux molécules chlorés à travers la formation d'un époxyde sans rupture initiale de la liaison C–Cl (Abe et al. 2009).

Les difficultés d'identification des mécanismes réactionnels peuvent également être surmontées en croisant les fractionnements isotopiques de deux (2D-CSIA) ou trois éléments chimiques (3D-CSIA) (Abe et al. 2009; Wiegert et al. 2013) en utilisant l'équation 13 suivante.

$$\frac{\Delta\delta^H_{E'}}{\Delta\delta^H_E} = \frac{\varepsilon_{E'}}{\varepsilon_E} \quad \text{Équation. 13}$$

Avec :

- $\Delta\delta^H_E$ et $\Delta\delta^H_{E'}$, les variations des ratios isotopiques des éléments E et E' dans une molécule entre un instant t et un temps initial d'expérience.
- $\varepsilon_{E'}$ et ε_E , les facteurs d'enrichissement isotopiques des éléments E et E'.

La pente de la droite tracée à partir des fractionnements isotopiques des deux éléments correspond aux ratios entre les facteurs d'enrichissement isotopiques mesurés pour les deux éléments étudiés (Abe et al. 2009) (Figure 12).

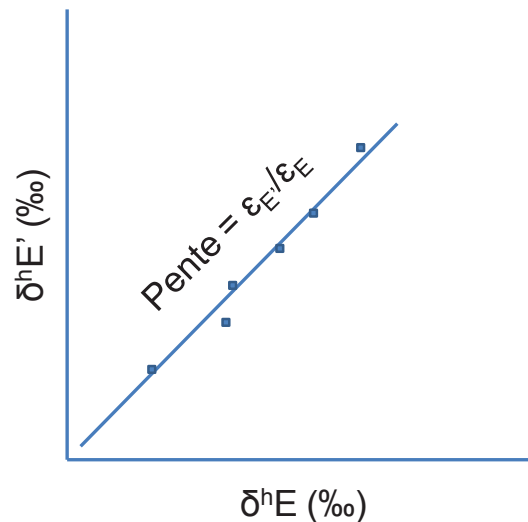


Figure 12. Concept 2D-CSIA : corrélation linéaire entre les fractionnements isotopiques des éléments E et E' (Kuder et al., 2013). Chaque point de la droite correspond à un point de la cinétique de biodégradation de la molécule étudiée.

La pente $\epsilon_{E'}/\epsilon_E$ présente l'avantage d'être plus spécifique d'un mécanisme de dégradation que lorsqu'un seul élément est analysé (Hofstetter et al. 2008). L'approche 2D-CSIA est également plus sûre que le calcul des AKIE pour identifier des mécanismes réactionnels pour la raison suivante. Lors de la dégradation d'une molécule, des étapes supplémentaires, qui ne sont pas à l'origine d'un fractionnement isotopique, peuvent s'ajouter (désorption de la molécule des sédiments, transfert vers les microorganismes, passage à travers la membrane cellulaire). Si, et seulement si, certaines de ces étapes s'avèrent être cinétiquement limitantes, elles peuvent alors induire une diminution des facteurs d'enrichissement isotopiques mesurés et des AKIE estimés (Schmidt et al. 2004; Elsner 2010; Cretnik et al. 2013). Alors même que le mécanisme de dégradation est resté inchangé, les AKIE déterminés seront plus faibles et sous-estimeront alors les KIE réels engendrant des erreurs d'interprétation des mécanismes réactionnels. Ces étapes additionnelles ne sont en général pas élément-spécifiques et les AKIE diminuent de façon identique pour les différents éléments étudiés lorsque des étapes de transfert s'ajoutent (Elsner 2010). L'approche 2D-CISA, en étudiant un élément relativement à un autre, compense ces diminutions possibles des AKIE. La pente relative de la droite 2D-CSIA ($\epsilon_{E'}/\epsilon_E$) présente donc l'avantage d'être spécifique à un mécanisme de dégradation sans distinction des étapes additionnelles de réaction propres à chaque catalyseur enzymatique au contraire des AKIE. L'étude de la déchloration du trichloréthylène par deux souches microbiennes différentes a conduit à des valeurs d'AKIE du carbone légèrement différentes (Cretnik et al. 2013). Au contraire, les pentes des deux droites 2D-CSIA mesurées pour les deux expériences sont

apparues identiques traduisant un mécanisme de dégradation commun entre les deux bactéries étudiées.

Dans le cas des études sur échantillons réels, l'approche 2D-CSIA présente un avantage significatif par rapport aux AKIE et à la mesure d'un seul facteur d'enrichissement isotopique car elle permet d'obtenir des informations sur les mécanismes de dégradation en s'affranchissant des mesures de concentration (Equation 13) (Hofstetter et al. 2008). Ainsi, l'étude conjointe des fractionnements isotopiques du carbone et du chlore générés lors de la biodégradation du tétrachloroéthylène dans un aquifère contaminé ont permis d'identifier le mécanisme de dégradation de ce contaminant, une hydrogénolyse, sans avoir recourt aux mesures de concentrations (Wiegert et al. 2012a).

3.4. Limites lors de l'application du fractionnement isotopique à la quantification de la biodégradation *in situ*

3.4.1. Difficultés concernant le choix du facteur d'enrichissement isotopique

Le choix du facteur d'enrichissement isotopique ϵ à appliquer sur le terrain est compliqué à réaliser en raison de la diversité des valeurs obtenues en laboratoire. Le facteur d'enrichissement est lié à un mécanisme réactionnel spécifique. Il est donc important d'identifier, pour chaque contaminant étudié, les mécanismes de dégradation qui s'opèrent sur le terrain en fonction des conditions environnementales rencontrées pour pouvoir appliquer avec robustesse le modèle de Rayleigh. Une bonne connaissance de l'influence potentielle de divers paramètres physico-chimiques sur les mécanismes de dégradation et donc sur l'ampleur de l'enrichissement isotopique est essentielle.

3.4.1.1. Impact des conditions redox sur l'enrichissement isotopique

Chaque mécanisme réactionnel de dégradation est caractérisé par un potentiel redox spécifique. Les mécanismes réactionnels des contaminants peuvent varier en fonction des conditions redox rencontrées dans le milieu, autrement dit en fonction de la nature des accepteurs d'électrons présents dans l'environnement. Les conditions redox peuvent donc avoir une influence sur l'ampleur de l'enrichissement isotopique (Meckenstock et al. 2004). Ainsi, le fractionnement isotopique du carbone mesuré lors de la biodégradation du benzène (Mancini et al., 2003) ou du méthyl tert-butyl éther (Tableau 6) est fortement dépendant des conditions redox appliquées.

3.4.1.2. Impact des cinétiques de biodégradation sur l'enrichissement isotopique

Les cinétiques de biodégradation ne semblent pas avoir d'effets sur l'ampleur des variations isotopiques (comme exprimé par l'équation de Rayleigh) car elles n'ont pas d'impact sur les mécanismes réactionnels. Ainsi, des expériences qui ont nécessité 3 mois pour dégrader totalement le toluène en conditions sulfato-réductrices à 12°C ont généré le même fractionnement isotopique que lorsque l'expérience a été réalisée en 2 semaines à 30°C (Meckenstock et al., 1999). La dégradation accélérée du benzène, par ajout de protéines dans un milieu de culture, a conduit au même facteur d'enrichissement isotopique que lorsque cette molécule fut dégradée par une culture standard (Mancini et al., 2003).

3.4.2. Situations limitantes

Dans le cas où plusieurs voies de biodégradation se superposent dans l'environnement pour un contaminant donné et que ces dernières engendrent des fractionnements isotopiques significativement différents, les mesures d'enrichissement isotopique seront utilisées comme simple indicateur qualitatif de la biodégradation. En effet, dans ces conditions, l'équation de Rayleigh ne conduit plus à une relation linéaire entre variations isotopiques et ampleur de la biodégradation. De même, lorsqu'un composé est simultanément formé et dégradé dans l'environnement (comme dans le cas des métabolites intermédiaires), l'application de l'équation de Rayleigh ne permet plus d'avoir accès au facteur d'enrichissement isotopique de ce composé.

3.5. Conclusion sur le fractionnement isotopique

Les études réalisées jusqu'à aujourd'hui ont permis de confirmer la possibilité et l'intérêt d'utiliser le fractionnement isotopique pour quantifier spécifiquement la biodégradation de composés organiques *in situ*. L'élucidation des mécanismes de biodégradation sur le terrain, à partir des mesures d'AKIE ou des pentes 2D-CSIA, est également une approche intéressante et prometteuse pour comprendre les processus de biodégradation et utiliser adéquatement le fractionnement isotopique comme indicateur quantitatif de biodégradation. Néanmoins, l'absence de données expérimentales rend pour l'instant compliquées les interprétations mécanistiques des résultats (Wiegert et al. 2012a, 2013). Les informations sur la biodégradation *in situ* auxquelles le fractionnement isotopique donne accès sont résumées

dans la Figure 13. Les étapes nécessaires pour obtenir ces informations sont également présentées.

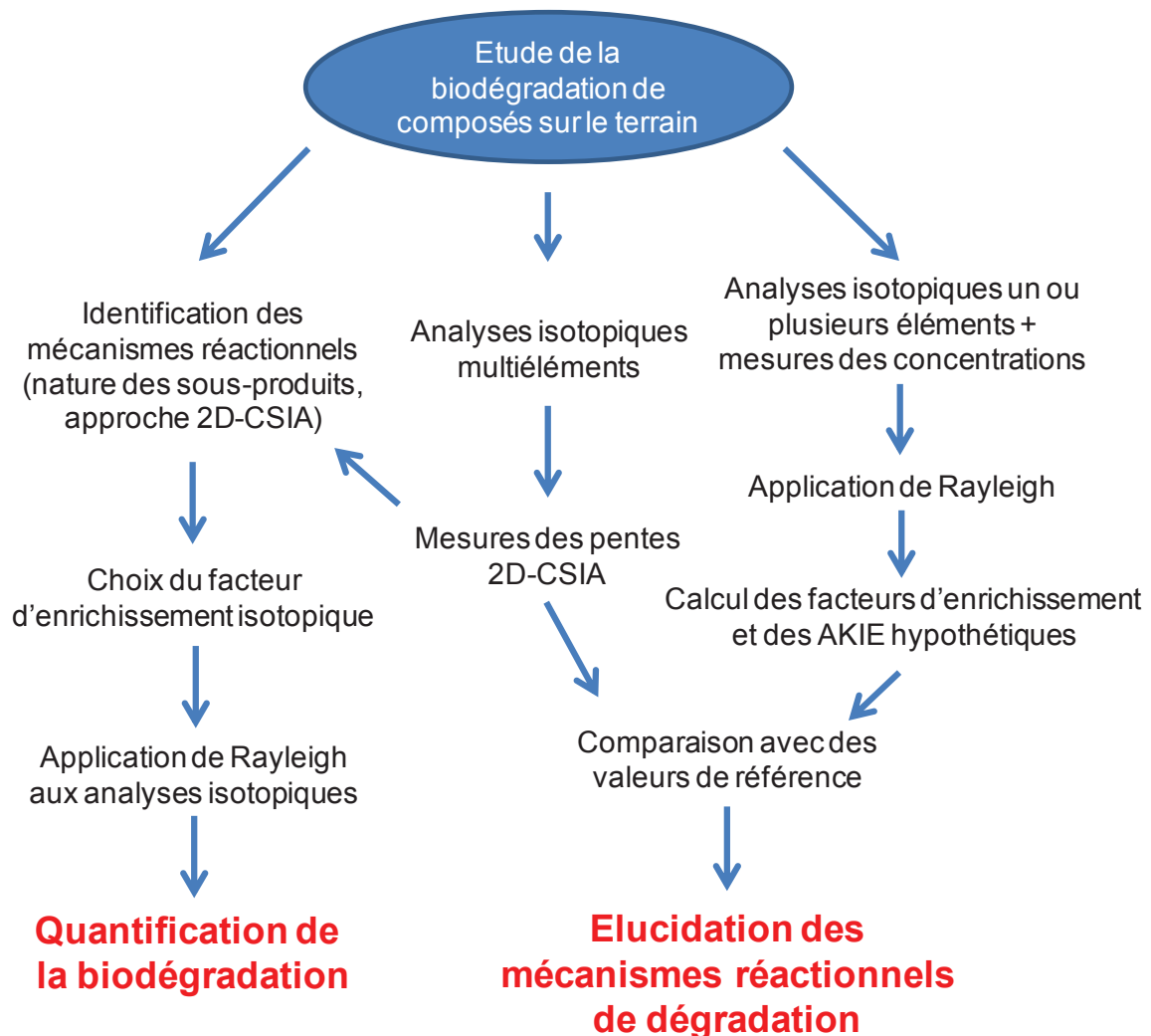


Figure 13. Schéma récapitulatif des applications possibles du fractionnement isotopique à l'étude de la biodégradation sur le terrain.

Les travaux effectués sur le fractionnement isotopique se sont limités à certaines classes de contaminants et à des applications à des concentrations élevées. De nouvelles études s'imposent pour adapter l'outil du fractionnement isotopique à l'étude quantitative de la biodégradation de PPSP à des concentrations faibles, de l'ordre du ng/L ou du ng/g, en aval de STEP.

4. Le fractionnement énantiomérique

A ce jour, le fractionnement énantiomérique a exclusivement permis d'identifier qualitativement des processus de biodégradation de micropolluants organiques *in situ*. Les résultats d'une étude récente (Jammer et al., 2014) suggèrent que le fractionnement énantiomérique pourrait être utilisé comme indicateur quantitatif de biodégradation mais des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse dans des conditions représentatives de celles rencontrées sur le terrain. Le concept du fractionnement énantiomérique, les méthodes de mesure et ses applications jusqu'à aujourd'hui dans le domaine des contaminations environnementales sont présentés par la suite.

4.1. Concept de l'application du fractionnement isotopique à l'étude de la biodégradation de micropolluants organiques

4.1.1. Définition de l'énantiométrie

Un grand nombre de micropolluants sont des molécules dites chirales ce qui signifie qu'en raison de la présence d'un ou plusieurs centres d'asymétrie, ces molécules existent au moins sous deux formes appelées énantiomères. Ainsi, 25 % des composés agrochimiques (Williams, 1996) et 56 % des PPSP (Nguyen et al., 2006) sont commercialisés sous deux formes énantiomères. Pour rappel, des énantiomères sont des composés de même formule chimique, qui sont images l'une de l'autre dans un miroir mais qui ne se superposent pas. Il ne faut pas les confondre avec les diastéréoisomères, qui sont des molécules qui ont le même enchaînement d'atomes mais qui ne sont ni superposables, ni images l'une de l'autre dans un miroir (Figure 14).

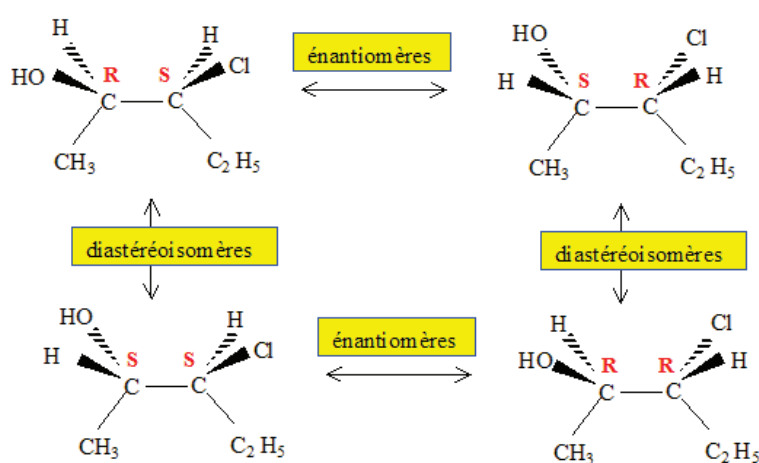


Figure 14. Relations entre énantiomères et diastéréoisomères : exemple du 3-chloropentane-2-ol.

La seule propriété physique qui distingue les deux énantiomères d'une molécule concerne leur pouvoir rotatoire vis-à-vis d'un faisceau de lumière polarisée plane : deux énantiomères ont des pouvoirs rotatoires identiques en valeur absolue, mais opposés. Ainsi, l'énantiomère capable de dévier la lumière dans le sens des aiguilles d'une montre sera appelé « composé dextrogyre (+) » et l'énantiomère capable de dévier la lumière dans le sens inverse des aiguilles d'une montre sera nommé « composé lévogyre (-) ». Une autre notation R/S, qui repose sur un ensemble de règles de priorité définies par Cahn, Ingold et Prelog (convention CIP), permet également de nommer les deux énantiomères d'une molécule lorsque leurs configurations absolues sont connues.

4.1.2. Propriétés biologiques différentes des deux énantiomères d'une molécule

Les deux formes énantiomères d'une molécule présentent des propriétés physico-chimiques identiques mais peuvent, au niveau biologique, avoir des effets physiologiques différents voire antagonistes (Kasprzyk-Hordern and Baker 2012). Dans le cas des médicaments, les deux formes énantiomères d'une substance active peuvent avoir des propriétés thérapeutiques différentes (Evans and Kasprzyk-Hordern 2014). Ainsi, la forme S de l'antidépresseur citalopram a une action 100 fois plus puissante que la forme R (Kasprzyk-Hordern, 2010). De même, les deux énantiomères d'une molécule peuvent présenter une toxicité différente dans l'environnement. Par exemple, des recherches récentes ont montré que la forme S de la fluoxétine, un PPSP très dangereux, est 9,4 fois plus toxique que la forme R vis-à-vis d'organismes aquatiques modèles (Stanley et al., 2007). Les risques liés à la présence de la fluoxétine dans l'environnement ont souvent été estimés en considérant que le pharmaceutique était présent sous forme racémique, ce qui a pu conduire à une sous-évaluation du risque environnemental réel engendré si la forme S est en réalité majoritaire.

4.1.3. Le fractionnement énantiomérique, un outil d'étude des processus de biodégradation

Le fait que la toxicité d'un micropolluant puisse dépendre de la forme énantiomère qu'il contient a incité certaines études d'occurrence environnementales à analyser séparément les énantiomères des contaminants chiraux. Si la plupart des composés organiques chiraux sont commercialisés sous forme racémique (environ 88 % ; Nguyen et al.), certains de ces composés ont été détectés dans l'environnement avec des ratios énantiomériques différents du ratio racémique (Zipper et al. 1998; Nikolai et al. 2006; Selke and Hühnerfuss 2009;

Kasprzyk-Hordern et al. 2010; MacLeod and Wong 2010; Bagnall et al. 2012a; Barclay et al. 2012; Kasprzyk-Hordern and Baker 2012; Ribeiro et al. 2012b). Cet enrichissement d'un des deux énantiomères, appelé fractionnement énantiomérique, est caractéristique d'une action biologique.

En effet, les réactions de dégradation abiotiques sont réalisées dans un environnement achiral et ne sont donc pas stéréosélectives (Zipper et al. 1998; Jammer et al. 2014b). De plus, les phénomènes physiques tels que la sorption (Zipper et al. 1998; Li et al. 2013), la volatilisation (Hühnerfuss and Shah 2009) ou les processus hydrauliques (Zipper et al. 1998) n'engendrent pas de fractionnement énantiomérique car les deux énantiomères d'une molécule possèdent des propriétés physico-chimiques identiques.

Au contraire, les réactions de biodégradation peuvent engendrer un enrichissement significatif d'un des deux énantiomères car ces derniers peuvent être distingués par les enzymes qui forment un environnement chiral. Ainsi, les enzymes se lient avec les formes énantiomères des molécules compatibles avec leur propre chiralité, ce qui peut favoriser la dégradation d'un des deux énantiomères des molécules (Evans and Kasprzyk-Hordern 2014). De plus, lors d'une réaction de biodégradation, les complexes diastéréoisomériques, formés entre les enzymes et les molécules à dégrader, présentent des propriétés physico-chimiques différentes selon la forme énantiomérique de la molécule considérée. Par conséquent, la vitesse de biodégradation peut varier significativement entre les deux énantiomères d'une molécule. Certaines études ont déjà utilisé l'outil énantiomérique pour distinguer spécifiquement des processus de biodégradation de molécules PPSP (Hühnerfuss et al., 2006), de polychlorobiphényles (Wong et al., 2007) et également de pesticides (Zipper et al. 1998).

4.1.4. Le fractionnement énantiomérique, un outil pour quantifier les processus de biodégradation ?

Les fractionnements isotopiques et énantiomériques utilisent la même approche qui consiste à comparer l'enrichissement d'une espèce par rapport à une autre pour prouver l'existence de processus de biodégradation. De la même manière que pour le fractionnement isotopique, la possibilité d'appliquer l'équation de Rayleigh au fractionnement énantiomérique pour quantifier la biodégradation de micropolluants chiraux a été étudiée récemment.

Rappelons la formule (Equation 3) de l'équation de Rayleigh appliquée au fractionnement isotopique :

$$\ln \frac{({}^hE/{}^lE)_t}{({}^hE/{}^lE)_0} = \varepsilon_E \ln f = (\alpha_E - 1) \ln f \quad \text{Équation. 3}$$

Avec :

- $({}^hE/{}^lE)_t$ et $({}^hE/{}^lE)_0$, les ratio isotopiques entre les isotopes lourd hE et léger lE de l'élément E dans la molécule mère à l'instant t et au temps initial de la réaction de biodégradation respectivement.
- f, le pourcentage de biodégradation défini comme le ratio des concentrations de la molécule mère à l'instant t (C_t) et au temps initial (C_0).
- ε_E et α_E , les facteurs d'enrichissement et de fractionnement isotopiques respectivement.

Similairement aux études isotopiques, l'application de l'équation de Rayleigh au fractionnement énantiomérique peut être imaginée selon l'équation 14 suivante, comme illustré sur la Figure 15 :

$$\ln \frac{ER_t}{ER_0} = \varepsilon_{ER} \ln f = (\alpha_{ER} - 1) \ln f \quad \text{Équation. 14}$$

Avec :

- ER_t et ER_0 , les ratios énantiomériques de la molécule mère ($E1/E2$) à l'instant t et au temps initial de la réaction de biodégradation respectivement.
- f, le pourcentage de biodégradation défini comme le ratio des concentrations de la molécule mère (somme des deux énantiomères) à l'instant t (C_t) et au temps initial (C_0).
- ε_{ER} et α_{ER} , les facteurs d'enrichissement et de fractionnement énantiomériques respectivement.

Le ratio énantiomérique ER ne doit pas être confondu avec la fraction énantiomérique EF définie par l'équation 15 suivante :

$$EF = \frac{E1}{E1+E2} \quad \text{Équation. 15}$$

Avec E1 et E2, les concentrations des deux énantiomères. En cas de mélange racémique, ER et EF seront égaux à 1 et 0,5 respectivement.

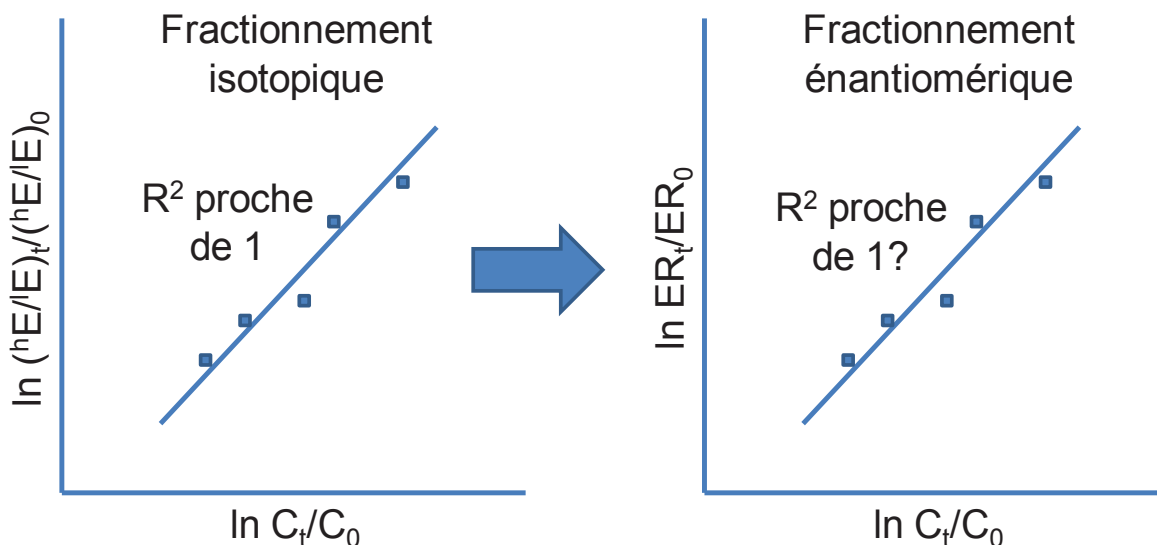


Figure 15. Extrapolation de l'équation de Rayleigh au fractionnement énantiomérique, en s'appuyant sur l'approche isotopique, pour quantifier la biodégradation.

Pour la première fois, l'équation de Rayleigh a été appliquée avec succès au fractionnement énantiomérique mesuré dans le cadre d'expériences de biodégradation de pesticides réalisées en conditions contrôlées à l'aide d'extraits enzymatiques (Jammer et al., 2014). Les coefficients de détermination calculés (compris entre 0,96 et 0,99) ont confirmé l'existence d'une relation linéaire entre l'ampleur de la biodégradation et les variations énantiomériques lorsque l'équation de Rayleigh a été appliquée. Ces premiers résultats, bien que prometteurs, méritent d'être approfondis sur d'autres molécules et dans des conditions d'étude proches de celles rencontrées en aval des STEP, pour confirmer la possibilité d'utiliser le fractionnement énantiomérique comme marqueur quantitatif de la biodégradation des PPSP *in situ*.

4.2. Comment mesurer le fractionnement énantiomérique d'un composé organique?

4.2.1. Principe des analyses chirales

L'analyse chirale d'une molécule nécessite une séparation de ses deux formes énantiomères par chromatographie ce qui représente un véritable challenge analytique car les énantiomères possèdent des propriétés physico-chimiques identiques. Cette séparation peut être réalisée selon deux approches expérimentales.

La première technique, dite indirecte, consiste à transformer le mélange d'énantiomères de la molécule en diastéréoisomères par réaction de la molécule avec un réactif chiral (Hühnerfuss and Shah 2009). La séparation des diastéréoisomères formés est alors possible

sur colonne chromatographique classique car ces derniers se distinguent par certaines de leurs propriétés physico-chimiques. Cette approche est néanmoins risquée car les deux énantiomères d'une molécule peuvent réagir selon des cinétiques différentes avec le réactif chiral. Si la réaction n'est pas complète au moment de l'analyse, le ratio mesuré entre les deux diastéréoisomères formés sera erroné, c'est pourquoi l'analyse directe présentée par la suite est conseillée.

La deuxième approche consiste à séparer directement les énantiomères d'une molécule par chromatographie liquide ou gazeuse en utilisant des phases stationnaires spécifiques chirales. Au cours de leur migration dans la colonne chromatographique chirale, les énantiomères vont former temporairement des diastéréoisomères avec la phase stationnaire. La différence de stabilité entre les complexes diastéréoisomériques constitués conduit alors à la séparation des énantiomères : l'énantiomère qui formera les complexes les moins stables sera élué plus rapidement. L'ordre d'éluion des deux énantiomères peut être déterminé grâce à l'injection d'un standard énantiomérique pur. Les énantiomères de la venlafaxine et de ses métabolites principaux ont été séparés avec succès à l'aide de cette méthode (résolution > 1) en utilisant une colonne chirale Astec Chirobiotic V (Supelco, 25 cm x 2,1 mm ; 5 μ m) (Figure 16) (Li et al. 2013).

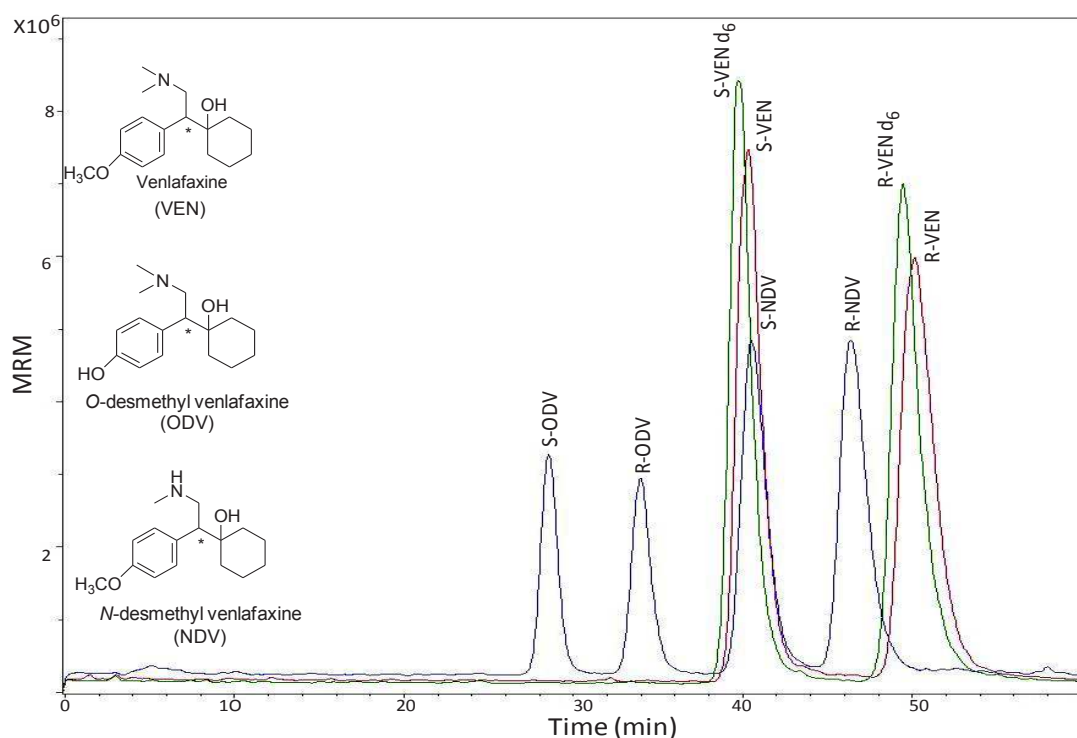


Figure 16. Séparation des énantiomères de la venlafaxine et de ses métabolites sur colonne chirale (Li et al. 2013).

Pour qu'il y ait séparation des deux énantiomères d'une molécule par cette approche, au moins trois sites d'interaction de la molécule étudiée avec la phase stationnaire sont nécessaires et au moins l'une de ces interactions doit dépendre de la stéréochimie de la molécule (Taylor and Maher, 1992). Ces interactions incluent majoritairement des liaisons hydrogènes, des liaisons π - π , des formations de complexes d'inclusion ou des interactions dipôles-dipôles (Hühnerfuss and Shah 2009; Evans and Kasprzyk-Hordern 2014).

La séparation de deux énantiomères en chromatographie est caractérisée par le paramètre de résolution R_s qui se calcule selon l'équation 16 suivante (Allenmark, 1988).

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{0.5 \times (w1 + w2)} \quad \text{Équation. 16}$$

Avec :

- t_{r1} et t_{r2} , les temps de rétention des deux énantiomères E1 et E2 respectivement.
- $w1$ et $w2$, la largeur des pics chromatographiques des énantiomères E1 et E2 respectivement au niveau de leur ligne de base.

Une résolution > 1 indique un maximum de 2 % de recouvrement (Bagnall et al. 2012a). Cette limite est requise pour réaliser des analyses quantitatives précises.

4.2.2. Phases stationnaires chirales utilisées

L'absence de phases stationnaires adaptées à la séparation énantiomérique a longtemps limité les analyses chirales qui se sont surtout développées à partir des années 1990. Les phases stationnaires chirales principalement utilisées aujourd'hui sont fabriquées en greffant sur un support de silice des dérivés de polysaccharides (cellulose, amylose). Ces phases à base de polysaccharides assurent plus de 80 % des séparations des molécules pharmaceutiques chirales grâce à la complémentarité de plusieurs systèmes de solvants (phase normale, phase polaire organique (acétonitrile/méthanol additifs acides ou basiques) ou phase inverse). D'autres types de phases stationnaires (glycopeptides, Pirkle, cyclodextrines, protéines...) apportent des sélectivités complémentaires des précédentes mais leur utilisation est ralentie par des problèmes de stabilité (protéines) ou de transfert à l'échelle préparative (cyclodextrines) (Tableau 8) (Barclay et al., 2012; MacLeod and Wong, 2010; Morin, 2009).

Tableau 8. Listes des principales phases stationnaires chirales utilisées pour l'analyse des PPSP chiraux.

Familles de phases stationnaires chirales	Principales phase stationnaires utilisées et exemples de colonnes associées	Phase mobile	Type d'interactions	Molécules analysées	Références
Polysaccharides	Triacétate de cellulose (Chiralcel OA), Tris-(3,5-dimethylphenyl carbamate) de cellulose (Chiralcel OD), Tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) d'amylose (Chiralpak AD-RH)	Phase inverse Phase normale Phase organique polaire	Liaisons hydrogènes, π - π , interactions dipôles-dipôles	Alcaloïdes, β -bloquants, antihistaminiques, anti-inflammatoires	(Barclay et al., 2012; MacLeod and Wong, 2010; Selke and Hühnerfuss, 2009)
Phases type Pirkle	1-(3,5-dinitrobenzamido)-tetrahydrophenanthrene (Whelk-O1, Whelk-O2)	Principalement en phase normale mais aussi possible en phase inverse	Liaisons π - π , hydrogènes, interactions dipôles-dipôles et stériques	Amides, époxydes, esters, urées, carbamates, éthers, aldéhydes, cétones, acides carboxyliques, alcools et anti-inflammatoire non stéroïdiens	(Collet et al., 2006)
Protéines	Albumine (Chiralpak HSA), α 1-acid glycoprotéine (Chiralpak AGP), Cellobiohydrolase (Chiralpak CBH)	Phase inverse	Liaisons hydrogènes, hydrophobes, ioniques	Amines, acides, amides, esters, alcools	(Bagnall et al., 2012a; Barclay et al., 2012; Huang et al., 2012; Kasprzyk-Hordern et al., 2010a)

Glycopeptides macrocycliques	Vancomycine (Chirobiotic V)	Phase normale, polaire organique, ionique ou inverse	Liaisons hydrogènes, π - π , hydrophobes, ioniques, interactions dipôles-dipôles	Acides aminés et dérivés, peptides, composés acides, alcools, aminés, esters, sulfamides, aromatiques ou aliphatiques	(Bagnall et al., 2012a; Barclay et al., 2012; Li et al., 2013; Nikolai et al., 2006; A. R. Ribeiro et al., 2012)
Phases à cavités chirales	Cyclodextrine (Cyclobond)	Phase inverse Phase normale Phase organique polaire	Liaisons hydrogènes, π - π , interactions dipôles-dipôles, stériques, complexes d'inclusion	Ethers cycliques, aminoacides, porphyrines, stéroïdes, hydrocarbures aromatiques polycycliques, alcanes, cycloalkanes, cétones, amines, dérivés d'alcools, diols, acides carboxyliques	(Selke and Hühnerfuss 2009; Jammer et al. 2014b)

Il convient de noter que, dans le cas des applications chirales, la chromatographie en phase liquide est plus conseillée que celle en phase gazeuse (Hühnerfuss and Shah 2009). En effet, les hautes températures utilisées en chromatographie gazeuse peuvent racémiser ou dégrader les molécules. De plus, si la molécule étudiée est thermosensible à hautes températures, l'énantiomère qui sera retenu plus longtemps dans la colonne sera plus dégradé que l'autre forme ce qui peut conduire à des erreurs de mesure de ratios énantiomériques (A. Ribeiro et al., 2012).

4.2.3. Influence de différents paramètres sur la séparation chromatographique chirale

4.2.3.1. Nature des phases stationnaires et mobiles

Plusieurs paramètres peuvent affecter la séparation chromatographique des énantiomères des composés étudiés.

Bien évidemment, la phase stationnaire et la phase mobile jouent un rôle crucial dans la séparation chromatographique des énantiomères d'une molécule. Ainsi, plusieurs colonnes et différentes phases mobiles doivent être testées pour choisir les conditions qui permettent une séparation énantiomérique optimale des composés étudiés. L'utilisation de modifiants organiques dans les phases mobiles (méthanol, éthanol, 2-propanolol) peut améliorer la résolution des pics chromatographiques associés aux énantiomères (Evans and Kasprzyk-Hordern 2014).

4.2.3.2. Température, pH et débit appliqués lors des analyses

La température, le pH et le débit utilisés lors de la chromatographie peuvent également avoir un impact sur la séparation. Ainsi, l'utilisation de températures plus élevées (55°C) ou plus faibles (15°C) que les températures ambiantes peut améliorer la résolution chromatographique des énantiomères dans certains cas (Fedurcova et al., 2006; Jonsson et al., 1992). Le pH peut également avoir une influence sur la séparation de composés qui contiennent des groupements fonctionnels acides ou basiques (Aboul-Enein and Ali, 2000). Notons que la gamme de pH autorisée en chromatographie chirale est comprise entre 3,5 et 7 (MacLeod et al. 2007). L'utilisation de faibles débits améliore en général la résolution des pics chromatographiques mais ces derniers sont alors plus élargis ce qui diminue la sensibilité de la méthode. Ainsi, un compromis doit être choisi pour obtenir une résolution de pics satisfaisante tout en conservant une sensibilité d'analyse faible et des temps d'analyse acceptables.

4.2.3.3. Paramètres utilisés pour la préparation d'échantillon

Une étape de préparation d'échantillon est souvent nécessaire avant analyse de celui-ci pour concentrer et purifier les molécules étudiées. Les paramètres appliqués, lors de la préparation d'échantillon, doivent être sélectionnés précautionneusement car ils peuvent influencer la séparation chromatographique chirale des composés étudiés. Lors de l'extraction SPE (sur phase solide) de composés basiques sur cartouches MCX (*Mixed-mode Cation-eXchange*), l'ajout de 7 % d'hydroxyde d'ammonium au méthanol lors de l'élution a réduit considérablement la résolution chromatographique des énantiomères de presque tous les composés étudiés (Evans and Kasprzyk-Hordern 2014). L'étude ne donne pas d'explications sur les raisons de cette diminution de résolution.

Les effets de matrice, observés lorsque des composés présents dans la matrice co-éluent avec ceux étudiés, peuvent également diminuer la résolution chromatographique des énantiomères des molécules d'intérêt. La préparation d'échantillon doit être optimisée dans le but de réduire au maximum ces effets matriciels. Pour minimiser ces derniers, certaines études ont choisi de réaliser une première séparation de l'échantillon sur une colonne achirale avant d'effectuer la chromatographie chirale (Barreiro et al., 2011, 2010).

4.2.4. Application de la chromatographie chirale aux études environnementales

Pour obtenir une sensibilité d'analyse qui soit appropriée à la détection de molécules chirales dans l'environnement à des concentrations de l'ordre du ng/L, un couplage entre la chromatographie chirale et la spectrométrie de masse est généralement utilisé (Kasprzyk-Hordern et al. 2010; Bagnall et al. 2012b; Barclay et al. 2012; Kasprzyk-Hordern and Baker 2012).

Similairement aux analyses achirales, les paramètres des méthodes chirales tels que la linéarité, le pourcentage d'extraction, les limites de quantification et de détection de la méthode ou encore la précision doivent être mesurés et validés pour pouvoir appliquer les méthodes à la quantification d'énantiomères de micropolluants dans l'environnement. L'utilisation d'étalons deutérés ou labellisés est conseillée pour corriger les pertes lors des étapes d'extraction et les effets de matrice qui peuvent varier entre les deux énantiomères d'une molécule.

4.3. Historique des applications du fractionnement énantiomérique à l'étude de la biodégradation de micropolluants organiques

4.3.1. Identification qualitative des processus de biodégradation

Le fractionnement énantiomérique a surtout été utilisé comme marqueur qualitatif de biodégradation des micropolluants dans l'environnement. Une atténuation des concentrations en micropolluants au sein ou en aval des STEP qui s'accompagne d'un fractionnement énantiomérique significatif indique l'occurrence de processus de biodégradation (Zipper et al. 1998; Fono et al. 2006; Kunkel and Radke 2012; Li et al. 2013). Au contraire, une diminution des concentrations qui ne s'accompagne pas d'un fractionnement énantiomérique significatif est en faveur de mécanismes d'atténuation abiotiques. Par exemple, le mécoprop, un herbicide, a été analysé le long de l'écoulement d'eaux souterraines en aval d'une zone contaminée (Zipper et al. 1998). Les analyses chirales ont montré que le ratio énantiomérique du mécoprop augmente au cours de son transit dans les eaux souterraines (Figure 17). Ces résultats confirment que la biodégradation contribue à l'atténuation de ce composé dans l'environnement sans apporter pour autant des informations quantitatives sur ce processus de dégradation.

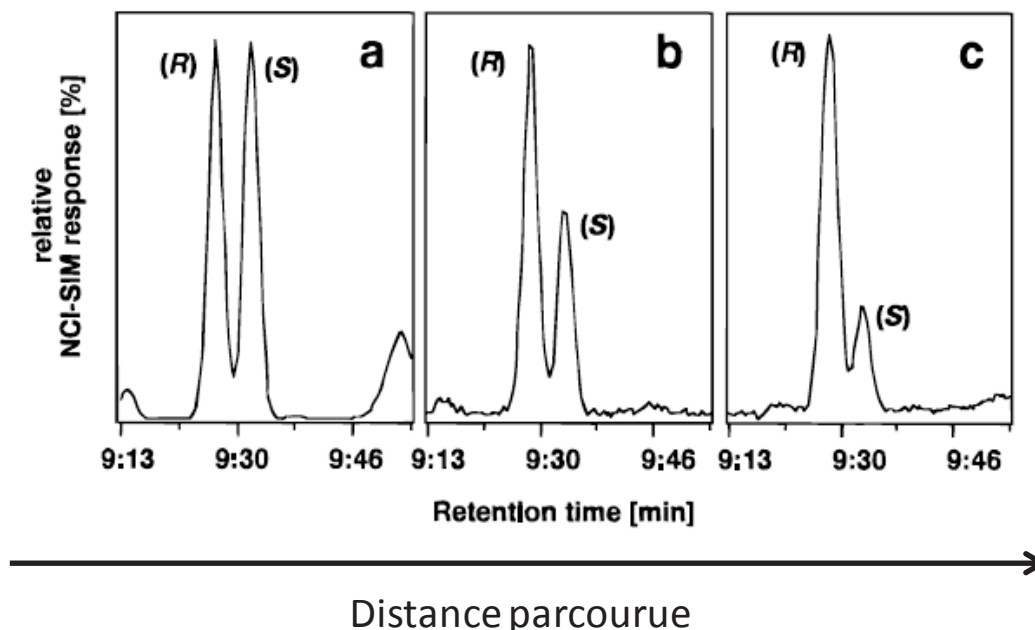


Figure 17. Chromatogrammes GC-MS correspondant à l'analyse des énantiomères du mécoprop dans des échantillons d'eau souterraine prélevés en aval d'une zone contaminée (Zipper et al. 1998).

4.3.2. Quantification des processus de biodégradation

4.3.2.1. Conditions nécessaires à l'obtention d'une relation linéaire lorsque l'équation de Rayleigh est appliquée

L'utilisation du phénomène d'enrichissement énantiomérique pour quantifier la biodégradation de composés organiques, à travers l'application de l'équation de Rayleigh, est une approche très récente qui s'inspire du concept du fractionnement isotopique. Pour l'instant, seule une étude réalisée en conditions enzymatiques a montré qu'une relation linéaire peut être observée entre le pourcentage de biodégradation de composés et les variations énantiomériques lorsque l'équation de Rayleigh est appliquée (Jammer et al., 2014).

Pour développer les applications de l'équation de Rayleigh à la quantification de la biodégradation de molécules chirales, il est important d'identifier les conditions qui permettent l'obtention d'une relation linéaire entre le fractionnement énantiomérique et l'ampleur de la biodégradation. L'équation de Rayleigh s'appuie sur l'hypothèse que les deux entités d'une molécule étudiée (isotopologues ou énantiomères) suivent une cinétique de dégradation linéaire de premier ordre (Aelion et al. 2010; Jammer et al. 2014b). Néanmoins, dans l'environnement, certaines réactions de biodégradation n'obéissent pas à ces cinétiques linéaires et sont alors décrites par les cinétiques de Michaelis-Menten.

Toutefois, dans le cas des analyses isotopiques, la prépondérance des isotopes légers permet de conserver une relation linéaire entre le fractionnement isotopique et l'ampleur de la biodégradation lorsque l'équation de Rayleigh est appliquée, même lorsque les cinétiques de dégradation des isotopologues ne sont pas d'ordre 1 (Aelion et al., 2010). Pour confirmer cette affirmation, rappelons la définition du facteur de fractionnement isotopique α_E :

$$\alpha_E = \frac{({}^hE/{}^lE)_{\text{produit}}}{({}^hE/{}^lE)_{\text{molécule mère}}} \quad \text{Équation. 4}$$

Avec :

- $({}^hE/{}^lE)_{\text{produit}}$ et $({}^hE/{}^lE)_{\text{molécule mère}}$, les ratio isotopiques de l'élément E dans le métabolite généré et la molécule mère au même instant t.

Le facteur de fractionnement isotopique α_E peut aussi être exprimé en fonction de la composition isotopique de la molécule mère aux instants t_0 et t (Hayes 2004).

$$\ln f \times \left(\frac{1 + (^hE/^lE)_0}{1 + (^hE/^lE)_t} \right) (\alpha - 1) = \ln \frac{(^hE/^lE)_t}{(^hE/^lE)_0} \quad \text{Équation. 17}$$

Avec :

- $(^hE/^lE)_t$ et $(^hE/^lE)_0$, les ratio isotopiques entre les isotopes lourd hE et léger lE de l'élément E dans la molécule mère à l'instant t et au temps initial respectivement.
- f , le pourcentage de biodégradation.

L'obtention de l'équation 17 à partir de l'équation 4 ne s'appuie à aucun moment sur l'hypothèse que les cinétiques des isotopologues sont d'ordre 1 (Hayes 2004). Cette équation 17 conduit à l'expression linéaire de Rayleigh seulement si $(^hE/^lE)_0$ et $(^hE/^lE)_t$ sont significativement inférieurs à 1, autrement dit seulement si l'isotope lourd de l'élément E est présent en faible abondance en comparaison à l'isotope léger ce qui est vérifié pour les isotopes stables présents dans l'environnement (Tableau 5).

Au contraire des isotopes, l'un des énantiomères d'une molécule chirale n'est en général pas prépondérant par rapport à l'autre. Lorsque les cinétiques de dégradation des énantiomères n'obéissent pas à une cinétique linéaire d'ordre 1 et suivent plutôt la loi de dégradation enzymatique de Michaelis-Menten (Equation 18), l'application de l'équation Rayleigh n'est pas censée conduire à une relation linéaire :

$$\frac{dC}{dt} = \frac{-kC}{[K_M + C]} \quad \text{Équation. 18}$$

Avec :

- k , la constante de réaction de dégradation enzymatique.
- C , la concentration de la molécule.
- K_M , la constante de saturation de Michaelis-Menten.

D'après la loi de Michaelis-Menten, les cinétiques de dégradation des énantiomères restent toutefois linéaires d'ordre 1 si la concentration de chaque énantiomère C est très inférieure aux constantes de saturation K_M associées aux réactions. La majorité des contaminants sont présents dans l'environnement à des concentrations de l'ordre du ng- μ g/L alors que les valeurs de K_M reportées dans la littérature sont de l'ordre de 10^6 μ g/L (Jammer et al. 2014b). La condition $C \ll K_M$ est donc vérifiée pour la plupart des micropolluants dans l'environnement. L'application de l'équation de Rayleigh au fractionnement énantiomérique, dans le but de quantifier la biodégradation de PPSP présents en faibles concentrations sur le terrain, apparaît donc comme une approche prometteuse.

4.3.2.2. Choix du facteur d'enrichissement énantiomérique à appliquer sur le terrain

Comme pour l'outil isotopique, si le fractionnement énantiomérique se révèle être un indicateur quantitatif de biodégradation fiable, l'un des challenges de l'application de Rayleigh aux mesures énantiomériques consistera à choisir de manière adéquate les facteurs d'enrichissement à appliquer sur le terrain.

L'enrichissement énantiomérique est dépendant du composé étudié et des mécanismes réactionnels de dégradation. Des études supplémentaires sont requises pour établir le lien qui existe entre mécanismes réactionnels et enrichissement énantiomérique pour chaque PPSP analysé. Ces informations sont essentielles pour choisir judicieusement les facteurs d'enrichissement à appliquer en fonction des mécanismes de dégradation identifiés sur le terrain.

4.3.3. Fractionnement énantiomérique et mécanismes réactionnels de biodégradation

L'enrichissement énantiomérique concerne le composé dans son ensemble. Il n'y a pas d'effet dilution comme dans le cas du fractionnement isotopique qui concerne seulement les atomes du site réactionnel. Au contraire de son homologue isotopique, le fait que l'ampleur du fractionnement énantiomérique d'une molécule soit spécifique d'un mécanisme réactionnel en particulier reste à être démontré. Certaines études ont déjà utilisé le fractionnement énantiomérique pour différencier plusieurs voies de dégradation (sans identification des mécanismes). Par exemple, la biodégradation aérobie de l'O-desmethylvenlafaxine (ODV) conduit à un enrichissement énantiomérique significatif de la molécule résiduelle alors que la biodégradation anaérobie de l'ODV n'engendre pas de fractionnement énantiomérique. Ainsi, les mesures du ratio énantiomérique de l'ODV dans une rivière en aval de STEP ont permis de mieux comprendre le cheminement de cette molécule dans l'environnement (Gasser et al. 2012b).

Pour l'instant, les informations manquent pour déterminer si le fractionnement énantiomérique peut constituer un outil adéquat pour distinguer des mécanismes réactionnels sur le terrain. Si l'outil énantiomérique s'avère être spécifique d'un mécanisme donné, il ne pourra tout de même pas permettre, comme son homologue isotopique,

d'identifier les éléments chimiques qui sont impliqués dans les liaisons réactionnelles donc les informations seront plus limitées pour élucider de nouveaux mécanismes.

4.3.4. Identification des sources de contamination

Les analyses énantiomériques apportent des informations qui peuvent aider à l'identification des sources de contamination. Par exemple, les analyses croisées des concentrations et des ratios énantiomériques d'un PPSP, la venlafaxine (VEN), et de son métabolite *in vivo*, l'Odesmethylvenlafaxine (ODV), en entrée de plusieurs STEP en Israël ont permis d'identifier si la présence de la VEN était due à des rejets domestiques ou industriels (Gasser et al. 2012b). Des expériences préliminaires ont montré que la dégradation biologique de la VEN en ODV n'est pas énantiosélective mais que la dégradation de l'ODV favorise l'élimination de la forme S de ce métabolite. Des concentrations très élevées de VEN ont ensuite été mesurées en entrée de la STEP de Jérusalem (STEP 1) en comparaison aux autres STEP étudiées. Concernant l'ODV, les concentrations et le ratio énantiomérique de ce métabolite en entrée de la STEP 1 étaient similaires aux autres STEP. Ces résultats obtenus ont prouvé :

- Que l'ODV n'a pas été plus dégradé en amont de la STEP 1 qu'en amont des autres STEP (sinon son ratio énantiomérique serait différent de celui des autres STEP).
- Que les concentrations élevées de la VEN ne sont pas dues à une consommation plus importante de ce médicament (sinon les concentrations en ODV seraient également plus élevées ou alors l'ODV formé se serait plus dégradé ce qui n'est pas le cas).

La présence anormalement élevée de la VEN en entrée de la STEP 1 était donc due à des rejets industriels (rejets qui ne contiennent pas d'ODV).

Dans une autre étude portant sur les drogues illicites, les deux énantiomères de la MDA (3,4-méthylènedioxyamphétamine) ont été analysés en entrées de trois STEP (Kasprzyk-Hordern and Baker 2012). Ce composé peut être directement consommé sous forme racémique. La métabolisation *in vivo* de la MDA conduit alors à un enrichissement de la forme R de ce composé dans les urines. Cette substance peut également provenir de la métabolisation *in vivo* d'une autre drogue, la MDMA (3,4-méthylènedioxy-méthamphétamine). La biodégradation de la MDMA en MDA est fortement stéréosélective et conduit à un enrichissement de la forme S de la MDA dans les urines. Les analyses chirales effectuées en entrées de trois STEP ont montré que la MDA est enrichie en forme S pour les STEP 2 et 3 (Figure 18). Les ratios énantiomériques mesurés pour ces deux STEP

($EF = R/(S+R) = 0,26-0,30$) sont proches de ceux mesurés dans les urines de personnes qui ont consommé de la MDMA. Ces résultats prouvent que la présence de la MDA en entrée des STEP 2 et 3 est essentiellement due à la dégradation *in vivo* de la MDMA (Kasprzyk-Hordern and Baker 2012) et non à une consommation directe de la MDA. Concernant la STEP 1, les ratios énantiomériques sont proches du racémique. La présence de la MDA est sûrement due, dans ce cas, à la fois à une consommation directe de ce composé et à une dégradation *in vivo* de la MDMA.

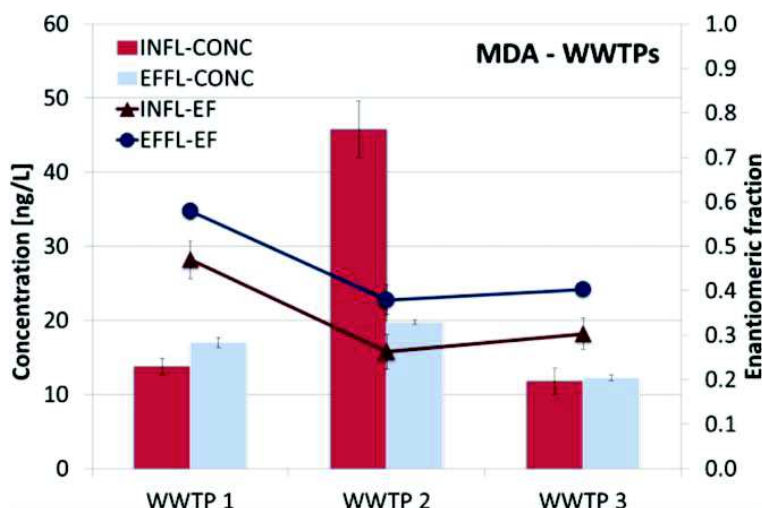


Figure 18. Concentrations et ratios énantiomériques de la MDA en entrée et sortie de trois STEP (WWTP 1, WWTP 2, WWTP 3) (Kasprzyk-Hordern and Baker 2012).

4.4. Limites lors de l'application du fractionnement énantiomérique à la quantification de la biodégradation *in situ*

4.4.1. Inversion chirale

Les réactions enzymatiques peuvent conduire à une inversion chirale de certaines molécules (Hashim et al. 2011). Par exemple, les énantiomères R du propanolol, du kétoprofène et de l'ibuprofène se transforment en énantiomères S lors de leur métabolisation *in vivo* (Kasprzyk-Hordern, 2010). Dans des boues activées, la forme S du naproxène peut subir une transformation en forme R, conduisant à une augmentation des concentrations de l'énantiomère R au cours du procédé de traitement (Hashim et al. 2011). Lorsqu'une inversion chirale est observée, l'enrichissement énantiomérique mesuré ne peut alors plus être corrélé à la dégradation du contaminant. Si le fractionnement énantiomérique s'avère être un bon indicateur quantitatif de la biodégradation, l'application de Rayleigh ne sera pas applicable dans ce cas particulier.

4.4.2. Superposition des voies de dégradation dans l'environnement

L'utilisation du fractionnement énantiomérique comme marqueur quantitatif de processus de biodégradation *in situ* sera également compliqué si la molécule étudiée se biodégrade simultanément selon plusieurs mécanismes réactionnels, qui conduisent chacun à un enrichissement énantiomérique distinct. Dans ce cas, l'enrichissement énantiomérique pourra seulement être utilisé comme marqueur qualitatif de la biodégradation. La biodégradation peut même devenir difficile à identifier si les voies de dégradation qui se superposent (ou se succèdent) engendrent un fractionnement énantiomérique inverse qui annule le fractionnement global. La métabolisation *in vivo* de l'ibuprofène conduit à un enrichissement de la forme S de la molécule alors que sa biodégradation dans les STEP peut conduire à un enrichissement de la forme R (Hühnerfuss et al., 2006). Comme conséquence, le ratio de l'ibuprofène mesuré dans certains effluents de STEP est proche du racémique, ce qui peut être interprété à tort comme une absence de biodégradation dans les STEP si l'enrichissement *in vivo* n'a pas été mesuré au préalable. Ainsi, l'importance de connaître l'ampleur et l'orientation de l'enrichissement énantiomérique des molécules étudiées en fonction des mécanismes de dégradation et des conditions physico-chimiques rencontrées sur le terrain prend ici tout son sens pour pouvoir appliquer correctement le fractionnement énantiomérique à l'étude de la biodégradation des contaminants.

De même, lorsqu'un composé est simultanément formé et dégradé dans l'environnement (comme dans le cas des métabolites intermédiaires), l'application de l'équation de Rayleigh ne permettra plus d'avoir accès au facteur d'enrichissement énantiomérique de ce composé.

4.5. Conclusion sur le fractionnement énantiomérique

Le fractionnement énantiomérique a été utilisé jusqu'à aujourd'hui pour identifier qualitativement des processus de biodégradation. Récemment, l'équation de Rayleigh a été appliquée pour la première fois aux fractionnements énantiomériques mesurés dans le cadre d'expériences de biodégradation réalisées au sein d'extraits enzymatiques (Jammer et al., 2014). Les coefficients de détermination calculés (compris entre 0,96 et 0,99) ont confirmé l'existence d'une relation linéaire entre l'ampleur de la biodégradation et les variations énantiomériques lorsque l'équation de Rayleigh est appliquée.

Ces premiers résultats, bien que prometteurs, méritent d'être approfondis sur d'autres molécules PPSP et dans des conditions d'étude proches de la réalité de terrain, pour confirmer si le fractionnement énantiomérique peut constituer un marqueur quantitatif de la biodégradation des PPSP *in situ*.

Objectifs de thèse

L'évaluation des risques liés à la présence des PPSP en aval de STEP nécessite d'avoir accès à des données qualitatives et quantitatives sur les processus de biodégradation de ces composés dans l'environnement et d'avoir donc à disposition des outils/méthodes permettant de fournir ces données. Nous avons recensé les outils/méthodes qui sont classiquement appliqués pour étudier les processus de biodégradation. Les techniques qui permettent d'étudier spécifiquement la biodégradation (ratio métabolite/molécule mère, biologie moléculaire, études *in vitro*) ne fournissent que des données qualitatives. Les méthodes quantitatives (méthode traceur) ne sont, quant à elles, pas capables de différencier les mécanismes d'atténuation les uns des autres et surestiment ainsi les processus de biodégradation dans la plupart des cas.

L'objectif de la thèse a consisté à développer des techniques qui permettent de quantifier spécifiquement les processus de biodégradation des PPSP en aval des STEP. Ces outils pourraient permettre aux acteurs de l'eau, tels que Veolia ou les pouvoirs publics, une meilleure évaluation et gestion des risques liés aux rejets de PPSP dans l'environnement. Une étude bibliographique approfondie a permis de sélectionner deux outils prometteurs à savoir les fractionnements isotopiques et énantiomériques.

Le fractionnement isotopique a déjà été appliqué pour étudier quantitativement les processus de (bio)dégradation de contaminants organiques dans l'environnement à des concentrations élevées sur des sites industriels contaminés. **L'un des objectifs d'étude de cette thèse consiste à étudier la possibilité d'élargir le champ d'application du fractionnement isotopique à la quantification de la biodégradation des PPSP en aval de STEP à des concentrations faibles (de l'ordre du ng/L).**

Nous nous sommes limités à l'étude du fractionnement isotopique du chlore pour les raisons suivantes :

- Une de nos volontés premières était de développer des méthodes qui soient applicables dans des laboratoires conventionnels. Or, seule la composition isotopique du chlore peut être analysée à l'aide d'instruments conventionnels de type GC-MS (Aeppli et al. 2010). L'analyse de la composition isotopique des autres éléments nécessite d'avoir accès à des instruments spécifiques (de type GC-IRMS) peu disponibles dans les laboratoires d'analyse, tel que celui dans lequel la thèse a eu lieu.

- Le fractionnement isotopique du chlore est dédié à l'étude de la biodégradation des PPSP chlorés. Ces derniers représentent une classe importante de micropolluants. Le fractionnement isotopique du chlore pourrait ainsi permettre d'étudier la biodégradation d'un bon nombre de contaminants.
- Pour observer un fractionnement isotopique du chlore, le contaminant étudié doit subir une réaction de déchloration ou de chloration microbienne dans l'environnement au cours de laquelle une liaison C-Cl est rompue ou formée. Au contraire de la chloration qui reste limitée en aval des STEP, les réactions de déchloration représentent l'une des voies majoritaires de dégradation des contaminants chlorés déjà étudiés (solvants chlorés). Le fractionnement isotopique du chlore pourrait donc représenter un indicateur quantitatif de biodégradation pertinent pour les PPSP chlorés si ces derniers se dégradent également majoritairement via une réaction de déchloration. De plus, les réactions de déchloration sont importantes à étudier d'un point de vue écologique puisque les atomes de chlore sont connus pour conférer une toxicité à la molécule (Clewell et al., 2001; Kliegman and McNeill, 2008). La déchloration d'une molécule conduit, dans la plupart des cas, à la formation de produits de transformation moins toxiques.
- Il est plus difficile de mesurer le fractionnement isotopique d'un élément chimique présent en nombre élevé dans la molécule, car celui-ci est atténué par les atomes éloignés du site réactionnel qui ne subissent pas de fractionnement isotopique. Si le carbone ou l'hydrogène sont les atomes qui constituent majoritairement les composés organiques, la faible présence du chlore dans les molécules minimise les effets d'atténuation et peut conduire à des valeurs de fractionnement isotopique plus élevées et facilement mesurables.

Les applications du fractionnement énantiomérique à l'étude de la biodégradation de composés organiques sont récentes et encore rares en comparaison de celles qui utilisent l'outil isotopique. Pour l'instant, le fractionnement énantiomérique a essentiellement permis d'identifier qualitativement des processus biologiques de dégradation de contaminants organiques dans l'environnement. **Un second objectif de la thèse consiste à analyser si l'outil énantiomérique peut permettre de quantifier les processus de biodégradation de PPSP chiraux dans l'environnement à travers l'application de Rayleigh.**

**Chapitre 2 : Evaluation du
fractionnement isotopique du
chlore comme indicateur
quantitatif de la biodégradation
des PPSP chlorés dans les
sédiments en aval de STEP**

1. Choix méthodologiques

Le chapitre 2 de la thèse restitue l'ensemble des travaux qui ont porté sur le fractionnement isotopique. Comme expliqué précédemment, ces travaux ont eu pour objectif d'analyser si l'étude quantitative de la biodégradation des PPSP chlorés en aval des STEP peut être réalisée à l'aide du fractionnement isotopique du chlore.

La première étape du projet a consisté à sélectionner des molécules d'étude. Ces molécules modèles devaient répondre aux contraintes suivantes :

- Critère 1 : Les molécules sont des micropolluants qui appartiennent à la catégorie des PPSP et qui possèdent un ou plusieurs chlores.
- Critère 2 : La présence des molécules au sein et en aval des STEP à des concentrations mesurables est avérée.
- Critère 3 : Les composés sélectionnés se biodégradent majoritairement dans l'environnement via une réaction de déchloration car celle-ci est nécessaire pour pouvoir observer un enrichissement isotopique du chlore (Abe et al., 2009; Kuder et al., 2013).

Une première sélection de molécules a été réalisée à l'aide d'une revue bibliographique approfondie. Un croisement des mesures d'occurrence reportées dans la littérature avec les résultats issus de travaux portant sur la biodégradation des PPSP chlorés dans l'environnement a permis de retenir trois composés. D'autres composés, peu documentés mais suspectés d'être également des molécules d'étude intéressantes, ont été recherchés dans les échantillons environnementaux analysés durant la thèse pour vérifier s'ils répondaient aux contraintes énoncées ci-dessus. Aucune molécule d'étude supplémentaire n'a été retenue lors de cette seconde phase de sélection expérimentale.

1.1. Sélection des molécules d'étude

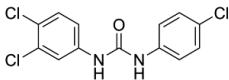
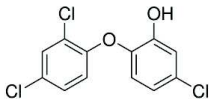
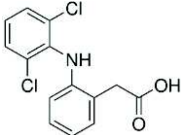
1.1.1. Le triclocarban

1.1.1.1. Critère 1 : PPSP micropolluant chloré

Le triclocarban (TCC), ou 3,4,4'-trichlorocarbanilide, est une substance chimique peu soluble dans l'eau (< 1,55 mg/L à 25°C) et fortement hydrophobe ($\log K_{ow} = 4,9$) (Tableau 9) qui est commercialisée pour ses propriétés biocides depuis 1957 (Coogan et al., 2007). Le TCC est ainsi présent à des niveaux de concentration compris entre 0,5–2 % dans un certain nombre de produits pharmaceutiques et de soins personnels qui incluent des désinfectants, des

cosmétiques, certains savons liquides pour les mains, des déodorants ou encore des dentifrices (EPA, n.d.). Des études ont démontré que le TCC peut engendrer des effets néfastes vis-à-vis d'organismes aquatiques ou d'êtres humains tels que des effets perturbateurs endocriniens (Chen et al., 2008; Sood et al., 2013; Yueh et al., 2012), des résistances bactériennes (Boone, 2012) ou encore des effets cancérogènes (Sood et al., 2013). Par conséquent, le TCC a été classé au rang de contaminant potentiel.

Tableau 9. Propriétés physico-chimiques des PPSP chlorés sélectionnés pour étudier le fractionnement isotopique du chlore.

Composé	Structure chimique	Masse molaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (mg/L)	Log ₁₀ K _{ow}	pKa	Coefficient de Henry (atm·m ³ /mole)
Triclocarban (TCC)		315,59	0,65–1,55 ^{a,b} (Halden and Paull, 2005)	4,9 ^c (Kwon and Xia, 2012)	12,7 (Kwon and Xia, 2012)	< 1 × 10 ⁻⁸ (J. L. Zhao et al., 2010b)
Triclosan (TCS)		289,55	1,97–4,6 ^{a,b} (Halden and Paull, 2005)	4,8 ^c (Kwon and Xia, 2012)	7,9 (Kwon and Xia, 2012)	1,5 × 10 ⁻⁷ (J. L. Zhao et al., 2010b)
Diclofénac (DCF)		296,16	2,4	4,51 (Tran et al., 2009)	4,15 (Tran et al., 2009)	4,73 × 10 ⁻¹² (Tran et al., 2009)

^aCalculé en utilisant le profilé PBT (Persistent, Bioaccumulative, and Toxic).

^bCalculé à partir du logiciel ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationships).

^cCalculé à partir du logiciel K_{ow}WIN (logiciel pour estimer les coefficients de partition octanol-eau).

1.1.1.2. Critère 2 : présence environnementale

Le TCC est actuellement l'un des contaminants les plus fréquemment détectés dans l'environnement à des concentrations pouvant atteindre le niveau du µg/L (ou µg/g) notamment dans les eaux de rivière (Carmona et al., 2014), les boues des stations

d'épuration (Chu and Metcalfe, 2007; Heidler et al., 2006a; Lozano et al., 2013a), les sols amendés en boues (Cha and Cupples, 2009; G. G. Ying et al., 2007a) et les sédiments (Miller et al., 2008a; Venkatesan et al., 2012; Wang et al., 2014).

1.1.1.3. Critère 3 : déchloration dans l'environnement

Si l'occurrence du TCC dans l'environnement a été très étudiée, peu d'informations sont disponibles concernant le devenir de ce composé dans le milieu naturel. Dans les STEP, la biodégradation du TCC est faible ($\leq 20\%$; Heidler et al., 2006b; Lozano et al., 2013b) et l'élimination de ce composé (65–97 %, Lozano et al., 2013b; TCC Consortium, 2002) s'explique principalement par le fait qu'il tend à s'adsorber sur les boues, en raison de son coefficient de partage octanol/eau élevé (Heidler et al., 2006a; Lozano et al., 2013a).

Le TCC résiduel, rejeté dans l'environnement via les effluents de STEP ou l'épandage des boues, s'accumule et persiste dans les sédiments ou les sols, ce qui explique les concentrations élevées détectées dans ces deux matrices solides (Agyin-Birikorang et al., 2010; Wu et al., 2009a). Plusieurs études de laboratoire ont ainsi montré que la biodégradation du TCC est faible dans les sols en conditions aérobies (temps de demi-vie compris entre 80 et 231 jours) et inexistante en conditions anaérobies (Cha and Cupples, 2010b; Wu et al., 2009b; G. G. Ying et al., 2007a).

Bien que le TCC soit connu pour être persistant, une déchloration réductive microbienne de ce biocide conduisant à la formation du dichlorocarbanilide (DCC) a été mise en évidence dans des sédiments en aval de STEP (Miller et al., 2008b; Venkatesan et al., 2012). Les produits de déchloration du TCC issus de la perte de deux ou trois chlores, le monochlorocarbanilide (MCC) et le carbanilide (NCC) respectivement, ont également été détectés dans ces sédiments mais à des concentrations bien inférieures au DCC (Figure 19) (Miller et al., 2008b; Venkatesan et al., 2012).

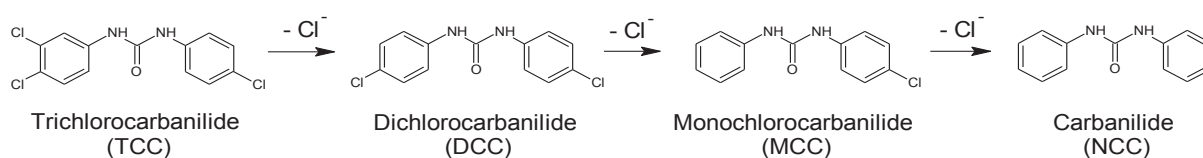


Figure 19. Voie de déchloration réductive du TCC décrite dans des sédiments en aval de STEP (Miller et al., 2008a; Venkatesan et al., 2012).

Cette déchloration réductive du TCC observée dans l'environnement ainsi que la présence avérée de ce biocide en aval des STEP font de cette molécule un candidat intéressant pour l'étude du fractionnement isotopique du chlore.

1.1.2. Le diclofénac

1.1.2.1. Critère 1 : PPSP micropolluant chloré

Le diclofénac (DCF), dérivé arylacétique (Tableau 9), est un anti-inflammatoire très consommé en Europe. Selon plusieurs sources convergentes (Besse and Garric, 2008; Besse, 2010; Sadezky and Loffler, 2008), la consommation française de DCF a tendance à augmenter et serait d'environ 10 tonnes/an soit 0,167 g/hab/an. Des études d'écotoxicité ont démontré que le DCF peut avoir des effets toxiques sur les organismes vivants tels que des altérations cytotoxiques, des perturbations de la reproduction ou de la croissance (Triebkorn et al., 2004).

1.1.2.2. Critère 2 : présence environnementale

Le DCF est peu éliminé dans les STEP (taux d'élimination compris entre 17 et 69 %) (Heberer, 2002; Yu et al., 2006). Par conséquent, ce composé est souvent détecté à des concentrations élevées pouvant atteindre plusieurs µg/L dans les effluents de STEP et les eaux de rivière (Daneshvar et al., 2010; Heberer, 2002; Kasprzyk-Hordern et al., 2008; Kunkel and Radke, 2012; Yu et al., 2006). Sa présence dans les sédiments est peu décrite et les résultats contradictoires entre les études qui indiquent des concentrations élevées (10–100 ng/g) (Ferreira da Silva et al., 2011; Varga et al., 2010) et celles qui, malgré des méthodes d'analyse optimisées et une présence avérée du DCF dans l'eau de rivière, n'arrivent pas à détecter ce composé dans la matrice sédimentaire (Antonić and Heath, 2007; Martín et al., 2010). En l'absence de données sur les caractéristiques des sédiments, ces résultats sont difficilement interprétables.

1.1.2.3. Critère 3 : déchloration dans l'environnement

Dans les STEP, le DCF est peu dégradé et ne s'adsorbe pas de manière significative sur les boues (Heberer, 2002; Ternes et al., 2004; Yu et al., 2006). Dans l'environnement, le DCF peut être dégradé selon plusieurs processus. Une élimination du DCF relative à une molécule traceur, comprise entre 41 et 69 %, a ainsi été mesurée entre deux points d'un tronçon de rivière distants de 12,5 km (Kunkel and Radke, 2012). Si la photodégradation du

DCF, qui conduit principalement à la formation du 8-chlorocarbazole-1-acetic acide (Poiger et al., 2001), peut contribuer à l'atténuation de ce composé dans certaines rivières peu profondes et peu turbides (Bartels and von Tümpling, 2007; Heberer, 2002; Kunkel and Radke, 2012), cette molécule peut également être éliminée via des processus de biodégradation. Ainsi, une biodégradation aérobie du DCF par la flore microbienne présente dans les sédiments de rivière a été observée, celle-ci conduisant notamment à la formation du 4'-hydroxydiclofenac, du 5-hydroxydiclofenac et du 5-hydroxydiclofenac quinone imine (Li et al., 2014).

Récemment, une étude menée en laboratoire a également démontré que le DCF peut subir une déchloration réductive microbienne lorsque cette molécule est mise en présence d'enzymes naturellement présentes dans l'environnement, telles que la peroxydase de raifort (HRP) et la glutathion-S-transférase (GST) (Boerma et al., 2014). Cette déchloration conduit à la formation d'un adduit stable au glutathion (Figure 20).

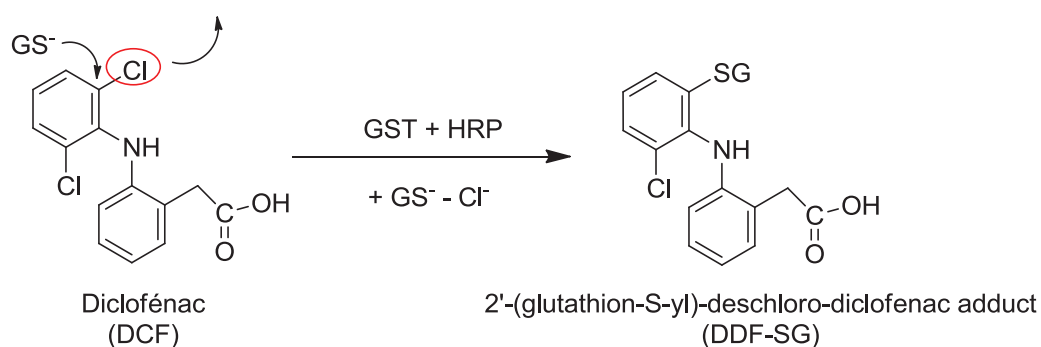


Figure 20. Déchloration réductive du DCF observée lors d'incubations menées en présence des enzymes HRP et GST (Boerma et al., 2014).

Cette déchloration réductive reste à être étudiée *in situ* mais ces premiers résultats en laboratoire incitent à retenir le DCF comme molécule modèle.

1.1.3. Le triclosan

1.1.3.1. Critère 1 : PPSP micropolluant chloré

Le triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxyacétique)phénol ou TCS), composé peu soluble dans l'eau (< 4,6 mg/L à 25°C) et fortement hydrophobe ($\log_{10}K_{ow} = 4,8$) (Tableau 9), est largement utilisé depuis les années 1970 pour ses propriétés biocides. Il est ainsi présent dans des centaines de produits PPSP à des concentrations comprises entre 0,03–0,3 % tels que les savons, les déodorants, les dentifrices, les crèmes ou les gels d'aseptisation

(Sabaliunas et al., 2003). En Europe, environ 350 tonnes de TCS sont produites chaque année pour des applications commerciales (Singer et al., 2002). Les effets néfastes du TCS vis-à-vis d'organismes vivants ont été mis en évidence par plusieurs études (Yazdankhah et al., 2006; Zorrilla et al., 2008). Ce composé peut entraîner une modification de la fonction thyroïdienne chez les amphibiens à des concentrations inférieures à 0,15 µg/L (Veldhoen et al., 2006) et peut induire une toxicité chronique chez certains poissons à une concentration de 22 mg/L (G. G. Ying et al., 2007a). Le TCS et son métabolite, le méthyltriclosan, ont également été identifiés comme étant deux des principaux polluants organiques qui contribuent actuellement à la toxicité aiguë des eaux usées domestiques, suite à des études sur l'organisme *Vibrio fischeri* (Farré et al., 2008). Par ailleurs, les résultats de plusieurs études *in vitro* ont classé le TCS parmi les composés perturbateurs endocriniens (Jacobs et al., 2005; Wang and Tian, 2015).

1.1.3.2. Critère 2 : présence environnementale

Similairement au TCC, le TCS est un contaminant très répandu dans l'environnement. De nombreuses études d'occurrence reportent ainsi la présence de ce composé à des concentrations atteignant plusieurs µg/L ou µg/g dans diverses matrices environnementales telles que les eaux de rivière (Gautam et al., 2014; Halden and Paull, 2005; J. L. Zhao et al., 2010b), les sols (Cha and Cupples, 2009), les boues de STEP (Chu and Metcalfe, 2007; Pycke et al., 2014a) ou les sédiments (Miller et al., 2008b; Venkatesan et al., 2012; J. L. Zhao et al., 2010b). Une corrélation entre les concentrations en TCS et TCC dans des échantillons d'eaux de rivière a été observée (Halden and Paull, 2005), en raison des propriétés physico-chimiques similaires partagées par ces deux composés.

1.1.3.3. Critère 3 : déchloration dans l'environnement

L'élimination du TCS dans les STEP (69–97 %, Lozano et al., 2013b; Yu et al., 2006) s'explique par la sorption d'une partie de ce composé sur les boues des STEP (30–70 %) mais également par la biodégradation du TCS au cours des procédés de traitement des eaux usées (Lozano et al., 2013b). Les processus biologiques des STEP peuvent ainsi éliminer jusqu'à 33 % du TCS (Lozano et al., 2013b).

Similairement au TCC, le TCS relargué dans l'environnement tend à s'adsorber sur les sédiments ou les sols (Cha and Cupples, 2009; Wu et al., 2009a). Dans les sols, le TCS peut être biodégradé de manière effective en conditions aérobies (temps de demi-vie issus d'expériences en laboratoire compris entre 18 et 83 jours) (Butler et al., 2012; Cha and

Cupples, 2010b). Au contraire, la biodégradation du TCS dans la matrice sol reste négligeable en conditions anaérobies (G. G. Ying et al., 2007b). Les données sur la biodégradation du TCS dans les sédiments sont peu disponibles.

Le méthyl-TCS est souvent décrit comme étant le produit majoritaire issu de la biodégradation du TCS dans les STEP et les sols (Butler et al., 2012; Lozano et al., 2013b). Dans des études menées sur des sols, les concentrations en méthyl-TCS mesurées ont permis d'expliquer 44–80 % de la disparition du TCS (Butler et al., 2012). Néanmoins, dans une autre étude réalisée dans des colonnes de sol, la formation du métabolite méthylé n'a permis d'expliquer que 1,67 % de l'élimination du TCS, suggérant l'existence d'autres voies de biodégradation significatives du TCS dans l'environnement (Kwon and Xia, 2012).

Récemment, une déchloration réductive du TCS en diclosan a été observée en présence d'une culture algale *Chlorella pyrenoidosa* (Wang et al., 2013a). Une analyse approfondie du métabolite généré en LC-MS/MS a permis de démontrer que le chlore du TCS est éliminé au niveau du cycle phénolique (Figure 21).

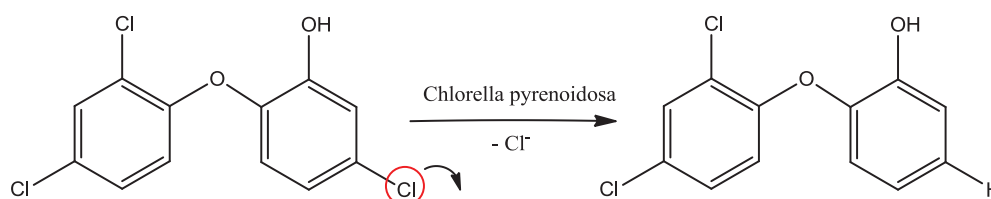


Figure 21. Déchloration réductive du TCS observée lors d'incubations menées en présence d'une culture algale *Chlorella pyrenoidosa* (Wang et al., 2013a).

La déchloration potentielle du TCS n'a encore jamais été étudiée sur le terrain. Cependant, les résultats obtenus, en présence de la culture algale, suggèrent que le TCS est capable de subir une déchloration dans l'environnement. Le TCS pourrait donc être un bon modèle pour étudier le fractionnement isotopique du chlore.

1.1.4. Recherche par masse exacte d'autres molécules d'étude potentielles

Pour confirmer la déchloration environnementale des 3 molécules sélectionnées, le TCC, le TCS et le DCF, ces composés ainsi que leurs métabolites déchlorés ont été analysés dans des échantillons de sédiments prélevés en aval de STEP (cf partie 1.2.1). Les analyses ont été réalisées en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS), après un traitement des échantillons permettant l'extraction et l'enrichissement des composés étudiés. Contrairement aux spectromètres de masse de type

triple quadripôle, qui donnent seulement accès à des masses nominales et qui présentent une sensibilité faible lorsque les analyses sont conduites en balayage complet, l'utilisation d'un spectromètre de masse à haute résolution en balayage complet peut permettre de rechercher des molécules, dont les étalons ne sont pas disponibles, dans les échantillons analysés (Chiaia-Hernandez et al., 2013).

Ainsi, lorsque les trois molécules sélectionnées et leurs métabolites ont été analysés dans des échantillons environnementaux, d'autres molécules d'étude potentielles, de structure chimique similaire, ont également été recherchées, avec leurs métabolites déchlorés, en se basant sur les critères d'identification définis ci-dessous. Ces molécules d'étude potentielles correspondent à des PPSP chlorés dont l'occurrence et le devenir environnemental ont été peu étudiés (aucune réaction de déchloration reportée dans la littérature). Les critères utilisés pour l'identification sont les suivants :

- Une recherche de la molécule suspectée est réalisée en construisant le chromatogramme issu du courant ionique généré par l'ion d'intérêt relatif à la molécule recherchée, avec une précision inférieure à 5 ppm. Cette opération suppose que le comportement de la molécule recherchée lors de l'ionisation soit connu, ce qui est possible avec les techniques d'ionisation utilisées en spectrométrie de masse qui produisent majoritairement des ions moléculaires $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$ (Chiaia-Hernandez et al., 2013).
- Le massif isotopique du chlore de la molécule recherchée dans l'échantillon doit être semblable au massif isotopique théorique.
- Des ions fils peuvent être générés dans la cellule de collision HCD (*Higher Energy Collision Dissociation*) mais ces ions seuls ne permettent pas de confirmer la présence des molécules recherchées puisqu'ils peuvent provenir de la fragmentation d'autres molécules présentes dans la matrice. Les ions MS/MS peuvent cependant être utilisés comme ions de confirmation.

Un exemple de recherche par masse exacte du diclosan (métabolite déchloré du TCS) dans un échantillon de sédiment, extrait et injecté en LC-ESI-HRMS, est présenté Figure 22. Les critères d'identification du diclosan ont été validés, ce qui a permis de suspecter fortement la présence de ce composé dans la matrice étudiée même en l'absence d'étalon.

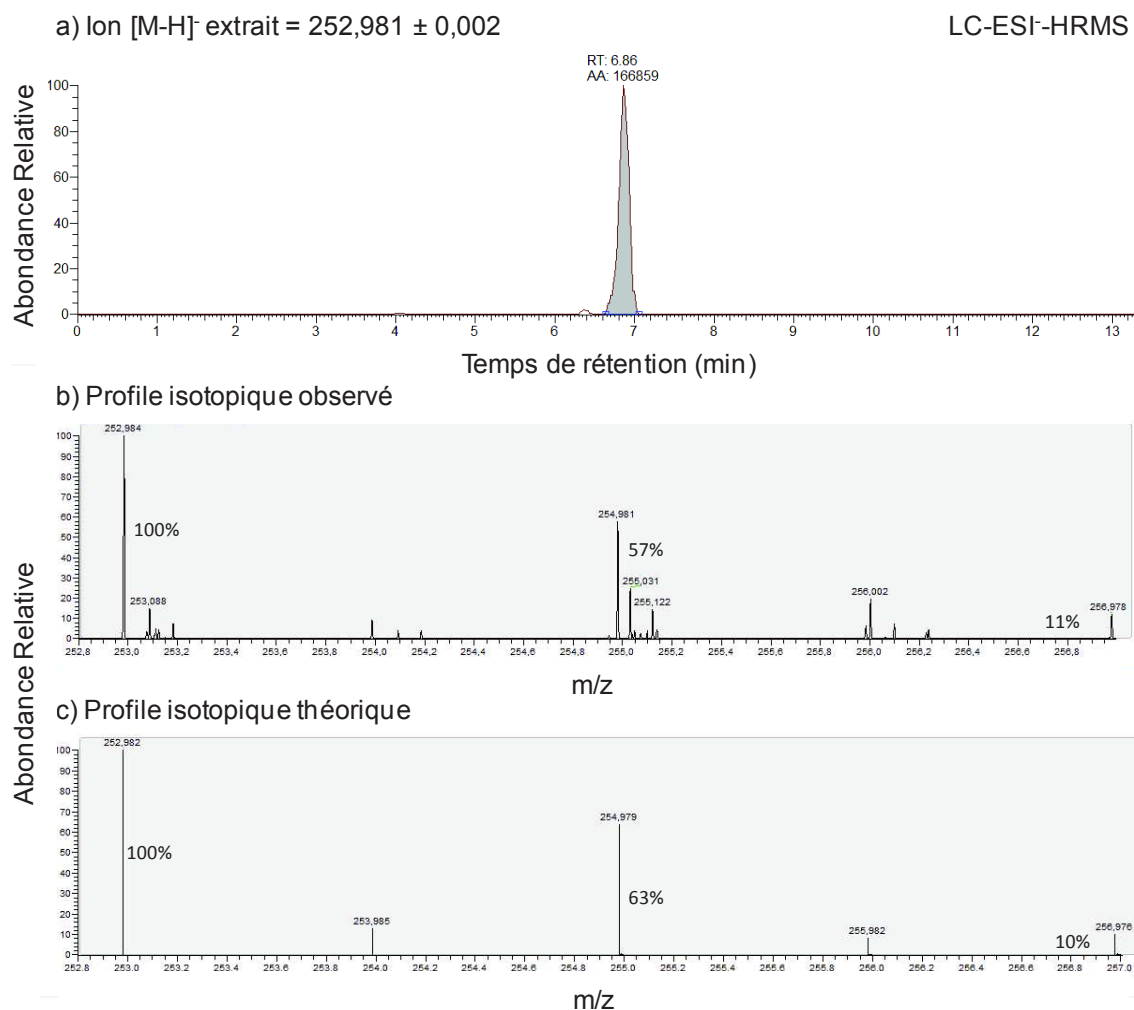
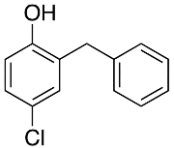
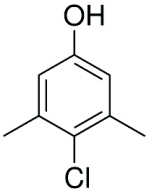


Figure 22. a) Chromatogramme d'un échantillon de sédiment (analysé au cours de la thèse) reconstruit à partir de l'ion de rapport m/z 252,981 ($[M-H]^-$ du diclosan), avec une précision de ± 5 ppm ; b) Massif isotopique du chlore du diclosan dans l'échantillon sédimentaire (ratio relatif de 100/57/11 entre les trois pics isotopiques du chlore détectés) ; c) Massif isotopique théorique du chlore du diclosan (ratio relatif de 100/63/10 entre les trois pics isotopiques du chlore détectés).

Les molécules d'étude potentielles supplémentaires, recherchées dans les échantillons environnementaux en utilisant les critères de confirmation énoncés ci-dessus, sont présentées dans le Tableau 10. Aucune d'entre elles n'a été retenue pour l'étude du fractionnement isotopique du chlore, en raison de l'absence de ces molécules ou de leurs métabolites déchlorés dans les échantillons.

Ainsi, le choix final des molécules d'étude s'est limité au triclocarban, triclosan et diclofénac. La liste retenue ne prétend pas être exhaustive et d'autres PPSP sont susceptibles de constituer de bons modèles pour étudier le fractionnement isotopique du chlore.

Tableau 10. Molécules d'étude potentielles recherchées par masse exacte dans les échantillons environnementaux analysés durant la thèse.

Molécules d'étude potentielles	Structure chimique	Toxicité	Utilisation	Données d'occurrence	Résultats obtenus lors de la recherche par masse exacte
Chlorophène		Accumulation dans des organismes aquatiques (Rostkowski et al., 2011)	Désinfectant en milieux hospitaliers et domestiques	Concentrations élevées dans les effluents de STEP (jusqu'à 1,2 µg/L) (Bueno et al., 2012) Détection dans des eaux de rivière (<LOD–16 ng/L) (Kasprzyk-Hordern et al., 2008)	Détection du chlorophène mais pas de ses métabolites déchlorés
Chloroxylénol		/	Désinfectant en milieux hospitaliers et domestiques	Détection dans des eaux de rivière (<LOD–254 ng/L) (Kasprzyk-Hordern et al., 2008)	Pas de détection du chloroxylénol dans les échantillons environnementaux

1.2. Stratégie d'étude du fractionnement isotopique du chlore

Une stratégie d'étude a été mise en place pour analyser si le fractionnement isotopique du chlore peut constituer un indicateur pertinent pour quantifier la biodégradation des PPSP chlorés à l'état de traces en aval des STEP. Elle comprend une étape préalable d'analyse des voies et mécanismes de biodégradation des composés chlorés sélectionnés, afin de s'assurer que ces molécules modèles se dégradent *in situ* via des mécanismes qui engendrent un fractionnement isotopique du chlore. La deuxième étape consiste à mesurer les facteurs d'enrichissement isotopique, liés à ces mécanismes en conditions contrôlées, pour pouvoir ensuite réaliser des applications en aval des STEP.

1.2.1. Etude des réactions de déchloration réductive des PPSP chlorés sélectionnés dans les sédiments en aval de STEP

Plusieurs publications mettent en évidence la déchloration microbienne des trois molécules modèles sélectionnés (Boerma et al., 2014; Miller et al., 2008a; Wang et al., 2013b) mais cette réaction n'a encore jamais été étudiée sur le terrain pour le DCF et le TCS. Ainsi, la première étape a consisté à s'assurer que les molécules sélectionnées subissent réellement un processus de déchloration microbienne en aval des STEP et à évaluer l'ampleur de cette réaction de dégradation. Pour ce faire, les trois composés d'étude ainsi que leurs métabolites déchlorés potentiels ont été analysés dans l'environnement en aval de STEP.

1.2.1.1. Nature des métabolites déchlorés étudiés dans les échantillons réels

Les réactions de déchloration décrites dans la littérature pour les trois molécules sélectionnées correspondent à des réactions de déchloration réductive au cours desquelles un atome de chlore est remplacé par un atome d'hydrogène. De plus, les fractionnements isotopiques du chlore sont significativement plus élevés lorsque la réaction de déchloration est réductive plutôt qu'oxydative (remplacement d'un chlore par un groupement hydroxyle) (Abe et al., 2009; Kuder et al., 2013). Pour ces deux raisons, les métabolites déchlorés qui ont été suivis prioritairement sur le terrain sont ceux qui sont issus d'une déchloration réductive de la molécule mère.

Pour une meilleure compréhension des processus environnementaux, les métabolites issus d'une déchloration oxydative des composés étudiés ont également été recherchés par masse exacte dans les échantillons analysés même si cette réaction n'a encore jamais été décrite dans la littérature.

Concernant le DCF, l'étude qui a mis en évidence une déchloration réductive de ce composé, en présence d'enzymes environnementales, a décrit la formation d'un adduit au glutathion (Boerma et al., 2014) comme produit de transformation majoritaire. Cet adduit a été recherché par masse exacte dans les échantillons environnementaux.

1.2.1.2. Matrices d'étude analysées

Pour vérifier que les molécules sélectionnées subissent une réaction de déchloration réductive sur le terrain, les trois composés d'étude ainsi que leurs métabolites déchlorés potentiels ont été analysés dans des sédiments prélevés en aval de STEP. Le choix d'étudier la déchloration des composés et donc le fractionnement isotopique du chlore dans le compartiment sédimentaire a été réalisé pour les trois raisons suivantes :

- Le fractionnement isotopique est un outil destiné à des études au niveau de zones d'activités microbiennes intenses ou de zones qui permettent un temps de résidence élevé des molécules tels que des aquifères ou des sédiments.
- La réaction de déchloration réductive est souvent décrite dans la littérature comme étant une réaction qui se déroule en conditions anaérobies (Miller et al., 2010, 2008a) ce qui nécessite de travailler dans le compartiment sédimentaire pour rencontrer ces conditions redox spécifiques.
- Le choix d'analyser les molécules d'étude dans le compartiment sédimentaire est pertinent pour le TCS et le TCC car ces deux biocides tendent à s'accumuler dans les sédiments en aval de STEP (Cha and Cupples, 2009; Wu et al., 2009a). Concernant le DCF, la sorption de cette molécule sur les sédiments est peu documentée et les résultats disponibles ne permettent pas de déduire une tendance générale. En effet, certaines études ne détectent pas de DCF dans le compartiment sédimentaire malgré une présence de ce médicament dans l'eau (Antonić and Heath, 2007; Martín et al., 2010) alors que d'autres observent une sorption significative du DCF sur les sédiments (Ferreira da Silva et al., 2011; Varga et al., 2010). Ces résultats contradictoires sont difficilement interprétables car les caractéristiques des sédiments étudiés ne sont pas renseignées dans toutes les études citées. Deux des études démontrent cependant que la sorption du DCF semble être positivement corrélée au pourcentage de carbone organique des sédiments. Des analyses sont nécessaires pour confirmer ou non la capacité du DCF à s'accumuler dans les sédiments et l'occurrence d'une réaction de déchloration de ce composé dans cette matrice solide.

Dans le cas où les composés et leurs métabolites sont identifiés dans les sédiments, ces derniers ont également été analysés dans les effluents des STEP, situées en amont des sites de collecte des sédiments, pour s'assurer que la réaction de déchloration n'a pas lieu durant le traitement des eaux usées. De plus, les sédiments analysés ont été prélevés 20–30 m en aval des rejets de STEP, ce qui exclut toute possibilité de dégradation microbienne significative des molécules étudiées dans la colonne d'eau entre les rejets de STEP et le site de prélèvement des sédiments.

1.2.1.3. Choix des sites d'étude et échantillonnage

1.2.1.3.1. Choix des sites d'étude

Pour étudier la déchloration réductive des trois PPSP sélectionnés dans les sédiments en aval de STEP, différents critères ont été utilisés pour choisir des sites d'étude appropriés :

- Les sites sélectionnés pour prélever les sédiments sont des rivières/ruisseaux situés en aval de STEP dont les rejets contiennent les molécules d'étude à des concentrations mesurables (plusieurs dizaines de ng/L).
- Les rivières/ruisseaux étudiés doivent avoir un débit d'écoulement faible (< 1 m/s) pour limiter la dilution des effluents de STEP et des molécules étudiées dans les eaux de rivière. De plus, un débit d'écoulement faible permet de favoriser le dépôt des sédiments et limite leur renouvellement.
- Les sites d'étude doivent être accessibles pour la collecte de sédiments.
- Dans les rivières étudiées, une couche sédimentaire, dont la hauteur est supérieure à 5 cm, doit être présente. En effet, certains auteurs décrivent la déchloration réductive comme étant une réaction qui se déroule en conditions anaérobies (Miller et al., 2010, 2008a). Si cette hypothèse est exacte, les sédiments doivent être prélevés à une profondeur dont la faible teneur en oxygène permet l'existence de processus anaérobies. La quantification des accepteurs d'électrons dans des sédiments a permis de montrer qu'à partir de 5 cm, la quantité d'oxygène disponible est déjà largement réduite et qu'il y a coexistence de processus aérobie et anaérobies (Mermillod-Blondin et al., 2005). Bien évidemment, la profondeur à laquelle la quantité d'oxygène diminue significativement peut varier en fonction des caractéristiques de la rivière, d'où l'intérêt de travailler sur des rivières à faibles débits pour limiter les échanges d'oxygène au niveau de la zone hyporhéique (Kunkel and Radke, 2008). Une étude a ainsi montré que lorsque le débit de la rivière est faible (0,12 m/s), l'oxygène disparaît totalement à une profondeur de 6 cm au contraire d'une rivière qui présente un débit élevé (0,31 m/s). Dans ce cas, la quantité

d'oxygène diminue peu au sein des 30 premiers cm de sédiments (Kunkel and Radke, 2008).

En se basant sur ces critères de sélection, trois sites d'étude ont été retenus. Leur localisation est représentée sur la carte ci-dessous (Figure 23). Les caractéristiques des sites sélectionnés et des STEP présentes en amont de chaque site étudié sont présentées Tableau 11.



Figure 23. Localisation des trois sites sélectionnés en France pour l'étude du fractionnement isotopique du chlore (Google Earth).

Tableau 11. Caractéristiques des sites et des STEP étudiés (données 2014).

	Site 1	Site 2	Site 3
Milieu de rejet des effluents de STEP	Canal large de 15 m qui rejoint la mer 20 km en aval	Ruisseau large de 1 m qui rejoint un canal 150 m en aval. Rejet du canal au niveau d'étangs 7 km en aval	Ruisseau d'1 m de large alimenté à 80 % par les effluents de STEP
Hauteur de la colonne d'eau	1,5–2 m	80–100 cm	20–30 cm
Hauteur de la couche sédimentaire	1 m environ	≈ 10 cm	≈ 10 cm
Caractéristique des sites	Zone agricole Autoroute à proximité de la STEP	Zone agricole	Zone agricole
	STEP 1	STEP 2	STEP 3
Procédés Equivalent habitants	M/B/N/D/P 140 300	M/B/N/D/P 32 083	M/B/N/D/P/MB 20 000
Débit moyen en sortie (m³/j)	9 311	4 819	1 566
Débit DCO (kg/j)	254,1	123,2	26,8
Traitement d'effluents hospitaliers	1 hôpital	1 hôpital	

M procédés physiques (filtration, décantation), *B* procédés biologiques de type boues activées, *N* nitrification, *D* dénitrification, *P* traitement du phosphore, *MB* bioréacteur à membrane.

1.2.1.3.2. Prélèvements des échantillons environnementaux

Des sédiments ont été prélevés sur les sites sélectionnés environ 20–30 m après les rejets des trois STEP en août et novembre 2013. Pour le site 2, les sédiments ont été collectés dans le ruisseau avant que celui-ci ne rejoigne le canal. Les caractéristiques physico-

chimiques de la rivière et les conditions météorologiques enregistrées lors des prélèvements sont présentées dans les annexes de l'article intitulé *Screening triclocarban and its transformation products in river sediment using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry*.

Des échantillons instantanés de sédiments ont été prélevés à l'aide d'une pelle pour les sites 2 et 3 et à l'aide d'un carottier à gravité pour le site 1, en respectant les consignes d'échantillonnage énoncées dans le rapport rédigé par l'IRSTEA (Schiavone and Coquery, 2011). Pour chaque matrice sédimentaire étudiée, plusieurs échantillons ont été collectés à différents emplacements de la section transversale de la rivière avant d'être mélangés pour obtenir un échantillon composite. Conjointement aux échantillonnages de sédiments, les effluents des trois STEP ont également été prélevés sous forme d'échantillons composites sur 24 h.

Une fois prélevés, les échantillons ont été acheminés vers le laboratoire en moins de 3 h. Durant le transport, leur température a été maintenue à 10°C. Une fois arrivés au laboratoire, les effluents ont été directement filtrés à 0,7 µm et conservés à 4°C avant d'être extraits dans les 24 h et les sédiments ont été directement stockés à -20°C pendant 3 jours avant d'être lyophilisés puis broyés et tamisés à 2 mm.

1.2.1.4. Préparation des échantillons

Etant donné la complexité des matrices étudiées et les concentrations faibles analysées (de l'ordre du ng-µg/L ou ng-µg/g), une étape de préparation d'échantillon a été nécessaire pour extraire, purifier et concentrer les molécules d'intérêt.

1.2.1.4.1. Extraction des sédiments

Des méthodes d'extraction accélérée par solvant (ASE), permettant d'extraire le TCS, le DCF et le TCC contenus dans des sédiments avec des rendements de récupération > 70 %, sont déjà décrites dans la littérature (Chiaia-Hernandez et al., 2013; Gautam et al., 2014). D'autres méthodes permettent également d'obtenir de bons rendements d'extraction des molécules d'étude. Le but ici ne consiste pas à réaliser un inventaire de l'ensemble des techniques disponibles dans la littérature mais l'on peut citer pour exemples l'extraction du DCF par microonde (73–97 %) (Varga et al., 2010), l'extraction solide/liquide du TCS et TCC par agitation (81–88 %) (Venkatesan et al., 2012) ou encore l'extraction solide/liquide du DCF par ultrasons (73 %) (Martín et al., 2010).

La méthode d'extraction accélérée par solvant a été retenue pour extraire nos échantillons sédimentaires mais une phase d'optimisation a été nécessaire pour développer une méthode qui soit commune pour le DCF, le TCC et le TCS. La méthode optimisée est décrite en détails dans l'article intitulé *Screening triclocarban and its transformation products in river sediment using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry*.

1.2.1.4.2. Extraction des effluents

L'extraction des molécules d'étude et de leurs métabolites dans des matrices aqueuses type eaux usées ou eaux de rivière est également largement décrite dans la littérature. Les extractions des matrices aqueuses sont réalisées essentiellement par extraction en phase solide (SPE). Ainsi, l'extraction SPE sur cartouches HLB (*hydrophilic-lipophilic balance*) a permis l'obtention de rendements compris entre 70,6–120 % pour les trois molécules étudiées dans des études d'occurrence menées sur des effluents ou des eaux de rivière (Bueno et al., 2009; Gautam et al., 2014; Halden and Paull, 2004; Kasprzyk-Hordern et al., 2008; Lozano et al., 2013b; Radke et al., 2010; Vulliet et al., 2009; J. L. Zhao et al., 2010b).

Cette méthode d'extraction sur cartouches HLB a été sélectionnée pour analyser nos échantillons d'effluents. Plusieurs solvants d'élution ont été testés au préalable pour obtenir des rendements optimums pour l'ensemble des molécules analysées. La méthode optimisée est décrite dans la partie 2.2.1 du chapitre 2.

1.2.1.5. Instruments LC-MS utilisés

Le TCS et le DCF ne sont pas analysables en GC-MS sans dérivation (Maier et al., 2014; Zhang et al., 2007) et le TCC ne peut être analysé en GC-MS même après dérivation (Bisceglia et al., 2010). Ainsi, les molécules modèles et leurs métabolites ont été analysés en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Jusqu'à aujourd'hui, les spectromètres de masse de type triple quadripôle ont été beaucoup utilisés car, couplés à une phase d'extraction/concentration des échantillons, ils permettent d'obtenir une sensibilité d'analyse élevée qui peut atteindre 0,01 ng/g ou ng/L en utilisant un mode de détection sélectif d'ions (*SIM, Selected Ion Monitoring*) (Bueno et al., 2012; Cha and Cupples, 2009; Higgins et al., 2011; Pycke et al., 2014b; Sapkota et al., 2007; Zhao et al., 2010). Cependant, la confirmation de la présence du TCC, du TCS et du DCF dans des échantillons environnementaux a souvent été réalisée en s'appuyant sur une seule réaction de transition (*SRM, selected ion monitoring*) et la détection d'un seul ion fils (Miao et al.,

2002; Venkatesan et al., 2012; J. L. Zhao et al., 2010b). Or, des études récentes (Hernández et al., 2012) ont montré qu'utiliser une seule SRM lors des analyses peut conduire à des faux positifs et les auteurs de ces travaux recommandent ainsi de suivre au moins deux ions de transitions. Pour le TCS, le risque d'obtenir des faux positifs est encore plus élevé car la confirmation de la présence de ce composé repose sur la détection d'un ion fils non spécifique, dont le ratio masse/charge (m/z) est de 35 (Venkatesan et al., 2012; J. L. Zhao et al., 2010b).

Par conséquent, l'analyse des molécules et de leurs métabolites dans les effluents et les sédiments au cours de la thèse a été réalisée en utilisant un spectromètre de masse à haute résolution de type Orbitrap, muni d'une cellule de collision à haute énergie. Cet appareil permet d'obtenir une meilleure confirmation de la présence des molécules grâce à sa résolution élevée (25 000–100 000 Hz) et sa précision de masse inférieure à 5 ppm qui sont couplées à une sensibilité d'analyse atteignant l'échelle du picogramme, même lorsque l'acquisition est conduite en balayage complet.

L'identification d'une molécule par haute résolution dans un échantillon environnemental repose sur plusieurs critères :

- Le temps de rétention de l'ion recherché dans l'échantillon doit être similaire à celui de l'étalon à $\pm 0,5$ min.
- La masse exacte de l'ion recherché est détectée avec une précision < 5 ppm.
- Le massif isotopique de la molécule dans l'échantillon analysé est similaire au massif théorique.

Des ions fils peuvent être générés dans la cellule de collision HCD mais ces ions seuls ne permettent pas de confirmer la présence des molécules recherchées puisqu'ils peuvent provenir de la fragmentation d'autres molécules présentes dans la matrice. Les ions MS/MS peuvent cependant être utilisés comme une preuve supplémentaire de confirmation.

L'utilisation d'un spectromètre de masse à haute résolution permet également d'identifier des composés, dont les étalons ne sont pas disponibles dans le commerce, par recherche de leurs masses exactes dans les chromatogrammes issus de l'analyse des échantillons. Cette aptitude de l'appareil a été de grand intérêt dans le cadre de cette thèse car les étalons n'étaient pas disponibles pour certains des métabolites étudiés.

Les analytes étudiés, dont les étalons sont disponibles, ont été quantifiés dans les effluents et les sédiments grâce à des gammes d'étalonnage à 6 points, établies à des niveaux de concentration qui couvrent ceux classiquement retrouvés dans l'environnement. Les composés ont été quantifiés par étalonnage interne, les étalons internes deutérés étant

ajoutés dans les échantillons en quantité parfaitement connue et unique avant extraction pour corriger à la fois les pertes de signal dues aux effets de matrice et les pertes de molécules engendrées par les étapes d'extraction. Les étalons deutérés ont également été ajoutés dans chaque point de la gamme d'étalonnage à une quantité qui correspond à la situation idéale où 100 % des étalons deutérés ajoutés avant extraction sont extraits. La courbe de calibration relative, qui a été utilisée pour la quantification des molécules, a été établie à partir des ratios calculés entre les aires des pics de chaque substance étudiée et les aires des étalons deutérés correspondants.

1.2.1.6. Validation des méthodes d'analyse

La validation des méthodes développées pour l'analyse des sédiments et des effluents a été réalisée à travers la vérification de différents paramètres de performance tels que la linéarité, les limites de détection et de quantification, les rendements d'extraction ou encore la fidélité.

1.2.1.6.1. Linéarité

Les méthodes d'analyse quantitatives nécessitent un étalonnage, dont le but est de construire un modèle mathématique qui sert à prédire les concentrations d'analytes dans les échantillons. Le point de départ d'un étalonnage repose sur le choix d'un modèle mathématique correct. Dans la majorité des cas, les méthodes s'appuient sur des phénomènes physico-chimiques qui peuvent se ramener à un modèle linéaire, au moins pour une certaine gamme de concentration (Feinberg, 2001). Dans notre cas, pour valider la linéarité de la méthode, les coefficients de détermination des droites de régression des courbes d'étalonnage à 6 points devaient être significativement proches de 1 et les écarts entre les points expérimentaux et la droite de régression devaient être le plus faible possible (< 20 %).

1.2.1.6.2. Rendements d'extraction absolus

En plus des étalons deutérés, les matrices à extraire ont été dopées avant extraction (n = 5 pour chaque matrice étudiée à savoir les sédiments et les effluents) avec un mélange qui contenait les étalons des composés à étudier. Les matrices ont par la suite été extraites, selon les méthodes définies au préalable, pour calculer les rendements absolus des méthodes d'extraction. Ces rendements ont été calculés à partir d'une droite de calibration absolue (non corrigée par les étalons deutérés), établie dans un extrait de matrice qui n'a

pas été dopé avant extraction, pour prendre en compte les pertes de signal dues à l'extraction seule et non aux effets de matrice.

Les rendements d'extraction ont été déterminés à partir de l'équation suivante :

$$\text{Rendements d'extraction absolus} = \frac{\text{Concentrations absolues extraites}}{\text{Concentrations absolues dopées}}$$

1.2.1.6.3. Limites de quantification et de détection

Selon la norme (NF T90-210, 2009), la limite de détection est définie comme la « plus petite quantité ou concentration d'un analyte dans l'échantillon d'essai qui peut être distinguée de manière fiable du zéro ». La limite de quantification de la méthode est la « plus petite grandeur d'un analyte pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une exactitude définie ».

Les limites de détection (IDL) et de quantification (IQL) instrumentales ont été estimées à partir des rapports signal/bruit. Les IDL et IQL correspondent aux concentrations des analytes dans le vial d'injection pour lesquelles des rapports signal/bruit de 3 et 10 sont observés respectivement. Pour déterminer les IDL et IQL, des dilutions successives d'une solution étalon ont été injectées, et les rapports signal/bruit ont été déterminés pour chaque composé.

Les limites de détection (MDL) et de quantification (MQL) de la méthode correspondent aux concentrations des composés dans l'échantillon qui engendrent, après extraction, des rapports signal/bruit de 3 et 10 respectivement. Les MDL et MQL ont été déterminées à partir des équations suivantes :

$$MDL = \frac{IDL \times 100}{REA \times CF} \quad \text{Équation. 19}$$

$$MQL = \frac{IQL \times 100}{REA \times CF} \quad \text{Équation. 20}$$

Avec :

- MDL, la limite de détection de la méthode.
- MQL, la limite de quantification de la méthode.
- IDL, la limite de détection instrumentale.
- IQL, la limite de quantification instrumentale.
- REA, le rendement d'extraction absolu du composé.
- CF, le facteur de concentration de la méthode d'extraction.

1.2.1.6.4. Fidélité

Il s'agit de l'étroitesse d'accord entre des résultats de tests indépendants obtenus dans des conditions stipulées (définition de la décision 2002/657/CE et de la norme NF T90-210, 2009). L'injection successive d'une solution étalon en triplicats et le calcul du coefficient de variation associé a permis de déterminer la répétabilité des méthodes d'analyse. Pour déterminer la reproductibilité des méthodes, une solution étalon a été injectée en triplicats sur trois jours et le coefficient de variation des valeurs obtenues a été calculé.

1.2.2. Elucidation des mécanismes réactionnels de déchloration réductive des PPSP chlorés sélectionnés

L'étape qui suit les mesures d'occurrence a consisté à identifier les mécanismes réactionnels de déchloration des PPSP chlorés pour lesquels cette réaction a été mise en évidence sur le terrain. En effet, l'ampleur des variations isotopiques observées au cours de la réaction de dégradation d'une molécule est intimement liée au mécanisme réactionnel sous-jacent (Elsner, 2010). La connaissance des mécanismes de déchloration peut permettre de prédire et comprendre les fractionnements isotopiques du chlore mesurés *in situ*. De plus, il est important de vérifier au préalable que les molécules ne se dégradent pas selon plusieurs mécanismes réactionnels distincts pour pouvoir utiliser les variations isotopiques comme indicateur quantitatif de la biodégradation *in situ*. L'identification des mécanismes réactionnels de déchloration est donc nécessaire pour appliquer adéquatement l'outil isotopique du chlore à l'étude de la biodégradation des PPSP chlorés en aval des STEP.

Si les mécanismes de déchloration réductive et leur capacité à engendrer un fractionnement isotopique du chlore ont été largement décrits pour les solvants chlorés (Cretnik et al., 2013; Kuder et al., 2013), peu d'informations sont disponibles concernant les molécules aromatiques dont font partie les trois composés sélectionnés.

1.2.2.1. Etat des connaissances sur les mécanismes de déchloration réductive des molécules aromatiques chlorés

Les mécanismes réactionnels de déchloration réductive ont été peu étudiés pour les molécules aromatiques chlorés dont font partie de nombreux contaminants persistants. Cette voie de dégradation peut pourtant contribuer significativement à l'atténuation naturelle de ces composés dans l'environnement. Une étude bibliographique approfondie a permis d'identifier plusieurs mécanismes réactionnels potentiels qui sont présentés par la suite.

1.2.2.1.1. Substitution nucléophile en conditions anaérobies

Les bactéries anaérobies strictes sont soupçonnées de contribuer significativement à la déchloration réductive des composés aromatiques chlorés dans l'environnement, via le processus de respiration nommé halorespiration (Holliger et al., 1999). Cette hypothèse s'appuie sur l'identification, à plusieurs reprises, de souches bactériennes anaérobies capables de se développer en utilisant les composés aromatiques chlorés du milieu comme accepteurs d'électrons (Adrian et al., 2009; Bunge et al., 2003). Pour rappel, l'halorespiration est une voie métabolique présente chez certaines bactéries anaérobies. Ces bactéries utilisent les composés chlorés du milieu comme accepteurs d'électrons dans leur processus de respiration anaérobie ce qui provoque une déchloration réductive de ces composés. Cette réaction de déchloration exothermique libère de l'énergie, qui est alors utilisée par les microorganismes pour générer l'ATP (adénosine triphosphate) cellulaire nécessaire à leur fonctionnement (Adrian et al., 2000). L'étape de déchloration réductive est réalisée par des enzymes, nommées déhalogénases réductives, et des cofacteurs corrinnoïdes, dont le plus étudié est la cobalamine (Holscher et al., 2003).

La cobalamine, plus connue sous le nom de vitamine B12, possède une structure chimique proche de l'hème mais l'atome central de fer y est remplacé par un atome de cobalt (Figure 24).

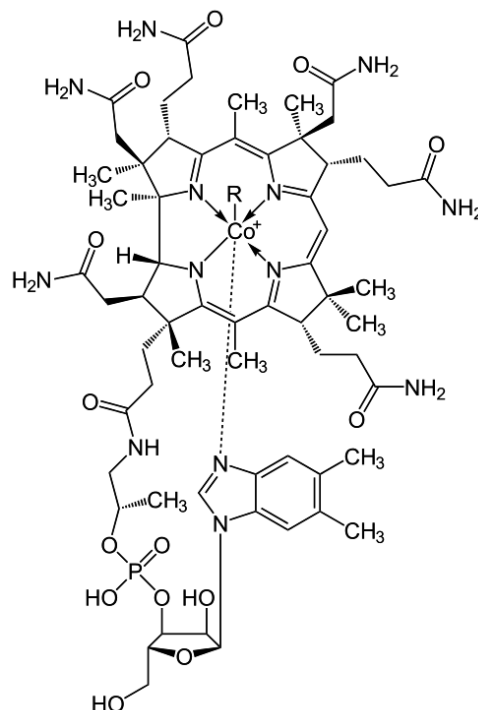
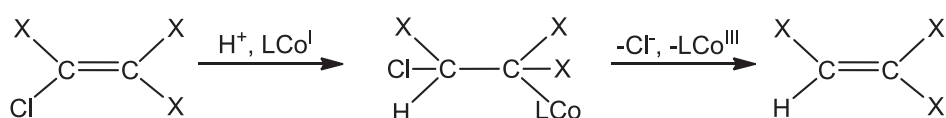


Figure 24. Structure chimique de la cobalamine.

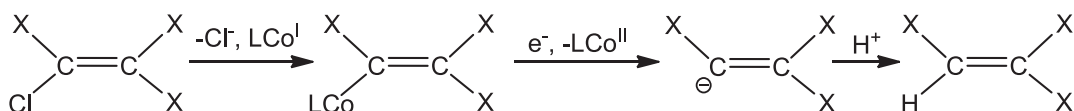
Le rôle de ce cofacteur dans le processus d'halorespiration a été maintes fois mis en évidence, notamment dans le cas des solvants chlorés. La cobalamine intervient ainsi dans les trois mécanismes de déchloration réductive identifiés pour les solvants chlorés qui sont les suivants (Figure 25) (Cretnik et al., 2013; Kliegman and McNeill, 2008; Kuder et al., 2013; Wiegert et al., 2013a) :

- Le chlore est éliminé via une addition nucléophile du cobalt de la cobalamine sous sa forme réduite (Co(I)) sur le carbone le plus électrophile de la molécule.
- Le chlore est substitué par le Co(I) via un mécanisme de substitution nucléophile.
- Un électron est transféré entre le Co(I) et le chlore ce qui engendre une rupture homolytique de la liaison C–Cl.

1) Addition nucléophile



2) Substitution nucléophile



3) Transfert d'électron

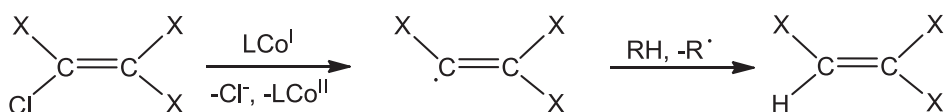


Figure 25. Mécanismes réactionnels de déchloration réductive anaérobies des solvants chlorés en présence de cobalamine (LCo) à savoir 1) une addition nucléophile, 2) une substitution nucléophile et 3) un transfert dissociatif d'électron (Kuder et al., 2013).

Concernant les composés aromatiques, les premières études réalisées sont plutôt en faveur d'un mécanisme de substitution nucléophile du chlore par le Co(I) pour expliquer la déchloration de ces molécules à travers le processus d'halorespiration (Smith, 1993) (Figure 26).

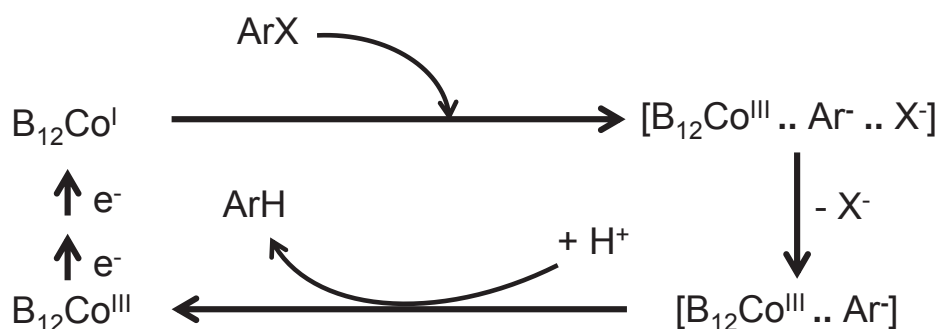


Figure 26. Mécanisme de substitution nucléophile proposé pour expliquer la déchloration réductive des chlorophénols (ArX) via le processus d'halorespiration en présence de cobalamine ($B_{12}Co$) (Smith, 1993).

Ces observations suggèrent qu'un fractionnement isotopique du chlore significatif pourrait être généré lors de la déchloration réductive des molécules aromatiques par les bactéries anaérobies. En effet, le mécanisme de substitution nucléophile est connu pour engendrer un fractionnement isotopique du chlore élevé étant donné qu'une liaison C–Cl est rompue durant l'étape cinétiquement limitante de la réaction. Ces premières études, issues de la littérature, nous confortent dans le fait d'utiliser les trois composés aromatiques sélectionnés pour étudier l'outil isotopique du chlore. Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires pour une meilleure compréhension des mécanismes de déchloration des aromatiques en conditions anaérobies en fonction des molécules considérées.

1.2.2.1.2. Addition nucléophile d'un hydrure en conditions anaérobies

Le transfert d'un hydrure peut également être à l'origine de la déhalogénéation réductive des composés aromatiques en conditions anaérobies (Sadowsky et al., 2014). Ce mécanisme de transfert d'hydrure a été décrit pour les chlorobenzènes récemment (Sadowsky et al., 2014). Lorsque l'halogène s'avère être un chlore, le transfert d'hydrure sur le cycle aromatique s'effectue préférentiellement via un mécanisme d'addition nucléophile et non via un mécanisme de substitution, en raison des énergies d'activation plus faibles observées dans le cas des mécanismes d'addition (Sadowsky et al., 2014). L'hydrure attaque préférentiellement les positions non substituées, adjacentes au maximum de sites substitués, car le complexe anionique généré est stabilisé par les effets inductifs attracteurs des chlores. Le complexe anionique formé peut alors subir une protonation au niveau de la position ortho de l'hydrure qui est chargée négativement. Cette protonation peut ensuite conduire à une déchloration via un processus d'élimination (Figure 27).

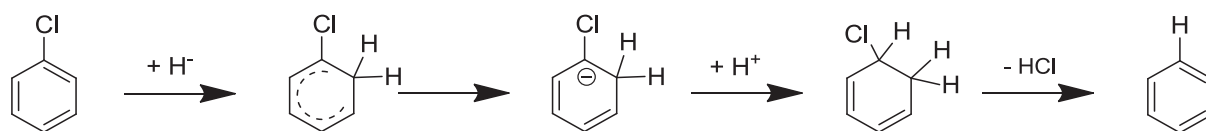


Figure 27. Mécanisme d'addition nucléophile d'un hydrure, décrit pour le chlorobenzène, qui conduit à une déchloration réductive de la molécule (Sadowsky et al., 2014).

L'hydrure est une espèce chimique qui est formé biologiquement dans les bactéries strictement anaérobies car sa production nécessite des potentiels redox faibles (Schwarzenbach et al., 2003). Ce mécanisme d'addition nucléophile d'hydrure ne peut ainsi être rencontré qu'en conditions anaérobies. Des effets isotopiques secondaires sont attendus via ce mécanisme.

1.2.2.1.3. Addition ou substitution nucléophiles en conditions aérobies

La déchloration réductive des composés aromatiques chlorés a longtemps été considérée comme étant un processus se déroulant en conditions strictement anaérobies. Cependant, l'existence d'une voie de déchloration alternative aérobie a été supposée, après la détection des métabolites déchlorés de molécules aromatiques au niveau de zones oxygénées (TP du TCS dans des cultures algales (Wang et al., 2013a), TP de polychlorobiphényles dans des sols oxygénés (Meggo et al., 2013), TP du TCC dans des sédiments oxygénés (Venkatesan et al., 2012)). Deux articles récents proposent des mécanismes pour expliquer la déchloration réductive des composés aromatiques en conditions aérobies, en utilisant le diclofénac et la dichloroaniline comme molécules modèles (Boerma et al., 2014; Zhang et al., 2011).

Ces deux mécanismes impliquent une activation préalable des molécules via l'arrachement d'un ou deux électrons. Par effet de résonance, les propriétés électrophiles d'un des carbones du cycle aromatique sont accentuées par cette étape. L'élimination du chlore lié à ce carbone électrophile est alors possible via un mécanisme de substitution nucléophile (Figure 28a) ou via un mécanisme d'addition nucléophile (Figure 28b).

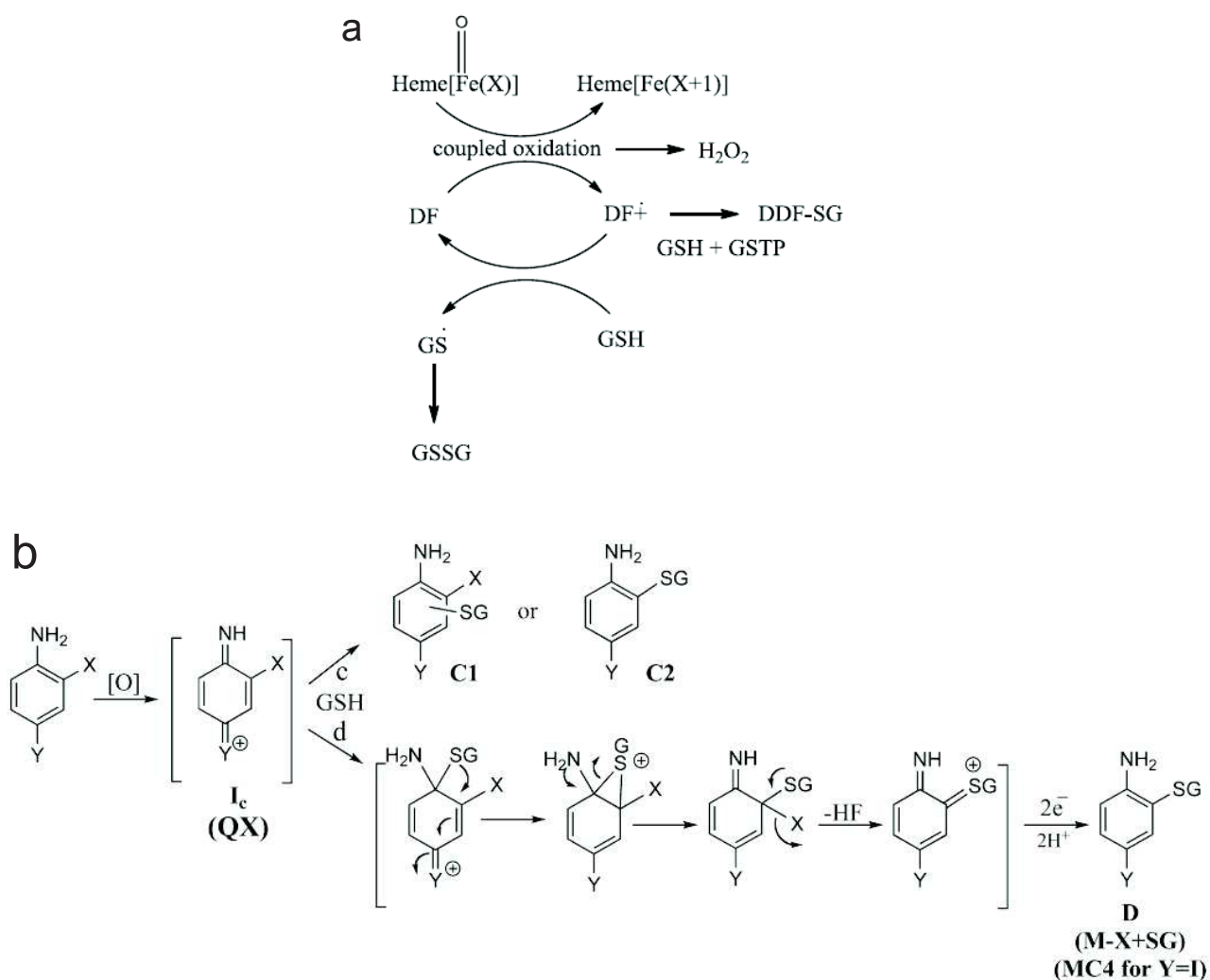


Figure 28. Mécanismes de déchloration réductive aérobie décrits dans la littérature pour a) le diclofénac (DF) qui se dégrade via un mécanisme de substitution nucléophile du chlore par le glutathion après arrachement d'un électron de la molécule (Boerma et al., 2014); b) la dichloroaniline qui se dégrade via un mécanisme d'addition nucléophile du glutathion en ipso suivi d'une élimination du chlore après arrachement initial de deux électrons (Zhang et al., 2011).

Des études supplémentaires sont nécessaires pour analyser si ces deux mécanismes proposés peuvent être extrapolés à d'autres molécules aromatiques. Le fractionnement isotopique du chlore généré par ces mécanismes aérobie n'a, à notre connaissance, jamais été étudié et est donc difficile à prévoir étant donné que l'étape limitante de la réaction n'est pas connue.

Les différents mécanismes présentés ci-dessus peuvent générer des fractionnements isotopiques du chlore très variés dans les molécules aromatiques. Le rôle important des bactéries anaérobies démontré pour de nombreux composés organiques suppose une déchloration des aromatiques principalement via un mécanisme de substitution nucléophile ce qui serait en faveur d'un fractionnement isotopique du chlore significatif. Cependant, des études mécanistiques approfondies sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

1.2.2.2. Mode opératoire appliqué pour étudier les mécanismes réactionnels

1.2.2.2.1. Identification du chlore partant dans les échantillons environnementaux

Pour déterminer les mécanismes réactionnels de déchloration d'une molécule, il faut tout d'abord identifier la(les) position(s) du(des) chlore(s) partant(s) lorsque la molécule contient plusieurs chlores. En effet, connaître le(les) groupe(s) partant(s) peut aider à l'élucidation des mécanismes réactionnels.

Concernant nos molécules étudiées, le diclofénac possède deux chlores, tous deux positionnés aux positions ortho d'un cycle aromatique symétrique. Par conséquent, les deux chlores possèdent les mêmes caractéristiques électrochimiques et seront donc éliminés sans distinction de position si le diclofénac subit une déchloration dans l'environnement.

Le TCC possède trois chlores, dont deux sont situés sur le même cycle aromatique en positions méta et para. Les études, qui ont observé une déchloration du TCC dans des sédiments, n'ont pas identifié la position moléculaire au niveau de laquelle le chlore s'élimine sur le cycle dichloré (Miller et al., 2008a; Venkatesan et al., 2012). Pour identifier le chlore partant dans le cas où la déchloration réductive du TCC est confirmée sur le terrain, il sera donc nécessaire de développer une méthode analytique qui permette la séparation des deux isomères potentiels du DCC, le 3,4'-DCC et le 4,4'-DCC (Figure 29), pour déterminer lequel des deux isomères se forme *in situ*.

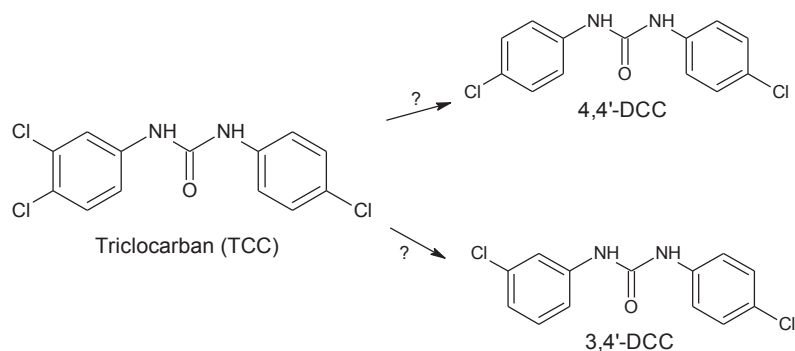


Figure 29. Déchloration réductive du TCC et formation possible de deux isomères de DCC, le 3,4'-DCC et le 4,4'-DCC.

Concernant le TCS, le chlore partant a été identifié dans des travaux qui ont observé une déchloration réductive de ce composé en présence d'une culture algale (Wang et al., 2013a). Il s'agit du chlore positionné sur le cycle phénolique. Dans le cas où une déchloration du TCS est détectée dans les sédiments, un travail analytique sera nécessaire pour vérifier si l'élimination du chlore est réalisée au niveau de la même position moléculaire que celle identifiée dans la littérature.

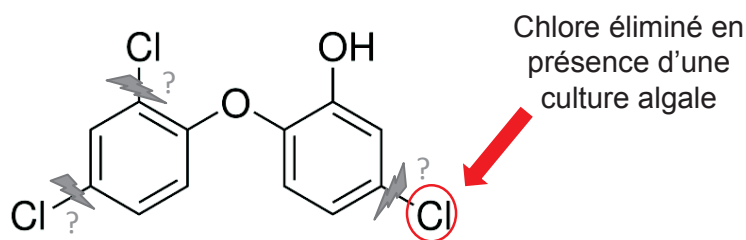


Figure 30. Positions moléculaires au niveau desquelles un chlore peut être éliminé lors de la déchloration du TCS.

1.2.2.2.2. Analyse des mécanismes réactionnels en conditions contrôlées

Une fois la position du chlore partant déterminée, des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier le mécanisme réactionnel responsable de la perte de ce chlore spécifique.

Etudier les mécanismes réactionnels de dégradation sur le terrain se révèle très difficile étant donné la complexité des matrices environnementales dans lesquelles coexistent un grand nombre de microorganismes divers et de réactions de dégradation. Ainsi, des systèmes enzymatiques ou chimiques, qui permettent de mimer les réactions microbiennes en conditions contrôlées, sont de plus en plus utilisés dans les études mécanistiques. Pour

étudier la déchloration réductive microbienne en conditions anaérobies, la cobalamine a ainsi été utilisée dans de nombreuses études (Board et al., 1991; Cretnik et al., 2013; Kliegman and McNeill, 2008; Motwani et al., 2011; Smith and Woods, 1994). Une étude récente portant sur la déchloration du trichloréthylène (TCE) a permis de démontrer que la dégradation du TCE par des cultures microbiennes anaérobies strictes conduit aux mêmes fractionnements isotopiques du carbone et du chlore que lorsque le TCE est dégradé par la cobalamine seule (Cretnik et al., 2013). Ces observations permettent de confirmer que la déchloration du TCE par la cobalamine seule implique les mêmes mécanismes réactionnels que lorsque les souches microbiennes sont utilisées. Dans le cas des mécanismes de transfert d'hydrure en conditions anaérobies, des systèmes abiotiques peuvent être utilisés pour générer les hydrures (Scrivanti et al., 1998). La déchloration réductive microbienne en conditions aérobies peut être, elle, étudiée à l'aide du système enzymatique qui a permis d'observer une déchloration réductive du DCF (Boerma et al., 2014). Ce système enzymatique implique l'utilisation d'enzymes naturellement présentes dans l'environnement telles que la peroxydase de Raifort, pour réaliser l'arrachement d'électrons, et la glutathion-S-transférase, pour réaliser l'addition ou la substitution nucléophile.

En conclusion, les mécanismes réactionnels des trois PPSP modèles ont été étudiés en conditions contrôlées à l'aide des systèmes chimiques et enzymatiques biomimétiques décrits dans la littérature. Pour être valable, les mécanismes de déchloration réductive proposés, à l'aide des études en laboratoire, doivent :

- Pouvoir expliquer la déchloration des molécules au niveau des positions des chlores partants préalablement identifiées sur le terrain.
- Être cohérents avec les règles de la chimie organique.

1.2.3. Mesure du fractionnement isotopique du chlore lors de la déchloration réductive des PPSP étudiés et application de l'équation de Rayleigh en conditions contrôlées

Pour mesurer le fractionnement isotopique du chlore engendré par la déchloration des PPSP chlorés, une cinétique de biodégradation a été établie en laboratoire à l'aide des systèmes biomimétiques et les concentrations des molécules mères résiduelles ainsi que leur composition isotopique en chlore ont été mesurées au cours de la cinétique de biodégradation.

La composition isotopique du chlore des molécules d'étude avant et après déchloration a été mesurée en appliquant la méthode analytique GC-MS définie par (Aeppli et al., 2010).

Par la suite, la Figure 31 suivante, qui illustre la relation de Rayleigh, a été tracée pour mesurer les facteurs d'enrichissement isotopiques du chlore.

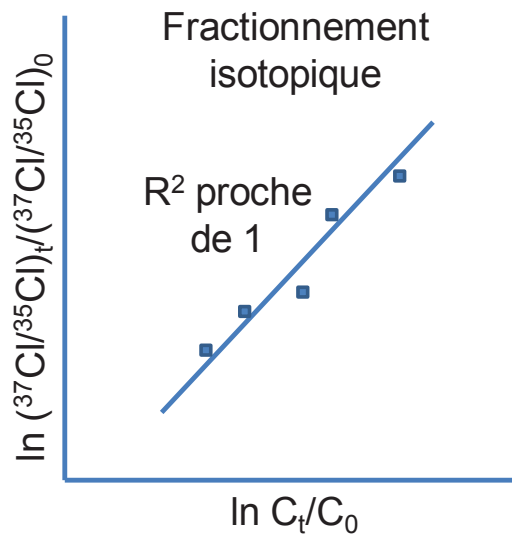


Figure 31. Schéma qui illustre la relation de Rayleigh appliquée au fractionnement isotopique du chlore.

Si l'ensemble des étapes énoncées sont respectées et validées, le fractionnement isotopique du chlore peut alors être appliqué *in situ* en aval des STEP comme vérifier si cet outil peut constituer un indicateur quantitatif de biodégradation des PPSP chlorés à l'état de traces.

2. Evaluation du fractionnement isotopique du chlore à l'aide du triclocarban (TCC)

2.1. Publication n°1 : Déchloration réductive du triclocarban dans les sédiments en aval de STEP

La première étape a consisté à vérifier si le triclocarban (TCC) subit une réaction de déchloration réductive dans l'environnement. Pour ce faire, une méthode de quantification du TCC et de ses métabolites déchlorés dans des sédiments a été développée et validée. Le métabolite chloré du TCC, le tétrachlorocarban, a également été inclus dans la méthode pour analyser si une chloration du TCC a lieu dans l'environnement. La méthode optimisée comprend une phase d'extraction accélérée par solvant des sédiments, puis une phase d'analyse des composés ciblés par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse à haute résolution. Le rendement d'extraction moyen obtenu pour l'ensemble des composés étudiés est de 89 ± 6 %. Les limites de détection de la méthode sont comprises entre 0,01 et 0,12 ng/g : la méthode est donc adaptée à la quantification des composés à l'état de traces sur le terrain.

Des mesures d'occurrence ont ensuite été réalisées à deux périodes différentes dans des sédiments prélevés en aval de trois STEP. Le TCC a été détecté dans l'ensemble des échantillons analysés à des concentrations comprises entre 1 et 500 ng/g. Le dichlorocarbanilide (DCC) a également été identifié dans l'ensemble des sédiments. Ce composé provient spécifiquement de la déchloration du TCC mais est également présent comme impureté dans le produit commercial du TCC, à un ratio TCC/DCC de 495/1. Les ratios TCC/DCC mesurés dans les sédiments varient entre 1,3/1 et 66/1. La déviation significative du ratio 495/1 dans l'environnement est la preuve que le TCC subit une déchloration réductive. Le monochlorocarbanilide (MCC) a été recherché par masse exacte mais n'a été identifié dans aucun des échantillons. La transformation du DCC en MCC constitue probablement l'étape limitante dans la déchloration réductive du TCC. La quantification d'un des isomères du tétrachlorocarban à de très faibles concentrations dans les sédiments a été expliquée par sa présence comme impureté dans le produit commercial de TCC.

Ces résultats sont présentés dans l'article intitulé *Screening triclocarban and its transformation products in river sediment using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry* publié en 2015 dans la revue *Science of the Total Environment*.

Publication n°1 :
Screening triclocarban and its transformation products in river sediment using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry

Marine Souchier^{a,b}, Dalel Benali-Raclot^b, David Benanou^b, Véronique Boireau^b, Elena Gomez^a, Claude Casellas^a and Serge Chiron^{*a}

^aUMR HydroSciences 5569, Montpellier Université, 15 Avenue Ch. Flahault, 34093 Montpellier cedex 5, France.

^bVeolia Recherche et Innovation, 36, Avenue Kleber, 75116 Paris 16^{ème} arrondissement, France.

*Corresponding author :

E-mail : Serge.Chiron@msem.univ-montp2.fr.

Tel : 33 (0)4 11 75 94 15; Fax : 33 (0)4 11 75 94

Abstract

An analytical method was developed and validated for the target screening of triclosan (TCS), triclocarban (TCC) and its lesser and higher chlorinated congeners namely, 4,4'-dichlorocarbanilide (DCC) 3,3',4,4'-tetrachlorocarbanilide (3-CI-TCC) and 2,3',4,4'-tetrachlorocarbanilide (2-CI-TCC) in river sediment. Sediment samples were extracted by pressurized liquid extraction and quantification and identification of target compounds were carried by liquid chromatography high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). The overall method recoveries were 89% with relative standard deviations below 6%. Method detection limits ranged from 0.01 to 0.12 ng/g. The usefulness of the method was demonstrated on sediment samples collected downstream of three wastewater treatment plants in an attempt to provide with a set of occurrence data of these biocides in France and for a better understanding of their fate in river. Major results are the following : TCC, DCC and 3-CI-TCC were ubiquitously detected demonstrating that these emerging contaminants have been probably overlooked in France. Reductive dechlorination of TCC into DCC was also ubiquitous but predominated in anoxic sediment. 3-CI-TCC is probably more persistent than TCC and LC-HRMS enabled the detection and identification of a suite of other chlorinated biocides in river sediment.

Keywords : Triclocarban; sediment; reductive dechlorination; tetrachlorocarbanilides; high resolution mass spectrometry.

I. Introduction

Triclocarban (TCC) is a polychlorinated high-production volume antimicrobial substance still in use. Even though TCC has probably more limited applications than triclosan (TCS), mostly as an additive to antimicrobial soap, cosmetics and other personal care products at levels of 0.2–1.5% (w/w), co-occurrence of TCC and TCS residues in water resource can be easily understood from their similar usage and chemical structure and due to their incomplete removal in biological wastewater treatment plants (WWTPs). TCC is actually one of the most frequently detected emergent contaminant at the ng- μ g range in water resources (Carmona et al., 2014; Gautam et al., 2014; Halden and Paull, 2005; Sapkota et al., 2007; Zhao et al., 2010), sludges (Chu and Metcalfe, 2007; Heidler et al., 2006; Lozano et al., 2013), biosolids-amended soils (Cha and Cupples, 2009; Ying et al., 2007) and in river sediments (Venkatesan et al., 2012; Wang et al., 2014) or in estuarine sediment (Miller et al., 2008) especially in the US or in China where it ranks in the list of top contaminants of concern (Halden and Paull, 2005; Zhao et al., 2010). Indeed, bioaccumulation in biota (Coogan and La Point, 2008; Higgins and Paesani, 2009; Higgins et al., 2011) together with its potential adverse effects in wildlife have been recently highlighted (Chen et al., 2008; Sood et al., 2013; Yueh et al., 2012).

In WWTPs, TCC biodegradation is believed to be minimal and elimination mainly due to accumulation in sewage sludge prevails (Heidler et al., 2006; Lozano et al., 2013). However, under anaerobic and reducing conditions, dechlorination process was evidenced and was supposed to be operated through the activity of exclusively anaerobic dechlorinating microorganisms leading to the formation of transformation products (TPs), namely dichlorocarbanilide (DCC), monochlorocarbanilide (MCC) and carbanilide (NCC) (Chiaia-Hernandez et al., 2013a; Higgins and Paesani, 2009; Miller et al., 2010, 2008; Venkatesan et al., 2012). DCC is also a manufacturing by-product together with 3,4,3',4'-tetrachlorocarbanilide (3-Cl-TCC) at levels of about 0.2% by weight in technical grade TCC (Sapkota et al., 2007). If these impurities are not eliminated during wastewater treatment, they may also contribute to the levels of contamination found in environment (Sapkota et al., 2007). Environmental fate and toxicity of TPs of TCC remain mostly unknown. Consequently, warning exists concerning TCC and this situation has drawn an increased scrutiny by US EPA and TCC regulating in the US is currently questioned (EPA, 2002; Halden, 2014). In contrast, in EU and more particularly in France, the issue of TCC in water cycle has been probably overlooked until now because this compound is scarcely monitored since it is not included in priority monitoring list for water quality control.

Consequently, the major contribution of this work is : 1) To develop and validate an analytical method for the screening of TCC and its TPs in river sediment and 2) To provide a first record of sediment contamination levels collected downstream of domestic WWTP outlet in France and to discuss it with respect to TCS contamination levels and situations in other countries. River sediment compartment has been selected in this study for monitoring purposes because TCC and its TPs tend to sorb and accumulate in sediment due to high octanol water coefficient values ($\log K_{ow}$) (calculated using $K_{ow}WIN$) of 4.3, 4.9, 5.6 and low water solubilities of 3.7, 0.65 and 0.11 mg/L (calculated using Solaris V4.67) for DCC, TCC and 3-Cl-TCC, respectively (Gautam et al., 2014; Miller et al., 2008; Venkatesan et al., 2012). In addition, for these persistent hydrophobic organic contaminants which rapidly sorb to sediment and suspended particles, river sediments are excellent archives of environmental contaminants since sediment can act as integrators of many inputs within rivers. This represents a relevant advantage compared to water analysis. TCC and its TPs have then been already detected in lake sediment and estuarine sediment at concentration levels in the ng- μ g/g dry weight (dw) range (Chiaia-Hernandez et al., 2013b; Miller et al., 2008; Venkatesan et al., 2012). However, their investigation in river sediments is rather scarce and river sediment is probably an under-investigated compartment.

Since TCC is not amenable by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) techniques even with a derivatization step (Bisceglia et al., 2010), liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) in association with an extraction step employing either an ultrasonic extraction, a pressurized liquid extraction (PLE) or a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) extraction together with a clean-up including either solid phase extraction or a dispersive solid-phase extraction (dSPE) method has turned out to be the most reliable techniques for TCC and its TP detection at trace levels in environmental samples. Until now, triple quadrupole tandem mass spectrometry with an electrospray interface in the negative ionization mode has been mostly used because of its high selectivity in the Selected Reaction Monitoring (SRM) mode of detection allowing limits of detection down to 0.01 ng/g dw in sediment (Cha and Cupples, 2009; Higgins et al., 2011; Pycke et al., 2014a; Sapkota et al., 2007; Zhao et al., 2010). The use of high resolution Orbitrap mass spectrometry in our study has been selected because it allows for studying parent compounds and TPs with and without reference standards based on accurate mass and fragmentation patterns (e.g.; MCC which is not commercially available). The most common HRMS instruments have resolving power in the 20,000–100,000 range with a high mass accuracy (< 5 ppm) and still a sensitivity down to the picogram range in the full scan mode of detection. This increase in selectivity allows for a reliable screening of molecular ions and their MS/MS fragments against a complex matrix background such as in sediment.

II. Material and methods

II.1. Chemicals and reagents

Standards of triclosan (TCS, $\geq 97\%$), triclocarban (TCC, 99%); 3,3',4,4'-tetrachlorocarbanilide (3-Cl-TCC); 2,3',4,4'-tetrachlorocarbanilide (2-Cl-TCC) and carbanilide (NCC, 98%) were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). 4,4'-dichlorocarbanilide (4,4'-DCC) was purchased from Apollo (Manchester, UK). Deuterated TCC (TCC-d₄, 99%) and deuterated TCS (TCS-d₃, 98.5%) were from CDN Isotopes (Quebec, Canada). Fontainebleau sand was purchased from Prolabo (Paris, France). HPLC grade methanol and pesticide analytical grade methanol and acetone were obtained from Carlo Erba (Val De Reuil, France). All chemicals were used as received without further purification. All aqueous solutions were prepared with UHQ milliQ water (Millipore, Bedford, USA).

II.2. Study area

Sediment grab samples were collected twice in summer and fall 2013 from the upper 10 cm layer of the bed sediment at 3 sites (Sed1, Sed2 and Sed3) within 100 m downstream from three WWTPs (WWTP1, WWTP2 and WWTP3) located in France. All these biological WWTPs included nitrogen and phosphorus removal steps. In addition, WWTP3 was equipped with a membrane bioreactor. Characteristics and operating conditions of the WWTPs are provided as Supplementary Material (Table SA1). Sed2 and Sed3 were collected in small streams with a flow rate of $< 1\text{--}5\text{ m}^3/\text{s}$ and Sed1 was sampled in a 2 m deep shipping channel. In this latter case, core sediment was extracted with free fall gravity corer while in the first case sediments were collected with a shovel. Site characteristics and other physicochemical properties (pH, temperature, dissolved oxygen) at the time of sampling are provided in Table SA2. Sediments were stored in the dark at -20°C before extraction. The organic matter rate in sediments was measured after calcination of dried sediment at 550°C in a furnace during 4 h, in accordance with the "NF EN 12879 Standard dated May 1997".

II.3. Sample preparation and extraction

Sed1, Sed2 and Sed3, were freeze-dried, gently disaggregated, and sieved to a particle size $< 2\text{ mm}$. TCC-d₄ and TCS-d₃ surrogates (10 ng/g) were added to the dried sediments. 5 g of sediment was mixed with 25 g of Fontainebleau sand to increase solvent channeling and placed into 34 mL stainless steel extraction cells equipped with glass fiber filters. The prepared cells were extracted by pressurized liquid extraction (PLE) using an ASE 350

system (Dionex, Sunnyvale, USA). The same operating conditions than those used by Wu et al., 2009a to extract TCC and TCS from soil samples were applied : preheat, 0 min; static, 5 min; flush, 60%; cycles, 2; purge, 120 s; oven temperature, 80°C; and pressure, 1500 psi. Several solvents, employed in the literature for extraction of TCC from sediments or soils, were evaluated using PLE including extraction with 100% methanol (Wu et al., 2009b), 30:70 acetone/ethyl acetate (Chiaia-Hernandez et al., 2013b) and 50:50 acetone/methanol (Miller et al., 2008). Finally, a mix of 50:50 methanol/acetone allowed for the best recoveries and was then selected (data not shown).

After extraction, a purification step is usually performed using solid phase extraction procedure (Chu and Metcalfe, 2007; Lozano et al., 2013) or more recently using a dispersive solid-phase extraction (dSPE) (Chiaia-Hernandez et al., 2013b). The dSPE method was tested. Briefly, the dried extract was resuspended in acetonitrile and water followed by the addition of ammonium chloride and magnesium sulfate to promote partitioning of less polar compounds into the acetonitrile phase. However, this step was not found fully necessary to be included in the analytical protocol for the removal of the matrix from the sediment extracts since signal responses were not significantly improved (Fig. SA1). This is probably due to the high selectivity provided by HRMS detector which prevented interferences with other molecules contained in sediment matrices. The final step only included evaporation to dryness of the extracts using a rotary evaporator system. Extracts were then dissolved in 1 mL of 60:40 (v/v) mixture of methanol/water and transferred to 2 mL autosampler vials for analysis.

For Sed3 analysis, TCS and TCC were present at levels which induced saturation of the detector. Consequently, a specific diluted method was optimized to allow their quantification. Briefly, only 0.1 g of sediment was extracted instead of the 5 g. Then, extracts were resuspended in 5 mL of 60:40 mixture of methanol/water instead of 1 mL.

II.4. Chromatographic and analytical conditions

Analyses were run on a liquid chromatography tandem with an Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA). The molecules were separated on a Xterra C₁₈ analytical column (150 mm x 2.1 mm i.d. x 3.5 µm particle size). A sample volume of 10 µL was injected using an autosampler. Separation was performed at 25°C with a binary mixture of water (A) and methanol (B) as mobile phase at a flow rate of 0.3 mL/min. The elution gradient was as follows : initial mixture of 40% A and 60% B, to 100% B in 8 min and

held at 100% B for 7 min to clean the column and avoid carry over, then back to 60% in 0.1 min and held for 10 min for equilibration.

Analytes were introduced into the Exactive mass spectrometer using an electrospray source operating in negative mode of ionization. The electrospray, capillary and skimmer voltages were set at -4 kV, -18 V and -65 V, respectively and the capillary temperature at 275°C. Tube lens voltage was set at -90 V. The sheath and auxiliary N₂ gas flow rates were set at 35 and 10 arbitrary units. Data were acquired in full scan mode from 150 to 370 m/z with a nominal resolving power of 50,000 and an automatic gain control of 5×10^5 by continuously alternating two scan events : one without and one with fragmentation into the Higher-Energy Collisional dissociation (HCD) cell. Fragmentation was obtained by applying a voltage of 70 eV to the HCD cell.

II.5.Method validation

Only Sed1 and Sed2 were used for method validation. Quantification of analytes was carried out using a 6 points matrix-matched calibration curve with concentrations ranging from 0.2 ng to 20 ng/g. The matrix-matched calibration curve was prepared by spiking an aliquot of the non-spiked sediment extracts (Sed1 and Sed2) with the desired amounts of standard solutions and with constant concentration of deuterated surrogates (10 ng/g). The relative calibration curves were obtained by calculating the ratios between the peak area of each substance and the peak area of the surrogates. As no deuterated surrogates were available for TPs of TCC, TCC-d₄ was used as the surrogate of all carbanilides and TCS-d₃ was used as the surrogate of TCS.

Linearity was evaluated using determination coefficient (R^2) of the slopes of the relative matrix-matched calibration curves in the studied range. Satisfactory correction of matrix effects for TPs using TCC-d₄ was checked by comparing slopes of the relative calibration curves between Sed1 and Sed2.

In addition to deuterated surrogates, sediments were spiked before extraction with a methanolic stock solution containing a standard mixture of the studied compounds at two concentration levels (5 and 20 ng/g) and were extracted according to the method described above to calculate the absolute and relative recoveries. The spiking procedure consisted of adding 50 µL of the standard mixture at the top of the extraction cells in hood. Then, sediments were thoroughly stirred and left in the hood until complete evaporation of the solvent (around 1 h). Standard addition was done in two different sediments (n = 3 for each sediment) with the aim to assess the impact of the variability of the matrix on the results and

to check the ability of TCC-d₄ to correct for extraction losses of the TPs whatever the studied matrix. Absolute recoveries were measured to provide information on the extraction method efficiency and to calculate method limit of detection and quantification. The absolute recovered concentrations of the spiked samples were determined using the absolute matrix-matched calibration curve spiked after extraction. Recoveries were measured by using contaminated sediments because analyte free sample was not found downstream of WWTPs so native concentrations measured from unspiked samples were subtracting out. Absolute recoveries were calculated using Eq. A1.

$$\text{Absolute recovery rate} = \frac{\text{Absolute recovered concentration} - \text{Absolute native concentration}}{\text{Spiked concentration}} \times 100 \text{ Eq. A1}$$

Relative recoveries were also measured because they were necessary for quantification of TPs as no deuterated surrogates were available for these molecules. For calculation of the relative recoveries, the results were corrected with the recovery of the spiked surrogate standard. Then, the ability of TCC-d₄ to correct for extraction losses was checked by comparing the relative recoveries calculated for TPs between the 2 sediments.

The sensitivity of the method was calculated in terms of the limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD), which corresponded to the minimum concentration of analyte that generated a signal-to-noise (S/N) ratio of 10 and 3, respectively, from signal obtained to matrix-matched calibration curves. Method detection limits (MDL) and method quantification limits (MQL) for sediments were calculated using Eqs. A2 and A3.

$$MDL = \frac{LOD}{ARR} \text{ Eq. A2}$$

$$MQL = \frac{LOQ}{ARR} \text{ Eq. A3}$$

MDL : method detection limit; *MQL* : method quantification limit; *LOD* : limit of detection; *LOQ* : limit of quantification; *ARR* : absolute recovery rate.

Repeatability of the instrumental method was determined using standard solutions (10 and 100 µg/L). These were injected in triplicate each day over a three-day period. Intra- and inter-day repeatability were evaluated as the relative standard deviation (RSD) of replicate measurements. Calibration curves were run at the beginning of the batch of 15 samples. Blank samples were run randomly with each sequence in order to check for carry over in the injector which was cleaned with isopropanol. One quality control (QC) was injected every 10 samples and deviations of the quality control standard by more than 10% were rejected and samples were re-analyzed. Data analysis was done by Xcalibur software using Qual Browser for compound identification.

III. Results and discussion

III.1. Analytical method development and performances

The developed liquid chromatography method allowed for a resolution of nearly all targeted compounds including the two tetrachlorocarbanilide isomers ($R_s = 2.6$) in less than 10 min. 2-Cl-TCC was included in this study because it is also a manufacturing by-product of TCC (see Fig. SA2) and because this compound might be generated upon chlorination processes. Previous studies dealing with TCC and its TPs in sediments relied on selected reaction monitoring (SRM) using triple quadrupole analyzer at unit mass resolution by monitoring only one transition ion (Venkatesan et al., 2012). However, recent studies (Hernández et al., 2012) have shown that this situation might result in false positive identifications for individual compound and at least two transition ions are then normally required. In addition, for TCS, the situation is even worse because an unspecific SRM transition ion at m/z 35 has been usually recorded (Venkatesan et al., 2012). HRMS instrument offered a better confirmation of targeted compounds and Table A1 reports the different criteria used for their detection. These criteria included 1) retention time (RT) with an allowed window of ± 0.5 min; 2) an exact mass acquisition with a precision below 6 ppm in routine analysis and 3) a prominent isotope pattern which can be compared to theoretical isotope profile, due to chlorine atoms, facilitating confirmation. Fragment ions generated by the HCD cell could not be used as a criterion of identification because those fragment ions might not arise specifically from the targeted parent compounds and were not detected at low concentrations. MS/MS ions were only used as an additional proof of confirmation. For quantification purposes, parent ions corresponding to pseudo molecular $[M-H]^-$ ions were used and quantification was carried out by isotope dilution using stable isotope of TCS and TCC as internal standards.

Table A1. Details for detection and quantification of targeted analytes using LC-HRMS.

Analyte	Formula [M-H] ⁻	RT \pm 0.5 (min)	Theoretical mass [M-H] ⁻	Experimental mass [M-H] ⁻	Mass error Δ ppm	MS/MS ion mass
TCS	C ₁₂ H ₆ Cl ₃ O ₂	7.4	286.9428	286.9445	5.8	none
NCC	C ₁₃ H ₁₁ N ₂ O	3.5	211.0866	211.0870	1.9	92.0488
DCC	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ N ₂ O	6.3	279.0086	279.0102	5.4	126.0998
TCC	C ₁₃ H ₈ Cl ₃ N ₂ O	7.4	312.9697	312.9715	5.7	159.9719
TCS-d ₃	C ₁₂ H ₃ D ₃ Cl ₃ O ₂	7.4	289.9616	289.9632	5.5	none
TCC-d ₄	C ₁₃ H ₄ D ₄ Cl ₃ N ₂	7.4	316.9948	316.9962	4.6	159.9719
2-Cl-TCC	C ₁₃ H ₇ Cl ₄ N ₂ O	8.4	348.9307	348.9324	5.0	159.9719
3-Cl-TCC	C ₁₃ H ₇ Cl ₄ N ₂ O	8.8	348.9307	348.9327	5.7	159.9719

Method validation was undertaken. The slopes of relative calibration curves obtained by spiking TCC-d₄ and TCC-d₃ after extraction in two different sediment extracts are reported in Table SA3. As expected, TCC-d₄ and TCS-d₃ allowed for satisfactory corrections of matrix effects of TCC and TCS with reported RSD between slopes of calibration curves below 10%. Surprisingly, DCC, NCC, 2-Cl-TCC and 3-Cl-TCC could be also quantified by using TCC-d₄ as internal standard since RSD values between slopes of calibration curves were also below 15%. This point is relevant because it has not been investigated in previous studies (Miller et al., 2008) and can otherwise lead to dramatic errors. Only one reference calibration curve was used thereafter for recovery and concentration determination in sediment samples. The calibration curve prepared in Sed1 extract was selected because this matrix contained the lowest amounts of targeted compounds preventing from interferences with other molecules.

Relative recoveries were determined using two different sediments and two different spiking levels, 5 and 20 ng/g of each targeted analyte. These concentration levels were selected because they are probably very close to environmental concentrations. Table A2 summarizes the results of the method performance with their corresponding average method recoveries and their minimum and maximum values.

Table A2. Relative recoveries (%) and limits of detection (MDL) and quantification (MQL) using two different sediments (Sed1 and Sed2) spiked at two different concentration levels (5 and 20 ng/g).

Analytes	Relative recoveries (mean ± % RSD, n = 3)				Method parameters			
	Sed1		Sed2		MDL (ng/g)		MQL (ng/g)	
	5 ng/g	20 ng/g	5 ng/g	20 ng/g	Sed1	Sed2	Sed1	Sed2
TCC	119 ± 1	116 ± 2	119 ± 2	114 ± 1	0.01	0.03	0.03	0.09
DCC	116 ± 10	132 ± 7	123 ± 3	120 ± 6	0.01	0.03	0.05	0.11
3-Cl-TCC	60 ± 2	58 ± 3	28 ± 2	24 ± 3	0.01	0.07	0.04	0.22
2-Cl-TCC	56 ± 4	59 ± 6	40 ± 10	40 ± 1	0.01	0.08	0.04	0.26
TCS	115 ± 2	116 ± 1	116 ± 14	106 ± 10	0.04	0.12	0.12	0.41

NCC was not extracted from Sed1 and Sed2 so this molecule was not quantified thereafter. Except this molecule, the overall average method recovery was 89% with the lowest and highest values of 24% and 124%, respectively. The worst results were obtained with the most hydrophobic compounds (2-Cl-TCC and 3-Cl-TCC) probably due a stronger sorption of

these compounds to the organic rich matrices. The overall method precision indicated by % RSD was good and ranged from 1 to 14% with an average value of 6%. The recoveries and precision of the method are consistent with the analysis of different organic contaminants in sediments using different extraction procedures. For instance, (Chiaia-Hernandez et al., 2013b) found an average method recovery of 103% with the highest and lowest value of 139% and 57% for a wide set of polar and non polar emergent contaminants. Löffler and Ternes (2003) reported recoveries between 38% and 152% using ultrasonic extraction for a wide range of pharmaceuticals. The increase in selectivity using HRMS, due to higher resolving power, allowed in our case for a reliable screening of molecular ions against complex matrix background without the need for time consuming clean-up steps; steps remaining even so necessary for routine analysis which include study of a large number of complex matrices. For instance, Fig. SA2 shows a comparison between Extracted Ion Chromatogram (EIC) for DCC and TCC obtained with and without a clean-up procedure. The dSPE clean-up procedure did not provide a better detection and quantification of these targeted compounds in spiked sediment at 10 ng/g level. This gain in selectivity cannot be obtained at the expense of sensitivity and a trade-off between sensitivity and selectivity was obtained with a resolving power of 50,000. No concentration dependence was observed as recoveries were not significantly different within the same sediment matrix for the two spiked concentrations (RSD < 6%). Moreover, no matrix dependence was observed for TCC, TCS and DCC (RSD of the recoveries between the two sediment < 5%) indicating that deuterated surrogates allowed for satisfactory correction of extraction losses for these molecules whatever the sediment characteristics. However, relative recoveries of 2 and 3-Cl-TCC varied significantly (RSD > 30%) between the 2 studied sediments so for a proper quantification of TPs in sediments, we applied the relative recovery calculated for each studied sediment matrix to correct for extraction losses according to Eq. A4 :

$$SC (ng/g) = \frac{VC (\mu g/L)}{RRR \times CF} \text{ Eq. A4}$$

With SC standing for sediment concentration (ng/g); VC, vial concentration (μ g/L); RRR, relative recovery rate and CF, concentration factor.

Reported limits of detection (LOD) ranged from 0.01 to 0.1 ng/g and limits of quantification (LOQ) ranged from 0.02 to 0.33 ng/g for all compounds (data not shown). Limits of detection (MDL) and limits of quantification (MQL) were then deduced from LOD and LOQ and absolute recoveries (Table SA4). MDL (see Table A2) ranged from 0.01 to 0.12 ng/g and MQL from 0.03 to 0.41 ng/g, according to the compound. In spite of a high resolving power of 50,000 with high mass precision (\pm 6 ppm in routine analysis), HRMS has still a sensitivity down to the nanogram in full scan mode. The MDL obtained in this study are somewhat

higher than those obtained with a triple quadrupole instrument (0.003, 0.22 and 0.01 ng/g for TCC, TCS, DCC, respectively, (Venkatesan et al., 2012)) but still allowing for reliable quantification of targeted compounds in sediments which are usually found at a few ng/g concentration levels (see the following section) but with a higher confidence rate in compound confirmation at trace levels.

Finally, the method provided linearity over at least two orders of magnitude starting from LOQ. Both intra- and inter-day instrumental precisions were on average less than 5% (Table SA5) indicating good overall precision.

III.2. Screening for TCC and its transformation products in real sediment samples

The usefulness of the developed analytical method was demonstrated by screening TCS and TCC together with its TPs in sediments collected downstream of WWTPs outlet. Results for targeted compounds screening are reported in Table A3 and Fig. A1 shows an example of LC-MS chromatograms corresponding to the analysis of Sed1 extract.

Table A3. Organic matter content (%) and average concentrations (n = 3) of TCS, TCC and its transformation products in three different sediments (Sed1, Sed2 and Sed3).

	Sed1		Sed2		Sed3	
Organic matter content (%)	4.55 ± 0.04		6.46 ± 0.06		7.40 ± 0.03	
Analytes	Concentrations (ng/g)					
	Summer	Fall	Summer	Fall	Summer	Fall
TCC	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.02	8.4 ± 0.3	12.9 ± 0.3	492 ± 11	158 ± 7
DCC	0.13 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.19 ± 0.01	14.3 ± 1.1	14.1 ± 1.5
3-CI-TCC	0.04 ± 0.001	0.06 ± 0.004	< MDL	< MDL	19.2 ± 2.8	7.1 ± 1.0
2-CI-TCC	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL
TCS	0.31 ± 0.03	0.45 ± 0.04	9.4 ± 0.2	23.3 ± 0.5	65.1 ± 1.4	57.2 ± 3.7

TCC and TCS were quantified in all studied sediments samples at concentration levels in the 1–500 ng/g and 1–65 ng/g range, respectively. These concentrations are similar than those reported in previous studies (Miller et al., 2008; Venkatesan et al., 2012), demonstrating that

TCC has been probably overlooked in French water resources and underlying the need to include TCC in priority contaminant list for further monitoring studies in France in addition to TCS. TCC and TCS presented significantly higher concentrations in Sed3 than in Sed2 and Sed1 which can be explained by a higher organic content in Sed3 (Table A3), promoting TCC accumulation by sorption processes. Moreover, effluents from WWTP3 represented almost 100% of the flow rate of the receiving stream excluding attenuation by dilution.

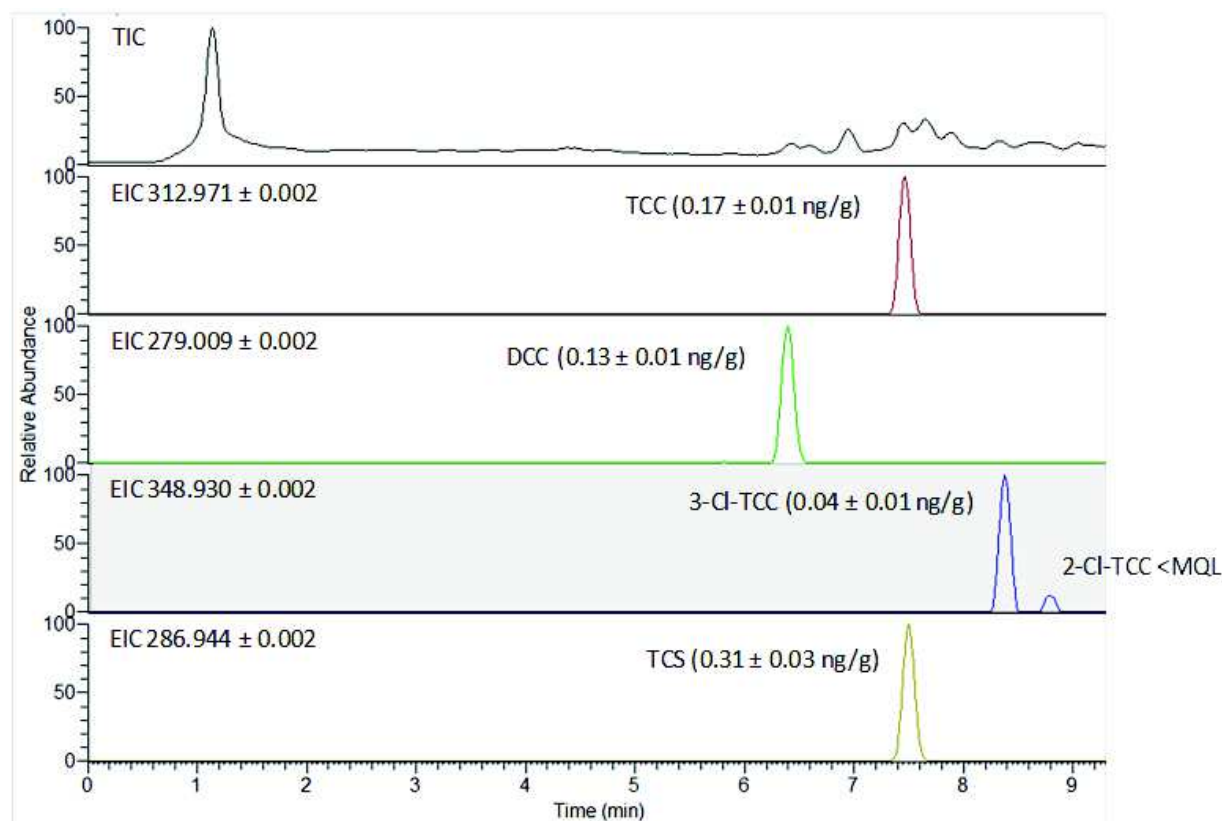


Fig. A1. LC–MS Extracted Ion Chromatograms (EIC) corresponding to the analysis of Sed1 extract where TCS, TCC, DCC and 3-Cl-TCC were quantified at 0.31 ± 0.03 , 0.17 ± 0.01 , 0.13 ± 0.01 and 0.04 ± 0.001 ng/g, respectively.

As expected, DCC was also ubiquitously determined (Table A3). DCC is known to be present as impurity ($\sim 0.2\%$, w/w) in technical grade TCC which corresponds to a TCC/DCC ratio of 495/1. TCC/DCC ratio measured in our study ranged from 1.3:1 to 66:1. The significant deviation from the 495:1 ratio constituted a proof for in situ dechlorination processes because with $\log K_{ow}$ values of 4.3 and 4.9 for DCC and TCC, respectively, similar sorption behavior to organic matter was anticipated for both compounds. No correlation was found between amounts of TCC and DCC/TCC ratios suggesting that other factors than concentration of TCC such as microbial communities or water/sediment exchange drive dechlorination processes. Moreover, TCC underwent the highest dechlorination rate in Sed1 because it was

collected in 2 m deep shipping channel under anoxic conditions which were supposed to induce reductive dechlorination of TCC to DCC.

Thanks to the opportunity to perform a screening for expected by-products, the occurrence of monochlorocarbanilide (MCC) could be investigated in spite of the lack of an analytical standard but knowing that similar MDL to those recorded for TCC can be obtained in electrospray LC-MS (Pycke et al., 2014). MCC was never detected in our study suggesting that transformation of DCC into MCC is probably rate limiting in TCC dechlorination processes as reported previously (Miller et al., 2008; Venkatesan et al., 2012) and in contrast to what has been observed recently in sludge (Pycke et al., 2014). Consequently, as DCC could be regarded as a persistent contaminant, the transformation of TCC into DCC might be contemplated as an indicator of biodegradation in anoxic sediments and the increase in the DCC/TCC ratio as a measurement of biodegradation intensity. This latter issue will deserve further investigation but this is a relevant result because there is a lack of marker of biodegradation in such a compartment.

As DCC, 3-Cl-TCC is also known to be present as impurity (~0.2%, w/w) in technical grade TCC but was reported to be fully sorbed to sludge during biological WWTP treatment (Sapkota et al., 2007). Surprisingly, 3-Cl-TCC was detected in our monitoring survey even though at very low concentration levels (down to ng/g level to around 20 ng/g). In spite of this, 3-Cl-TCC was unambiguously identified using three criteria of confirmation as depicted in Fig. A2 which corresponds to Sed1 analysis where 3-Cl-TCC occurred at 0.04 ± 0.001 ng/g. These criteria of confirmation included : 1) A RT of 8.39 min which fell into the allowed ± 0.5 min window of time around an average value of 8.4 min (Table A1), 2) An exact mass of 346.931 with a mass precision of 5 ppm and 3) An isotopic pattern, which includes three isotopic peaks at m/z 346.931 ($4 \times {}^{35}\text{Cl}$), at m/z 348.930 ($3 \times {}^{35}\text{Cl}/1 \times {}^{37}\text{Cl}$) and at m/z 350.927 ($2 \times {}^{35}\text{Cl}/2 \times {}^{37}\text{Cl}$) with a specific relative ratio of 81/100/55 close to the theoretical isotopic pattern with a relative ratio of 78/100/48. The relative abundances of the two remaining isotopic peaks were too low to be detected. In addition a MS/MS fragment ion at m/z 159.972 with a mass precision of 5 ppm was recorded, corresponding to the expected fragment ion of 3-Cl-TCC. Consequently all the identification criteria defined in Section III.1 were fulfilled for an unambiguous confirmation of the occurrence of 3-Cl-TCC at concentration levels below 0.1 ng/g. 3-Cl-TCC/TCC ratio ranged from < MQL to 4.5% in Sed2 and Sed3 and reached a value up to 31% in Sed1. These values are higher than the expected ones but might be explained by the high stability of this chemical while TCC is continuously degraded. This assumption might be particularly true in Sed1 where TCC underwent a high transformation rate.

In addition, a screening for other chlorinated biocides was performed because this kind of contaminants might be prevalent in the aquatic environment due to their widespread use and because occurrence data are scarce for this class of contaminants. This screening method was performed by reconstruction from HR-full scan chromatograms based on the exact mass of the expected ions with a mass window of ± 5 ppm with the assumption or knowledge of ionization behavior. This was possible since the electrospray ionization techniques produce molecular ions $[M-H]^-$ in most cases. Exactive Orbitrap being a high resolution mass analyzer without the possibility to acquire reliable MS/MS data, the presence of chlorine atoms in the chlorinated biocides with characteristic isotopic patterns in their MS spectra was of a great help to perform these unknown identification. 3,4,5-trichlorophenol (3,4,5-TCP), chlorophene, dichlorophene and 2-chloro-4-phenylphenol were then investigated because these were expected to be found in sediments based on their physical-chemical properties (i.e., $\log K_{ow} > 3$). Molecular ions of all these substances were detected in Sed2 as shown in Fig. SA3. Furthermore, assessing steps which also include comparison of isotope patterns to the theoretical ones were also used. However, unequivocal confirmation could be only achieved by injecting reference standards.

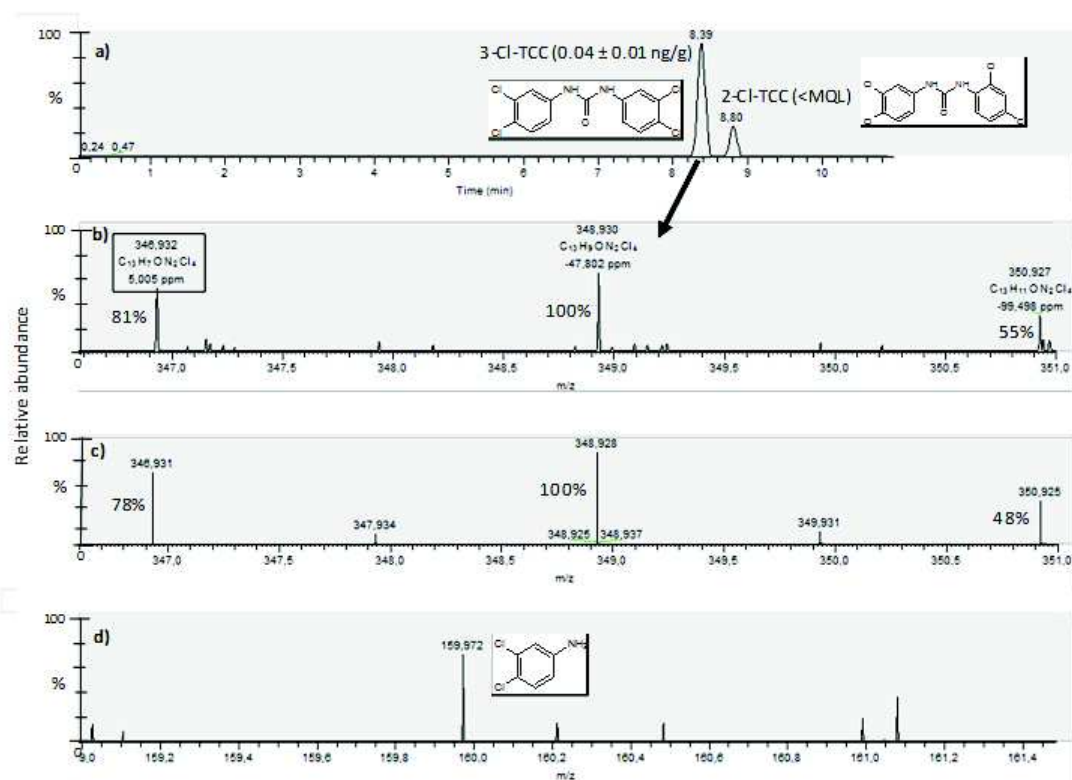


Fig. A2. a) Extracted Ion Chromatogram at m/z 346.931 for 2-Cl-TCC and 3-Cl-TCC in Sed1, b) 3-Cl-TCC isotopic profile corresponding to $[M-H]^-$ ion with a relative ratio of 81/100/55 between the 3 detected isotopic ions c) Theoretical isotopic profile of 3-Cl-TCC corresponding to $[M-H]^-$ ion with a relative ratio of 78/100/48 between the 3 main isotopic ions and d) 3-Cl-TCC MS/MS spectrum.

IV. Conclusions

Similar to TCS, TCC is a widely used chlorinated biocide but this chemical has been scarcely monitored in France. After the development of a robust analytical method relying on LC-HRMS, TCC was detected ubiquitously in river sediments downstream of 3 WWTPs at concentration levels as high as or even higher than those of TCS. These results obtained might help Priorisation Experts Committee to assess the need to include TCC along with TCS in the priority list of emerging pollutants. Furthermore, TCC underwent dechlorination processes and the transformation of DCC into MCC appeared to be the rate limiting step probably leading to the accumulation of DCC in sediment. Consequently, the evolution of the DCC/TCC ratio might be used as a marker of biodegradation in anoxic conditions even though this issue will deserve further investigation. 3-Cl-TCC was also unambiguously identified and quantified in almost all sediment samples. 3-Cl-TCC is probably more stable than TCC prompting its relative accumulation with respect to TCC. These data provide further evidences that not only parent compound but also their TPs have to be taken into account for a proper environmental risk assessment of TCC by the sanitary authorities. Finally, LC-HRMS enabled the detection of a suite of other chlorinated biocides such as chlorophene, dichlorophene or 2-chloro-4-phenylphenol calling for additional investigation on these biocides.

Acknowledgments

This research benefited from the support of the Chair Veolia HydroSciences: Risk analysis relating to emerging contaminants in water bodies and of Veolia Water Mediterranean. Valérie Ingrand, head of the department “Solutions d'Analyses Environnementales” at Veolia Research and Innovation; Brigitte Goral, technical vice-director Veolia Water Mediterranean and Nicolas Rampoux, Chair coordinator (Veolia Research and Innovation) are thanked for their support in this research.

References

- Bisceglia KJ, Yu JT, Coelhan M, Bouwer EJ, Roberts AL. Trace determination of pharmaceuticals and other wastewater-derived micropollutants by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2010;1217:558–64.
- Carmona E, Andreu V, Picó Y. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: from waste to drinking water. *Sci Total Environ* 2014;484:53–63.

- Cha J, Cupples AM. Detection of the antimicrobials triclocarban and triclosan in agricultural soils following application of municipal biosolids. *Water Res* 2009;43:2522–30.
- Chen J, Ahn KC, Gee NA, Ahmed MI, Duleba AJ, Zhao L, et al. Triclocarban enhances testosterone action: a new type of endocrine disruptor? *Endocrinology* 2008;149:1173–9.
- Chiaia-Hernandez AC, Krauss M, Hollender J. Screening of lake sediments for emerging contaminants by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization and electrospray ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 2013;47:976–86.
- Chu S, Metcalfe CD. Simultaneous determination of triclocarban and triclosan in municipal biosolids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2007;1164:212–8.
- Coogan MA, La Point TW. Snail bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyltriclosan in a North Texas, USA, stream affected by wastewater treatment plant runoff. *Environ Toxicol Chem* 2008;27:1788–93.
- EPA. High Production Volume (HPV) Chemical Challenge Program Data Availability and Screening Level Assessment for Triclocarban. Rep. No. 201-14186A <http://www.epa.gov/HPV/pubs/summaries/tricloca/c14186tc.htm>, 2002.
- Gautam P, Carsella JS, Kinney C. Presence and transport of the antimicrobials triclocarban and triclosan in a wastewater-dominated stream and freshwater environment. *Water Res* 2014;48:247–56.
- Halden R. On the need and speed of regulating triclosan and triclocarban in the United States. *Environ Sci Technol* 2014;48:3603–11.
- Halden RU, Paull DH. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in U.S. water resources. *Environ Sci Technol* 2005;39:1420–6.
- Heidler J, Sapkota A, Halden RU. Partitioning, persistence, and accumulation in digested sludge of the topical antiseptic triclocarban during wastewater treatment. *Environ Sci Technol* 2006;40:3634–9.
- Hernández F, Sancho JV, Ibáñez M, Abad E, Portolés T, Mattioli L. Current use of high resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Anal Bioanal Chem* 2012;403:1251–64.
- Higgins CP, Paesani ZJ. Pharmaceuticals and personal care products in the environment. Bioaccumulation of triclocarban in *Lumbriculus variegatus*. *Environ Toxicol Chem* 2009;28:2580–6.
- Higgins CP, Paesani ZJ, Chalew TEA, Halden RU, Hundal LS. Persistence of triclocarban and triclosan in soils after land application of biosolids and bioaccumulation in *Eisenia foetida*. *Environ Toxicol Chem* 2011;30:556–63.
- Löffler D, Ternes TA. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003;1021:133–44.

- Lozano N, Rice CP, Ramirez M, Torrents A. Fate of triclocarban, triclosan and methyltriclosan during wastewater and biosolids treatment processes. *Water Res* 2013;47:4519–27.
- Miller TR, Heidler J, Chillrud SN, DeLaquil A, Ritchie JC, Mihalic JN, et al. Fate of triclosan and evidence for reductive dechlorination of triclocarban in estuarine sediments. *Environ Sci Technol* 2008;42:4570–6.
- Miller TR, Colquhoun DR, Halden RU. Identification of wastewater bacteria involved in the degradation of triclocarban and its non-chlorinated congener. *J Hazard Mater* 2010; 183:766–72.
- Pycke B, Roll I, Brownawell B, Kinney CA, Furlong ET, Kolpin DW, et al. Transformation products and human metabolites of triclocarban and triclosan in sewage sludge across the United States. *Environ Sci Technol* 2014;48:7881–90.
- Sapkota A, Heidler J, Halden RU. Detection of triclocarban and two co-contaminating chlorocarbanilides in US aquatic environments using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environ Res* 2007;103:21–9.
- Sood S, Choudhary S, Wang H-CR. Induction of human breast cell carcinogenesis by triclocarban and intervention by curcumin. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 438:600–6.
- Venkatesan AK, Pycke BFG, Barber LB, Lee KE, Halden RU. Occurrence of triclosan, triclocarban, and its lesser chlorinated congeners in Minnesota freshwater sediments collected near wastewater treatment plants. *J Hazard Mater* 2012; 229–230:29–35.
- Wang X-K, Jiang XJ, Wang YN, Sun J, Wang C, Shen TT. Occurrence, distribution, and multi-phase partitioning of triclocarban and triclosan in an urban river receiving wastewater treatment plants effluent in China. *Environ Sci Pollut Res* 2014;21:7065–74.
- Wu C, Spongberg AL, Witter JD. Adsorption and degradation of triclosan and triclocarban in soils and biosolids-amended soils. *J Agric Food Chem* 2009;57:4900–5.
- Ying G-G, Yu X-Y, Kookana RS. Biological degradation of triclocarban and triclosan in a soil under aerobic and anaerobic conditions and comparison with environmental fate modelling. *Environ Pollut* 2007;150:300–5.
- Yueh M-F, Li T, Evans RM, Hammock B, Tukey RH. Triclocarban mediates induction of xenobiotic metabolism through activation of the constitutive androstane receptor and the estrogen receptor alpha. *PLoS One* 2012;7:e37705.
- Zhao J-L, Ying G-G, Liu Y-S, Chen F, Yang J-F, Wang L. Occurrence and risks of triclosan and triclocarban in the Pearl River system, South China: from source to the receiving environment. *J Hazard Mater* 2010;179:215–22.

Supplementary Material

Table SA1. Characteristics and operating conditions of the WWTPs.

	WWTP1	WWTP2	WWTP3
Purification steps	M/B/N/D/P	M/B/N/D/P	M/B/N/D/P/MB
Population served (PE)	140 300	32 083	20 000
Average flow (m³/d)	9311	4819	1566
DCO flow (kg/d)	254.1	123.2	26.8
Significant sources	1 hospital	1 hospital	
Sampling periods	23 Aug 2013 (Summer) and 27 Nov 2013 (Fall)	23 Aug 2013 (Summer) and 27 Nov 2013 (Fall)	23 Aug 2013 (Summer) and 27 Nov 2013 (Fall)
Sediment sample name	Sed1	Sed2	Sed3

M mechanical, *B* biological, *N* nitrification, *D* denitrification, *P* phosphorus removal, *MB* membrane bioreactor

Table SA2. Site characteristics and other physicochemical properties.

Station Name	Sampling Date	Weather at sampling time	Air Temp (°C)	Dissolved oxygen (mg/L)	pH	Water Temp (°C)
Sed1	2013-08-23	Sunny, Wind < 15 km/h	33.5 °C	4.2	6.8	22.2
Sed1	2013-11-27	Sunny, Wind < 15 km/h	10.4 °C	4.6	7.2	11.8
Sed2	2013-08-23	Sunny, Wind < 15 km/h	32.2°C	5.5	6.9	25.7
Sed2	2013-11-27	Sunny, Wind < 15 km/h	12.6 °C	6.3	7.1	13.2
Sed3	2013-08-23	Sunny, Wind < 15 km/h	39.2°C	9.2	6.5	27.0
Sed3	2013-11-27	Sunny, Wind < 15 km/h	8.5 °C	9.6	5.7	12.9

Table SA3. Comparison of slopes of relative calibration curves between the studied sediments.

Relative slopes	Sed1	Sed2	RSD (%)
TCC	0.0175	0.0199	9
DCC	0.0196	0.0174	8
NCC	0.0051	0.0055	5
3-Cl-TCC	0.0336	0.0297	9
2-Cl-TCC	0.0294	0.0239	14
TCS	0.0185	0.02	5

Table SA4. Percent absolute recovery of compounds (mean \pm RSD; $n = 3$).

Analyte	Sed1	Sed2
TCC	98 \pm 5	24 \pm 4
DCC	104 \pm 17	26 \pm 18
3-Cl-TCC	49 \pm 9	5 \pm 20
2-Cl-TCC	48 \pm 12	8 \pm 13
TCS	115 \pm 5	80 \pm 6

Table SA5. Inter- and intra-day precision ($n = 3$).

Analytes	Intra-day precision (%) ($n = 3$)						Intra-day precision (%) ($n = 3$)	
	2 ng/g			20 ng/g			2 ng/g	20 ng/g
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3		
TCC	0.6	0.8	0.1	2.8	0.4	0.2	2.8	5.9
DCC	1.5	1.7	3.3	1.7	1.0	4.5	6.9	3.9
3-Cl-TCC	1.9	3.5	1.8	3.7	1.5	3.3	2.9	1.7
2-Cl-TCC	3.0	2.5	2.6	3.1	3.0	1.1	10.0	2.1
TCS	1.6	1.3	0.7	1.8	1.1	1.3	0.7	4.0

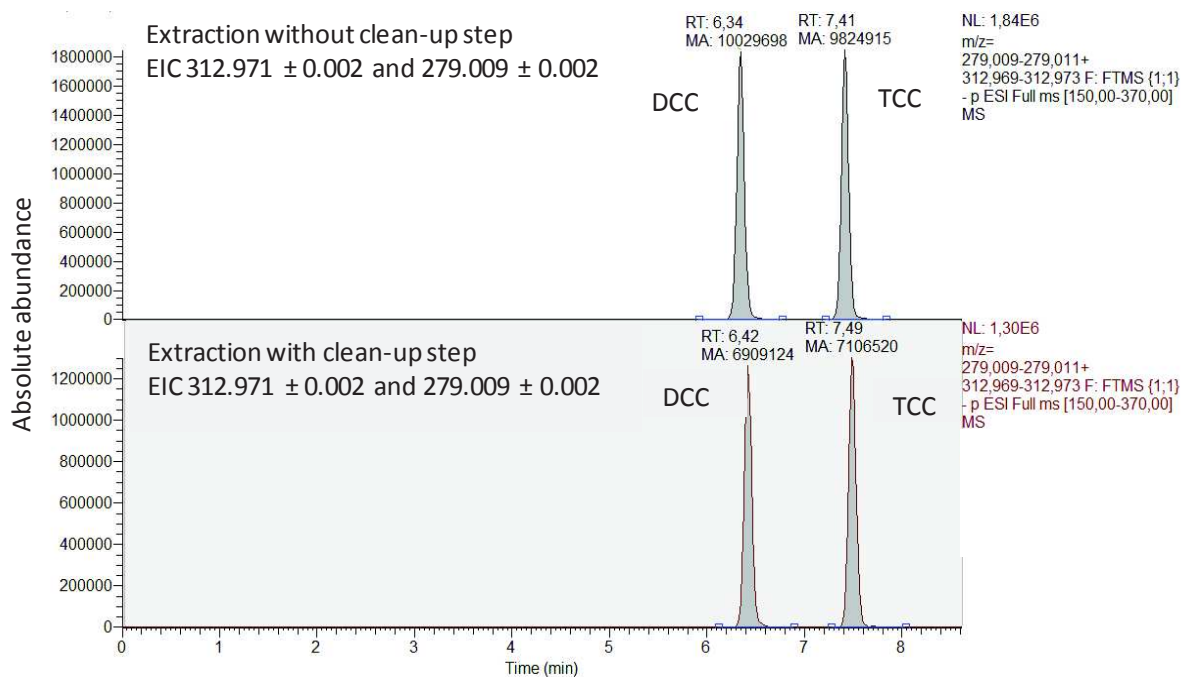


Fig. SA1. Comparison of LC-MS chromatograms of sediment extracts obtained with or without a purification step. Chromatograms were obtained by extraction of exact mass of TCC (312.971) and DCC (279.010) with a mass precision of 5 ppm.

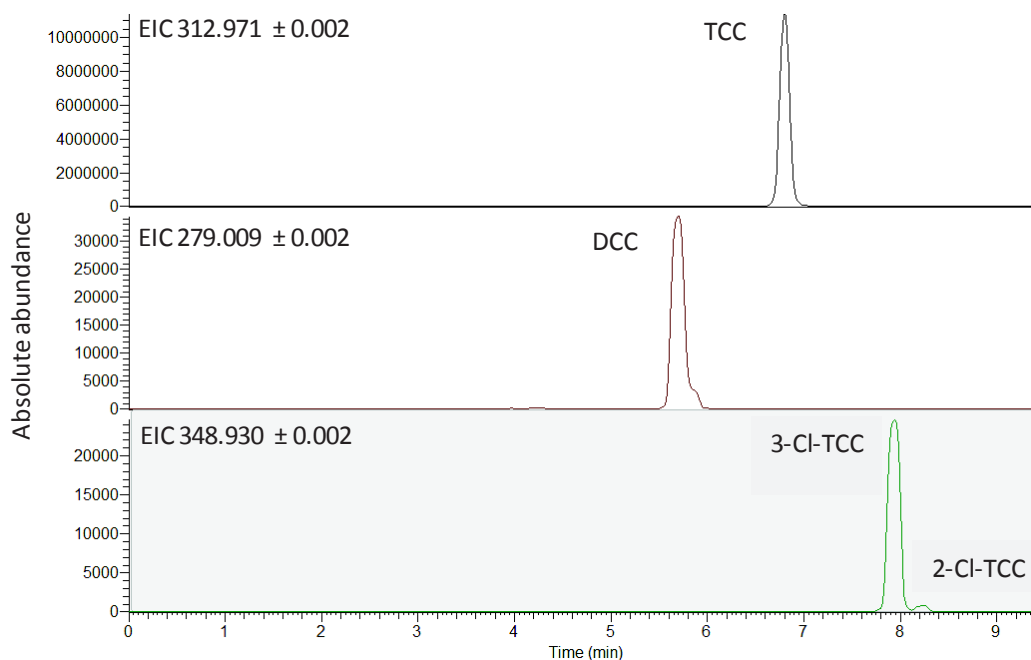


Fig. SA2. LC-MS chromatograms corresponding to TCC standard analysis at 1 ppm with the presence of DCC, 2-Cl-TCC and 3-Cl-TCC as impurities.

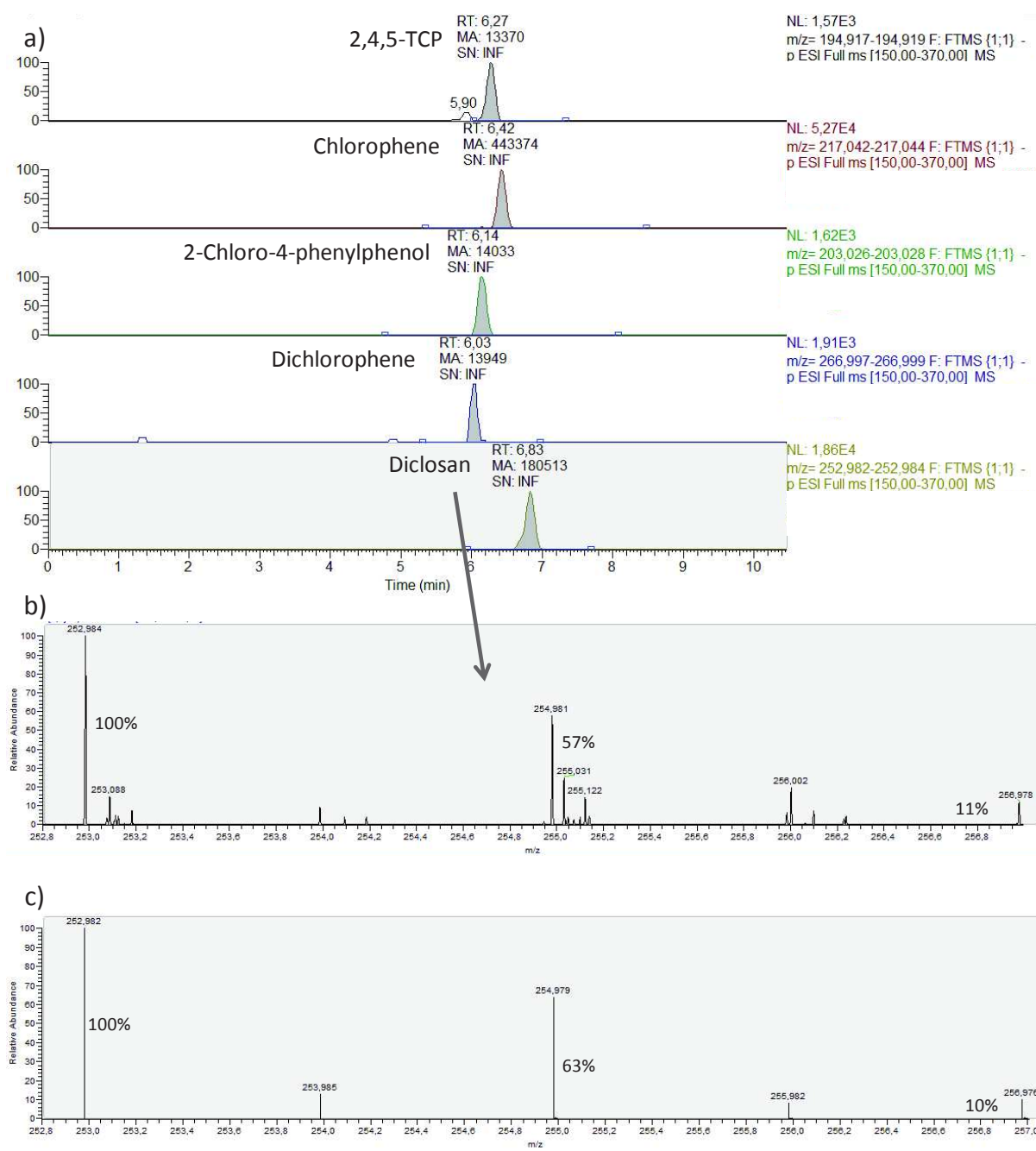


Fig. SA3. a) Extracted Ion Chromatogram at m/z 194.918, 217.043, 203.027, 266.998, 252.983 with a mass precision of 5 ppm corresponding to pseudo molecular $[M-H]$ ions of 2,4,5-trichlorophenol (2,4,5-TCP), chlorophene, 2-chloro-4-phenylphenol, dichlorophene and diclosan from HR full-scan chromatogram corresponding to Sed2 analysis b) Isotopic profile corresponding to $[M-H]$ ion of diclosan with a relative ratio of 100/57/11 between the 3 detected isotopic peaks c) Theoretical isotopic profile of the $[M-H]$ ion of diclosan with a relative ratio of 100/63/10 between the 3 isotopic peaks.

2.2. Déchloration réductive du triclocarban dans les effluents de STEP

Les résultats précédents confirment l'occurrence d'une déchloration réductive du TCC. Pour vérifier que cette déchloration réductive a lieu dans les sédiments et non dans les STEP, le TCC et ses métabolites déchlorés ont été analysés dans les effluents des STEP localisées en amont des sites de collecte des sédiments.

2.2.1. Description de la méthode d'analyse du TCC dans les effluents de STEP

La méthode d'extraction des effluents a été développée en s'appuyant sur celle préalablement décrite par (Halden and Paull, 2004) pour extraire le TCS et le TCC de matrices aqueuses. Cette méthode est identique pour les trois molécules étudiées, à savoir le TCC, le TCS et le DCF, et leurs métabolites.

L'extraction des effluents a été réalisée par SPE sur des cartouches HLB Oasis (6 cm³/500 mg de phase sorbante ; Waters Corp.) préalablement conditionnées avec 6 mL de méthanol et 6 mL d'eau milli-Q (EMQ). Pour chaque extraction, 250 mL de matrice aqueuse à analyser ont été percolés à travers la cartouche en respectant un débit d'environ 5 mL/min. Après séchage de la cartouche, les molécules extraites ont été éluées avec 8 mL de méthanol à un débit d'environ 1 mL/min. Puis, l'éluât a été évaporé à sec, sous flux d'azote, avant d'être repris dans 1 mL d'un mélange méthanol/EMQ (60 %/40 %) et filtré à 0,2 µm à l'aide de filtres PTFE (polytétrafluoroéthylène).

Les échantillons filtrés ont ensuite été analysés en LC-ESI⁻-HRMS pour identifier et quantifier le TCC et ses métabolites en utilisant la même méthode d'analyse que celle développée pour les sédiments (Souchier et al., 2014). L'étalon interne TCC-d4 a été ajouté avant extraction (200 ng/L) pour corriger les effets matriciels et les pertes générées lors de l'extraction SPE.

2.2.2. Validation de la méthode d'analyse du TCC dans les effluents de STEP

Les paramètres de performance de la méthode d'analyse du TCC et de ses métabolites déchlorés dans les effluents de STEP sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12. Paramètres de validation de la méthode d'analyse LC-ESI-HRMS du TCC et de ses métabolites déchlorés, le DCC et le NCC, dans les effluents de STEP.

Composé	Masse détectée [M-H] ⁻	Rendement d'extraction absolu ^a (% , n=5)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	Linéarité ^b
TCC	312,9697	82 ± 4	1,2	3,9	> 0,99
DCC	279,0086	90 ± 5	1,4	4,2	> 0,99
NCC	211,0866	96 ± 6	1,5	4,5	> 0,99

^aNiveau de dopage avant extraction des effluents : 200 ng/L.

^bLinéarité mesurée entre 4 et 400 ng/L (concentrations dans l'échantillon environnemental avant extraction).

Les rendements obtenus sont satisfaisants puisque supérieurs à 80 % pour les trois molécules étudiées et les limites de quantification sont faibles (de l'ordre du ng/L) et donc adaptées à l'analyse des composés à l'état de traces dans les effluents.

2.2.3. Résultats d'occurrence obtenus

Une fois la méthode d'analyse des effluents validée, les concentrations en TCC, DCC et NCC ont été mesurées en novembre 2013 dans les effluents des STEP situées en amont des trois sites de collecte des sédiments. L'étalon du MCC n'étant pas disponible dans le commerce, ce composé a été recherché par masse exacte dans les échantillons. Les valeurs d'occurrence sont reportées dans le Tableau 13. Un chromatogramme montrant l'analyse du TCC, DCC et NCC dans les effluents de la STEP 2 est présenté Figure 32.

Tableau 13. Concentrations en TCC, DCC et NCC mesurées dans les effluents des 3 STEP étudiées.

Composé	Concentrations dans les effluents (ng/L, moyenne ± écart type, n = 3)		
	STEP 1	STEP 2	STEP 3
TCC	253 ± 42	174 ± 15	230 ± 40
DCC	< MDL	< MDL	< MDL
NCC	< MDL	< MDL	< MDL

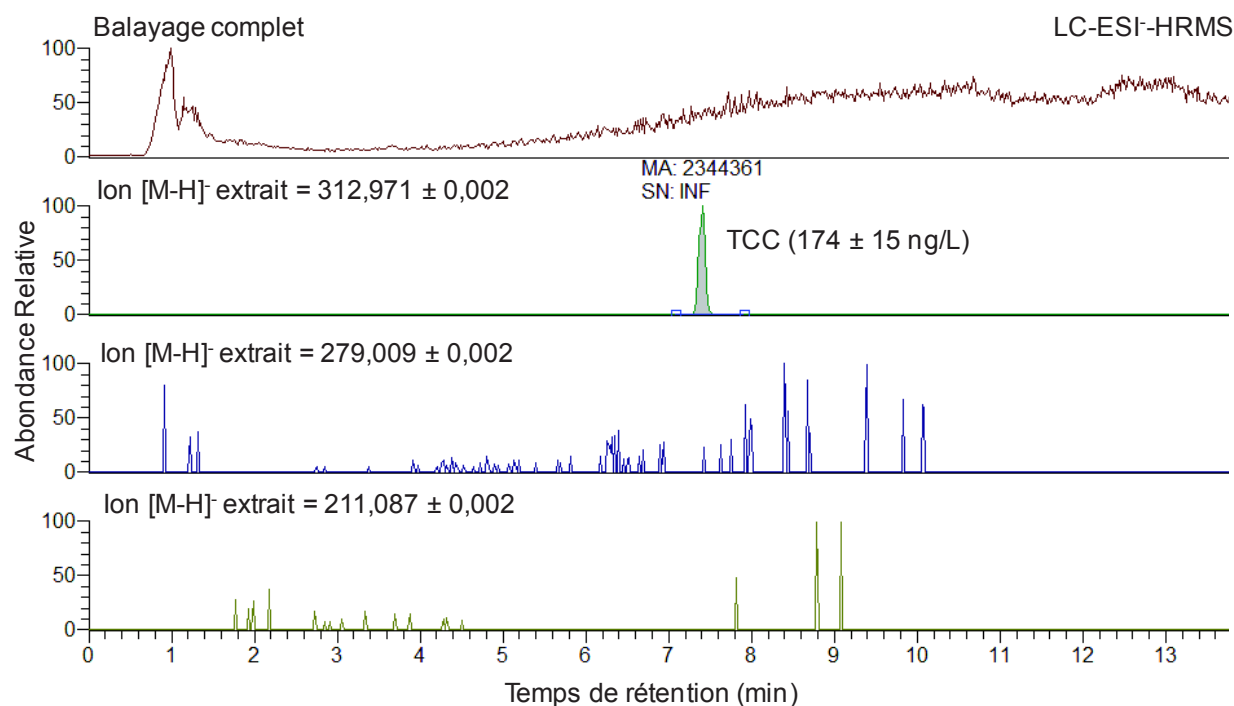


Figure 32. Chromatogrammes LC-ESI-HRMS correspondant à l'analyse du TCC (312,971), du DCC (279,009) et du NCC (211,087) dans un échantillon d'effluents de la STEP 2.

Les résultats d'occurrence reportés dans le Tableau 13 montrent que le TCC a été quantifié à des concentrations comprises entre 174 et 253 ng/L dans les effluents des 3 STEP. Au contraire, le DCC et le NCC n'ont pas été détectés aux seuils établis. A noter que la masse exacte du MCC ($245,047 \pm 0,002$) n'a été identifiée dans aucun des échantillons analysés.

Si le TCC a été détecté dans 100 % des effluents étudiés, les métabolites déchlorés n'ont été identifiés dans aucune des matrices aqueuses analysées. Ces résultats confirment le fait que la déchloration réductive du TCC se déroule dans les sédiments. Le TCC constitue donc un candidat intéressant pour étudier le fractionnement isotopique du chlore. L'étape suivante reporte les résultats obtenus suite aux études mécanistiques réalisées sur le TCC.

2.3. Publication n°2 : Etude des mécanismes réactionnels de déchloration réductive du TCC

La première étape a consisté à identifier la position moléculaire du chlore partant du TCC dans l'environnement. Une méthode chromatographique a été développée pour séparer les deux isomères de DCC qui sont potentiellement formés, le 3,4'-DCC ou le 4,4'-DCC selon si le chlore est éliminé en position para ou méta du cycle aromatique du TCC respectivement. L'application de cette méthode chromatographique à l'analyse du DCC, dans les mêmes sédiments que ceux analysés dans l'article 1, a permis de démontrer que les deux isomères du DCC étudiés sont formés simultanément dans l'environnement. Ces résultats suggèrent l'existence de deux voies de dégradation du TCC concomitantes.

Des expériences ont été réalisées *in vitro* à l'aide de systèmes enzymatiques et biomimétiques pour tenter de proposer des mécanismes réactionnels de déchloration qui puissent expliquer la formation des deux isomères du DCC dans l'environnement. Les résultats issus de ces expériences montrent que le 4,4'-DCC est spécifiquement formé en conditions anaérobies via un mécanisme d'addition nucléophile. Le 3,4'-DCC est, quant à lui, formé en conditions aérobies via un mécanisme radicalaire qui implique une activation préalable du TCC, par le biais d'un arrachement d'électron, suivie d'une substitution nucléophile du chlore. Ces résultats supportent l'hypothèse que la déchloration réductive du TCC dans les sédiments ne se déroule donc pas exclusivement dans des conditions strictement anaérobies comme supposé jusqu'à aujourd'hui.

Les ratios 4,4'-DCC/TCC et 3,4'-DCC/TCC ont été calculés afin d'évaluer l'importance de chaque chemin de dégradation dans les sédiments. Les valeurs obtenues, 1,5–47 % et 0,5–47 % respectivement, démontrent pour la première fois que le mécanisme qui conduit à la formation du 3,4'-DCC est significatif pour l'ensemble des échantillons analysés.

Ces résultats sont présentés dans l'article intitulé *Insights into reductive dechlorination of triclocarban in river sediments : Field measurements and in vitro mechanism investigations* publié en 2016 dans la revue *Chemosphere*.

Publication n°2 :

Screening triclocarban and its transformation products in river sediment using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry Insights into reductive dechlorination of triclocarban in river sediments : Field measurements and in vitro mechanism investigation

Marine Souchier^a, Claude Casellas^b, Valérie Ingrand^a, Serge Chiron^{b*}

^aVeolia Recherche et Innovation, Chemin de la digue, BP 76 78603 Maisons-Laffitte Cedex, France.

^bUMR Hydrosciences 5569, Université Montpellier, 15 Avenue Ch. Flahault, 34093 Montpellier cedex 5, France.

*Corresponding author:

E-mail: Serge.Chiron@msem.univ-montp2.fr.

Tel: 33 (0)4 11 75 94 15; Fax: 33 (0)4 11 75 94 61

Abstract

Triclocarban (TCC) reductive dechlorination was investigated using a combination of field and laboratory experiments. Field monitoring revealed that TCC reductive dechlorination in river sediments leads to formation of two isomers of its lesser chlorinated congener namely 3,4'-dichlorocarbanilide and 4,4'-dichlorocarbanilide. Monochlorocarbanilide was not detected in sediments supporting that transformation of dichlorocarbanilide into monochlorocarbanilide is the rate limiting step of TCC dechlorination. In vitro experiments were conducted to study TCC potential reductive dechlorination mechanisms. These experiments demonstrated that 4,4'-dichlorocarbanilide was specifically formed upon a nucleophilic addition reaction under anaerobic conditions. The 3,4'-dichlorocarbanilide was formed upon a two steps radical mechanism under aerobic conditions which includes TCC activation by one electron oxidation followed by a nucleophilic substitution reaction with glutathione. In vitro results suggested that strict anaerobic conditions might not be required for TCC reductive dechlorination in the environment. Moreover, in vitro reactions were performed using biomimetic or enzymatic systems supposing that TCC dechlorination might occur through microbial action *in situ*. Measured dichlorocarbanilide isomers/triclocarban ratios were used to evaluate the relative significance of both dechlorination pathways and the pathway leading to 3,4'-dichlorocarbanilide was found significant in all investigated river sediment samples.

Keywords : Triclocarban, sediment, reductive dechlorination, nucleophilic substitution, nucleophilic addition.

I. Introduction

Triclocarban (TCC) is a polychlorinated high-production volume antimicrobial chemical mostly used as an additive to antimicrobial soaps, cosmetics and other personal care products at levels of 0.2-1.5% (w/w). Due to incomplete removal in biological wastewater treatment plants (WWTPs) and long term persistence upon environmental release, TCC is actually one of the most frequently detected emerging contaminant at the ng- μ g range in water resources (Gautam et al., 2014), sludges (Pycke et al., 2014), biosolids amended soils (Cha and Cupples, 2009) and sediments (Souchier et al., 2014), especially in the US or in China where it ranks now in the list of top contaminants of concern (Halden and Paull, 2005; Zhao et al., 2010). Indeed, bioaccumulation of TCC in biota (Higgins et al., 2011) together with potential adverse effects of this compound in wildlife and humans have been recently highlighted (Chen et al., 2008; Sood et al., 2013).

In addition to TCC monitoring, studies have been performed during the last decade to elucidate the fate of this compound in the environment. TCC biodegradation in WWTPs is believed to be low (< 20%) and accumulation in sewage sludge mainly occurs (Heidler et al., 2006; Lozano et al., 2013). An aerobic wastewater bacteria potentially involved in TCC biodegradation during sewage treatment through the hydrolysis of the urea bridge has been recently evidenced (Miller et al., 2010). In soil, half-lives ranging from 80 to 231 d were measured under aerobic conditions (Cha and Cupples, 2010; Wu et al., 2009) and no significant biodegradation was observed in anaerobic conditions within 70 d experiments (Ying et al., 2007). Detection of 3,4-dichloroaniline and 4-chloroaniline at trace levels in soil column spiked with TCC suggested occurrence of urea bridge hydrolysis but this degradation pathway remained minor (< 1%) or further degradation of transformation products (TPs) occurred (Kwon and Xia, 2012). Interestingly, in sediment downstream from WWTPs where TCC tends to accumulate, TCC reductive dechlorination process was evidenced leading to significant formation of mainly dichlorocarbanilide (DCC) together with monochlorocarbanilide (MCC) and carbanilide (NCC), even if these two latter were formed only to a lesser extent (Miller et al., 2008; Venkatesan et al., 2012). If DCC provides specifically from TCC biodegradation, this metabolite is also known to occur as an impurity at levels of about 0.2% by weight in technical grade TCC. However, amounts of DCC measured in sediment were far too high to be only a consequence of its presence as an impurity (Souchier et al., 2014).

TCC reductive dechlorination processes in sediments have been speculated to occur through the action of strict anaerobic dechlorinating microorganisms even though bacterial strains

involved in these transformations and degradation mechanisms have not clearly been identified yet (Miller et al., 2010). Halo-respiration has been anticipated as a plausible TCC anaerobic reductive dehalogenation process (Miller et al., 2008). This cobalt corrinoid-dependent anaerobic reductive dehalogenation is thought to be involved in the reductive dehalogenation of highly halogenated persistent aromatic pollutants such as decabromodiphenyl ether (BDE-209) (Robrock et al., 2008) but also the reductive dehalogenation of lower halogenated aromatic compounds such as chlorobenzene or chlorotoluene isomers (Nelson et al., 2014). TCC aerobic reductive dehalogenation has also been hypothesized (Venkatesan et al., 2012) without providing with any transformation mechanisms or degradation conditions. Even though reductive dehalogenation is originally thought to rarely occur in aerobes, detection of a dehalogenated TP of triclosan in alga cell cultivation (Wang et al., 2013) and dechlorination products of polychlorobiphenyles in partially-oxygenated soils (Meggo et al., 2013) suggest existence of an alternate aerobic reductive dechlorination pathway for chlorinated aromatic compounds. Recently, diclofenac (DCF), a chlorinated amine derivative similarly to TCC, has shown to undergo aerobic reductive dechlorination leading to formation of a glutathione-adduct (DDF-SG) when incubated with horseradish peroxidase (HRP), glutathione S-transferases (GST) and reduced glutathione (GSH) (Boerma et al., 2014). DCF dechlorination was supposed to occur through a GST-catalyzed nucleophilic aromatic substitution reaction after one-electron oxidation process obtained in reaction with HRP. Similarly, dechlorination and GSH conjugation of a series of chlorinated anilines including dichlorinated anilines were also reported in human liver microsomes (Zhang et al., 2011). Surprisingly, this aerobic transformation pathway, which might occur in environment because HRP and GST are environmental widespread enzymes, has not been investigated yet in the case of TCC despite the closely related structures of TCC and DCF. Then, it still remains uncertain if TCC dechlorination reactions occur abiotically or biotically and if the latter, what organisms are carrying them out and under what conditions. The determination of TCC reductive dechlorination mechanisms is needed because it may help to elucidate these different points.

The main contribution of this work is then (i) to identify the regioselectivity of TCC reductive dehalogenation in the environment by monitoring the two potential dehalogenated metabolites, 3,4'- and 4,4'-dichlorocarbanilide in river sediments and (ii) to propose dechlorination mechanisms to explain field observations using *in vitro* mechanistic experiments. Investigating TCC reductive dechlorination in sediments was thought to be relevant since TCC dehalogenation probably reduces its toxicity and constitutes a clear remediation pathway for this persistent contaminant.

II. Material and methods

II.1. Chemicals and reagents

Triclocarban (TCC, 99%), diclofenac (DCF, 99%), pentachlorophenol (PCP, 99%), 3,4'-dichlorocarbanilide (3,4'-DCC, 99%), ketoprofen, peroxidase type II from horseradish (HRP), hydrogen peroxide (H₂O₂), sodium citrate, titanium(II) chloride solution (TiCl₃ 15% in 10% HCl), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS), glutathione S-transferase from equine liver (GST), bis(triphenylphosphine)nickel(II) dichloride (NiCl₂(PPh₃)₂) and sodium borohydride (NaBH₄) were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). 4,4'-dichlorocarbanilide (4,4'-DCC, 99%) was purchased from Apollo (Manchester, UK). Deuterated triclocarban (TCC-d₄, 99%) was provided from CDN Isotopes (Quebec, Canada), Cyanocobalamin (96%) from Acros Organic (Geel, Belgium) and Fontainebleau sand was purchased from Prolabo (Paris, France).

II.2. Study area

Sediment grab samples were collected twice in summer and fall 2013 from the upper 10 cm layer of the bed sediment at 3 sites (Sed1, Sed2 and Sed3) within 100 meters downstream from three French WWTPs (WWTP1, WWTP2 and WWTP3). Each of the three biological WWTPs included nitrogen and phosphorus removal steps. In addition, WWTP3 was equipped with a membrane bioreactor. Characteristics and operating conditions of the WWTPs are provided as Supplementary Material (SM) (Table SMB1). Sed2 and Sed3 were collected in small streams with flow rate < 1-5 m³.s⁻¹ and Sed1 was sampled in a 2 m deep shipping channel. In this latter case, core sediment was extracted with free fall gravity corer while in the first case sediments were collected with a shovel. Site characteristics and other physicochemical properties (pH, temperature, dissolved oxygen) at the time of sampling are provided in Table SMB2. The organic matter content in sediments was measured after calcination of dried sediment at 550°C in a furnace during 4 h, in accordance with the NF EN 12879, 2000. 24 h 1 L composite effluent samples of WWTP1, WWTP2 and WWTP3 were also collected in fall 2013.

II.3. Analysis of TCC, 4,4'-DCC and 3,4'-DCC in river sediments and effluents

Sediments were stored in the dark at -20°C and were extracted using a method previously described to quantify TCC and 4,4'-DCC (Souchier et al., 2014). Briefly, the method involved an extraction step by pressurized liquid extraction with a mixture of 50:50 v/v

methanol:acetone. 3,4'-DCC extraction recovery was assumed to be identical to that of 4,4'-DCC. Then, solvent extracts were concentrated to 1 mL and analyzed without further clean-up. Specific chromatographic method was developed to separate TCC and both DCC isomers. Analytes were separated on a Zorbax C₈ column (150 x 3 mm i.d, 3.5 µm particle size from Agilent) using an isocratic elution mode and a mobile phase consisting of 55% acetonitrile and 45% water at a flow rate of 400 µL.min⁻¹. Determination of TCC and its TPs was carried out using liquid chromatography coupled with an Exactive Orbitrap high resolution mass spectrometry (LC-HRMS, Thermo Fisher Scientific, USA) equipped with an electrospray source operating in the negative mode of ionization. The method identified individual compounds using chromatographic retention times (± 0.5 min), an exact mass acquisition with a precision below 5 ppm and by comparing chlorine isotopic profiles of targeted compounds with the theoretical ones. Quantification was performed by an isotope dilution method using TCC-d₄ as internal standard (IS), and a five point calibration curve spanning the range of anticipated analyte concentrations in the samples. Representative Extracted Ion Chromatograms corresponding to the analysis of a technical grade TCC standard together with Sed1, Sed2 and Sed3 extracts are depicted in Fig. SMB1. Method detection limits (MDLs) ranged from 0.01 to 0.03 ng.g⁻¹ for all targeted compounds which were suitable for real samples analysis.

WWTPs effluent samples were extracted using solid phase extraction (SPE). Briefly, after filtration (0.45 µm), 250 mL of effluents were passed through SPE cartridges (Oasis HLB, 6 cm³, 500 mg sorbent; Waters Corp., Milford, MA) and were eluted with 8 mL of methanol. Eluates were dried under a gentle stream of nitrogen, reconstituted in 1 mL (40:60 water:methanol), filtered (0.2 µm PTFE) and analysed using the LC-ESI-HRMS method previously described for sediment analysis (Souchier et al., 2014). Validation parameters of the analytical method for effluents are available in Table SMB3. Representative Extracted Ion Chromatograms (EIC) corresponding to the analysis of WWTP2 extract are depicted in Fig. SMB2.

II.4.TCC in vitro reductive dechlorination experiments

II.4.1.TCC reductive dechlorination under anaerobic conditions

Anaerobic reductive dechlorination mechanism of TCC was investigated using cyanocobalamin (vitamin B₁₂) by applying experimental conditions applied for PCP reductive dechlorination (Smith and Woods, 1994). Briefly, aqueous stock solution of Ti(III)citrate solutions were prepared from tris(hydroxymethyl)aminomethane (8.0 g), sodium citrate (14.7 g) and TiCl₃ (25 mL; 15% in HCl) under anoxic conditions in 40 mL of degassed ultrapure H₂O. Addition of NaOH followed to adjust pH to 8.2. 100 mL of 10 mg.L⁻¹ TCC and

PCP solutions were prepared in water. Into an anoxic chamber glove box, 2 mL of a cyanocobalamin solution at 12.0 g.L^{-1} were added. To initiate the reaction, 1.5 mL of the stock Ti(III)citrate were added. Solutions were purged with nitrogen until reduction of cyanocobalamin, indicated by a blue color solution. Then, solutions were capped with butyl rubber septa and aluminum crimp seals and covered with aluminum foil to exclude light. Samples were collected periodically for analysis over 67 d.

Anaerobic reductive dechlorination mechanism of TCC through hydrodehalogenation was also investigated using NaBH_4 in the presence of an Ni-phosphine catalytic system as previously reported for other aromatic halides (Scrivanti et al., 1998). Briefly, the catalytic system (0.1 mM of $\text{NiCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ and 0.2 mM of PPh_3) and 5 mM of NaBH_4 was added to a 10 mL ethanol/pyridine (9/1) solution of TCC (0.2 mM). The resulting slurry was stirred over a period of 9 h under nitrogen at 70°C and samples were collected periodically.

II.4.2.TCC reductive dechlorination under aerobic conditions

TCC aerobic reductive dechlorination was investigated by using experimental conditions previously applied for DCF (Boerma et al., 2014). Briefly, incubations were conducted in 1 mL 0.05 M phosphate buffer at pH 7.4 in presence of diethylenetriaminepentaacetic acid (DETAPAC, 0.5 mM). TCC and DCF were added as a stock solution in acetonitrile to reach a final concentration of $63 \text{ }\mu\text{M}$ (20 mg.L^{-1}). All reactions were performed in presence of $100 \text{ }\mu\text{M}$ reduced GSH, GST (1 U.mL^{-1}) with or without 20 U.mL^{-1} horseradish peroxidase (HRP). Reactions were started by addition of $50 \text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 and allowed to proceed for 10 d at 25°C . At selected time intervals, 1 mL sample was sacrificed. These samples were quenched by the addition of an equal volume of ice-cold methanol supplemented with 2% (v/v) 250 mM ascorbic acid in water to prevent further non-enzymatic oxidation after reactions were terminated. A centrifugation step was completed ($20,000 \text{ g}$, 20 min, at 4°C) to remove precipitated proteins and samples were subsequently analyzed by LC-HRMS. Non-enzymatic degradation was evaluated by use of heat inactivated GST (5 min at 95°C).

TCC was also incubated with GST and GSH upon Xenon lamp irradiation (Solarbox, Milano, Italy) in presence of ketoprofen to investigate if the one electron oxidation mediated by HRP may result from non-enzymatic reaction. For this purpose, 10 mL 0.05 M phosphate buffer at pH 7.4 containing $63 \text{ }\mu\text{M}$ TCC together with the same amount of ketoprofen used as a photosensitizer, $100 \text{ }\mu\text{M}$ GSH and 1 U.mL^{-1} GST were irradiated using a 1500 W Xenon lamp equipped with a 340 nm cut-off filter. Reactions were allowed to proceed during 9 h at 30°C . 500 μL samples were withdrawn at selected time intervals, quenched by the addition of an equal volume of ice-cold methanol supplemented with 2% (v/v) 250 mM ascorbic acid in water. A centrifugation step was completed ($20,000 \text{ g}$, 20 min, at 4°C) to remove precipitated

proteins and samples were subsequently analyzed by LC-HRMS. TCC direct photochemical degradation in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.4 was negligible after 10 h irradiation.

II.4.3. Degradation experiments analysis

TCC and its metabolites were analysed during in vitro degradation experiments using the analytical procedure implemented for sediments' analyses. Decrease in PCP concentrations during anaerobic experiments was measured using reversed-phase HPLC-UV (Dionex, Ultimate 3000, detection at 220 nm) in the isocratic mode of elution (20% water and 80% acetonitrile) and an Eclipse XDB C₈ column (150 x 3 mm i.d., 3.5 µm particle size from Agilent). DCF and its metabolites were analyzed on a C₁₈ analytical column with a mobile phase consisting of a binary mixture of water with 0.1% formic acid and acetonitrile at a flow rate of 0.3 mL.min⁻¹ coupled to electrospray HRMS operating in the positive mode of ionization. Chromatograms were acquired in the full scan mode of detection.

III. Results and discussion

III.1. Monitoring of 3,4'-DCC and 4,4'-DCC in river sediments

Based on a previous work focused on the determination of TCC and 4,4'-DCC in river sediments, TCC, 3,4'-DCC and 4,4'-DCC were analyzed in technical grade TCC and in different sediment samples collected downstream of three WWTPs at two different times. Targeted compounds were detected in all sediment samples and results are summarized in Table B1. TCC was quantified in the concentration range of 1–500 ng.g⁻¹ and both DCC isomers were quantified at concentrations ranging from 0.02 to 11.4 ng.g⁻¹. Significant higher TCC and DCC concentrations (Wilcoxon test; $p < 0.05$) reported in Sed3 can be explained by the higher organic content measured in Sed3 (Table B1) which may promote accumulation of TCC by adsorption processes (Agyin-Birikorang et al., 2010) and the high proportion of WWTP3 effluents in river which minimize in stream dilution. DCC was already known to be a manufacturing by-product with a reported DCC/TCC ratio of 0.2% in technical grade TCC (Sapkota et al., 2007), while this study showed that the 4,4'-DCC isomer contributes to the quasi total amount of DCC impurity in technical grade TCC with 4,4'-DCC/TCC and 3,4'-DCC/TCC ratio values of 0.20 and 0.04%, respectively. Both molar ratios were at least one order of magnitude higher in sediment samples even though a high variability was recorded between the different sampling sites. 3,4'-DCC/TCC increased from 0.04% in technical grade TCC to 0.1–47% range in sediment while 4,4'-DCC/TCC increased from 0.2 to 1.5–47% (Table B1).

Table B1. Triclocarban (TCC), 3,4'-dichlorocarbanilide (3,4'-DCC) and 4,4'-dichlorocarbanilide (4,4'-DCC) isomers concentrations (ng.g^{-1}) and molar 3,4'-DCC/TCC and 4,4'-DCC/TCC ratios (%) in technical grade triclocarban and in three sediment extracts collected downstream of three different domestic WWTPs at two different times. Organic matter contents (%) of the three sediment extracts are also reported.

		Concentrations (ng.g^{-1} dw \pm SD; n=3)					
Compound		Sed1		Sed2		Sed3	
		Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2
TCC	Technical grade TCC	0.17 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02	8.4 \pm 0.3	12.9 \pm 0.3	492 \pm 11	158 \pm 7
4,4'-DCC		0.06 \pm 0.005	0.08 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02	0.18 \pm 0.01	11.4 \pm 0.8	10.7 \pm 0.9
3,4'-DCC		0.06 \pm 0.005	0.08 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.02 \pm 0.001	2.9 \pm 0.2	3.3 \pm 0.6
		Molar ratio (% \pm SD; n=3)					
4,4'-DCC/TCC	0.2 \pm 0.09	43 \pm 4	47 \pm 7	1.5 \pm 0.2	1.6 \pm 0.1	2.6 \pm 0.6	7.6 \pm 2.2
3,4'-DCC/TCC	0.04 \pm 0.007	42 \pm 4	47 \pm 5	0.5 \pm 0.1	0.1 \pm 0.01	0.7 \pm 0.1	2.4 \pm 0.7
		Organic matter content (%)					
		4.55 \pm 0.04		6.46 \pm 0.06		7.40 \pm 0.03	

TCC and DCC were also analyzed in WWTPs effluents. DCC isomers were never detected in WWTPs effluents (Table SMB4) whereas TCC was detected in all samples at levels in the 174–253 ng.L⁻¹ range. Sediments were collected close to WWTPs outlet preventing from any TCC degradation in the river section between WWTP outlet and sampling site locations. Consequently, these results indicate for the first time that both DCC isomers are formed concomitantly in river sediments. In vitro experiments were then conducted to identify potential TCC dechlorination mechanisms and to intend to explain the formation of both DCC isomers *in situ*.

III.2.Reductive dechlorination of TCC under anaerobic conditions

III.2.1.Reductive dehalogenation through an electron transfer mechanism

TCC reductive dechlorination was first investigated using cyanocobalamin (vitamin B₁₂) which is known to mimic anaerobic microbial reductive dehalogenation (Cretnik et al., 2013). PCP was selected as a positive control since this compound was known to undergo reductive dechlorination to form 2,3,5,6-TCP and 2,4,5,6-TCP when vitamin B₁₂ is reduced to Co(I) oxidation state (vitamin B_{12s}) under anaerobic conditions in the presence of Ti(III) citrate (Smith, 1993). As expected, in presence of cyanocobalamin and under anaerobic conditions, PCP led to 2,4,5,6-TCP formation as proved by comparison with authentic standard (Fig. SMB3) allowing for the validation of experimental design effectiveness. In contrast, TCC was not degraded after two months incubations (results not shown). Recently, a mechanism has been proposed to explain reaction of aromatic halide with cyanocobalamin (Cooper et al., 2015). This mechanism includes a homolytic aromatic substitution (radical mechanism) in which dehalogenation is initiated through electron transfer from the Co(I) of vitamin B_{12s} to the halogen site. The regioselective removal of chlorine is governed by the least negative partial charge of the chlorine favoring reactions at ortho position in case of chloroanilines (Cooper et al., 2015), which might account for the lack of TCC reactivity in presence of cyanocobalamin due to the absence of chlorine at ortho position in this compound.

III.2.2.Reductive dehalogenation through a nucleophilic addition

Anaerobic reductive dehalogenation of TCC can also occur through hydrodehalogenation by hydride transfer reaction. Hydride species can be generated by anaerobic bacteria (Smolen, J. et al., 1999) or by chemical systems under anaerobic conditions (Scrivanti et al., 1998). During in vitro experiments, hydrodehalogenation pathway has readily led to TCC dechlorination using NaBH₄ in the presence of a Ni-phosphine as catalytic system to generate hydride (Fig. B1a). Degradation kinetic was fast as after 2 h already 50% of TCC

were transformed into DCC and the reaction was completed after 9 h (Fig. SMB4). The sum of both TCC and DCC led to a complete mass balance (Fig. SMB4) precluding the possibility of dechlorination beyond dichlorocarbanilide and the possibility of concomitant degradation pathways.

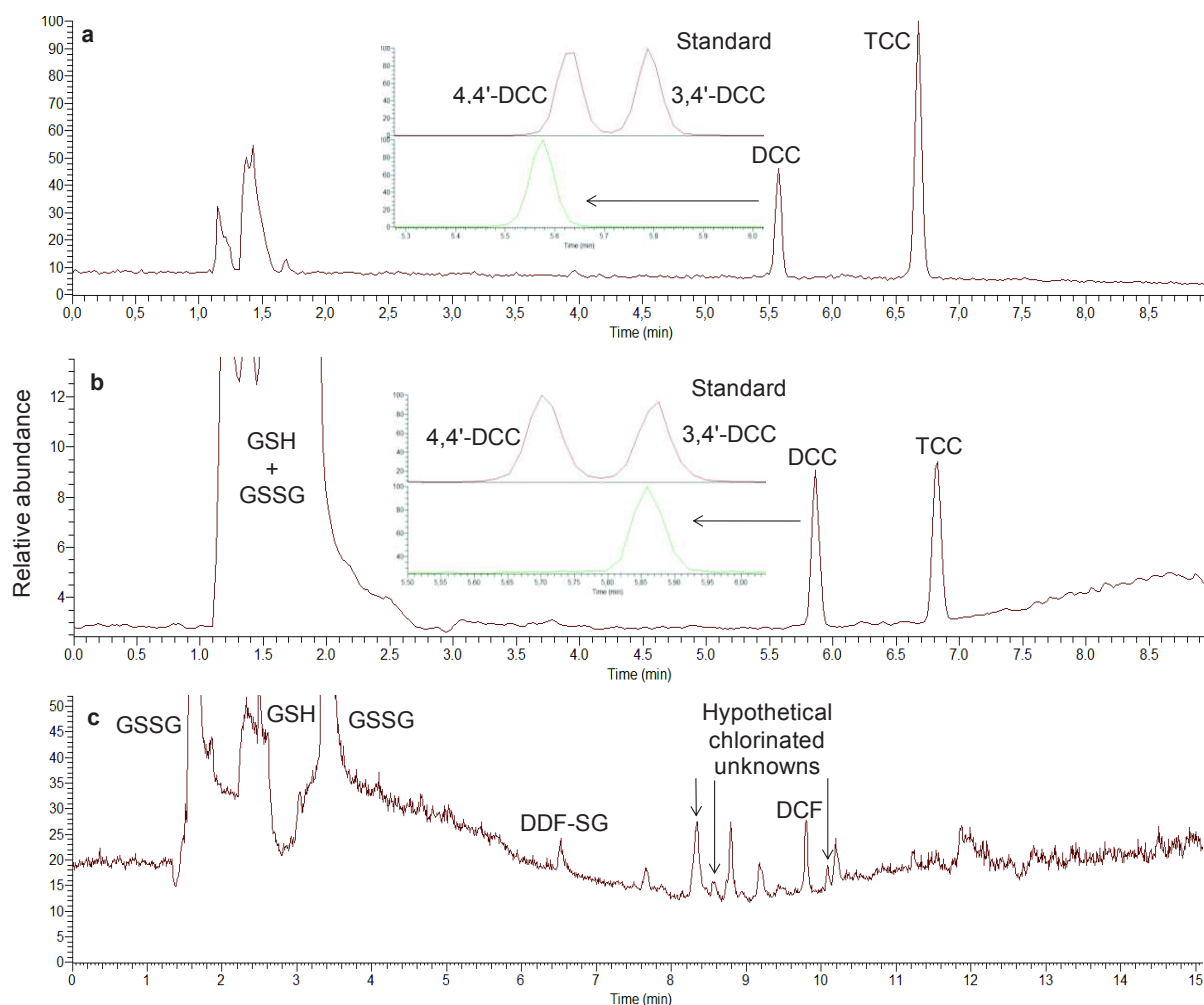
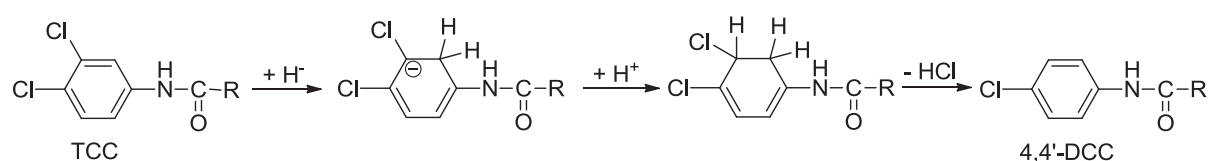


Figure B1. Total Ion Chromatograms (TIC) showing in a) Dechlorination of triclorcarban (TCC, m/z 312.971) into 4,4'-dichlorocarbanilide (4,4'-DCC, m/z 279.010) after 2 h incubation with NaBH₄ and NiCl₂(PPh₃)₂, b) Dechlorination of triclorcarban into 3,4'-dichlorocarbanilide (3,4'-DCC, m/z 279.010) after 5 d incubation upon glutathione S-transferase reactivity, c) Formation of 2'-(glutathion-S-yl)-deschloro-diclofenac adduct (DDF-SG, m/z 567.131) adduct after 8 h diclofenac incubation upon glutathione S-transferase reactivity.

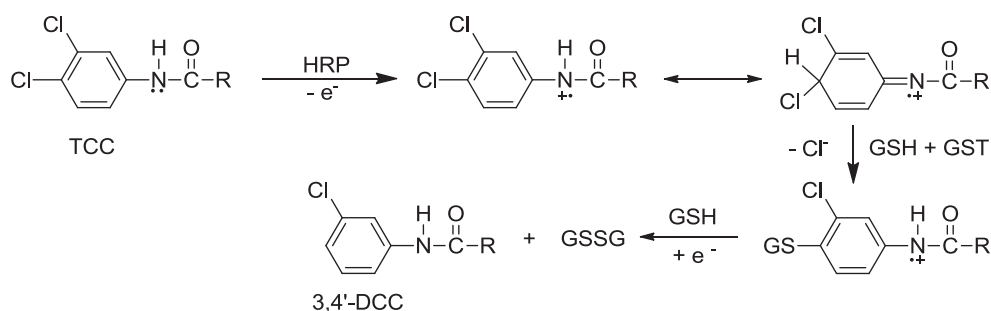
Experimental results revealed high regioselectivity as 4,4'-DCC was exclusively generated (Insert Fig. B1a). As far as chlorinated benzene is concerned, nucleophilic addition of hydride to benzene rings at unsubstituted sites might prevail over nucleophilic substitution due to lower activation energies in the former case leading to anionic σ -complex intermediates (see

Scheme B1A and Sadowsky et al., 2014). It is plausible that protonation occurs then at sites ortho to the hydride attack, where there are significant negative charges, which would allow for hydrodehalogenation by way of an E₂ elimination. When multiple unsubstituted sites are available, site adjacent to the maximum number of halogenated sites are preferred for hydride attack because the anionic σ -complex is stabilized by chlorine electron withdrawing effect (Sadowsky et al., 2014). This last observation implies hydride addition in 2' position for TCC due to N electron withdrawing effect in phenylurea structure in addition to chlorine electron withdrawing effect which explains the specific formation of 4,4'-DCC.

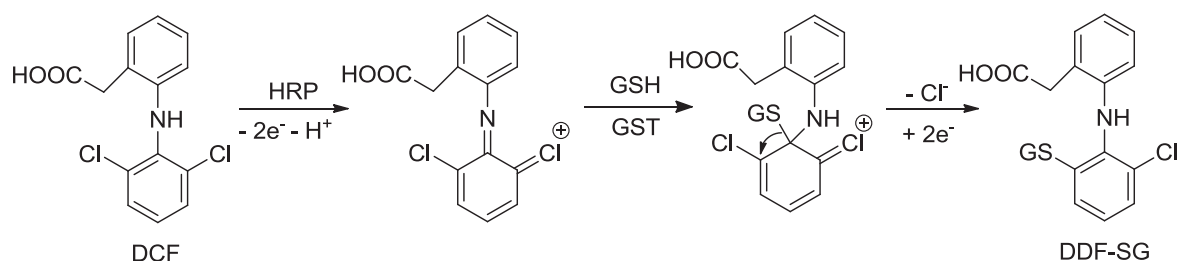
1A



1B



1C



Scheme B1. Proposed reaction mechanisms to account for triclorcarban reactivity with hydride (1A) and triclorcarban (1B) and diclofenac (1C) reactivity with glutathione S-transferase in presence of reduced glutathione and horseradish peroxidase.

The *in situ* formation of 4,4'-DCC isomer might also occur via nucleophilic addition mechanism potentially through microbial action as hydride can be generated by anaerobic bacteria but this last point will deserve further *in situ* investigation to be fully demonstrated.

III.3.Reductive dechlorination of TCC under aerobic conditions

To study possible aerobic TCC reductive dehalogenation, TCC was incubated under the same experimental conditions which induced DCF aerobic reductive dechlorination. TCC and DCF incubations were then conducted with HRP which is known to catalyze one electron-oxidation together with GST and GSH to proceed nucleophilic substitution. In this case, DCF was used as a positive control since it is known that DCF reductive dechlorination together with 2'-(glutathion-S-yl)-deschloro-diclofenac (DDF-SG) adduct formation occurred in such experimental conditions (Boerma et al., 2014). DDF-SG adduct was generated as expected (Fig. B1c and Fig. SMB5) in DCF incubations with the formation of three other unidentified chlorinated TPs (see MS spectra in Fig. SMB6) calling for concomitant transformation pathways. Ninety percent DCF transformation was reached in 36 h (Fig. SMB8c). However, contribution of side-reactions other than DCF dechlorination could not be ruled out because of the inability to identify all the TP and to measure DDF-SG concentrations due to the lack of analytical standard which prevented from any mass balance calculation.

Experimental results revealed the exclusive formation of 3,4'-DCC (insert Fig. B1b) in TCC incubations as 4,4'-DCC was never detected. The sum of both TCC and 3,4'-DCC led to a complete mass balance (Fig. SMB8a) indicating that 3,4'-DCC was the only TP formed ruling out any possibility of concomitant oxidative dehalogenation. Degradation kinetic was slow as 10 d were necessary to obtain $74 \pm 8\%$ of TCC conversion. The lack of formation of GSH-adduct during TCC dechlorination experiments prompts for different reaction mechanisms with respect to DCF while oxidized GSH (GSSG, identified using an analytical standard) was produced in both experiments.

No DCC formation was detected in absence of HRP or GST ruling out direct substitution of one chlorine of TCC by GSH. However, 3,4'-DCC formation in presence of GST and HRP but without H_2O_2 was still $58 \pm 6\%$ at the end of the incubation time with respect to experiments with H_2O_2 (Fig. SMB8b), suggesting that the electron-oxidation step mediated by HRP was non-enzymatic. A radical mechanism was suggested for TCC in which the first step might consist in one electron oxidation mediated by iron from prosthetic heme group in HRP (Scheme B1B). This step is anticipated for TCC because of the generation of an aromatic radical cation which can be stabilized by resonance and which is known to be prone to nucleophilic substitution. The nucleophilic attack might predominantly occur at the TCC 4-

chlorine position because this latter position has been activated by the electron oxidation step and is then more electrophilic than the 3-chlorine position due to resonance. The chlorine substitution might lead to a new aromatic radical cation in which GSH is bonded to the ring carbon. This radical cation is probably highly unstable and might be reduced by one electron equivalent followed by heterolytic cleavage of the GSH adduct and protonation to restore aromaticity. Consequently, this mechanism is supposed to lead preferentially to the formation of 3,4'-DCC.

Further evidence in favor of a radical mechanism in which TCC is activated by non-enzymatic one electron oxidation was provided with photochemical experiments. It is known that phenylurea undergo one electron transfer reaction with well defined excited triplet state such as aromatic ketones upon irradiation (Canonica et al., 2006). In this study, ketoprofen was selected to photogenerate its triplet state and oxidize TCC by prompting electron transfer from TCC to the ketone triplet state. In presence of GSH and GST, 3,4'-DCC formation was observed underlying the possibility for abiotic activation of TCC (Fig. SMB7 and SM8d).

In contrast, for DCF, a nucleophilic substitution mechanism might be suggested to explain DCF dechlorination and DDF-SG adduct formation (Scheme B1C). A first step might involve the formation of a halogenium reactive intermediate after oxidation followed by ipso addition of GSH at the imine moiety. The ipso GSH thiol attacks at the ortho-carbon through nucleophilic substitution mechanism and eventually leads to a loss of a halogen and GSH replacement as previously reported for other dichlorinated amines (Zhang et al., 2011).

The *in vitro* formation of 3,4'-DCC isomer required therefore TCC activation through oxidation under aerobic conditions before the chlorine at the *para* position could be eliminated through a nucleophilic substitution reaction. This mechanism might explain the specific 3,4'-DCC formation *in situ*. These reactions were performed with widespread environmental enzymes (HRP and GST), suggesting that the 3,4'-DCC *in situ* formation might be microbiologically conducted. But this latter issue will deserve further investigation.

III.4.Environmental implications

In vitro experiments showed that TCC dechlorination leads to specific 3,4'-DCC formation upon a two steps radical mechanism under aerobic conditions whereas 4,4'-DCC is specifically formed through nucleophilic addition under anaerobic conditions. Contrary to assumptions previously made by (Miller et al., 2008), TCC reductive dechlorination may not only occur *in situ* under anaerobic conditions and natural TCC attenuation probably does not require then deep sediment layer to occur. Measured total DCC/TCC and DCC isomers/TCC

ratios might be used to evaluate TCC degradation magnitude and the relative significance of both dechlorination pathways *in situ*. However this can be questioned if DCC isomers undergo further degradation and if different natural attenuation rates are contemplated between both DCC isomers in sediments. Consequently, the possibility for DCC degradation into MCC or NCC in sediments was explored. Thanks to the opportunity to perform a screening for suspected by-products by using LC-HRMS, the occurrence of MCC and NCC could be investigated in sediments in spite of the lack of an analytical standard but knowing that similar MDL to those recorded for TCC can be obtained in electrospray LC-MS (Pycke et al., 2014). MCC and NCC screening method was performed by reconstruction from high resolution full-scan chromatograms based on the exact mass of the expected $[M-H]^-$ ions with a mass window of ± 5 ppm and knowing the theoretical MCC chlorine characteristic isotopic pattern. MCC and NCC were never detected in the investigated samples suggesting that transformation of DCC into MCC was probably rate limiting in the TCC dechlorination process in the 3 studied sediments as reported previously (Venkatesan et al., 2012), prompting the DCC accumulation in sediment without consequences on the DCC isomers/TCC ratios values.

Consequently, DCC may be contemplated as a signature metabolite to indicate active TCC dechlorination in river because 1) it is only associated to TCC dechlorination processes, 2) DCC is commercialized but only as impurity at 0.2% level in technical grade TCC, and 3) transformation of DCC into MCC is probably the rate limiting step of TCC degradation. However, DCC/TCC ratios varied more than one order of magnitude between collection sites. A total DCC:TCC ratio of 1:1 was recorded in Sed1, a value which is close to that observed to occur in deep estuarine sediment (Miller et al., 2008) while total ratios in the range from 1:10 to 1:60 were recorded in partially oxygenated Sed2 and Sed3. These latter values are much closer to those found in fresh water lake sediments (Chiaia-Hernandez et al., 2013). These high differences and the impossibility to measure a mass balance in sediments clearly indicated that DCC/TCC ratios cannot be used as quantitative indicators but only provide excellent qualitative indication on the location of hot spot TCC degradation zones as already discussed (Jobelius et al., 2011). Similarly, the specific 3,4'-DCC/TCC and 4,4'-DCC/TCC ratio values may be used as an indicator of the relative qualitative significance of reductive dechlorination pathways. Results reported in Table B1 for these specific ratios (on a molar basis) shows for the first time that the dechlorination pathway leading to formation of 3,4'-DCC was significant in all collected river sediment samples.

IV. Conclusion

This work has enhanced our understanding on the fate of TCC in river sediments downstream of WWTPs discharges. TCC and DCC monitoring in effluents and river sediments showed that reductive dechlorination of TCC in river sediments leads to both formation of the 3,4'-DCC and 4,4'-DCC isomers. The determination of 3,4'-DCC/TCC and 4,4'-DCC/TCC ratios values in investigated river sediment samples supported for the first time the significance of the pathway leading to 3,4'-DCC formation. In vitro experiments demonstrated that 3,4'-DCC isomer might result of a two steps radical aerobic mechanism while a nucleophilic addition mechanism might explain the 4,4'-DCC isomer formation under anaerobic conditions. Further investigation is probably needed to fully demonstrate the occurrence of the hypothesized TCC dechlorination mechanisms *in situ*. Investigating the toxicity of the two DCC isomers, which accumulate in sediments, will be also requested for a better environmental risk assessment of TCC. This better understanding of TCC degradation might help Expert Committees in charge of PPCPs prioritization to assess the need for regulating TCC or to evaluate specific environmental sites which need to be controlled.

Supplementary Material

Characteristics of investigated WWTPs and field sites. Validation parameters of the analytical method developed for TCC and DCC determination in WWTPs effluents and their concentration data. PCP dechlorination experiment in presence of cyanocobalamin. TCC dechlorination experiment under xenon lamp irradiation in presence of ketoprofen, GST and GSH. Transformation products MS spectra. TCC degradation kinetics under anaerobic and aerobic conditions.

Acknowledgements

This research benefited from the support of the Chair VEOLIA ENVIRONNEMENT—HydroSciences: Risk analysis relating to emerging contaminants in water bodies. The ANRT is acknowledged for the PhD grant. Dalel Benali-Raclot and David Benanou from Veolia Research and Innovation are thanked for their support in this research and David Rosain and Frédérique Courant from HydroSciences are thanked for their technical assistance.

References

- Agyin-Birikorang, S., Miller, M., O'Connor, G.A., 2010. Retention-release characteristics of triclocarban and triclosan in biosolids, soils, and biosolids-amended soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1925–1933. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.251>.
- Boerma, J.S., Vermeulen, N.P.E., Commandeur, J.N.M., 2014. One-electron oxidation of diclofenac by human cytochrome P450s as a potential bioactivation mechanism for formation of 20-(glutathion-S-yl)-deschloro-diclofenac. *Chem. Biol. Interact.* 207, 32–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.11.001>.
- Canonica, S., Hellrung, B., Müller, P., Wirz, J., 2006. Aqueous oxidation of phenylurea herbicides by triplet aromatic ketones. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6636–6641, 0.1021/es0611238.
- Cha, J., Cupples, A.M., 2010. Triclocarban and triclosan biodegradation at field concentrations and the resulting leaching potentials in three agricultural soils. *Chemosphere* 81, 494–499. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.040>.
- Cha, J., Cupples, A.M., 2009. Detection of the antimicrobials triclocarban and triclosan in agricultural soils following land application of municipal biosolids. *Water Res.* 43, 2522–2530. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.004>.
- Chen, J., Ahn, K.C., Gee, N.A., Ahmed, M.I., Duleba, A.J., Zhao, L., Gee, S.J., Hammock, B.D., Lasley, B.L., 2008. Triclocarban enhances testosterone action: a new type of endocrine disruptor? *Endocrinology* 149, 1173–1179. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2007-1057>.
- Chiaia-Hernandez, A.C., Krauss, M., Hollender, J., 2013. Screening of lake sediments for emerging contaminants by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization and electrospray ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 47, 976–986. <http://dx.doi.org/10.1021/es303888v>.
- Cooper, M., Wagner, A., Wondrousch, D., Sonntag, F., Sonnabend, A., Brehm, M., Schüürmann, G., Adrian, L., 2015. Anaerobic microbial transformation of halogenated aromatics and fate prediction using electron density modeling. *Environ. Sci. Technol.* 49, 6018–6028. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.5b00303>.
- Cretnik, S., Thoreson, K.A., Bernstein, A., Ebert, K., Buchner, D., Laskov, C., Haderlein, S., Shouakar-Stash, O., Kliegman, S., McNeill, K., Elsner, M., 2013. Reductive dechlorination of TCE by chemical model systems in comparison to dehalogenating bacteria: insights from dual element isotope analysis ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$). *Environ. Sci. Technol.* 47, 6855–6863. <http://dx.doi.org/10.1021/es400107n>.

- Gautam, P., Carsella, J.S., Kinney, C.A., 2014. Presence and transport of the antimicrobials triclocarban and triclosan in a wastewater-dominated stream and freshwater environment. *Water Res.* 48, 247–256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.032>.
- Halden, R.U., Paull, D.H., 2005. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in U.S. water resources. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1420–1426. <http://dx.doi.org/10.1021/es049071e>.
- Heidler, J., Sapkota, A., Halden, R.U., 2006. Partitioning, persistence, and accumulation in digested sludge of the topical antiseptic triclocarban during wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3634–3639.
- Higgins, C.P., Paesani, Z.J., Chalew, T.E.A., Halden, R.U., Hundal, L.S., 2011. Persistence of triclocarban and triclosan in soils after land application of biosolids and bioaccumulation in *Eisenia foetida*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 556–563. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.416>.
- Jobelius, C., Ruth, B., Griebler, C., Meckenstock, R.U., Hollender, J., Reineke, A., Frimmel, F.H., Zwiener, C., 2011. Metabolites indicate hot spots of biodegradation and biogeochemical gradients in a high-resolution monitoring well. *Environ. Sci. Technol.* 45, 474–481. <http://dx.doi.org/10.1021/es1030867>.
- Kwon, J.W., Xia, K., 2012. Fate of triclosan and triclocarban in soil columns with and without biosolids surface application. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 262–269. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.1703>.
- Lozano, N., Rice, C.P., Ramirez, M., Torrents, A., 2013. Fate of triclocarban, triclosan and methyltriclosan during wastewater and biosolids treatment processes. *Water Res.* 47, 4519–4527. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.015>.
- Meggo, R.E., Schnoor, J.L., Hu, D., 2013. Dechlorination of PCBs in the rhizosphere of switchgrass and poplar. *Environ. Pollut.* 178, 312–321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.035>.
- Miller, T.R., Colquhoun, D.R., Halden, R.U., 2010. Identification of wastewater bacteria involved in the degradation of triclocarban and its non-chlorinated congener. *J. Hazard. Mater.* 183, 766–772. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.092>.
- Miller, T.R., Heidler, J., Chillrud, S.N., DeLaquil, A., Ritchie, J.C., Mihalic, J.N., Bopp, R., Halden, R.U., 2008. Fate of triclosan and evidence for reductive dechlorination of triclocarban in estuarine sediments. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4570–4576. <http://dx.doi.org/10.1021/es702882g>.
- Nelson, J.L., Jiang, J., Zinder, S.H., 2014. Dehalogenation of chlorobenzenes, dichlorotoluenes, and tetrachloroethene by three dehalobacter spp. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3776–3782. <http://dx.doi.org/10.1021/es4044769>.
- NF EN 12879, 2000. Caractérisation des boues - Détermination de la perte au feu de la matière sèche.

- Pycke, B.F.G., Roll, I.B., Brownawell, B.J., Kinney, C.A., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Halden, R.U., 2014. Transformation products and human metabolites of triclocarban and triclosan in sewage sludge across the United States. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7881–7890. <http://dx.doi.org/10.1021/es5006362>.
- Robrock, K.R., Koryt_ar, P., Alvarez-Cohen, L., 2008. Pathways for the anaerobic microbial debromination of polybrominated diphenyl ethers. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2845–2852. <http://dx.doi.org/10.1021/es0720917>.
- Sadowsky, D., McNeill, K., Cramer, C.J., 2014. Dehalogenation of aromatics by nucleophilic aromatic substitution. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10904–10911. <http://dx.doi.org/10.1021/es5028822>.
- Sapkota, A., Heidler, J., Halden, R.U., 2007. Detection of triclocarban and two cocontaminating chlorocarbanilides in US aquatic environments using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environ. Res.* 103, 21–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2006.03.006>.
- Scrivanti, A., Vicentini, B., Beghetto, V., Chessa, G., Matteoli, U., 1998. Hydrodehalogenation of aromatic chlorides with NaBH₄, in the presence of Ni(0) catalysts. *Inorg. Chem. Commun.* 1, 246–248.
- Smith, M.H., 1993. Thesis: Reductive Dechlorination of Chlorophenols by Vitamin B12.
- Smith, M.H., Woods, S.L., 1994. Comparison of reactors for oxygen-sensitive reactions : reductive dechlorination of chlorophenols by vitamin B12s. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4107–4411.
- Smolen, J., Weber, E., Tratnyek, P., 1999. Molecular probe techniques for the identification of reductants in sediments: evidence for reduction of 2-chloroacetophenone by hydride transfer. *Env. Sci. Technol.* 33, 440–445.
- Sood, S., Choudhary, S., Wang, H.C.R., 2013. Induction of human breast cell carcinogenesis by triclocarban and intervention by curcumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438, 600–606. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.009>.
- Souchier, M., Benali-Raclot, D., Benanou, D., Boireau, V., Gomez, E., Casellas, C., Chiron, S., 2014. Screening triclocarban and its transformation products in river sediment using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry. *Sci. Total Environ.* 502C, 199–205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.108>.
- Venkatesan, A.K., Pycke, B.F.G., Barber, L.B., Lee, K.E., Halden, R.U., 2012. Occurrence of triclosan, triclocarban, and its lesser chlorinated congeners in Minnesota freshwater sediments collected near wastewater treatment plants. *J. Hazard. Mater.* 229–230, 29e35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.049>.

- Wang, S., Wang, X., Poon, K., Wang, Y., Li, S., Liu, H., Lin, S., Cai, Z., 2013. Removal and reductive dechlorination of triclosan by *Chlorella pyrenoidosa*. *Chemosphere* 92, 1498–1505. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.067>.
- Wu, C., Spongberg, A.L., Witter, J.D., 2009. Adsorption and degradation of triclosan and triclocarban in soils and biosolids-amended soils. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4900–4905. <http://dx.doi.org/10.1021/jf900376c>.
- Ying, G.G., Yu, X.Y., Kookana, R.S., 2007. Biological degradation of triclocarban and triclosan in a soil under aerobic and anaerobic conditions and comparison with environmental fate modelling. *Environ. Pollut.* 150, 300–305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2007.02.013>.
- Zhang, C., Kenny, J.R., Le, H., Deese, A., Ford, K.A., Lightning, L.K., Fan, P.W., Driscoll, J.P., Halladay, J.S., Hop, C.E.C.A., Khojasteh, S.C., 2011. Novel mechanism for dehalogenation and glutathione conjugation of dihalogenated anilines in human liver microsomes : evidence for ipso glutathione addition. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1668–1677. <http://dx.doi.org/10.1021/tx2002228>.
- Zhao, J.L., Ying, G.G., Liu, Y.S., Chen, F., Yang, J.F., Wang, L., 2010. Occurrence and risks of triclosan and triclocarban in the Pearl River system, South China: from source to the receiving environment. *J. Hazard. Mater* 179, 215–222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.082>

Supplementary material

Table SMB1. Characteristics and operating conditions of the investigated WWTPs.

	WWTP1	WWTP2	WWTP3
Purification steps	M/B/N/D/P	M/B/N/D/P	M/B/N/D/P/MB
Population served (PE)	140 300	32 083	20 000
Average flow (m³/d)	9311	4819	1566
DCO flow (kg/d)	254.1	123.2	26.8
Significant sources	1 hospital	1 hospital	
Sampling periods	23 Aug 2013 and 27 Nov 2013	23 Aug 2013 and 27 Nov 2013	23 Aug 2013 and 27 Nov 2013
Sediment sample name	Sed1	Sed2	Sed3

M mechanical, *B* biological, *N* nitrification, *D* denitrification, *P* phosphorus removal, *MB* membrane bioreactor.

Table SMB2. Site characteristics and other physicochemical properties.

Station Name	Sampling Date	Weather at sampling time	Air Temp (°C)	Dissolved oxygen (mg.L ⁻¹)	pH	Water Temp (°C)
Sed1	2013-08-23	Sunny, Wind < 15 km/h	33.5°C	4.2	6.8	22.2
Sed1	2013-11-27	Sunny, Wind < 15 km/h	10.4°C	4.6	7.2	11.8
Sed2	2013-08-23	Sunny, Wind < 15 km/h	32.2°C	5.5	6.9	25.7
Sed2	2013-11-27	Sunny, Wind < 15 km/h	12.6°C	6.3	7.1	13.2
Sed3	2013-08-23	Sunny, Wind < 15 km/h	39.2°C	9.2	6.5	27.0
Sed3	2013-11-27	Sunny, Wind < 15 km/h	8.5°C	9.6	5.7	12.9

Table SMB3. Performance of the analytical method developed to quantify TCC and DCC in effluents.

Analyte	Experimental mass [M-H] ⁻	Absolute recoveries ^a (% , n=5)			MDL (ng.L ⁻¹)	MQL (ng.L ⁻¹)	Linéarité ^b
TCC	312.9697	82	±	4	1.2	3.9	> 0.99
DCC	279.0086	90	±	5	0.5	1.7	> 0.99

^aSpiking level: 200 ng.L⁻¹.

^bLinearity measured in the 20 - 2000 ng.L⁻¹ range .

Table SMB4. TCC and DCC concentrations measured in WWTPs effluents in fall 2013.

Analyte	Concentrations (ng.L ⁻¹ , mean ± SD, n = 3)								
	WWTP1			WWTP2			WWTP3		
TCC	253	±	42	174	±	15	230	±	40
DCC	< MDL			< MDL			< MDL		

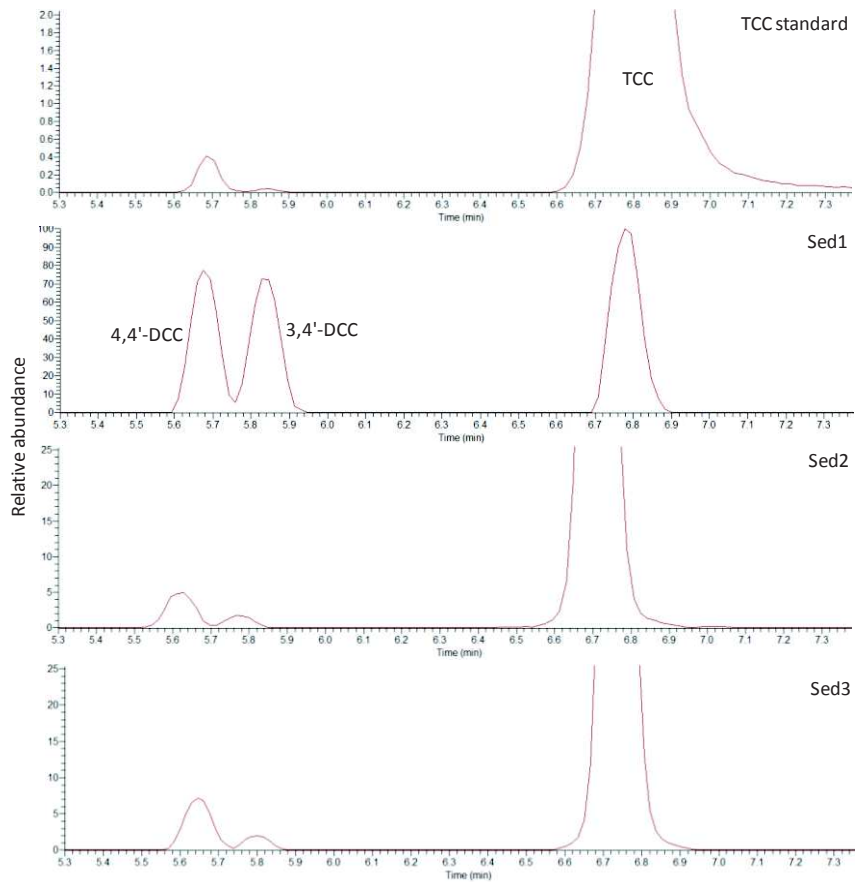


Figure SMB1. Representative Extracted Ion Chromatograms (EIC) corresponding to the analysis of the technical grade triclocarban standard and Sed1, Sed2, Sed3 sediment extracts in which 4,4'-DCC, 3,4'-DCC (both at $m/z = 279.010$) and TCC ($m/z = 312.970$) were detected.

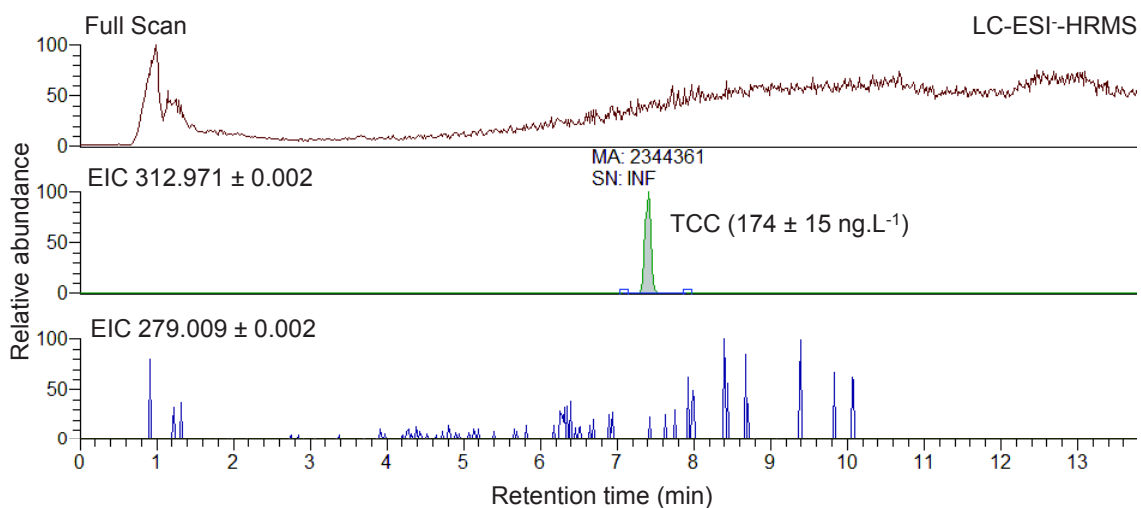


Figure SMB2. Representative Extracted Ion Chromatograms (EIC) corresponding to the analysis of an effluent extract from WWTP2 in which TCC ($m/z = 312.970$) was detected but where DCC ($m/z = 279.010$) was not detected.

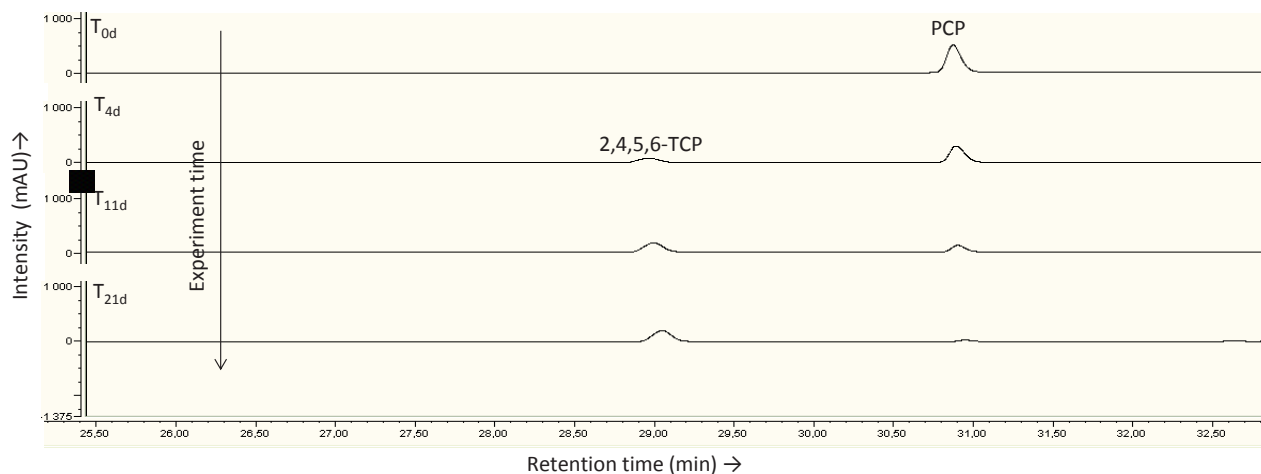


Figure SMB3. HPLC-UV chromatogram (220 nm) showing PCP dechlorination in 2,4,5,6-TCP in presence of cyanocobalamin at different sampling times (T₀, T₄, T₁₁ and T₂₁ d).

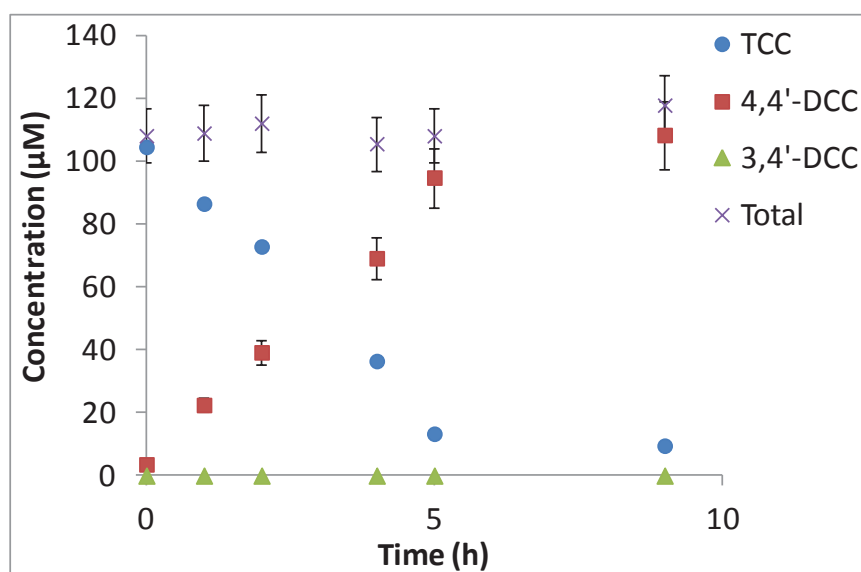


Figure SMB4. a) TCC degradation kinetic upon hydride reactivity in presence of NaBH₄ and Ni-phosphine leading to the formation of 4,4'-DCC (100%).

Identification of transformation products (TPs).

Unknown TPs identification was carried out by comparing experimental and theoretical molecular masses with a mass error below 5 ppm and by comparing their chlorine isotopic patterns with the theoretical ones. This latter criteria was relevant for the identification of the adduct between glutathione and diclofenac (DDF-SG, Figure SMB5 a and b).

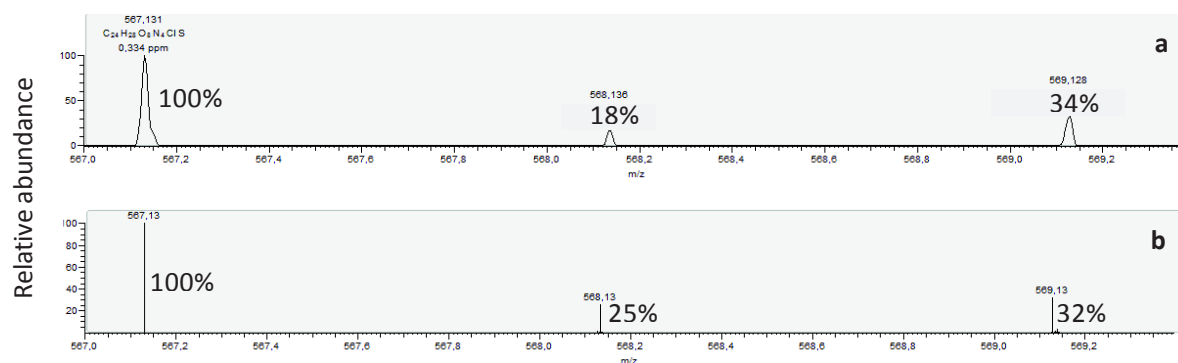


Figure SMB5. a) DDF-SG $[M+H]^+$ ion chlorine isotopic pattern in DCF incubations upon GST reactivity with a relative ratio of 100/18/34 between the three detected isotopic ions; b) DDF-SG theoretical $[M+H]^+$ ion chlorine isotopic pattern with a relative ratio of 100/25/32 between the three main isotopic ions.

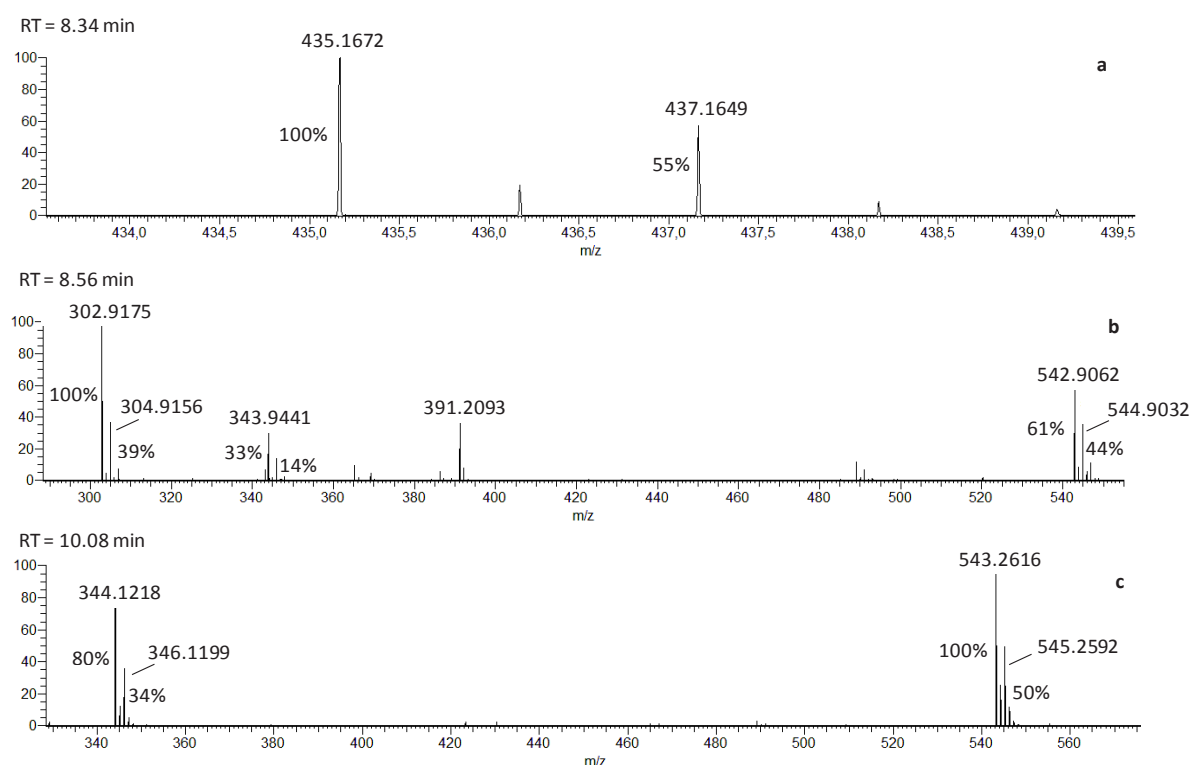


Figure SMB6. $[M+H]^+$ ion accurate masses and their chlorine isotopic patterns of unknown potentially chlorinated compounds detected in DCF degradation experiments upon GST reactivity at RT of a) 8.34 min; b) 8.56 min; c) 10.08 min. For the Total Ion Chromatogram, see Figure B1c in the manuscript.

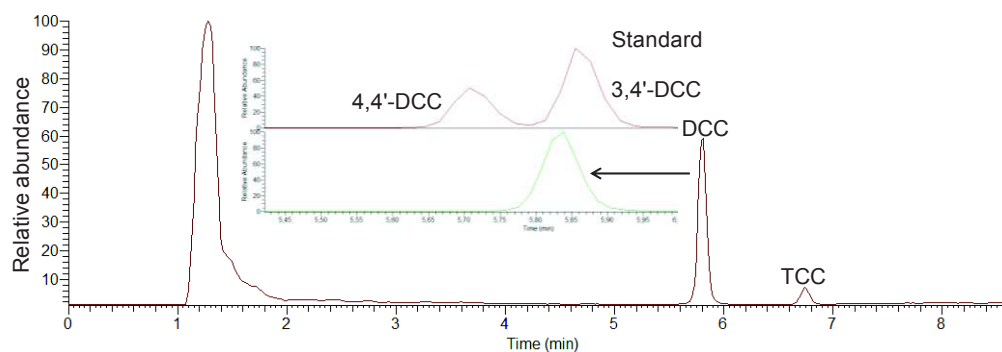


Figure SMB7. Total Ion Chromatogram (TIC) showing dechlorination of TCC ($m/z = 312.971$) into 3,4'-DCC ($m/z = 279.010$) under xenon lamp irradiation in presence of ketoprofen, GST and GSH after 5 h experiment.

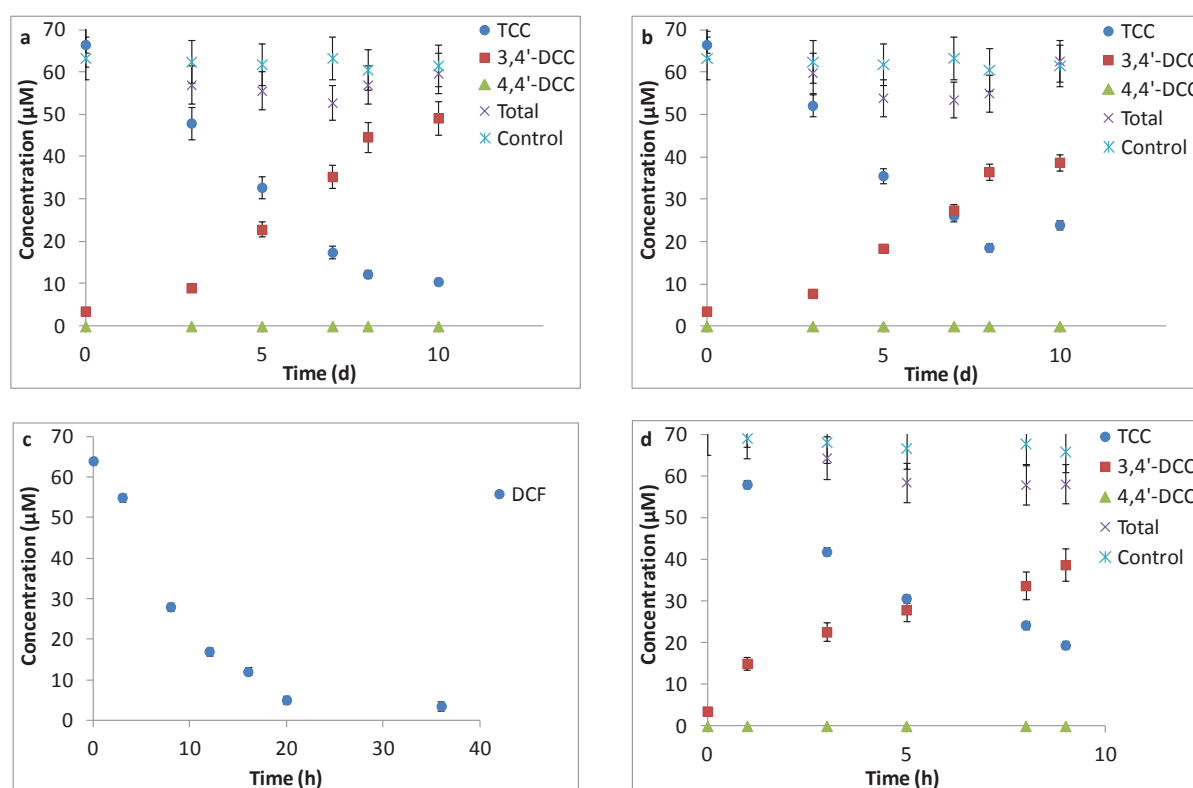


Figure SMB8. a) TCC degradation kinetic upon GST reactivity in presence of HRP, H_2O_2 and GSH leading to the formation of 3,4'-DCC (74%); b) TCC degradation kinetic upon GST reactivity in presence of HRP and GSH but without H_2O_2 leading to the formation of 3,4'-DCC (58%). For both a) and b), the total corresponds to the mass balance (sum of TCC and both DCC isomers) and the control corresponds to TCC degradation upon heat inactivation of GST; c) DCF degradation kinetic upon GST reactivity in presence of HRP, H_2O_2 and GSH; d) TCC degradation kinetic under xenon lamp irradiation in presence of ketoprofen, GST and GSH leading to the formation of 3,4'-DCC (53%). The total corresponds to the mass balance (sum of TCC and both DCC isomers) and the control corresponds to TCC degradation under dark conditions.

2.4. Conclusions sur le triclocarban

Le fait que la déchloration réductive du TCC s'effectue selon deux mécanismes réactionnels distincts dans l'environnement rend complexe l'utilisation de ce composé pour étudier l'outil isotopique. En effet, le fractionnement isotopique du chlore mesuré au cours de la biodégradation du TCC *in situ* correspondra à une résultante des variations isotopiques engendrées par chaque mécanisme de déchloration. Dans ces conditions, l'ampleur du fractionnement isotopique mesurée sera dépendante de la contribution de chaque mécanisme de déchloration et l'application de l'équation de Rayleigh ne conduira plus à une relation linéaire entre biodégradation et fractionnement isotopique. Ainsi, le TCC ne constitue pas un candidat d'étude approprié. Qu'en est-il des deux molécules d'étude restantes ?

3. Evaluation du fractionnement isotopique du chlore à l'aide du diclofenac (DCF)

3.1. Description des méthodes d'analyse du DCF dans les sédiments et les effluents de STEP

3.1.1. Préparation des échantillons

Le DCF et ses métabolites déchlorés ont été extraits des sédiments et des effluents en appliquant les mêmes méthodes d'extraction que celles préalablement décrites pour le TCC (Souchier et al., 2014 et partie 2.2). L'étalon interne (DCF-d4) a été ajouté dans les sédiments (10 ng/g) et les effluents (200 ng/L) avant extraction.

3.1.2. Paramètres de la méthode d'analyse LC-HRMS

Les extraits d'effluents et de sédiments ont été analysés par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse Exactive Orbitrap (ThermoFisher Scientific, USA) (Tableau 14 et 15). Etant donné qu'aucun étalon n'est disponible dans le commerce pour les métabolites déchlorés du DCF, la méthode d'analyse LC-HRMS a été validée pour le DCF seul. Les métabolites déchlorés ont ensuite été recherchés pour masse exacte dans les échantillons environnementaux.

Tableau 14. Conditions chromatographiques appliquées pour l'analyse du DCF et de ses métabolites déchlorés dans les sédiments et les effluents de STEP.

Colonne	C18 Xterra (150 x 2,1 mm ; 3,5 µm)	
Température de la colonne	25°C	
Phases mobiles	A : Eau + 0,1 % acide formique B : Acétonitrile (ACN) + 0,1 % acide formique	
	Temps (minutes)	% B
	0	10
Gradient	20	100
	25	100
	25,1	10
	35	10
Durée de l'analyse	35 minutes	
Débit	0,2 mL/min	
Volume injecté	10 µL	
Solvant d'injection	EMQ/ACN 90/10	

Le DCF engendre un meilleur signal en mode d'ionisation négatif en spectrométrie de masse alors que certains métabolites du DCF sont susceptibles d'être mieux détectés en mode positif (Boerma et al., 2014). L'approche retenue a donc été d'utiliser deux méthodes avec des conditions opératoires identiques (solvant de reprise, phases mobiles) pour injecter chaque échantillon deux fois successivement, une fois en mode positif et une fois en mode négatif. Cela explique l'emploi, non habituel, de phases mobiles acidifiées en mode d'ionisation négatif. Malgré la présence d'acide, la sensibilité obtenue pour le DCF en mode négatif est restée satisfaisante. Le Tableau 15 présente les paramètres de l'interface électrospray du spectromètre de masse appliqués pour chaque mode d'ionisation utilisé.

Tableau 15. Paramètres de masse appliqués en modes positif et négatif pour l'analyse du DCF et ses métabolites déchlorés dans les sédiments et les effluents de STEP.

Mode d'ionisation	ESI⁻	ESI⁺
Tension du capillaire	-65 V	65 V
Tension de l'électrospray	3,4 V	3,5 V
Tension de l'extracteur	-14 V	14 V
Tension des lentilles RF	-90 V	90 V
Température du capillaire	300°C	300°C
Température source	200°C	200°C
Débit du « sheath gas »	35 L/min	35 L/min
Débit du « auxiliary gas »	10 L/min	10 L/min
Débit du « sweep gas »	0 L/min	0 L/min

Les données ont été acquises en balayage complet sur une échelle de masses comprises entre 80 et 900 m/z, en appliquant un pouvoir de résolution nominal de 50 000 and un contrôle de gain automatique de 5×10^5 et en alternant en continu une acquisition sans fragmentation et une acquisition avec une fragmentation à 70 eV dans la cellule de collision HCD.

3.2. Validation des méthodes d'analyse du DCF dans les sédiments et les effluents de STEP

Les méthodes d'analyse du DCF dans les sédiments et les effluents ont été validées seulement pour le mode d'ionisation négatif puisque le mode positif a été utilisé essentiellement d'un point de vue qualitatif pour détecter les métabolites déchlorés. Les

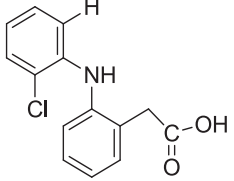
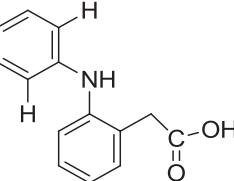
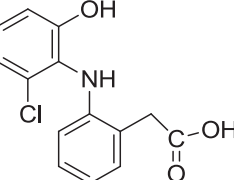
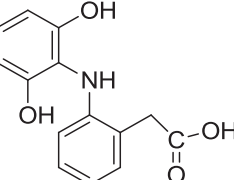
paramètres de masse utilisés pour détecter et quantifier le DCF en mode d'ionisation négative ont été les suivants :

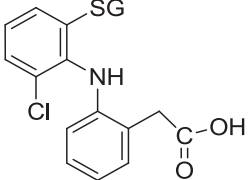
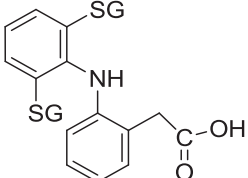
Tableau 16. Paramètres utilisés pour détecter et quantifier le DCF en LC-ESI⁻-HRMS.

Composé	Formule [M-H] ⁻	RT ± 0.5 (min)	Masse théorique [M-H] ⁻	Masse expérimentale [M-H] ⁻	Décalage de masse Δppm	Masse de l'ion MS/MS
DCF	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NO ₂	16,9	294,0083	294,0101	6,0	250,020

Les paramètres de masse utilisés pour identifier les métabolites du DCF en modes positif et négatif sont présentés dans le Tableau 17.

Tableau 17. Paramètres de masse utilisés pour rechercher les métabolites déchlorés du DCF dans les sédiments et les effluents de STEP en LC-ESI⁻-HRMS et LC-ESI⁺-HRMS.

Composé	Structure chimique	Formule chimique	Masse théorique recherchée en LC-ESI ⁻ -HRMS	Masse théorique recherchée en LC-ESI ⁺ -HRMS
DCF - 1 Cl + 1 H		C ₁₄ H ₁₂ ClNO ₂	260,0472	262,0629
DCF - 2 Cl + 2 H		C ₁₄ H ₁₃ NO ₂	226,086	228,102
DCF - 1 Cl + 1 OH		C ₁₄ H ₁₂ ClNO ₃	276,042	278,058
DCF - 2 Cl + 2 OH		C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	258,076	260,092

DCF - 1 Cl + 1 GS		$C_{14}H_{11}ClNO_2GS$	565,115	567,131
DCF - 2 Cl + 2 GS		$C_{14}H_{11}NO_2GS_2$	836,222	838,238

Les paramètres de validation mesurés pour le DCF seul en mode d'ionisation négatif sont présentés dans le Tableau 18.

Tableau 18. Paramètres de validation de la méthode d'analyse LC-ESI-HRMS du DCF dans les sédiments et les effluents de STEP.

Paramètres instrumentaux				Effluents			
Composé	Fidélité (%)	IDL (µg/L)	IQL (µg/L)	Rendement d'extraction absolu ^a (% , n = 5)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	Linéarité ^b
DCF	< 5	0,1	0,42	70 ± 6	1,7	5,1	> 0,99

Sédiments				
Composé	Rendement d'extraction absolu ^c (% , n = 5)	MDL (ng/g)	MQL (ng/g)	Linéarité ^d
DCF	78 ± 5	0,08	0,24	>0,99

^aNiveau de dopage des effluents avant extraction : 200 ng/L.

^bLinéarité calculée entre 4 et 400 ng/L (concentrations dans les effluents avant extraction).

^cNiveau de dopage des sédiments avant extraction : 10 ng/g.

^dLinéarité calculée entre 0,2 et 20 ng/g (concentrations dans les sédiments avant extraction).

Les rendements obtenus sont satisfaisants puisque supérieurs à 75 % et les limites de quantification de la méthode sont de 5,1 ng/L pour les effluents et 0,24 ng/g pour les sédiments et donc adaptées à l'analyse du DCF à l'état de traces.

3.3. Résultats d'occurrence obtenus et conclusions sur le DCF

Les méthodes d'analyse validées ont été appliquées à l'analyse du DCF et de ses métabolites déchlorés potentiels dans les effluents (novembre 2013) et les sédiments (août et novembre 2013) collectés sur les trois sites d'étude sélectionnés (Tableau 19). Un chromatogramme correspondant aux analyses du DCF dans les effluents et les sédiments du site 3 est présenté Figure 33.

Tableau 19. Concentrations en DCF mesurées dans les effluents de STEP et les sédiments collectés sur les 3 sites d'étude.

Composé	Sédiments (ng/g, moyenne ± écart type, n = 3)					
	Site 1		Site 2		Site 3	
	Août 2013	Nov 2013	Août 2013	Nov 2013	Août 2013	Nov 2013
DCF	2,6 ± 0,2	3,5 ± 0,3	3,2 ± 0,04	5,2 ± 0,06	12,6 ± 1,4	15,3 ± 3,7

Composé	Effluents (ng/L, moyenne ± écart type, n = 3)		
	STEP 1	STEP 2	STEP 3
DCF	27,5 ± 2,1	13,6 ± 3,3	9,8 ± 1,2

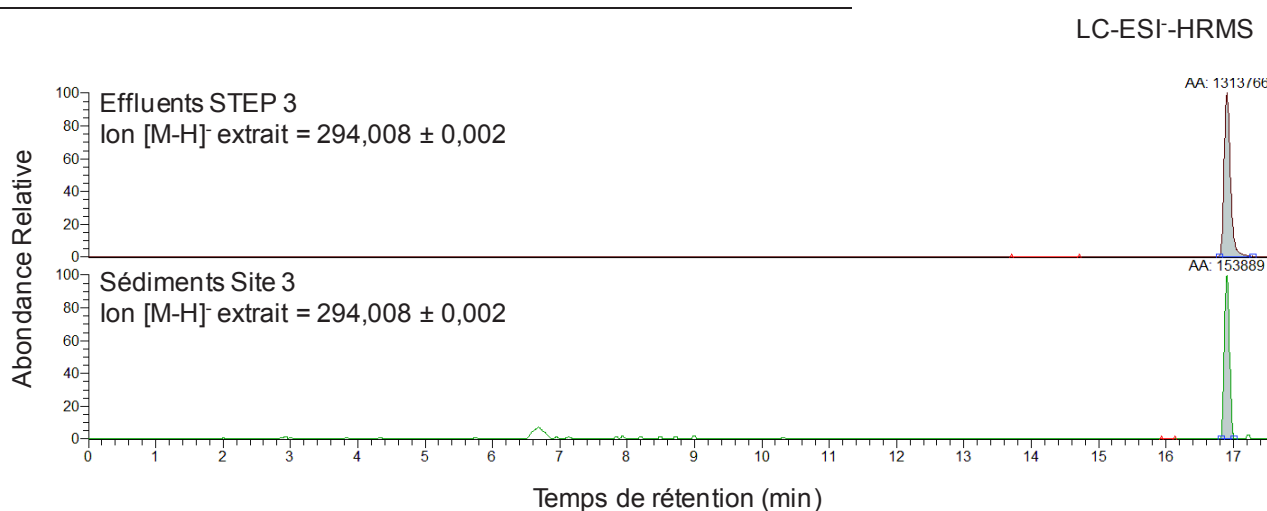


Figure 33. Chromatogrammes LC-ESI-HRMS correspondant à l'analyse du DCF (294,008) dans un échantillon d'effluents de la STEP 3 et un échantillon de sédiments prélevé en aval de cette STEP.

Les concentrations en DCF sont de 2,6–15,3 ng/g dans les sédiments et de 9–27 ng/L dans les effluents. Les métabolites déchlorés potentiels (Tableau 17) ont été recherchés par masse exacte dans l'ensemble des matrices étudiées mais n'ont pu être identifiés.

Ces résultats indiquent l'absence de biodégradation significative du DCF via une déchloration réductive, réaction pourtant observée en laboratoire par voie enzymatique (Boerma et al., 2014). Ainsi, le DCF ne convient pas à l'étude du fractionnement isotopique du chlore.

4. Evaluation du fractionnement isotopique du chlore à l'aide du triclosan (TCS)

4.1. Déchloration réductive du triclosan dans les sédiments en aval de STEP

4.1.1. Description des méthodes d'analyse du TCS dans les sédiments et les effluents de STEP

Le TCS et ses métabolites déchlorés ont été extraits et analysés en LC-ESI⁻HRMS dans les sédiments et les effluents de STEP des trois sites étudiés en appliquant les mêmes méthodes que celles préalablement décrites pour le TCC (Souchier et al., 2014 et partie 2.2). L'étalon interne (TCS-d3) a été ajouté avant extraction dans les sédiments (10 ng/g) et les effluents (200 ng/L) pour corriger les effets matriciels et les pertes générées par les étapes d'extraction.

4.1.2. Validation des méthodes d'analyse du TCS dans les sédiments et les effluents de STEP

Concernant les métabolites déchlorés du TCS, seul l'étalon d'un isomère du diclosan (DCS) était disponible dans le commerce. Les méthodes d'analyse ont donc été validées exclusivement pour le TCS et le DCS. Les autres métabolites potentiels du TCS, à savoir ceux issus d'une perte de 2 ou 3 chlores via un processus de déchloration réductive ou ceux issus d'une déchloration oxydative, ont été recherchés par masse exacte dans les chromatogrammes résultant de l'analyse des échantillons environnementaux.

Les paramètres de masse utilisés pour détecter et quantifier le TCS et le DCS en LC-ESI⁻HRMS sont reportés dans le Tableau 20.

Tableau 20. Paramètres utilisés pour détecter et quantifier le TCS et le DCS en LC-ESI⁻HRMS.

Composé	Formule [M-H] ⁻	RT ± 0.5 (min)	Masse théorique [M-H] ⁻	Masse expérimentale [M-H] ⁻	Décalage de masse Δppm
TCS	C ₁₂ H ₆ Cl ₃ O ₂	7,4	286,9427	286,9445	5,8
DCS	C ₁₂ H ₇ Cl ₂ O ₂	6,8	252,9817	252,9831	5,3

Les paramètres de validation des méthodes d'analyse du TCS et du DCS dans les sédiments et les effluents sont reportés dans le Tableau 21.

Tableau 21. Paramètres de validation de la méthode d'analyse LC-ESI-HRMS du TCS et du DCS dans les sédiments et les effluents de STEP.

Paramètres instrumentaux				Effluents			
Composé	Fidélité (%)	IDL (µg/L)	IQL (µg/L)	Rendement d'extraction absolu ^a (% , n = 5)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	Linéarité ^b
TCS	< 5	1,4	4,8	90 ± 6	6,2	21	>0,99
DCS	< 5	1,1	4,2	87 ± 4	5,1	19	>0,99

Sédiments				
Composé	Rendement d'extraction absolu ^c (% , n = 5)	MDL (ng/g)	MQL (ng/g)	Linéarité ^d
TCS	97 ± 6	0,08	0,26	>0,99
DCS	88 ± 5	0,07	0,23	>0,99

^aNiveau de dopage des effluents avant extraction : 200 ng/L.

^bLinéarité calculée entre 4 et 400 ng/L (concentrations dans les effluents avant extraction).

^cNiveau de dopage des sédiments avant extraction : 5 et 20 ng/g.

^dLinéarité calculée entre 0,2 et 20 ng/g (concentrations dans les sédiments avant extraction).

Les rendements obtenus sont satisfaisants puisque supérieurs à 80 % et les limites de quantification de la méthode sont comprises entre 19 et 21 ng/L pour les effluents et 0,23 et 0,26 ng/g pour les sédiments et donc adaptées à l'analyse du TCS et du DCS à l'état de traces.

4.1.3. Résultats d'occurrence obtenus

Les méthodes LC-HRMS validées ont été appliquées pour analyser le TCS et ses métabolites déchlorés dans les mêmes effluents et sédiments que ceux utilisés pour étudier

la déchloration réductive du TCC et du DCF. Les concentrations en TCS et DCS mesurées sont reportées dans le Tableau 22 et un chromatogramme correspondant aux analyses du TCS et DCS dans les effluents et les sédiments du site 3 est présenté Figure 34.

Tableau 22. Concentrations en TCS et DCS mesurées dans les sédiments et les effluents collectés sur les 3 sites d'étude.

Composé	Sédiments (ng/g, moyenne ± écart type, n = 3)					
	Site 1		Site 2		Site 3	
	Août 2013	Nov 2013	Août 2013	Nov 2013	Août 2013	Nov 2013
TCS	0,31 ± 0,03	0,45 ± 0,04	9,4 ± 0,02	23,3 ± 0,5	65,1 ± 1,4	57,2 ± 3,7
DCS	< MDL	< MDL	0,4 ± 0,02	1,05 ± 0,2	161 ± 15	22,07 ± 1,2
Ratio DCS/TCS	/	/	4,4	4,5	247	38

Composé	Effluents (ng/L, moyenne ± écart type, n = 3)		
	STEP 1	STEP 2	STEP 3
TCS	146 ± 3	142 ± 6	156 ± 4
DCS	< MDL	< MDL	< MDL

Le TCS a été quantifié dans l'ensemble des sédiments analysés à des concentrations comprises entre 0,31 et 65,1 ng/g. Le DCS a également été détecté dans les sédiments collectés sur les sites 2 et 3 à des concentrations comprises entre 0,4 et 161 ng/g. La présence du DCS dans les échantillons a été confirmée en comparant les profils isotopiques observées dans les échantillons environnementaux avec le profil isotopique théorique du DCS (Figure 34). Le TCS a également été analysé à des concentrations comprises entre 142 et 156 ng/L dans les effluents des 3 STEP localisées en amont des sites de collecte des sédiments. Si le TCS a été détecté dans 100 % des effluents étudiés, le DCS n'a été identifié dans aucun des effluents analysés. A noter qu'aucun des autres métabolites du TCS recherchés par masse exacte n'a été détecté dans les effluents ou les sédiments.

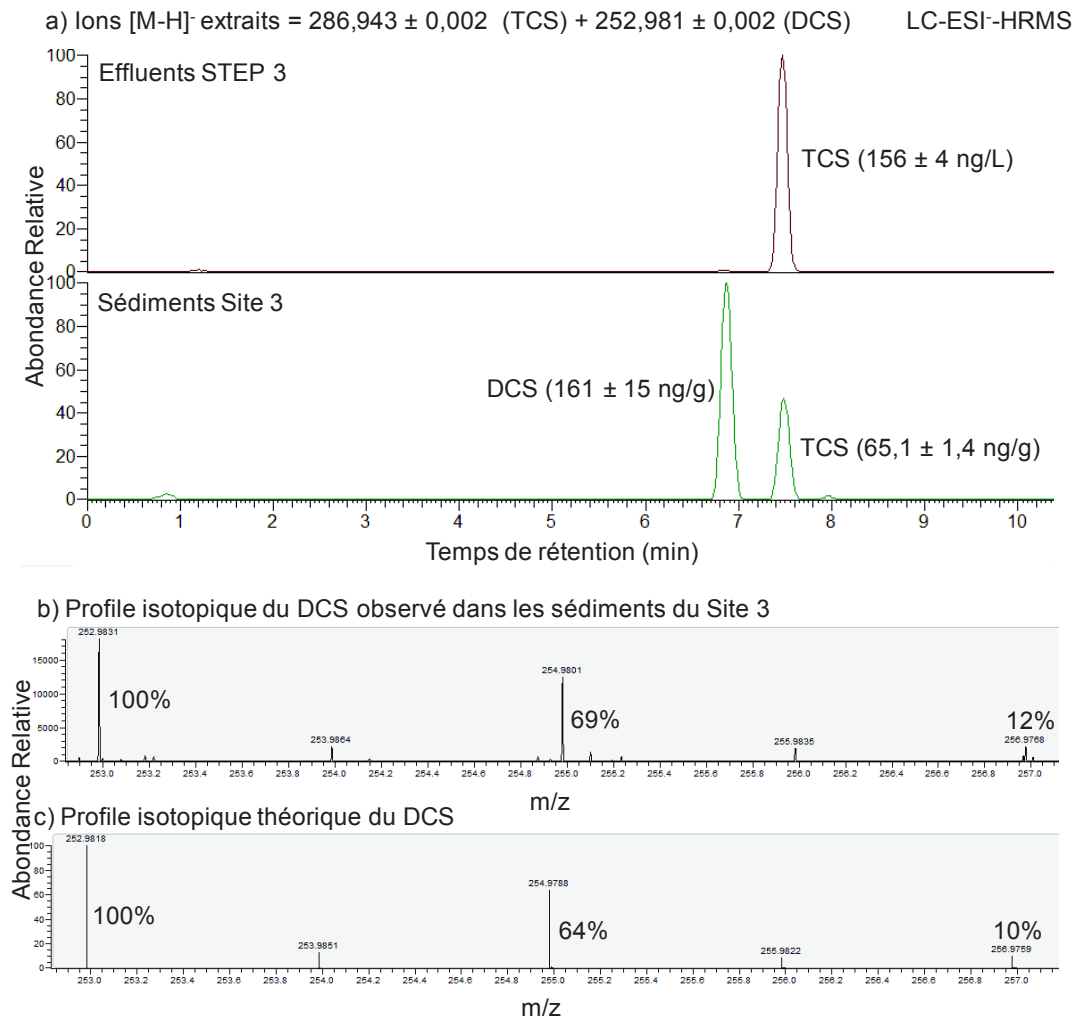


Figure 34. a) Chromatogrammes LC-ESI-HRMS correspondant à l'analyse du TCS ($286,943$) et du DCS ($252,981$) dans un échantillon d'effluents de la STEP 3 et un échantillon de sédiments prélevé en aval de cette STEP, b) profile isotopique du DCS dans l'échantillon de sédiments et c) profile isotopique théorique du DCS.

Les concentrations en TCS mesurées dans les effluents sont similaires entre les 3 STEP ($142\text{--}156$ ng/L). Au contraire, les niveaux de concentrations en TCS et DCS détectés dans les sédiments varient fortement entre les 3 sites étudiés. Les concentrations des composés analysés sont significativement plus élevées dans les sédiments du site 3. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus pour le TCC. Ils peuvent s'expliquer par les taux de matière organique plus élevés des sédiments du site 3 qui peuvent favoriser la sorption des composés sur cette matrice (Souchier et al., 2014). De plus, le ruisseau du site 3, dans lequel les sédiments ont été prélevés, est presque exclusivement alimenté par les eaux de STEP au contraire des deux autres sites, ce qui minimise l'atténuation des concentrations des composés par dilution.

Malgré les variations de concentration intersites, les résultats sont sans équivoque : étant donné que le DCS est un composé issu spécifiquement de la biodégradation du TCS, l'identification de ce métabolite exclusivement dans les sédiments démontre, pour la première fois, que le TCS peut se dégrader dans l'environnement via une réaction de déchloration réductive. Ces informations sont très intéressantes puisque, jusqu'à aujourd'hui, seul le méthyl-TCS était décrit comme étant le produit majoritaire issu de la biodégradation du TCS dans les STEP et l'environnement (Butler et al., 2012; Lozano et al., 2013b). La déchloration apparaît comme une voie concurrentielle à la méthylation puisque le méthyltriclosan n'a été détecté, après recherche par masse exacte, dans aucun des sédiments étudiés.

Le DCS ne semble pas se dégrader ultérieurement dans l'environnement puisque le MCS (monoclosan) et le NCS (noclosan) n'ont pas été détectés dans les sédiments. Ce produit de transformation peut donc constituer un indicateur qualitatif de biodégradation du TCS puisqu'il répond aux contraintes énoncées par Beller, 2000. Les ratios DCS/TCS ont été calculés et les résultats montrent qu'ils varient fortement entre les différents sites (Tableau 22). Au niveau du site 1, le DCS n'a pas été identifié, certainement en raison des concentrations en TCS très faibles mesurées. S'il y a formation de DCS sur ce site, les concentrations de ce métabolite sont susceptibles d'être inférieures aux limites de détection de la méthode. Les ratios DCS/TCS varient ensuite entre 4,4–4,5 % et 38–247 % entre les sites 2 et 3. Les conditions environnementales semblent favoriser la biodégradation du TCS sur le site 3. Concernant le site 3, les ratios sont très différents entre les deux prélèvements. Ces différences pourraient s'expliquer par des perturbations de la couche sédimentaire.

Le fait que le TCS se biodégrade via une réaction de déchloration réductive dans les sédiments indique que ce biocide constitue un candidat intéressant pour étudier le fractionnement isotopique du chlore. L'étape suivante a consisté à identifier les mécanismes de déchloration du TCS et à mesurer le fractionnement isotopique associé pour analyser si le TCS peut permettre d'étudier l'outil isotopique du chlore sur le terrain.

4.2. Etude des mécanismes réactionnels de déchloration réductive du TCS

4.2.1. Mode opératoire appliqué *in vitro*

En fonction de la position moléculaire du chlore partant, jusqu'à trois isomères potentiels de DCS peuvent être formés lors de la déchloration réductive du TCS (Figure 30). Nous n'avons pas réussi à séparer par chromatographie ces différents isomères potentiels et à identifier celui qui se forme dans les sédiments. En l'absence de cette information, l'élucidation des mécanismes réactionnels du TCS apparaît très compliquée. Des expériences mécanistiques de déchloration ont tout de même été menées en laboratoire, à l'aide des mêmes systèmes biomimétiques et enzymatiques que ceux utilisés pour le TCC, pour identifier les conditions qui permettent une déchloration du TCS. Ces renseignements peuvent aider à formuler des hypothèses sur les mécanismes potentiels de déchloration du TCS *in situ*.

La déchloration du TCS en conditions anaérobies a été étudiée à l'aide de la cobalamine en présence de tétrahydroborate de sodium pour mimer l'action des bactéries anaérobies. La déchloration aérobie du TCS a été examinée à l'aide du système enzymatique glutathion-S-transférase/peroxydase de Raifort, comme décrit préalablement (Boerma et al., 2014). Les conditions expérimentales appliquées sont résumées dans le Tableau 23.

Tableau 23. Conditions expérimentales appliquées pour étudier les mécanismes de déchloration réductive du triclosan *in vitro*.

	Déchloration réductive anaérobie	Déchloration réductive aérobie
Milieu réactionnel	<p>Dans un volume aqueux de 40 mL, ajout de :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 0,1 M tris(hydroxyméthyl)aminométhane ajusté à pH 8 - 5 mg hydroxycobalamine - 500 mg tétrahydroborate de sodium (NaBH₄) - 100 µL d'une solution méthanolique de TCS à 1 g/L 	<ul style="list-style-type: none"> - Dans un tampon phosphate (pH 7,4) en présence de diéthylentriaminepentaacétique (0.5 mM), ajout de : - TCS (Concentration finale Cf = 63 µM) - Glutathion (GSH ; Cf = 100 µM) - Glutathion-S-transférase (GST ; Cf = 1 U/mL) - Peroxydase de Raifort (HRP ; Cf = 20 U/mL) - 50 µM de peroxydase d'oxygène (H₂O₂)
Conditions d'incubation	Préparation des milieux réactionnels sous azote puis scellage et incubation dans le noir à 20°C durant 7 j	Agitation en conditions aérobies dans le noir durant 10 j à 25°C
Prélèvements et préparation d'échantillon	A chaque prélèvement, sacrifice et analyse LC-MS d'un des milieux réactionnels après filtration à 0,2 µm	A chaque prélèvement, sacrifice et analyse LC-MS d'un des milieux réactionnels après centrifugation d'un aliquote à 20000 g durant 20 min et filtration à 0,2 µm
Injections	<p>Méthode d'analyse LC-MS similaire à celle utilisée pour les mesures d'occurrence dans les sédiments/effluents excepté pour le gradient méthanol (A)/EMQ (B) :</p> <ul style="list-style-type: none"> A = 5 => A= 100 entre 0 et 15 min A = 100 entre 15 et 20 min A= 100 => A= 5 entre 20 et 20,1 min A = 5 entre 20,1 et 30 min 	

4.2.2. Résultats des expériences mécanistiques *in vitro*

Aucune formation de DCS n'a été identifiée en présence de GSH, GST et HRP. La réaction de polymérisation du TCS en TCS-TCS domine dans ces conditions oxydatives, en raison de la présence du groupement phénol sur l'un des deux cycles aromatiques du TCS (Figure 35). Cette polymérisation de phénols en présence de peroxydases est connue dans la littérature (Dordick et al., 1987). Au contraire du TCC, ce système enzymatique ne permet donc pas de déchlorer le TCS et de formuler d'hypothèses sur une potentielle contribution de chemins réactionnels aérobie dans la formation de DCS dans les sédiments.

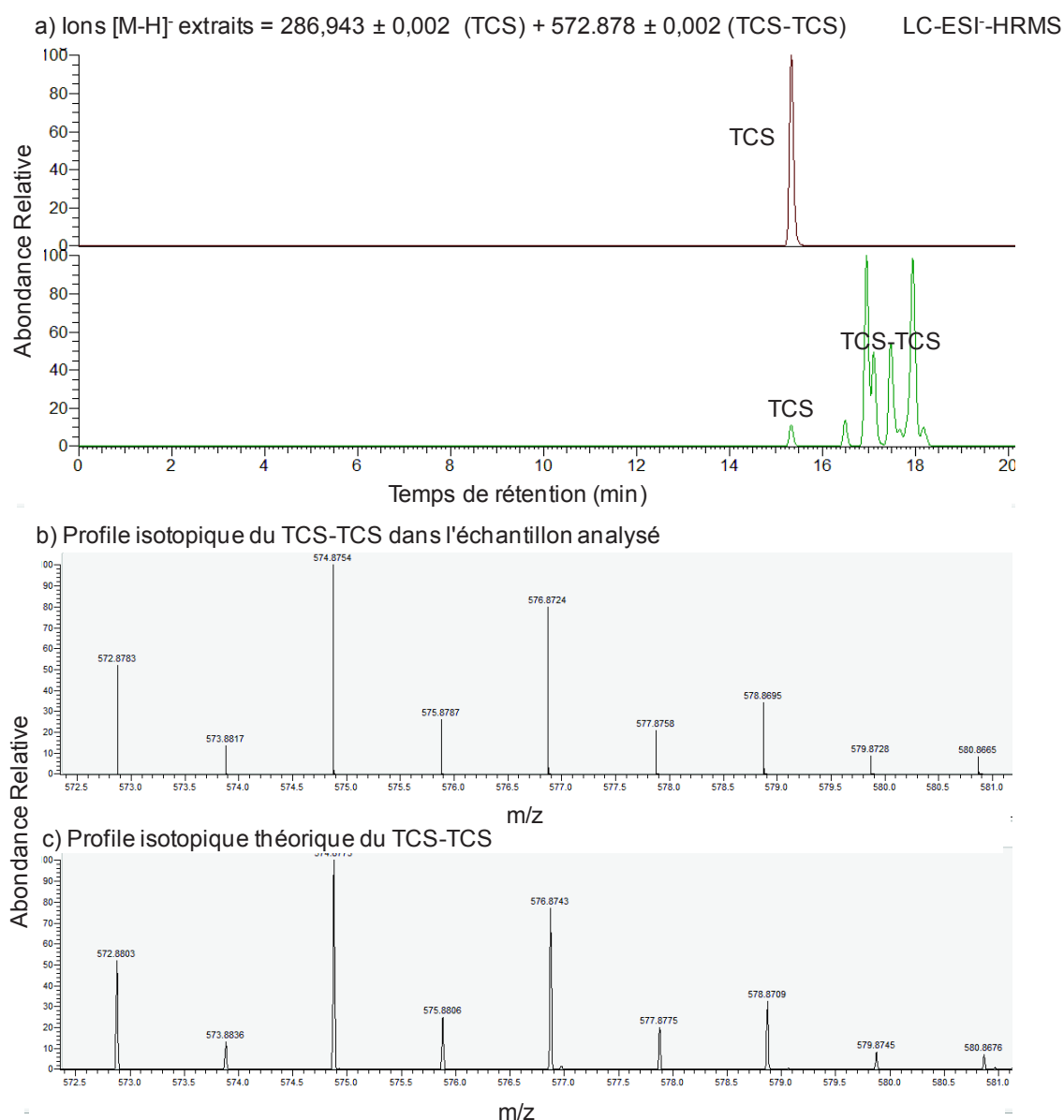


Figure 35. a) Chromatogrammes LC-ESI-HRMS montrant la polymérisation du TCS (286,943) en TCS-TCS (572,878) en présence de GST et HRP ; b) Profile isotopique du TCS-TCS dans l'échantillon et c) profile isotopique théorique du TCS-TCS.

Le DCS a au contraire été identifié dans les incubations réalisées en conditions anaérobies avec la cobalamine et le tétrahydroborate de sodium, comme illustré sur le chromatogramme de la Figure 36 qui correspond à l'analyse du milieu réactionnel après 6 jours d'incubation.

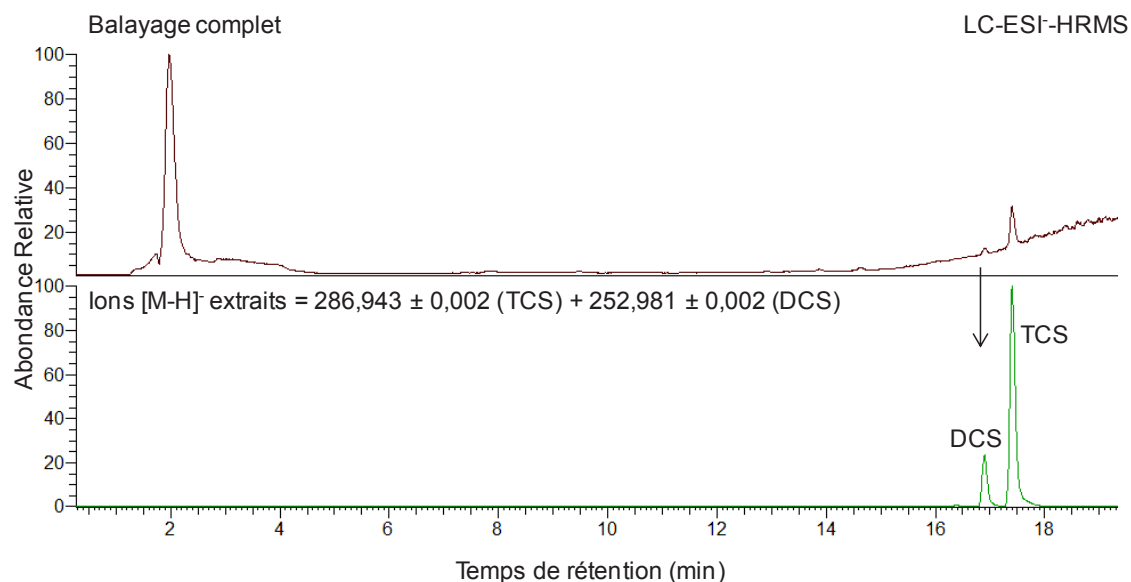


Figure 36. Chromatogrammes LC-ESI-HRMS (acquis en balayage complet et dans lequel les masses du TCS et du DCS ont été extraites) montrant la déchloration du TCS (286,943) en DCS (252,981) après 6 jours d'incubation en présence de cobalamine et de tétrahydroborate de sodium.

Le ratio DCS/TCS est de 23 % après 6 jours d'incubation. D'autres prélèvements ont été réalisés à 10 et 16 jours d'expérience mais le ratio DCS/TCS est resté égal à 23 %. Ces observations peuvent s'expliquer par le fait, qu'après 6-7 j, les conditions anaérobies dans les milieux réactionnels n'arrivent pas à être conservées sous scellage (au vu de la couleur des milieux), ce qui conduit probablement à un arrêt de la réaction de déchloration du TCS. Néanmoins, la cobalamine, à travers un processus d'halorespiration, est fortement susceptible de contribuer à la déchloration du TCS dans l'environnement.

En s'appuyant sur les mécanismes décrits pour les solvants chlorés, plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer la déchloration du TCS en présence de cobalamine (Cretnik et al., 2013; Kliegman and McNeill, 2008; Kuder et al., 2013; Wiegert et al., 2013a) :

- Le chlore est éliminé via une addition nucléophile du cobalt de la cobalamine sous sa forme réduite (Co(I)) sur le carbone le plus électrophile de la molécule.
- Le chlore est substitué par le Co(I) via un mécanisme de substitution nucléophile.

- Un électron est transféré entre le Co(I) et le chlore ce qui engendre une rupture homolytique de la liaison C–Cl.

Les premières études menées sur les aromatiques étaient plutôt en faveur d'un mécanisme de substitution nucléophile du chlore par le Co(I) pour expliquer la déchloration des molécules aromatiques à travers le processus d'halorespiration. Néanmoins, simultanément à la réalisation des expériences mécanistiques, deux articles sont parus et remettent en question l'hypothèse d'une déchloration des aromatiques via une substitution nucléophile (Cooper et al., 2015; Payne et al., 2015a). Ces deux articles démontrent, expérimentalement, que le processus d'halorespiration élimine préférentiellement les atomes de chlore qui possèdent une charge partielle positive élevée dans les composés aromatiques (ce qui est en désaccord avec un mécanisme S_NAr). Pour expliquer cette régiosélectivité, le mécanisme réactionnel qui a été proposé est celui qui inclue un transfert d'électron dissociatif du Co(I) de la cobalamine vers l'atome de chlore du composé aromatique. Ce transfert d'électron, favorisé lorsque le chlore possède une charge positive partielle élevée, peut conduire ensuite à une rupture homolytique de la liaison C–Cl du composé aromatique. Ce mécanisme de transfert d'électron pourrait expliquer le fait que le TCS se biodégrade en présence de cobalamine au contraire du TCC. En effet, dans le cas des chloroanilines, les chlores éliminés en priorité, à travers un mécanisme de transfert d'électron, sont ceux qui se situent en position ortho de l'azote, en raison de l'effet attracteur d'électron du groupement azote (Cooper et al., 2015). Ce schéma peut être extrapolé aux molécules qui possèdent des groupements oxygènes à la place des groupements azotes tel que le TCS. Le TCC ne possède pas de chlore en position ortho de l'azote ce qui pourrait expliquer pourquoi ce composé ne se déchlore pas en présence de cobalamine alors que le TCS, qui possède un chlore en position ortho du phénol, se déchlore. D'après ce schéma, le chlore du TCS qui serait éliminé correspondrait à celui en position ortho du phénol.

Le fait qu'on ne puisse pas identifier analytiquement la position du chlore partant lors de la déchloration du TCS ne permet pas de confirmer directement les hypothèses émises sur les mécanismes réactionnels sous-jacents. Pour vérifier l'intérêt de poursuivre l'investigation des mécanismes de déchloration du TCS dans le cadre de l'étude du fractionnement isotopique du chlore, nous avons décidé de nous assurer au préalable que la déchloration du TCS conduit à un fractionnement isotopique du chlore mesurable.

4.3. Mesure du fractionnement isotopique du chlore lors de la déchloration réductive du TCS

Pour analyser l'existence d'un fractionnement isotopique du chlore lors de la déchloration réductive du TCS, la composition isotopique du chlore du TCS après déchloration a été comparée à celle au temps initial.

4.3.1. Mode opératoire appliqué pour mesurer le fractionnement isotopique du chlore

4.3.1.1. Méthode d'analyse utilisée pour les mesures isotopiques

Les mesures isotopiques du chlore du TCS ont été réalisées à l'aide de la méthode GC-MS définie par (Aeppli et al., 2010). Les abondances relatives des deux isotopes du chlore ($^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$) dans le TCS résiduel, après déchloration, ont été calculées à partir du ratio des aires des pics chromatographiques GC-MS des isotopologues du TCS contenant respectivement zéro ^{37}Cl (A_0) et un ^{37}Cl (A_1) en appliquant la formule suivante (Equation 12).

$$\frac{^{37}\text{Cl}}{^{35}\text{Cl}} = \frac{A_1}{A_0} \times \frac{1}{n} \quad \text{Equation. 12}$$

Avec n , le nombre de chlores dans la molécule ($n = 3$ pour le TCS).

Dans le cas du TCS, les deux isotopologues A_0 et A_1 correspondent respectivement aux ions de ratios m/z 288 et 290.

Les ratios $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ mesurés ont ensuite été rapportés à ceux d'un étalon de référence pour mesurer les $\delta\text{Cl}'$ du TCS (Equation 21). L'utilisation d'un étalon de référence permet de prendre en compte un éventuel fractionnement isotopique des molécules lors des étapes de chromatographie ou d'ionisation dans la source.

$$\delta^{37}\text{Cl}_{\text{TCS}} = \frac{(^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl})_{\text{TCS}} - (^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl})_{\text{Std}}}{(^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl})_{\text{Std}}} \times 1000 \quad \text{Equation. 21}$$

Avec :

- $(^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl})_{\text{TCS}}$, la mesure du ratio entre les isotopes lourd et léger du chlore du TCS dans l'échantillon que l'on cherche à analyser.
- $(^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl})_{\text{Std}}$, la mesure du ratio entre les isotopes lourd et léger du chlore dans l'étalon utilisé comme référence.

L'étalon doit avoir la même formule chimique que les composés étudiés et doit être injecté à la même concentration. Ainsi, pour déterminer les $\delta\text{Cl}'$ du TCS, l'étalon de TCS utilisé dans les expériences mécanistiques a été désigné comme étalon de référence. Dans ces conditions, la valeur $\delta\text{Cl}'$ du TCS à l'instant initial avant déchloration est égale à 0 ‰. Seuls les $\delta\text{Cl}'$ du TCS résiduel ont été mesurés et l'on considère l'existence d'un fractionnement

isotopique du chlore si les valeurs obtenues sont significativement différentes de 0 ‰. Chaque mesure $\delta^{37}\text{Cl}$ du TCS a été calculée à partir de 10 injections de l'échantillon à analyser et de 10 injections de l'étalon pour augmenter la précision de mesure comme conseillé par (Aeppli et al., 2010).

En général, les valeurs $\delta^{37}\text{Cl}$ des composés relatives aux étalons de référence sont ensuite rapportées en valeurs absolues $\delta^{37}\text{Cl}$ versus le référentiel international SMOC en appliquant l'équation suivante :

$$\delta^{37}\text{Cl}_{\text{Comp}} = \delta^{37}\text{Cl}_{\text{Comp}} + \delta^{37}\text{Cl}_{\text{Std}} \quad \text{Équation. 22}$$

Pour mesurer le $\delta^{37}\text{Cl}$ absolu d'une molécule versus le référentiel SMOC en GC-MS, il faut disposer d'un étalon, de même structure chimique que la molécule étudiée, dont la valeur $\delta^{37}\text{Cl}$ absolue versus SMOC est répertoriée dans la littérature. Dans le cas de l'étalon de TCS, la valeur de $\delta^{37}\text{Cl}$ absolue n'est pas disponible. Ainsi, seules les valeurs relatives $\delta^{37}\text{Cl}$ ont pu être mesurées. Néanmoins, lorsque l'équation de Rayleigh est appliquée aux mesures isotopiques du chlore, le fait de ne disposer que des valeurs relatives $\delta^{37}\text{Cl}$ à défaut des valeurs absolues $\delta^{37}\text{Cl}$ ne change pas la pente de la droite de Rayleigh. Les facteurs de fractionnement α ou d'enrichissement ϵ isotopiques du chlore sont donc similaires peu importe s'ils sont obtenus à partir de valeurs isotopiques relatives ou absolues.

Il faut noter que cette absence d'étalons, dont la composition isotopique est connue par rapport aux référentiels internationaux, est un problème récurrent dans le domaine des analyses isotopiques. Certaines communautés scientifiques prennent ainsi l'initiative de créer elles-mêmes leurs étalons de référence pour aider au développement du fractionnement isotopique. Par exemple, l'Université Indiana propose une douzaine d'étalons organiques de référence (Elsner et al., 2012) et a essayé en 2011, en partenariat avec une dizaine d'autres laboratoires, de développer des composés organiques étalons de référence dans le but de les distribuer au niveau international par le biais d'agences telles que l'Agence Internationale de l'Energie Atomique. Cependant, en raison du grand nombre de PPSP présents dans l'environnement, les molécules, dont la composition isotopique versus les référentiels internationaux est connue, sont peu disponibles dans le commerce.

4.3.1.2. Paramètres de la méthode d'analyse GC-MS

Pour mesurer la composition isotopique du TCS, les échantillons à analyser ont été extraits avec de l'hexane puis injectés directement en GC-MS, sans dérivation préalable, en appliquant les paramètres reportés dans le Tableau 24.

Tableau 24. Paramètres de la méthode d'analyse GC-MS appliqués pour mesurer la composition isotopique du chlore dans le TCS.

Conditions chromatographiques	
Appareil GC utilisé	Thermo Scientific, USA
Volume d'échantillon injecté	1 µL
Mode d'injection	Splitless
Température d'injection	250°C
Colonne	DB-5 column (30 m × 0,25 mm ; 0,25 µm, J&W Scientific, Folsom, Canada)
Gaz vecteur	Hélium
Débit du gaz	1,7 mL/min (débit constant)
Programme de température	70°C : 1 min 70–230°C : 10°C/min 230–280°C : 30°C/min 280°C : 5 min
Temps de rétention du TCS	15,8 min
Paramètres de masse	
Appareil MS utilisé	Quantum XLS Thermo Scientific, USA
Ionisation par impact électronique	70 Ev
Mode d'acquisition	SIM : ions ciblés = 288 et 290
Température de la source	250°C
Courant d'émission	29 µA

4.3.1.3. Fidélité et exactitude des mesures isotopiques

Avant de mesurer le fractionnement isotopique du chlore obtenu lors de la déchloration du TCS, l'exactitude et la fidélité des mesures isotopiques GC-MS ont dû être évaluées. La mesure de ces paramètres nécessite d'avoir à disposition une molécule dont la composition isotopique absolue en chlore δCl versus le référentiel SMOC est disponible pour deux fournisseurs différents. Le pentachlorophénol (PCP) répond à cette contrainte puisque sa composition isotopique en chlore versus SMOC est reportée pour les fournisseurs Sigma Aldrich et Supelco (Aeppli et al., 2010). Ainsi, nous avons pu mesurer le δCl absolu d'un des

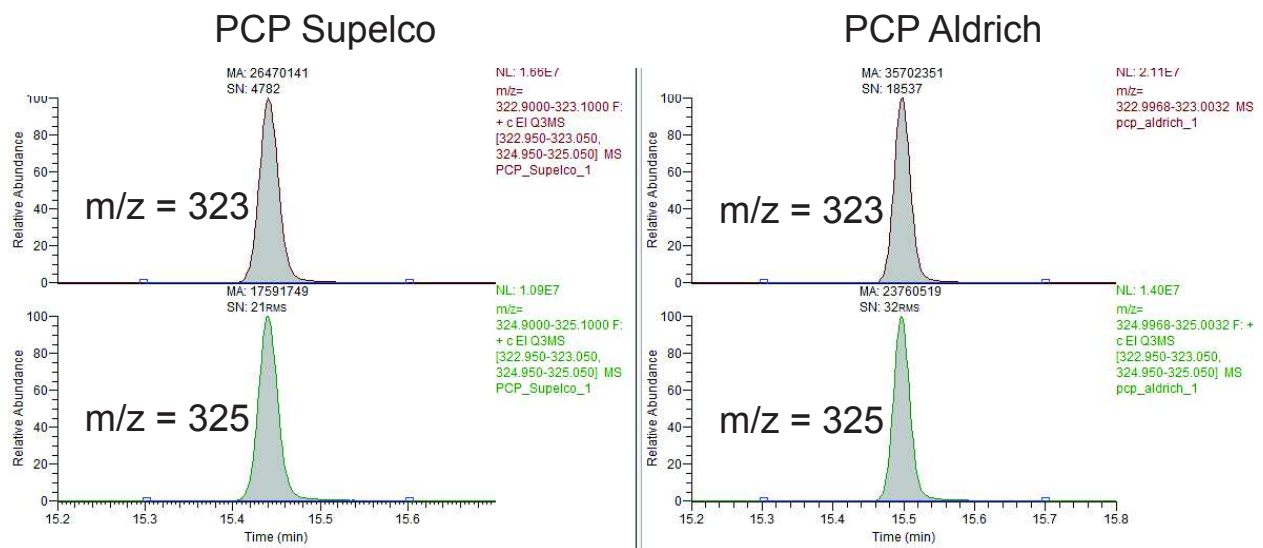
deux étalons de PCP (Std 1) en GC-MS à partir du $\delta^{37}\text{Cl}$ absolu du second étalon (Std 2) en utilisant les deux formules suivantes (Equation 23 et 24 et Figure 37) :

$$\delta^{37}\text{Cl}_{Std1} = \frac{(^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl})_{Std1} - (^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl})_{Std2}}{(^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl})_{Std2}} \times 1000 \quad \text{Équation. 23}$$

$$\delta^{37}\text{Cl}_{Std1} = \delta^{37}\text{Cl}_{Std1} + \delta^{37}\text{Cl}_{Std2} \quad \text{Équation. 24}$$

Avec :

- $(^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl})_{Std1}$ la mesure du ratio entre les isotopes lourd et léger du chlore dans l'étalon de PCP que l'on cherche à analyser.
- $(^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl})_{Std2}$ la mesure du ratio entre les isotopes lourd et léger du chlore dans l'étalon de PCP utilisé comme référence.



$$^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}_{PCP\ Supelco} = \frac{A_{\text{Ion } 325}}{A_{\text{Ion } 323}} \times \frac{1}{5}$$

$$^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}_{PCP\ Aldrich} = \frac{A_{\text{Ion } 325}}{A_{\text{Ion } 323}} \times \frac{1}{5}$$

$$\delta^{37}\text{Cl}_{PCP\ Supelco} = \frac{(^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl})_{PCP\ Supelco} - (^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl})_{PCP\ Aldrich}}{(^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl})_{PCP\ Aldrich}} \times 1000$$

$$\delta^{37}\text{Cl}_{PCP\ Supelco} = \delta^{37}\text{Cl}_{PCP\ Supelco} + \delta^{37}\text{Cl}_{PCP\ Aldrich}$$

Figure 37. Illustration de la méthode de mesure du $\delta^{37}\text{Cl}$ du PCP Supelco à partir de la valeur absolue de $\delta^{37}\text{Cl}$ du PCP Aldrich.

L'exactitude des mesures isotopiques a été évaluée en comparant la valeur absolue de δCl mesurée pour PCP Supelco avec celle renseignée dans la littérature. De plus, la précision des mesures isotopiques a été évaluée en mesurant l'écart type obtenu sur les 10 injections nécessaires à la mesure du δCl en GC-MS.

Pour pouvoir être analysés en GC-MS, les deux échantillons standards de PCP ont été préalablement silanisés. Pour ce faire, 100 μL de N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (MSTFA) et 10 μL de iodotriméthylsilane (TMSI) ont été ajoutés aux deux échantillons standards de PCP préparés dans l'heptane à 1 mg/L (volume total = 1,1 mL). Après ajout des réactifs, les deux échantillons ont été incubés à 70°C durant une heure avant d'être injectés en GC-MS. Les conditions d'analyse du PCP en GC-MS sont présentées dans le Tableau 25.

Tableau 25. Conditions d'analyse du PCP en GC-MS.

Conditions chromatographiques	
Appareil GC utilisé	Thermo Scientific, USA
Volume d'échantillon injecté	1 μL
Mode d'injection	Splitless
Température d'injection	280°C
Colonne	DB-5 column (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm , J&W Scientific, Folsom, Canada)
Gaz vecteur	Hélium
Débit du gaz	1,3 mL/min (constant)
Programme de température	<ul style="list-style-type: none"> • 70°C : 1 min • 70–230°C : 10°C.min⁻¹ • 230–280°C : 30°C.min⁻¹ • 280°C : 3°C.min⁻¹
Durée d'analyse	18 min
Temps de rétention	15,5 min
Paramètres de masse	
Appareil MS utilisé	Quantum XLS Thermo Scientific, USA
Ionisation par impact électronique	70 eV
Mode d'acquisition	SIM : ions ciblés = 323 et 325
Température de la source	250°C
Courant d'émission	29 μA

4.3.2. Résultats issus des mesures isotopiques

4.3.2.1. Fidélité et exactitude des mesures isotopiques réalisées en GC-MS

La valeur absolue δCl du PCP Supelco mesurée dans notre travaux est égale à $-1,19 \pm 2,2 \text{ ‰}$. La valeur mesurée par (Aeppli et al., 2010) à l'aide de la méthode GC-MS est de $-0,86 \pm 1,3 \text{ ‰}$ et celle de référence mesurée par spectrométrie de masse par ionisation thermique (TIMS) dans la littérature est de $-1,26 \pm 0,73 \text{ ‰}$. L'exactitude de notre mesure par rapport à celle de référence est de 94 % ce qui est élevé malgré les faibles valeurs mesurées. La fidélité de mesure est de 1,9 ‰ ce qui est légèrement plus faible que celle mesurée par (Aeppli et al., 2010) (1,3 ‰) mais largement suffisant pour bon nombre d'applications environnementales. Seuls des fractionnements isotopiques du chlore $> 2 \text{ ‰}$ pourront donc être mesurés à l'aide de la méthode GC-MS.

4.3.2.2. Fractionnement isotopique du chlore lors de la déchloration du TCS

La mesure du ratio $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ du TCS utilisé comme étalon de référence est de $2,863 \pm 0,011$ sur 10 réplicats et celle du TCS résiduel dans l'échantillon, après 6 jours d'incubation en présence de cobalamine et tétrahydruroborate de sodium, est de $2,859 \pm 0,005$ sur 10 réplicats. Le δCl du TCS résiduel qui découle de ces mesures est de $-0,40 \pm 1,2 \text{ ‰}$. Ces valeurs obtenues montrent l'absence d'un fractionnement isotopique du chlore significatif lors de la déchloration réductive du TCS. Cette molécule ne convient ainsi pas à l'étude du fractionnement isotopique du chlore.

4.4. Conclusions sur le TCS

Les études d'occurrence réalisées dans des effluents de STEP et des sédiments en aval de STEP ont permis de démontrer, pour la première fois, que le TCS subit une réaction de déchloration réductive dans les sédiments. La position du chlore partant n'ayant pas pu être identifiée, les mécanismes de déchloration réductive n'ont pu être élucidés avec certitude. Néanmoins, les études mécanistiques réalisées *in vitro* suggèrent que des réactions de déchloration anaérobies, impliquant des cofacteurs tels que la cobalamine, sont susceptibles de contribuer à la déchloration du TCS *in situ*. Les mesures isotopiques réalisées ont démontré que ces réactions de déchloration anaérobies n'engendrent pas de fractionnement isotopique significatif du chlore. Le TCS ne constitue donc pas un candidat adéquat pour l'étude du fractionnement isotopique du chlore.

Aucune des trois molécules sélectionnées n'est donc adaptée pour étudier le fractionnement isotopique du chlore comme indicateur quantitatif de biodégradation des PPSP *in situ*. Néanmoins, des expériences supplémentaires ont été réalisées en laboratoire dans le but de mieux comprendre le lien qui existe entre mécanismes réactionnels de déchloration réductive et fractionnement isotopique du chlore dans le cas des molécules aromatiques. Les résultats issus de ces expériences sont présentés dans la partie suivante.

5. Mécanismes réactionnels de déchloration réductive et fractionnement isotopique du chlore : cas des molécules aromatiques

Les mécanismes de déchloration réductive et leur capacité à engendrer un fractionnement isotopique du chlore ont été largement décrits pour les solvants chlorés (Cretnik et al., 2013; Kuder et al., 2013) alors que peu d'informations sont disponibles pour les molécules aromatiques. Pour remédier à ce manque d'informations, le fractionnement isotopique du chlore a été mesuré au cours de la déchloration réductive du TCC et du DCF en conditions contrôlées. En effet, même si ces deux molécules aromatiques ne permettent pas d'étudier le fractionnement isotopique du chlore *in situ*, elles se déchlorent en conditions contrôlées selon des mécanismes connus. Le TCC se déchlore, en conditions anaérobies, selon un mécanisme d'addition nucléophile alors qu'en conditions aérobies, le chlore du TCC est éliminé via un mécanisme radicalaire (Souchier et al., 2016). Le DCF se déchlore, en conditions aérobies, selon un mécanisme d'addition nucléophile suivi d'une élimination du chlore via une substitution nucléophile (Article 2 et Zhang et al., 2011).

Mesurer le fractionnement isotopique du chlore généré par chacun de ces trois mécanismes peut permettre d'identifier les mécanismes de déchloration qui sont susceptibles d'engendrer des variations isotopiques significatives du chlore chez les composés aromatiques. Ces connaissances supplémentaires sur l'outil isotopique sont importantes dans le but de rendre cet outil fonctionnel pour quantifier la biodégradation des PPSP en aval des STEP.

5.1. Mode opératoire appliqué *in vitro* pour étudier le lien entre mécanismes réactionnels et fractionnement isotopique du chlore

Les systèmes biomimétiques qui ont permis d'élucider les mécanismes réactionnels de déchloration du TCC et du DCF *in vitro* ont été utilisés pour déchlorer ces deux composés. Le fractionnement isotopique du chlore a été estimé en mesurant les variations isotopiques du chlore des composés au cours de leurs cinétiques de déchloration puis en appliquant l'équation de Rayleigh aux mesures effectuées. Les mesures isotopiques ont été effectuées en GC-MS en utilisant les étalons de DCF et de TCC comme étalons de référence pour déterminer les $\delta^{37}\text{Cl}$ du DCF et du TCC respectivement dans les échantillons analysés.

Les conditions d'expériences et d'analyses appliquées pour étudier le fractionnement isotopique du chlore au cours de la déchloration réductive du TCC et du DCF sont présentées dans le Tableau 26.

Tableau 26. Conditions d'expériences et d'analyses appliquées pour étudier le fractionnement isotopique du chlore au cours de la déchloration réductive du TCC et du DCF.

Mécanisme étudié	Addition nucléophile d'un hydrure et élimination	Addition nucléophile du glutathion en ipso et élimination via une substitution nucléophile	Mécanisme radicalaire avec arrachement d'électron suivi d'une substitution nucléophile
Conditions d'étude des mécanismes de déchloration			
Molécule étudiée	TCC	DCF	TCC
Système biomimétique	Ni-phosphine + NaBH ₄	GST + GSH + HRP	GST + GSH + HRP
Conditions d'incubation	Anaérobies	Aérobies	Aérobies
Temps d'incubation	9 h	40 h	10 j
Préparation d'échantillon	Extraction avec hexane et injection GC-MS	Méthylation : extraction des échantillons avec 3 x 500 µL d'hexane et évaporation. Ajout 400 µL de BF ₃ et incubation 1 h à 40°C	Extraction avec hexane et injection GC-MS
Conditions chromatographiques			
Appareil GC utilisé	Thermo Scientific, USA		
Volume injecté	1 µL		
Mode d'injection	Splitless		

Température d'injection	280°C		
Colonne	DB-5 column (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm, J&W Scientific, Folsom, Canada)		
Gaz vecteur	Hélium		
Débit du gaz	1.3 mL/min (constant)		
Programme de température	70°C : 1 min 70–230°C : 10°C/min 230–280°C : 30°C/min 280°C : 5 min	70°C : 1 min 70–230°C : 10°C/min 230–280°C : 30°C/min 280°C : 5 min	70°C : 1 min 70–230°C : 10°C/min 230–280°C : 30°C/min 280°C : 5 min
Temps de rétention	10,4 min	11,9 min	10,4 min
Paramètres de masse			
Appareil MS utilisé	Quantum XLS Thermo Scientific, USA		
Ionisation par impact électronique	70 Ev		
Mode d'acquisition	Conversion du TCC en 3,4-dichloroaniline SIM : ions ciblés = 161 et 162	SIM : ions ciblés = 310 et 312	Conversion du TCC en 3,4-dichloroaniline SIM : ions ciblés = 161 et 162
Température de la source	280°C		
Courant d'émission	40 µA		

La méthode GC-MS conduit à une conversion totale du TCC en 3,4-dichloroaniline. Les analyses isotopiques du chlore ont été réalisées sur ce fragment dichloré. Cette approche est possible car la déchloration réductive du TCC conduit à une élimination du chlore sur le cycle aromatique dichloré et n'est donc pas censée affecter la composition isotopique du cycle aromatique monochloré.

Pour appliquer l'équation de Rayleigh, les concentrations résiduelles du TCC et du DCF dans les échantillons analysés isotopiquement ont été quantifiées en LC-MS, en appliquant les mêmes méthodes analytiques que celles utilisées pour les mesures d'occurrence sur le terrain.

Une fois les δ_{Cl} et les concentrations du DCF et du TCC mesurés à différents instants des cinétiques de déchloration, la relation de Rayleigh a pu être appliquée aux valeurs obtenues (Équation 25) pour calculer les facteurs de fractionnement α_{Cl} et d'enrichissement ϵ_{Cl} isotopiques pour chaque mécanisme considéré.

$$\ln \left[\frac{(\delta^{37}Cl' + 1000)_t}{(\delta^{37}Cl' + 1000)_0} \right] = (\alpha_{Cl} - 1) \ln f \approx \epsilon_{Cl} \ln f \quad \text{Équation. 25}$$

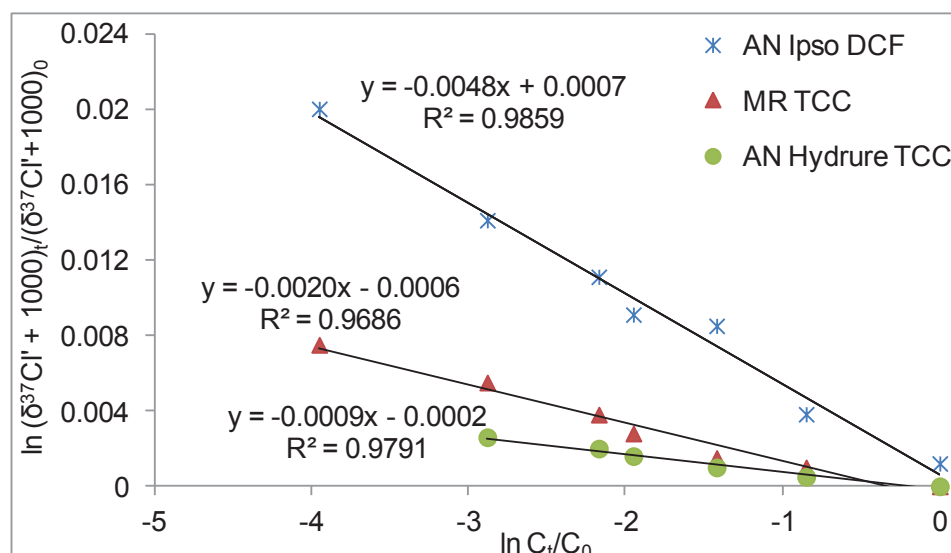
Avec :

- $(\delta^{37}Cl' + 1000)_t$ et $(\delta^{37}Cl' + 1000)_0$, la composition isotopique du chlore dans le composé étudié à l'instant t et au temps initial respectivement.
- f, le pourcentage de biodégradation.
- α_{Cl} , le facteur de fractionnement isotopique.
- ϵ_{Cl} ($= \alpha_{Cl} - 1$), la pente de la droite de Rayleigh appelé facteur d'enrichissement isotopique.

Les mesures des facteurs α_{Cl} et ϵ_{Cl} ont permis de comparer les différents mécanismes réactionnels entre eux et d'identifier ceux qui engendrent un fractionnement isotopique du chlore significatif.

5.2. Résultats issus de l'application de Rayleigh aux cinétiques de déchloration du TCC et du DCF

Le fait que l'application de Rayleigh conduise à une linéarité entre biodégradation et variations isotopiques a été confirmé pour les trois mécanismes étudiés ($R^2 > 0,968$) (Figure 38). Les facteurs de fractionnement isotopique du chlore obtenus sont compris entre -0,9 ‰ et -4,8 ‰. Ces valeurs sont similaires aux enrichissements observés dans le cas des solvants chlorés (Cretnik et al., 2013; Kuder et al., 2013; Wiegert et al., 2013b).



Avec AN = addition nucléophile et MR = mécanisme radicalaire

Figure 38. Application de l'équation de Rayleigh au fractionnement isotopique du chlore généré par différents mécanismes de déchloration réductive : une AN du glutathion sur le DCF suivie d'une substitution nucléophile en conditions aérobies (étoiles) ; un mécanisme radicalaire lors de la déchloration aérobie du TCC (triangles) et une AN d'un hydrure lors de la déchloration anaérobie du TCC (ronds).

La déchloration aérobie du DCF génère le fractionnement isotopique du chlore le plus élevé ($\epsilon_{\text{Cl}} = -4,8 \text{ ‰}$). L'étape cinétiquement limitante de la réaction est probablement l'étape de substitution nucléophile en raison des fortes variations isotopiques observées. Dans le cas de la déchloration aérobie du TCC, un fractionnement isotopique du chlore est observé ($\epsilon_{\text{Cl}} = -2,0 \text{ ‰}$) car le chlore est également éliminé via une substitution nucléophile lors d'un mécanisme radicalaire, après activation de la molécule par arrachement d'un électron. Le fractionnement isotopique plus faible enregistré pour le TCC, en comparaison au DCF, peut s'expliquer par l'existence d'étapes cinétiquement limitantes, dans le cas du TCC, qui n'impliquent pas de fractionnement isotopique et qui diminuent l'enrichissement isotopique global. Enfin, l'hydrodéphalogenation du TCC génère un fractionnement isotopique du chlore faible qui est de l'ordre de l'erreur analytique ($\epsilon_{\text{Cl}} = -0,9 \text{ ‰}$). Le mécanisme de cette réaction est une addition nucléophile qui n'engendre que des effets isotopiques secondaires du chlore, généralement de un à deux ordres de grandeur plus faibles que les effets primaires.

Ces résultats permettent de mieux prévoir le fractionnement isotopique du chlore généré lors de la déchloration de composés aromatiques chlorés. Ces informations sont importantes pour développer l'outil du fractionnement isotopique comme indicateur qualitatif et quantitatif de la biodégradation *in situ*.

**Chapitre 3 : Evaluation du
fractionnement
énantiomérique comme
indicateur quantitatif de la
biodégradation des PPSP chiraux
en aval des STEP**

1. Choix méthodologiques

Le chapitre 3 de la thèse restitue l'ensemble des travaux qui ont porté sur le fractionnement énantiomérique. Ces travaux ont eu pour objectif d'analyser si l'étude quantitative de la biodégradation des PPSP chiraux en aval des STEP peut être réalisée à l'aide de l'outil du fractionnement énantiomérique.

La première étape du projet a consisté à sélectionner des molécules d'étude. Ces molécules devaient répondre aux contraintes suivantes :

- Critère 1 : Les molécules sont des micropolluants chiraux qui appartiennent à la catégorie des PPSP et qui sont commercialisés sous forme racémique.
- Critère 2 : Les données pharmacocinétiques, concernant l'évolution de la stéréochimie des molécules au cours de leur métabolisation *in vivo*, sont disponibles si possible dans la littérature.
- Critère 3 : La présence des molécules au sein et en aval des STEP à des concentrations mesurables est avérée.
- Critère 4 : Les composés sélectionnés doivent se biodégrader dans l'environnement selon une réaction stéréosélective.

Un croisement des données de concentrations et de pharmacocinétiques disponibles dans la littérature avec les résultats issus de travaux portant sur la biodégradation des PPSP chiraux *in situ* a permis de sélectionner plusieurs molécules modèles.

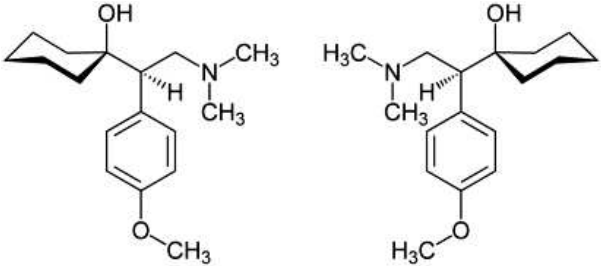
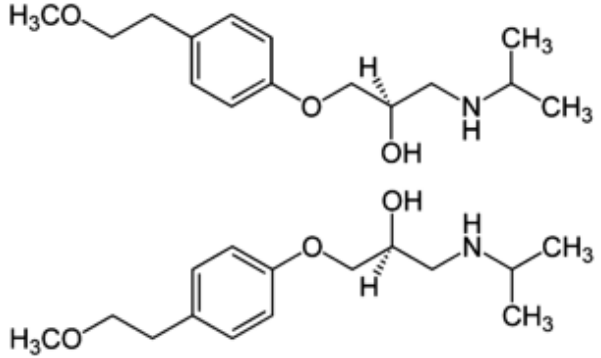
1.1. Sélection des molécules d'étude

1.1.1. La venlafaxine

1.1.1.1. Critère 1 : micropolluant PPSP chiral commercialisé sous forme racémique

La venlafaxine (VEN) est un psychotrope qui est commercialisé sous forme racémique, sous le nom commercial d'Effexor depuis 1994 (date d'autorisation de mise sur le marché), dans le cadre du traitement de la dépression ou des troubles anxieux (Tableau 27). La VEN fait désormais partie de la liste des 100 médicaments les plus prescrits aux Etats-Unis depuis 2010 ("<http://drugtopics.modernmedicine.com/drugtopics/data/articlestandard//drugtopics/252011/727243/article.pdf>) et les quantités prescrites de cette substance dans différents pays européens dépassent plusieurs tonnes et augmentent chaque année (Schlüsener et al., 2015).

Tableau 27. Propriétés physico-chimiques des PPSP chiraux sélectionnés pour étudier le fractionnement énantiomérique.

Composé	Structure chimique	Masse molaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (mg/L)	Log ₁₀ K _{ow}	pKa	Coefficient de Henry (atm·m ³ /mole)
Venlafaxine (VEN)	 <p>Enantiomères R (gauche) et S (droite)</p>	277,40	270 (à 25°C) (Rúa-Gómez and Püttmann, 2012)	3,28 (Rúa-Gómez and Püttmann, 2012)	9,3 (Li et al., 2013)	2,04 x 10 ⁻¹¹ (Rúa-Gómez and Püttmann, 2012)
Métoprolol (MET)	 <p>Enantiomères R (en haut) et S (en bas)</p>	267,36	16 900 (à 25°C) (Lahti, 2012b)	1,69 (Lahti, 2012b)	9,68 (Lahti, 2012b)	1,40 x 10 ⁻¹³ (Lahti, 2012b)

Des études récentes ont montré que la VEN peut engendrer des effets néfastes sur la croissance ou la physiologie de la faune et la flore présentes dans le milieu aquatique (Feito et al., 2013; Fonga and Hoy, 2002), classant ce composé au rang de micropolluant environnemental.

1.1.1.2. Critère 2 : devenir de la molécule *in vivo* chez l'homme

L'élimination rénale permet d'expliquer 92 % de l'excrétion de la VEN et de ses métabolites formés *in vivo* (Metcalf et al., 2010). Environ 56 % de la VEN ingérée par le patient est dégradée selon une réaction énantiosélective en O-desmethylvenlafaxine (ODV) (90 % de la VEN transformée) et de manière non énantiosélective en N-desmethylvenlafaxine (NDV) et O,N-desmethylvenlafaxine (ONDV) (10 %) (Ereshefsky and Dugan, 2000) (Figure 39). La transformation de la VEN en ODV favorise la dégradation de l'énantiomère R (Eap et al., 2003). La VEN non dégradée *in vivo* (44 %) est majoritairement excrétée (90 % environ) sous une forme conjuguée à l'acide glucuronique qui peut se déconjuguer au cours des procédés de traitement des eaux usées (Gasser et al., 2012a).

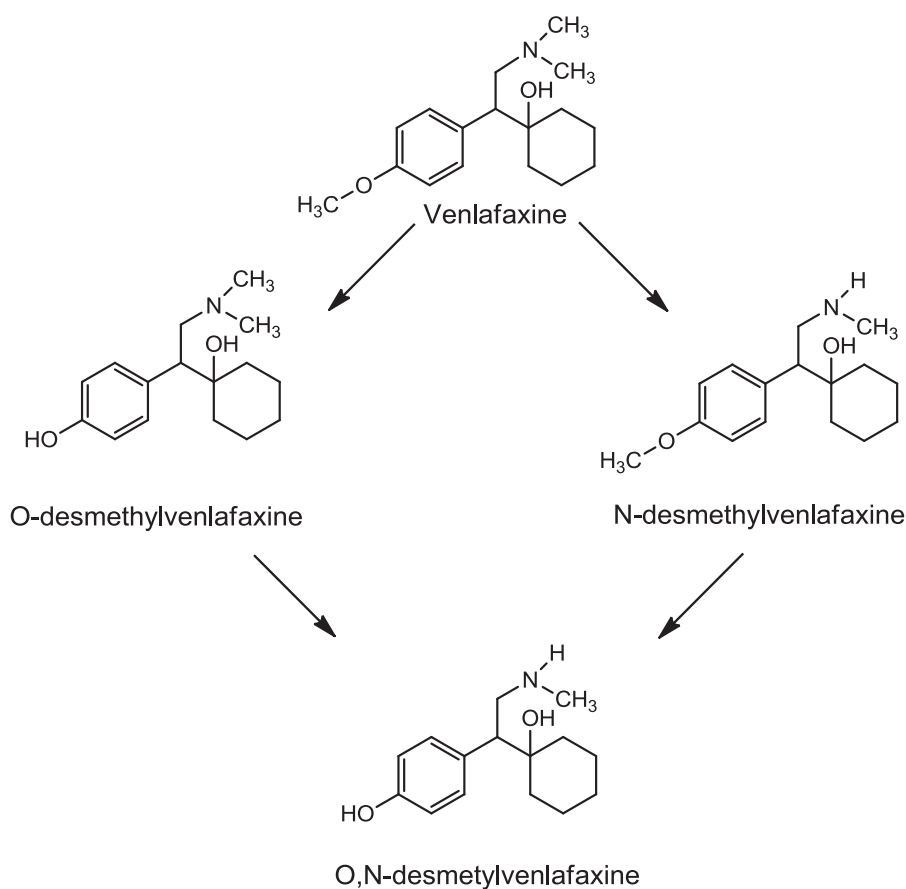


Figure 39. Devenir métabolique de la venlafaxine *in vivo* (Ereshefsky and Dugan, 2000).

1.1.1.3. Critère 3 : présence environnementale

La VEN ne s'adsorbe pas de manière significative sur les boues ($\text{Log}_{10}K_{ow} = 3.28$) (Lajeunesse et al., 2013) et seule une partie de la VEN se dégrade dans les STEP à travers une réaction d'O-desmétylation (Gasser et al., 2012a). Ainsi, ce composé n'est pas totalement éliminé dans les STEP et ses concentrations peuvent parfois même augmenter au cours du procédé de traitement des eaux usées en raison du phénomène de déconjugaison (Kasprzyk-Hordern and Baker, 2012; Kasprzyk-Hordern et al., 2010a; Vazquez-Roig et al., 2014).

Par conséquent, ce composé hydrophile est souvent détecté à des concentrations élevées, pouvant atteindre plusieurs $\mu\text{g/L}$, dans les effluents de STEP et les eaux de rivière (Bagnall et al., 2012a; Gasser et al., 2012b; Kasprzyk-Hordern et al., 2010a; Li et al., 2013; Rúa-Gómez and Püttmann, 2012). De même, les métabolites issus de la dégradation *in vivo* ou environnementale de la VEN, l'ODV essentiellement et parfois le NDV, ont déjà été détectés dans des effluents de STEP et des eaux de rivière (Metcalf et al., 2010; Rúa-Gómez and Püttmann, 2012).

1.1.1.4. Critère 4 : biodégradation énantiosélective dans l'environnement

La biodégradation de la VEN *in vivo*, dans les STEP et les rivières conduit majoritairement à la formation du même métabolite, l'ODV. La biodégradation énantiosélective de la VEN en ODV, conduisant à un enrichissement de la forme S, a déjà été reportée dans les STEP (Kasprzyk-Hordern et al., 2010b) et les eaux de rivière (Bagnall et al., 2012b; Kasprzyk-Hordern and Baker, 2012; Li et al., 2013).

D'autres travaux présentent toutefois des résultats contradictoires. Ainsi, la biodégradation de la VEN dans les STEP ne conduit pas toujours à un enrichissement énantiomérique de la molécule résiduelle, comme l'attestent les ratios énantiomériques proches du racémique mesurés dans les entrées et sorties de plusieurs STEP (Gasser et al., 2012b; Kasprzyk-Hordern and Baker, 2012; Li et al., 2013).

Des analyses supplémentaires sont donc nécessaires pour identifier et comprendre les mécanismes de dégradation qui sont à l'origine d'une biodégradation stéréosélective de la VEN dans l'environnement.

1.1.2. Le métoprolol

1.1.2.1. Critère 1 : micropolluant PPSP chiral commercialisé sous forme racémique

Le métoprolol (MTP) est un bêtabloquant commercialisé sous forme racémique, sous plusieurs noms commerciaux dont Lopressor et Bétaloc, pour traiter les dysfonctionnements liés à l'hypertension artérielle ou l'insuffisance cardiaque (Tableau 27). Le MTP fait désormais partie des 20 substances les plus prescrites aux Etats-Unis et sa production en 2009 s'élevait déjà à $8,26 \times 10^5$ kg (Dong et al., 2013).

Des études ont montré que le MTP présente une toxicité à des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g-mg/L}$ vis-à-vis de certains organismes vivants (*Daphnia magna*, *Desmodesmus subspicatus* and *Lemna minor* ; Cleuvers, 2005; Dzialowski et al., 2006).

1.1.2.2. Critère 2 : devenir de la molécule *in vivo* chez l'homme

Le MTP est éliminé essentiellement par la voie hépatique à travers 3 chemins de dégradation à savoir une O-desmethylation, une déamination oxydative et une hydroxylation (Murthy et al., 1990) (Figure 40). Seulement 3 % du MTP est excrété inchangé (Lennard, 1985). Les composés issus de la déamination oxydative et de l'hydroxylation du MTP (le N-DMTP et l' α -HMTP respectivement) sont des métabolites mineurs dont les quantités mesurées dans les urines correspondent à moins de 20 % de la dose de MTP ingérée par le patient (Hoffmann et al., 1980; Lennard, 1985; Murthy et al., 1990; Regårdh et al., 1979). Le métabolite issu de l'O-desmethylation du MTP, l'O-DMTP, subit quantitativement une oxydation plus poussée qui conduit à la formation d'un métabolite acide, le MTPA, qui permet d'expliquer plus de 60 % de l'élimination du MTP ingéré (Borg et al., 1975; Lennard, 1985; McGourty et al., 1985; Murthy et al., 1990). La transformation du MTP en MTPA est peu stéréosélective *in vivo* (ratio R/S MTP et MTPA dans les urines = $0,73 \pm 0,16$ et $1,15 \pm 0,09$ respectivement) (Cerqueira et al., 2003; Murthy et al., 1990) et l'hydroxylation et la déamination oxydative ne conduisent pas à l'enrichissement d'un des deux énantiomères du MTP (Lennard, 1985). Un ratio énantiomérique du MTP proche du racémique est donc attendu en entrée de STEP.

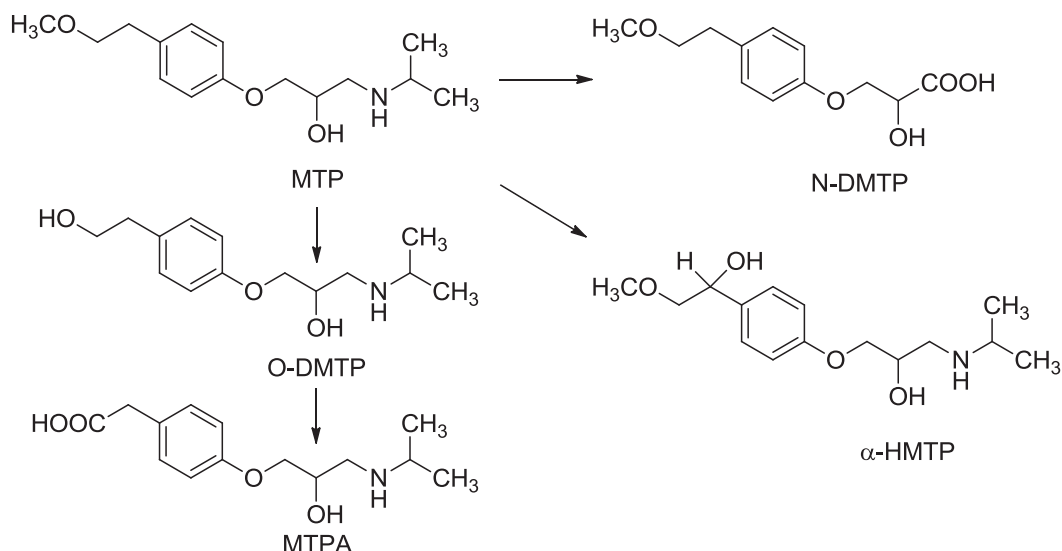


Figure 40. Devenir métabolique du métoprolol *in vivo*.

1.1.2.3. Critère 3 : présence environnementale

Le MTP est peu dégradé dans les STEP, via la formation de MTPA, et ne s'adsorbe pas de manière significative sur les boues en raison de son caractère hydrophile (Maurer et al., 2007) ce qui explique les faibles taux d'élimination du MTP reportés dans la littérature (entre 0 et 31 %, Lacey et al., 2012; MacLeod et al., 2007; Rubirola et al., 2014). Par conséquent, ce composé est souvent détecté à des concentrations atteignant le $\mu\text{g/L}$ dans les effluents de STEP ou les eaux de rivière (Bagnall et al., 2012b; Barclay et al., 2012; Selke and Hühnerfuss, 2009). Le MTP faisait ainsi partie des 20 composés pharmaceutiques les plus détectés dans les eaux de rivière européennes en 2009 (Hughes et al., 2013). De même, les métabolites *in vivo* et environnementaux du MTP sont fréquemment détectés dans les effluents ou en aval des STEP (Barclay et al., 2012; Selke and Hühnerfuss, 2009).

1.1.2.4. Critère 4 : biodégradation énantiosélective dans l'environnement

Les résultats divergent entre les études qui observent une biodégradation énantiosélective du MTP dans les STEP (Nikolai et al., 2006; A. R. Ribeiro et al., 2012) ou les rivières (Fono et al., 2006) et celles qui n'observent pas de variations du ratio énantiomérique du MTP lors de sa dégradation dans l'environnement (MacLeod et al., 2007). Plusieurs produits de transformation issus de la biodégradation du MTP dans l'environnement du MTP ont été reportés (le MTPA mais également le kétometoprolol, l' α -HMTP et l'O-DMTP) (Li et al., 2014; Rubirola et al., 2014; Selke and Hühnerfuss, 2009) mais le mécanisme responsable de la dégradation énantiosélective du MTP n'a pas été clairement identifié.

1.2. Stratégie d'étude du fractionnement énantiomérique

Notre objectif était d'analyser, à l'aide des deux molécules modèles sélectionnées, si le fractionnement énantiomérique peut permettre de quantifier la biodégradation des PPSP chiraux en aval des STEP. Pour répondre à cet objectif, des études ont été réalisées dans un premier temps *in vitro* pour vérifier si une relation linéaire est obtenue entre le fractionnement énantiomérique et la biodégradation lorsque l'équation de Rayleigh est appliquée dans des conditions contrôlées, proches de celles rencontrées dans l'environnement. Ces études en microcosmes ont également permis d'étudier l'impact des différents mécanismes d'atténuation naturelle (photodégradation, autres réactions abiotiques) sur le fractionnement énantiomérique et de vérifier si ce phénomène est effectivement spécifique des réactions biologiques. Le fractionnement énantiomérique a ensuite été étudié dans des STEP. Le but de ces expériences était d'analyser l'existence d'une relation linéaire entre fractionnement énantiomérique et biodégradation, dans des conditions expérimentales différentes de celles appliquées dans les microcosmes, afin d'étudier la robustesse de l'outil énantiomérique comme indicateur de biodégradation. L'avantage des STEP, contrairement à des études en rivière, est qu'elles permettent d'étudier spécifiquement et dans des temps limités les processus de biodégradation du MTP et de la VEN. Les différentes étapes de travail qui ont été réalisées sont détaillées par la suite.

1.2.1. Développement d'une méthode chirale adaptée

1.2.1.1. Molécules incluses dans la méthode

Pour étudier le fractionnement énantiomérique du MTP et de la VEN dans les STEP et en microcosmes, une méthode analytique chirale a été au préalable développée et validée. En plus du MTP et de la VEN, les métabolites potentiels de ces deux molécules, sélectionnés à l'aide d'une étude bibliographique, ont été analysés pour mieux comprendre le lien qui existe entre le fractionnement énantiomérique et les voies/mécanismes réactionnels de dégradation. L'analyse des produits de transformation (TP) et de leur stéréochimie peut en effet aider à identifier les voies ou mécanismes de biodégradation qui seraient responsables des variations énantiomériques pour chaque molécule étudiée. Ces informations sont nécessaires pour :

- Choisir adéquatement le facteur d'enrichissement énantiomérique à appliquer *in situ*, si l'outil énantiomérique se révèle être un indicateur quantitatif de biodégradation approprié.
- Interpréter les résultats de fractionnement énantiomérique obtenus sur le terrain.

Prenons par exemple le cas où, lors du transit d'une molécule chirale dans une rivière, aucun fractionnement énantiomérique n'a été observé. Connaitre les mécanismes de biodégradation, qui sont à l'origine d'un fractionnement énantiomérique chez cette molécule, peut permettre d'élucider, grâce à une analyse chirale qualitative des TP présents dans la rivière, si l'absence de fractionnement énantiomérique est due :

- Au fait que la molécule ne se dégrade pas.
- Au fait que la molécule se dégrade selon un mécanisme de transformation qui n'engendre pas de fractionnement énantiomérique.

L'analyse stéréochimique des TP peut également prouver, pour les molécules étudiées, l'intervention de plusieurs mécanismes de biodégradation. Dans ce cas spécifique, similairement au fractionnement isotopique, le fractionnement énantiomérique pourra difficilement être utilisé comme indicateur quantitatif de biodégradation.

Enfin, il est important d'identifier les TP formés sur le terrain car la quantification des processus de biodégradation doit être accompagnée d'une analyse de la toxicité des TP dans le cadre de la démarche d'évaluation des risques.

1.2.1.2. Extraction des matrices aqueuses

L'extraction du MTP, de la VEN et de leurs métabolites dans les influents et effluents de STEP est déjà largement décrite dans la littérature (Tableau 28). Ces molécules sont en général extraites des matrices aqueuses par SPE sur cartouches HLB en utilisant le méthanol comme solvant d'élution. La méthode d'extraction SPE qui a été développée dans le cadre de la thèse, pour extraire simultanément la VEN, le MTP et l'ensemble de leurs métabolites, s'est appuyée sur celles reportées dans la littérature. Cette méthode est décrite dans l'article *Enantiomeric fractionation of metoprolol and its major transformation products for quantitative biodegradation measurement and elucidation of biodegradation mechanisms*.

Tableau 28. Caractéristiques des méthodes d'extraction SPE utilisées dans la littérature pour extraire le MTP, la VEN et leurs métabolites des matrices aqueuses.

Molécules extraites	Matrice étudiée	Cartouche SPE	Volume percolé (mL)	Solvant d'élution	Volume élué (mL)	Volume de reprise (mL)	Rendements d'extraction absolus (RE)	Références
MTP VEN	Effluent	HLB	100	Méthanol	4	0,5	> 80 %	(Bagnall et al., 2012b)
MTP N-DMTP α -HMTP	Effluent	HLB	500	Méthanol	10	0,25	73 < RE < 86 %	(Barclay et al., 2012)
MTP	Influent Effluent	HLB	Influent → 100 Effluent → 500	Méthanol	5		Influent → 86 % Effluent → 98 %	(MacLeod et al., 2007)
MTP	Influent Effluent	HLB	Influent → 100 Effluent → 500	Méthanol	6	1	Influent → 104 % Effluent → 75 %	(Nikolai et al., 2006)
VEN	Influent Effluent	HLB	100	Méthanol	1	0,5	122–125 %	(Kasprzyk-Hordern et al., 2010b)
VEN ODV NDV	Eau de rivière	HLB	500	Méthanol	6	0,5	72–78 %	(Li et al., 2013)
VEN ODV	Influent Effluent	HLB	Influent → 250 Effluent → 500	Méthanol/Acétone (1/1, v/v)	1	0,4	Influent → 71–79 % Effluent → 81–85 %	(Rúa-Gómez and Püttmann, 2012)

1.2.1.1. Instruments LC-MS utilisés

L'analyse des énantiomères du MTP, de la VEN et de leurs métabolites dans les matrices aqueuses a été réalisée par chromatographie liquide chirale couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS). Des méthodes d'analyse chirale sont déjà décrites dans la littérature pour ces molécules. Cependant, la résolution de l'ensemble des composés, que l'on a souhaité étudier, nécessite en général l'utilisation de plusieurs colonnes chromatographiques chirales (Barclay et al., 2012). Ainsi, l'un des objectifs analytiques a consisté à développer une méthode d'analyse chirale commune pour l'ensemble des molécules étudiées. Cette méthode est décrite dans l'article *Enantiomeric fractionation of metoprolol and its major transformation products for quantitative biodegradation measurement and elucidation of biodegradation mechanisms*.

L'identification des molécules modèles et de leurs métabolites en HRMS dans les échantillons a reposé sur les critères suivants :

- Le temps de rétention de la molécule dans l'échantillon doit être similaire à celui de l'étalon à ± 0.5 min.
- La masse exacte de l'ion recherché doit être détectée avec une précision < 5 ppm.
- Des ions MS/MS ont été utilisés comme une preuve supplémentaire de confirmation.

Pour identifier l'ordre d'éluion des deux énantiomères de chaque molécule, des étalons énantiomériques purs ont été injectés.

Les analytes étudiés ont été quantifiés dans les matrices aqueuses par étalonnage interne, à l'aide d'une gamme d'étalonnage à 6 points établie à des niveaux de concentration qui couvrent ceux classiquement retrouvés dans l'environnement. Les étalons internes, à savoir le MTP-d7 et la VEN-d6, ont été ajoutés sous forme racémique avant extraction SPE pour corriger à la fois les pertes de signal dues aux effets de matrice et les pertes de molécules engendrées par les étapes d'extraction. La méthode d'analyse chirale développée a été validée à travers la mesure de différents paramètres de performances tels que la résolution, la linéarité, les limites de détection et de quantification, les rendements d'extraction ou encore la fidélité (cf 1.2.1.6).

1.2.2. Etude du fractionnement énantiomérique dans des microcosmes

Une fois validée, la méthode d'analyse chirale a été appliquée à l'étude du fractionnement énantiomérique dans des microcosmes correspondant à des systèmes effluents de STEP/sédiments pour se rapprocher des conditions rencontrées en aval des

STEP (Figure 41). Les sédiments ont été ajoutés en quantité suffisante pour assurer la présence d'une culture microbienne mixte mais en quantité assez faible pour éviter tout phénomène de sorption des molécules d'étude. Au temps initial, les batchs ont été dopés en VEN et MTP dans des proportions racémiques et des prélèvements ont été réalisés régulièrement afin de mesurer l'évolution des concentrations et des ratios énantiomériques de ces molécules et de leurs métabolites.

Afin de vérifier l'impact de différents mécanismes d'atténuation sur l'enrichissement énantiomérique, quatre batchs (dont deux stérilisés) ont été incubés dans le noir et quatre batchs (dont deux stérilisés) ont été exposés à la lumière.

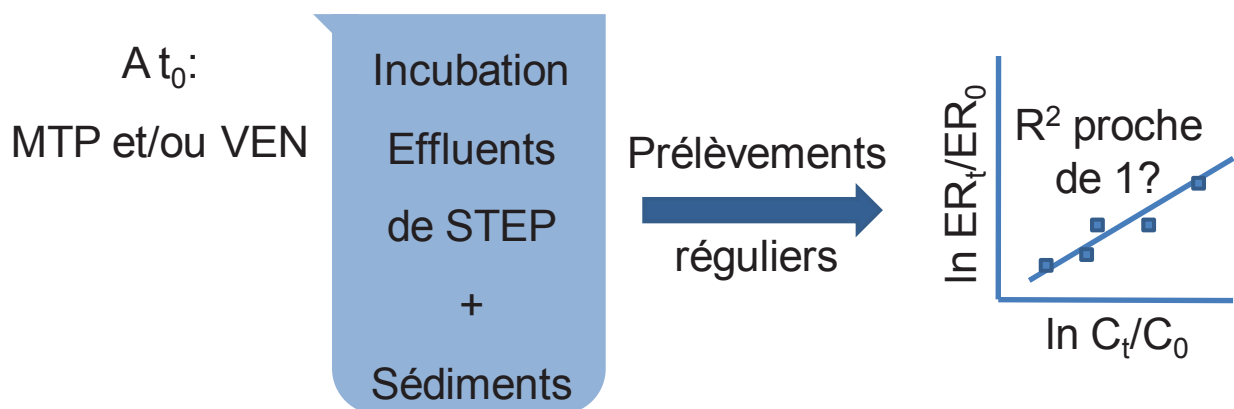


Figure 41. Conditions expérimentales appliquées en microcosmes pour vérifier l'existence d'une relation linéaire entre le fractionnement énantiomérique et l'ampleur de la biodégradation lors de l'application de l'équation de Rayleigh.

Une fois les concentrations et les ratios énantiomériques des molécules mesurés à différents temps d'expérience, il a fallu vérifier en premier lieu que :

- Les molécules d'étude sélectionnées se biodégradent effectivement selon une réaction stéréosélective, ce qui n'est pas avéré étant donné les résultats contradictoires reportés dans la littérature pour le MTP et la VEN.
- S'il y a dégradation stéréosélective, celle-ci doit être observée exclusivement dans les microcosmes biotiques et non dans les stériles.

Dans le cas où ces deux étapes préalables ont été vérifiées, l'équation de Rayleigh a ensuite été appliquée aux mesures de concentration et de ratios énantiomériques. Si une relation linéaire est observée entre la biodégradation et les variations énantiomériques, cela signifie que le fractionnement énantiomérique constitue effectivement un indicateur d'intérêt pour quantifier la biodégradation du MTP et potentiellement d'autres PPSP chiraux en aval des STEP.

1.2.3. Etude du fractionnement énantiomérique dans des STEP

L'existence d'une relation linéaire entre biodégradation et fractionnement énantiomérique a également été étudiée dans les STEP pour examiner la robustesse de l'outil énantiomérique. Pour ce faire, les concentrations et les ratios énantiomériques des deux molécules sélectionnées ont été mesurés et comparés entre les entrées et sorties de plusieurs STEP. Si les molécules d'étude s'avèrent être effectivement dégradées selon un processus stéréosélectif durant le traitement des eaux usées, l'équation de Rayleigh peut alors être appliquée aux mesures de concentration et de ratios énantiomériques réalisées. Dans le cas où une relation linéaire est observée à la fois dans les microcosmes et les STEP, les facteurs d'enrichissement énantiomérique mesurés peuvent alors être comparés pour vérifier si les mécanismes réactionnels mis en jeu sont similaires.

Les résultats issus de la littérature montrent que la VEN et le MTP sont peu éliminés dans les STEP (Gasser et al., 2012b; Rubirola et al., 2014). Les STEP, qui ont été sélectionnées pour étudier le fractionnement énantiomérique, présentent donc des traitements biologiques poussés (type traitement de l'azote ou traitement tertiaire...). Le but est d'obtenir des taux de biodégradation des molécules d'étude dans les STEP assez élevés pour mesurer un fractionnement énantiomérique, dans le cas où les réactions de biodégradation sont énantiosélectives.

La localisation et les caractéristiques des trois STEP sélectionnées sont présentées sur la carte ci-dessous (Figure 42) et dans le Tableau 29.



Figure 42. Localisation des trois STEP sélectionnées pour l'étude du fractionnement énantiomérique (Google Earth).

Tableau 29. Caractéristiques des STEP sélectionnées pour l'étude du fractionnement énantiomérique (données 2014).

	STEP 1	STEP 2	STEP 3
Procédés	M/B/N/D/P/MB	M/B/N/D/P	M/B/P
Equivalent habitants	20 000	140 300	299 100
Débit moyen en sortie (m³/j)	1 566	9 311	33 980
Débit DCO (kg/j)	26,8	254,1	1 070
Traitement d'effluents hospitaliers	/	1 hôpital	/

M procédés physiques (filtration, décantation), *B* procédés biologiques de type boues activées, *N* nitrification, *D* dénitrification, *P* traitement du phosphore, *MB* bioréacteur à membrane.

Les échantillons ont été collectés en entrée et sortie des STEP sous forme d'échantillons composites 24 h. Ils ont ensuite été transférés vers le laboratoire en maximum 3 h dans des glacières conservées à 10°C. Une fois arrivés au laboratoire, les échantillons ont été directement filtrés à 0,7 µm et conservés à 4°C avant d'être extraits dans les 24 h.

2. Publication n°3 : Evaluation du fractionnement énantiomérique à l'aide du métoprolol (MTP)

Une méthode d'analyse chirale a, tout d'abord, été développée pour quantifier les deux énantiomères du MTP et de ses métabolites à l'état de traces dans des matrices eaux usées. Elle comprend une étape d'extraction des échantillons sur phase solide suivie d'une étape d'analyse par chromatographie liquide chirale couplée à de la spectrométrie de masse à haute résolution. La méthode optimisée permet une bonne séparation des énantiomères (résolution supérieure à 1) de l'ensemble des composés étudiés sur colonne chirale. Les limites de quantification de la méthode sont comprises entre 5,1 et 30,1 ng/L pour des matrices entrées et sorties de STEP : la méthode est donc adaptée à la quantification des composés à l'état de traces sur le terrain.

Cette méthode chirale a ensuite été appliquée pour étudier le lien qui existe entre la biodégradation du MTP et le fractionnement énantiomérique associé dans des STEP et des microcosmes. Les résultats obtenus dans les trois STEP étudiées montrent que le MTP subit une biodégradation énantiosélective en faveur d'un enrichissement du MTP résiduel en énantiomère S. L'application de l'équation de Rayleigh semble conduire à une relation linéaire entre l'abattement du MTP dans les STEP et l'ampleur des variations énantiomériques observées. Les résultats issus d'expériences conduites en conditions contrôlées confirment, encore une fois, l'existence d'une relation linéaire entre la biodégradation du MTP et le fractionnement énantiomérique associé lorsque l'équation de Rayleigh est appliquée. Les expériences en microcosmes ont également permis de confirmer que l'enrichissement énantiomérique est généré spécifiquement par des réactions biologiques. Ces expériences prouvent que le fractionnement énantiomérique peut effectivement constituer un indicateur intéressant pour quantifier spécifiquement la biodégradation du MTP *in situ*.

La biodégradation stéréosélective du MTP dans les STEP et les microcosmes conduit à la formation du métoprolol acide (MTPA). En s'appuyant sur la stéréochimie du MTP et du MTPA, un mécanisme a été proposé pour expliquer la biodégradation énantiosélective du MTP en MTPA. Ce mécanisme inclut la formation d'un radical benzylique et d'un éther de vinyle comme intermédiaires.

L'ensemble des travaux réalisés sur le fractionnement énantiomérique, en utilisant le métoprolol (MTP) comme molécule modèle, est présenté dans l'article intitulé, *Enantiomeric fractionation of metoprolol and its major transformation products for quantitative biodegradation measurement and elucidation of biodegradation mechanisms*, soumis à *Water Research* en 2015.

Publication n°3 :
**Enantiomeric fractionation of metoprolol and its major
transformation products for quantitative biodegradation
measurement and elucidation of biodegradation mechanisms**

Marine Souchier^{a,b}, Dalel Benali-Raclot^b, Claude Casellas^a, Valérie Ingrand^b and Serge Chiron^{a*}

^aVeolia Environnement Recherche et Innovation, Chemin de la digue, BP 76 78603 Maisons-Laffitte Cedex, France.

^bUMR HydroSciences 5569, Université Montpellier, 15 Avenue Ch. Flahault, 34093 Montpellier cedex 5, France.

*Corresponding author:

E-mail: Serge.Chiron@msem.univ-montp2.fr.

Tel: 33 (0)4 11 75 94 15; Fax: 33 (0)4 11 75 94 61.

Abstract

On the basis of a newly developed chiral analytical method, the stereochemistry of R,S-metoprolol and its major metabolites O-desmethylnmetoprolol, α -hydroxymetoprolol and metoprolol acid was studied in biological wastewater treatment plants and in laboratory biodegradation batch experiments including nitrifying sludge and water / sediment system. Stereoselective degradation of metoprolol was exclusively observed under biotic conditions, confirming the specificity of enantiomeric fraction variations to biodegradation processes. In laboratory and field studies, metoprolol was always transformed into metoprolol acid with a significant (S)-enantiomer enrichment of metoprolol. The results of enantiomeric enrichment pointed the way for a quantitative assessment of in situ biodegradation processes due to a good fit ($R^2 > 0.98$) of the aerobic degradation of metoprolol to the Rayleigh dependency in the different investigated degradation processes. This could be contemplated probably due to identical transformation mechanisms and kinetics of both metoprolol enantiomers. The stereochemistry of metoprolol and its metabolites could also teach on the biodegradation mechanisms of metoprolol. In contrast to human metabolism, the benzylic hydroxylation pathway of metoprolol did not occur upon environmental conditions and the O-dealkylation pathway was probably limited. Instead, a novel degradation route was suspected involving the formation of an unstable benzylic radical and vinyl ether intermediates and which might account for the significant and specific stereoselective biotransformation mechanisms of metoprolol once entering in the environment.

Keywords : Metoprolol, stereochemistry, wastewater treatment, Rayleigh, transformation pathway

I. Introduction

The occurrence of pharmaceutical products residues and their metabolites / transformation products (TPs) in surface water in the ng- μ g/L concentration range as a result of their incomplete removal during sewage treatment is well documented (Petrie et al., 2014). This is contrasted by the still limited knowledge on their fate in river downstream of wastewater treatment plant (WWTP) discharges. Quantitative information regarding the capacity of receiving rivers to self-purify pharmaceutical residues remains scarcely available.

The majority of previous researches on environmental fate of trace organic compounds has focused on individual attenuation mechanisms (e.g. biodegradation, photolysis, sorption) in controlled laboratory experiments (Ramil et al. 2010; Gasser et al. 2012). These studies provide important, qualitative insight into attenuation processes but it is difficult to translate such information into a form that can be generalized to represent the attenuation and retention of pharmaceuticals in streaming waters (Radke and Maier, 2014). Chemical fate models have also been developed and provide predictions on expected environmental concentrations and persistence of compounds using estimates of mass loading, dilution and in-stream attenuation. However, current comprehension of the attenuation rates remains a limiting factor for the development and calibration of predictive models on the chemical fate of pharmaceuticals in rivers (Riml et al., 2013).

Due to limits of laboratory investigations and modeling techniques, *in situ* studies of trace emerging contaminant attenuation remain essential to aid in evaluating assumptions on dominant attenuation mechanisms and calibrating models. Our knowledge in field studies is limited to a few field works performed downstream of WWTPs discharges (Fono et al. 2006; Kunkel and Radke 2012; Writer et al. 2013). A negative concentration gradient has been generally observed for contaminants when moving downstream of WWTPs mainly due to increased dilution, but factors like phototransformation, biotransformation, and sediment adsorption may also contribute (Fono et al. 2006; Kunkel and Radke 2008, 2012; Radke et al. 2010). It is possible to estimate overall in-stream attenuation rates of emerging contaminants from monitoring data by using conservative tracers and time-consuming sampling methods to minimize potential effects of variable source input (Acuña et al., 2015, Kunkel and Radke, 2011). If the use of conservative tracers compensates for dilution effects, it does not allow for distinction between other natural attenuation processes. However, to better understand the capacity of receiving rivers to self-purify pharmaceutical residues, it is important to assess the quantitative contribution of individual natural attenuation processes.

Several approaches have then been considered to overcome monitoring limitations in quantifying specifically *in situ* biodegradation which is presumed to be the most important attenuation process (Fono et al. 2006; Kunkel and Radke 2012). Determination of compound-specific stable isotope ratios (CSIA) has been successfully used to study biological processes (Bombach et al. 2010; Elsner et al. 2012). This tool has undergone a rapid development toward important applications in contaminant hydrology and organic biogeochemistry providing evidence of pollutant biodegradation mainly in groundwater system (Thullner et al., 2012). In surface water, CSIA application has been limited to the assessment of diffuse river pollution by pesticides (Lutz et al., 2012). Enantiomeric analysis of pharmaceuticals (e.g venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine) has also proved the existence of biodegradation both in microcosms and in field studies (Gasser et al., 2012; Li et al., 2013). The parallel process of comparing the enrichment of one species relative to the other is applied in both CSIA and enantiomeric analysis to prove existence of biodegradation. By using these tools, the need for mass balance is not required to study contaminant biodegradation which represents a relevant advantage compared with conservative tracer approaches. The concept of applying the Rayleigh approximation (equation) for assessing the extent of biodegradation on the basis of enantiomeric fractionation (EF) has been recently endorsed (Jammer et al., 2014) on the basis of enzymatic biodegradation studies. Quantitative test case demonstrations of Rayleigh-type enantiomeric enrichments are still needed.

We believe that metoprolol (MTP) is a good candidate to investigate the enantiomeric enrichment-biodegradation dependency because (i) MTP is marketed as a racemic mixture and human MTP oxidative metabolism is well known with benzylic hydroxylation leading to α -hydroxymetoprolol (α -HMTP) as a minor metabolite (< 10 % of ingested dose) and O-dealkylation leading to O-desmethylnmetoprolol (O-DMTP) followed by further oxidation into metoprolol acid (MTPA) as a major metabolite (> 65 % of ingested dose). Both pathways have shown slight enantioselectivity (Murthy et al., 1990) which should preclude from an high variability in R/S enantiomer ratio when MTP will enter in WWTPs, (ii) MTP is highly and steadily consumed all year long, poorly removed by different biological sewage treatment (Sui et al., 2011) and accordingly is widely distributed in surface water including German (Nödler et al., 2013), French (Gabet-Giraud et al., 2014) and Spanish (Lopez-Serna et al., 2013) rivers at tens of ng/L concentration levels, (iii) MTP enantiomeric enrichment has been already qualitatively applied for biodegradation tracking in river (Fono et al., 2006) even though the mechanisms responsible for this enantioselective fate has not been described yet.

The major aims of this work are the following: (i) To develop a chiral analytical method for the quantification of enantiomeric fraction (EF) of MTP and those of its major metabolites (α -HMTP, O-DMTP and MTPA) in raw and treated domestic wastewater (ii) To investigate the enantiomeric enrichment dependence of MTP on MTP conversion (biodegradation) in laboratory microcosms and in field studies and, (iii) To investigate MTP biodegradation mechanisms.

II. Material and methods

II.1. Chemicals and reagents

Racemic metoprolol (MTP, > 98%), venlafaxine (VEN, > 98%), metoprolol acid (MTPA, >98%), O-desmethylnmetoprolol (O-DMTP, >98%), α -hydroxymetoprolol (α -HMTP), mixture of diastereoisomers, >98%), metoprolol- d_7 (MTP- d_7), venlafaxine- d_6 (VEN- d_6) as well as enantiopures (S)-MTP and (R)-MTP were obtained from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). N-allylthiourea was obtained from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Ammonium acetate (NH_4Ac) and sodium azide (NaN_3) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC grade and analytical grade methanol were obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France). All chemicals were used as received without further purification. All aqueous solutions were prepared with UHQ Milli-Q water (Millipore, Bedford, USA). Standard solutions were prepared on a weight basis in methanol (at 1000 mg/L).

II.2. Monitoring of MTP and its major transformation products in urban WWTPs

Influents and effluents were collected from 3 domestic WWTPs located in France namely WWTP1 (20,000 m^3/d), WWTP2 (1500 m^3/d) and WWTP3 (34,000 m^3/d). The treatment of WWTP2 and WWTP3 consisted of a preliminary treatment, primary sedimentation unit and a secondary treatment with biological nutrient removal including nitrogen and phosphorus removal steps. WWTP1 was equipped with a membrane bioreactor (MBR) technology. The treatment consisted of a preliminary treatment, primary treatment and a secondary (biological) treatment (two anoxic zones and two aerobic zones) with MBR technology. Additional details on the characteristics and operating conditions of the WWTPs are listed in Table SC1. 24 h composite samples were collected. All samples were filtered through 0.7 μm glass fiber filters, stored at 4 °C and extracted within 24 h after collection.

II.3. Batch biodegradation experiments in water/river sediment microcosms and in nitrifying activated sludge

To investigate the enantiomeric enrichment of MTP dependence on MTP conversion, batch tests were carried out in parallel in separated 1 L beakers filled with 1 L of effluent collected at WWTP1. Beakers were charged with 1 g/L of sediment collected downstream from WWTP1 to ensure the presence of an active mixed bacterial culture. Beakers designated for abiotic degradation were amended with 1 g/L of NaN_3 . Four beakers (2 under biotic conditions and 2 under sterile conditions) were incubated in light and four beakers (2 under biotic conditions and 2 under sterile conditions) were incubated in dark using aluminum foil. All microcosms were kept at 20 ± 5 °C and agitated with magnetic stirrers throughout whole experiments to ensure sufficient oxygen supply. The beakers were ventilated to prevent temperature rise. Prior to spiking pharmaceuticals, the test systems were preconditioned for 2 d. Then, racemic MTP dissolved in methanol was spiked into the water phase at a concentration level of 10 $\mu\text{g/L}$. Racemic VEN was added at the same concentration levels than MTP. The percentage of the methanol spiked was always below 0.1% (v/v). Samples were taken eight times over a 65 d sampling period. At every sampling time, 100 mL sample were removed and filtered on 0.7 μm glass fiber filters. Samples were then extracted and analyzed according to the procedure implemented for wastewater sample analysis (see below).

In parallel, 100 mL glass bottles were loaded with 50 mL of nitrifying activated sludge, freshly collected from the nitrification tank of the WWTP1 during the aerobic period. The sludge was amended with an initial N concentration (in the form of NH_4Cl) of 10 mg/L, to boost ammonium monooxygenase (AMO) activity. Two glass bottles were also amended with the specific AMO inhibitor allylthiourea (ATU, 50 mg/L) to evaluate MTP biodegradation under inhibited ammonia-oxidizing activity. Separated bottles were spiked either with MTP, O-DMTP or α -HMTP (final concentration of 1 mg/L) in order to identify potential TPs. Preliminary tests showed that no sorption of MTP on sludge occurred over time. Glass bottles were incubated at 25°C in the dark. Bubbling of air through Teflon tubing into the test medium provided aeration of the system and suspension of the sludge particulate matter. Moreover, the pH was kept at 7.5–8.0 by titration with Na_2CO_3 during the incubation. At each sampling time (five samples over a 8 d sampling period), 0.5 mL were removed from each glass bottle and were centrifuged for 4 min at 12,000 g. An aliquot of the supernatant was analyzed by liquid chromatography high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) according to the procedure implemented for wastewater sample analysis after addition of racemic MTP- d_7 (1 mg/L) as internal standard and filtration on 0.45 μm cellulose filter (Sartorius, France).

NH_4^+ was determined after reaction with phenol and hypochlorite to give indophenol, whose absorbance was measured at 635 nm with an UV/Vis spectrophotometer.

II.4. Analytical methodology

Details on analytical protocols are provided as Supplementary Material (Table SC2, SC3, SC4 and SC5). Wastewater sample extraction was done by SPE using Oasis HLB cartridges (6 mL, 500 mg, Waters Corporation, USA) based on the procedure described elsewhere (Kasprzyk-Hordern et al., 2010). Briefly, after conditioning, 100 mL of filtered (0.7 μm cellulose filter) wastewater samples spiked with 100 ng of surrogates (MTP-d₇ and VEN-d₆) was passed through the cartridge. Analytes were eluted with 8 mL of methanol. Extracts were evaporated to dryness and reconstituted in 1 mL of methanol and analyzed by LC-HRMS in positive electrospray mode of ionization using an Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA). For recovery, 100 mL wastewater samples (influent and effluent) were spiked before extraction ($n = 5$ for each aqueous matrix studied) with a standards mixture of the chiral compounds at single enantiomeric concentration of 500 ng/L.

Enantiomers of MTP, those of its TPs and those of venlafaxine (VEN) were separated on a Astec Chirobiotic™ V vancomycin-based chiral column (250 x 2.1 mm i.d., 5 μm particle size from Supelco) using a method previously optimized for separation of venlafaxine enantiomers (Gasser et al., 2012). Briefly, separation of the studied enantiomers was achieved within a 20 min run with a mobile phase consisting of water + 30 mM ammonium acetate / methanol (10/90 (v/v), pH 6.0) in an isocratic mode of elution at a flow rate of 0.250 mL/min. Enantiomers resolution (R_s) was determined using Eq. C1 over two single enantiomeric concentrations (at 10 and 100 $\mu\text{g/L}$) in standards, WWTP influent and effluent matrices.

$$R_s = \frac{2(tr_{E2} - tr_{E1})}{w_{E2} + w_{E1}} \quad \text{Eq. C1}$$

Where tr_{E1} , tr_{E2} are the retention times of the first and second eluted enantiomer and w_{E2} , w_{E1} are the baseline peak width. The order of elution for MTP enantiomers was determined experimentally by injecting enantiopure standards, (S)-MTP being the first eluting peak and (R)-MTP the last one. For O-DMTP and MTPA, the first and the second eluting enantiomer were named E1 and E2, respectively, in absence of enantiopure standards. For α -HMTP, only the two diastereoisomers (out of four stereoisomers) were chromatographically resolved and were named E1 and E2. Data was acquired in full-scan mode from 90 to 300 m/z with a nominal resolving power of 50,000 and an automatic gain control of 5×10^5 by continuously

alternating two scan events: one without and one with fragmentation into the Higher-Energy Collisional dissociation (HCD) cell (15 eV).

The suitability of the method was tested by the assessment of different quality parameters including linearity, recoveries, precision, instrumental limits of detection and quantification (LOD and LOQ respectively), method limits of detection and quantification (MDL and MQL respectively). For enantiomeric enrichment determination, the relative enantiomers concentration was expressed as the enantiomeric fraction (EF) as recommended (Harner et al., 2000) and was calculated with the following equation Eq. C2 :

$$EF = \frac{E1}{E1+E2} \quad \text{Eq. C2}$$

Where E1 and E2 are the concentrations of the first and the last eluting enantiomer. EF equals to 0.5 in the case of a racemate compound. Enantiomer enrichment factor (ϵ_{ER}) values were determined using the modified form of the Rayleigh equation (Eq. C3) :

$$\ln\left(\frac{ER_t}{ER_0}\right) = \epsilon_{ER} \times \ln f \quad \text{Eq. C3}$$

Where $ER_t = E1/E2$ and ER_0 are the current and the initial enantiomer ratio, f is the compound remaining fraction (C_t/C_0) measured by LC-HRMS. ER can be smaller or larger than 1, and there is no convention regarding which enantiomer should be in the denominator.

III. Results and discussion

III.1. Chiral analysis of metoprolol and its major transformation products

Chiral analysis of MTP has been already reported in wastewater using LC–MS/MS and vancomycin-based enantioselective analytical columns (i.e. Chirobiotic column, MacLeod et al., 2007, Bagnall et al., 2012). However, the resolution of the enantiomers of TPs of MTP (i.e., α -HMTP, O-DMTP and MTPA) has required the use of different chiral analytical columns (Barclay et al., 2012). This is the first time that the enantiomers of MTP and those of its major TPs were chromatographically resolved in a single 20 min run (see Fig. SC1) with a $R_s > 1$ which represented less than 2% overlap for two consecutive peaks and which allowed for accurate EF calculation. This result was obtained by using a mobile phase which previously allowed for the separation of enantiomers of VEN and its major metabolites (Gasser et al., 2012). However, the enantiomeric separation of MTP and its TPs has been improved with respect to the published method for VEN by modifying the mobile phase from 15/85 (v/v) of 30 mM ammonium acetate / methanol to 10/90 (v/v).

The major performances of the analytical method are reported in Table C1 for spiked wastewater.

Table C1. Performances of the chiral analytical method for MTP and its transformation products α -HMTP, O-DMTP and MTPA in spiked influent and effluent samples from WWTP1.

Compound	Exact mass [M + H] ⁺	Rs (n=5)		Relative recovery ^a (% n=5)		MQL influent (ng/L)	MQL effluent (ng/L)	EF (n=5)	
		Influent	Effluent	Influent	Effluent			Influent	Effluent
MTP-(S)	268.1907	1.44 ± 0.06	1.36 ± 0.11	91 ± 3	88 ± 6	11.5	5.1	0.50 ± 0.01	0.50 ± 0.01
MTP-(R)				89 ± 2	87 ± 6	12.4	6.5		
MTPA-(E1)	268.1543	1.41 ± 0.04	1.45 ± 0.09	15 ± 5	113 ± 6	132	13.2	0.53 ± 0.03	0.53 ± 0.03
MTPA-(E2)				13 ± 4	101 ± 7	159	16.5		
α -HMET-(E1)	284.1857	1.58 ± 0.02	1.54 ± 0.08	66 ± 8	98 ± 3	17.0	5.2		
α -HMET-(E2)				70 ± 7	99 ± 5	17.3	6.6		
O-DMTP-(E1)	254.175	1.45 ± 0.04	1.51 ± 0.03	55 ± 9	93 ± 7	30.1	7.9	0.47 ± 0.06	0.48 ± 0.01
O-DMTP-(E2)				62 ± 4	99 ± 6	28.1	9.6		

^aSpiking level: 500 ng/L.

Obtained R_s values ranged from 1.4 to 1.6 according to the compound and the matrix (influent or effluent of domestic WWTP). No losses in R_s were observed when switching from effluent to influent matrices. As an illustrative example, Fig. C1 shows the analysis of an influent sample from WWTP2 where MTP, α -HMTP and MTPA were detected and quantified

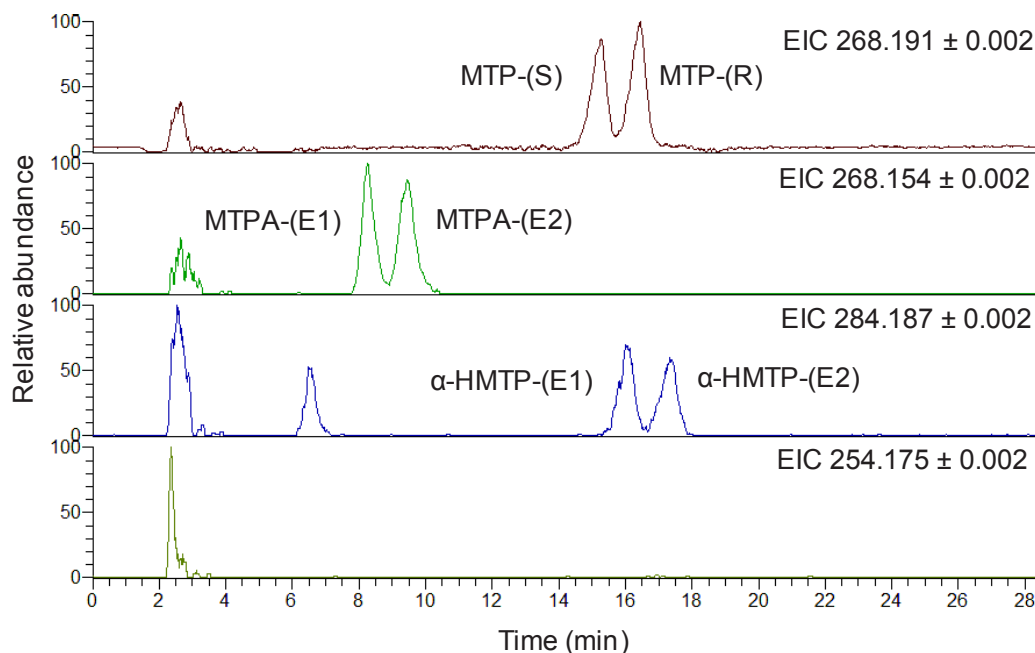


Fig. C1. LC–HRMS Extracted Ion Chromatograms (EIC) corresponding to the chiral analysis of an influent sample from WWTP1 where enantiomers of MTP (m/z 268.1907), MTPA (m/z 268.1543) and diastereoisomers α -HMTP (m/z 284.1857) were detected and quantified (see Table C2) but not O-DMTP.

As expected, SPE did not favor one enantiomer over another and recoveries varied from 55 to 99% according to the compound and matrices. Recovery values were higher in effluent than in influent. Low recovery values (< 20%) and high ion suppression mainly due to matrix effects were recorded for MTPA and this metabolite was therefore only qualitatively determined. Nevertheless, assuming identical behavior of both MTPA enantiomers during the whole analytical procedure, ER values of MTPA could be calculated. On the contrary, α -HMTP and O-DMTP concentrations could be determined using MTP- d_7 as internal standard.

For quantification purposes, parent ions corresponding to pseudo molecular $[M+H]^+$ ions were used and quantification was carried out by isotope dilution. Most previous studies dealing with MTP analysis relied on selected reaction monitoring (SRM) using triple quadrupole at unit mass resolution by monitoring only one transition ion (Rubirola et al.,

2014). However, recent studies (Hernández et al. 2012) have shown that this situation might result in false positive identifications for individual compound and at least two transition ions are then normally required. HRMS instrument used in this study offered a better confirmation of targeted compounds and Table SC2 reports the different criteria used for their detection. These criteria included 1) retention time (RT) with an allowed window of ± 0.5 min and 2) an exact mass acquisition of the molecular ion and the MS/MS fragment with a precision below 5 ppm.

In spite of a high resolving power of 50,000 with high mass precision (± 5 ppm), HRMS has still a sensitivity down to the ng/L in full scan mode as shown by the reported method quantification limits ranging, according to the target compound, from 5.1 to 9.6 ng/L in effluent and from 11.0 to 30.1 ng/L in influent, which makes this analytical method suitable for trace analysis of MTP enantiomers and those of its TPs in wastewater. Both intra- and inter-day precisions, as indicated by relative standard deviation calculated from the analysis of 3 replicates over 3 days, were less than 10%. Neither degradation nor racemization of MTP enantiomers or those of its TPs was observed when the samples were placed in the freezer (-20 °C) for at least 4 weeks.

III.2. Enantiomeric enrichment-biodegradation relationship in batch experiments and in field studies

First, the validated analytical method was used for chiral analysis of MTP and TPs in influents and effluents collected from three domestic WWTPs. The measured concentrations are summarized in Table C2 together with the EF values of detected compounds. MTP was detected in all samples and the average MTP concentrations ranged from 119 to 687 ng/L and from 18.6 to 157 ng/L in influent and effluent, respectively. These concentrations are similar to those previously reported (MacLeod et al. 2007; Bagnall et al. 2012b; Barclay et al. 2012). Results on MTP removal rates are higher than those reported in the literature. MTP presents low biodegradation rates in conventional WWTPs as illustrated by the mean removal efficiency of 28% ($n = 21$) previously reported (Sui et al., 2011). This study confirmed higher MTP removal under nitrification conditions (77% and 46% for WWTP2 and 3, respectively) whereas MBR technology was the most efficient technology for MTP removal (84% for WWTP1).

Table C2. Average concentration and enantiomeric fraction (EF) of MTP and its transformation products α -HMTP, O-DMTP and MTPA in influent and effluent collected from three domestic WWTPs.

	Concentration (ng/L) (mean \pm SD, n = 3)						EF (mean \pm SD, n = 9)	
	WWTP1		WWTP2		WWTP3		Influent	Effluent
	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent		
MTP-(S)	58.9 \pm 3	13.0 \pm 0.6	354 \pm 12	103 \pm 5	99.1 \pm 3.3	58.8 \pm 3.4	0.51 \pm 0.01	0.64 \pm 0.03
MTP-(R)	60.6 \pm 1.2	5.6 \pm 0.4	333 \pm 18	53.8 \pm 2.2	91.2 \pm 4.1	44.8 \pm 0.7		
MTPA-(E1)	n.q	n.q	n.q	n.q	n.q	n.q	0.51 \pm 0.01	0.54 \pm 0.06
MTPA-(E2)	n.q	n.q	n.q	n.q	n.q	n.q		
α -HMTP-(E1)	55 \pm 3.6	n.d	187 \pm 18	n.d	n.d	n.d		n.a
α -HMTP-(E2)	47 \pm 3.2	n.d	143 \pm 25	n.d	57.6 \pm 1.5	n.d		
O-DMTP-(E1)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d		
O-DMTP-(E2)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d		

n.a : not applicable

n.d : not detectable

n.q : not quantifiable

More interestingly, MTP composition remained close to racemic in influent. This stereochemical observation is consistent with the slight enantioselectivity of MTP O-desmethylation processes reported in human metabolism (Murthy et al., 1990). Even though MTPA could not be accurately quantified, it was detected in all samples with areas similar to those of MTP despite its low recovery and high ion suppression suggesting high concentrations of MTPA in accordance with previous monitoring studies (Rubirola et al., 2014). O-DMTP was never detected probably due to quick and quantitative oxidation into MTPA. The racemic profile of MTPA in influent further endorsed the lack of MTP enantioselective biodegradation in human and in sewage networks.

In contrast, a large MTP (S)-enantiomeric enrichment during wastewater treatment was always observed (see Fig. SC2 as an illustrative analysis) but this latter was not confirmed with MTPA EF values mainly because MTPA originated also from atenolol biodegradation for which an (R)-enrichment could take place during wastewater treatment (Kasprzyk-Horden and Baker, 2012). MTPA is not produced during the human metabolism of atenolol and consequently atenolol did not alter the stereochemistry of MTPA in influent (Escher et al., 2006). The benzylic hydroxylation of MTP produces α -HMTP which consists of 4 stereoisomers due to the generation of an additional chiral center. In this study, two diastereoisomers (out of 4 stereoisomers) were chromatographically separated namely 1S2S; 1S2R and 1R2R; 1R2S. The former diastereoisomer is formed from (S)-MTP and the latter one is formed from the (R)-MTP. A previous study using a Chirobiotic T column (Mistry et al., 2001) reported 1S2S; 1S2R as the first eluting peak of the two diastereoisomers. A similar behavior on the Chirobiotic V column might be reasonably assumed. With a diastereoisomer ratio value of 0.56 measured in influent on average, MTP benzylic oxidation proceeded through a (R)-MTP enrichment, as already reported in human and was probably not modified in sewerage. α -HMTP was detected in all influent samples in the 47–187 ng/L range and was fully eliminated during wastewater treatment. This latter result is consistent with recent study (Rubirola et al., 2014).

The magnitude of (S)-MTP enrichment and EF variation was clearly WWTP dependent (see Fig. C2). However, it might also be MTP conversion dependent as depicted in Fig. C3a where the plot of $\text{Ln}(ER_{\text{eff}}/ER_{\text{inf}})$ vs. $\text{Ln}(C_{\text{eff}}/C_{\text{inf}})$ (a Rayleigh like representation) is reported, where C_{eff} and C_{inf} stand for MTP concentrations in WWTPs effluent and influent, respectively. This plot indicates a rather good linear relationship trend ($R^2 > 0.98$) between MTP removal in WWTP and EF variations of MTP between influent and effluent even though the number of investigated WWTPs was limited to three.

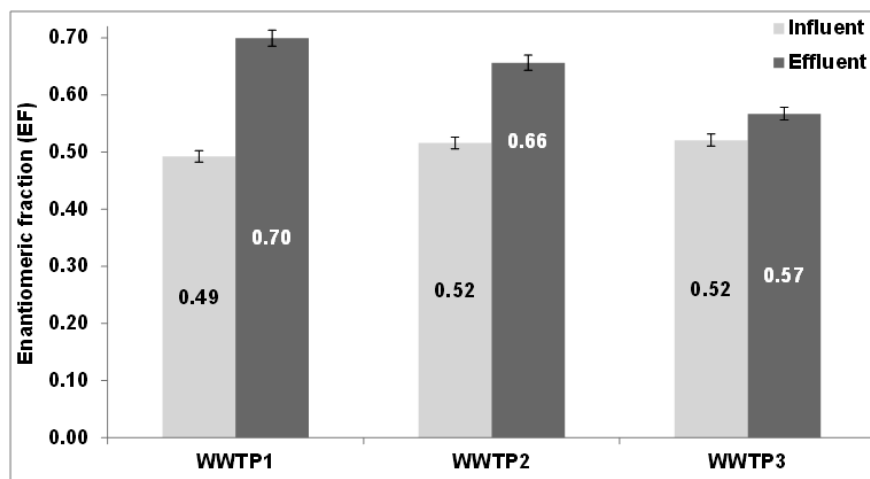


Fig. C2. Enantiomeric fraction (EF) of MTP in three WWTPs influent and effluent (mean \pm SD, $n = 3$).

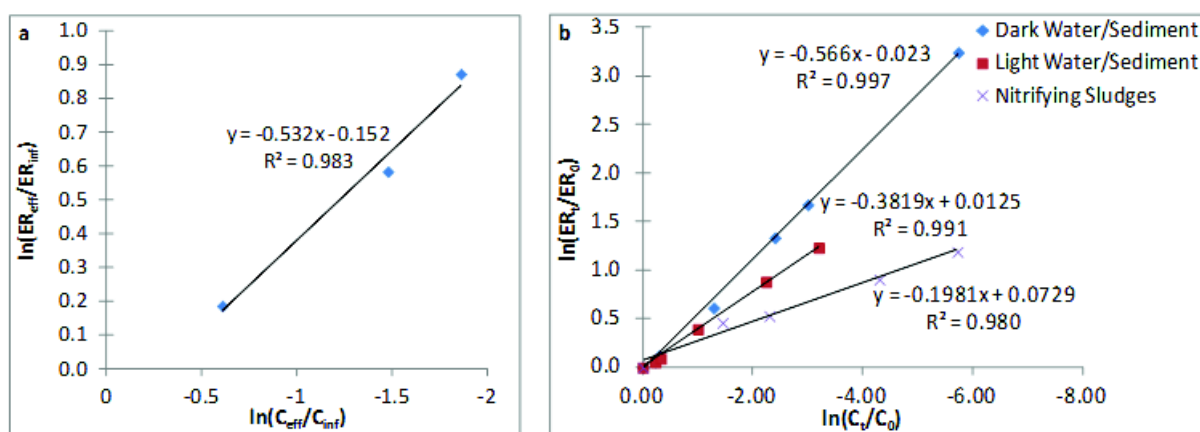


Fig. C3. a) Relationship between ER variation of MTP and MTP abatement in three WWTPs b) Rayleigh representation of the ER variations versus MTP biodegradation in laboratory batch biodegradation experiments including nitrifying sludge and water/sediment system.

Laboratory biodegradation batch experiments were performed to get insight into the ability of the enantiomeric MTP enrichment to quantify MTP biodegradation through the Rayleigh equation application. This approach made sense because MTP concentrations ($< 10 \mu\text{g/L}$) were supposed to be much lower than the Michaelis-Menten constant (K_M) of the enzymatic reaction responsible for MTP transformation (i.e., monooxygenase, Jammer et al., 2014) which is the major condition to employ the Rayleigh equation. K_M values ranging between 10^3 and $10^6 \mu\text{g/L}$ have been reported for monooxygenase. These data were taken from the BRENDA enzyme database (Scheer et al., 2011) and from several reviews dealing with cytochrome P450 enzymes (Hansch et al., 2004; Pirovano et al., 2015). MTP was incubated in nitrifying sludge and in WWTP effluent / river sediment under different biotic and abiotic conditions (i.e. in the dark or exposed to light). Sorption had a negligible influence on MTP

dissipation because MTP did not demonstrate to sorb to suspended particulate matter (results not shown). Nitrifying sludge was selected because higher MTP transformation rates than with conventional activated sludge were expected according to field study results. The aim was also to better investigate the role of nitrifying bacteria in MTP attenuation and in particular to investigate the assumption of a link between MTP biodegradation and ammonia oxidation activity. This hypothesis was based upon the fact that AMO is known to catalyze the oxidation of a wide array of organic contaminants mainly through hydroxylation reactions (Pérez and Barceló, 2007; Dawas-Massalha et al., 2014).

MTP was eliminated in presence of nitrification enrichment bacterial communities within 7 d, leading to formation of MTPA which was further degraded (see Fig. SC6 and SC7). MTP degradation was an enantioselective transformation process resulting in (S)-MET enantiomer enrichment similarly to field results. Degradation fitted apparent first order kinetics for both enantiomers with close $k_{\text{MTP-(S)}} = 0.90$ and $k_{\text{MTP-(R)}} = 1.30 \text{ d}^{-1}$ values (Table C3). Only slight ammonium degradation was observed in the nitrification inhibited control experiments which indicated the utility of N-allylthiourea (ATU) addition, a known AMO inhibitor (see Fig. SC6). MTP transformation rates were hardly inhibited by ATU for both MTP enantiomers ($k_{\text{MTP-(S)}} = 0.70$ and $k_{\text{MTP-(R)}} = 1.12 \text{ d}^{-1}$, see Table C3). The activity of nitrifying bacteria and particularly AMO might not control MTP biodegradation. This result is consistent with those of previous studies (Sathyamoorthy et al., 2013). MTP biodegradation might be link to ammonia removal but the biochemical mechanism is not necessarily linked to AMO activity as reported for other organic micropollutants (Helbling et al., 2012).

Table C3. Apparent kinetic rate constant (k), related half lives ($T_{1/2}$) and EF values reached for MTP and MTPA at the end of MTP biodegradation in nitrifying sludge (7 days) and in water/sediment system (63 days).

Batch		k (d ⁻¹)	T _{1/2} (d)	EF _{final} MTP	EF _{final} MTPA
Dark water/sediment	MTP-(S)	0.12 ± 0.01	5.82 ± 0.47	0.63	0.53
	MTP-(R)	0.19 ± 0.02	3.56 ± 0.28		
Light water/sediment	MTP-(S)	0.18 ± 0.01	3.84 ± 0.31	0.69	0.64
	MTP-(R)	0.25 ± 0.02	2.77 ± 0.22		
Nitrifying sludge	MTP-(S)	0.90 ± 0.07	0.77 ± 0.06	0.65	0.63
	MTP-(R)	1.30 ± 0.10	0.53 ± 0.04		
Nitrifying sludge with ATU	MTP-(S)	0.70 ± 0.06	0.99 ± 0.08	0.83	0.71
	MTP-(R)	1.12 ± 0.09	0.62 ± 0.05		

Results for biodegradation batch experiments kinetics in wastewater / river sediment microcosms are presented in Table C3 and in Fig. SC3, SC4 and SC5. Dark treatment resulted in complete MTP transformation in 27 d while in sterile controls, 63% of initial MTP concentration remained after 63 d incubation. The decrease in MTP concentrations in sterile control experiments could be due to insufficient sterilization against time. However, biodegradation was confirmed as the predominant MTP removal mechanism. Experiments in the light degraded MTP quicker than their dark equivalent ($k = 0.25$ vs 0.19 d^{-1} for MTP-(R) for instance). This was probably due to the contribution of photochemical processes. α -HMTP and O-DMTP were identified and quantified with bell-shaped kinetic profiles with O-DMTP and α -HMTP accounted for 20% and 10% of the initial MTP concentration in sterile control experiments after 25 d incubation time in light (see Fig. SC3). MTP hydroxylation and O-dealkylation reactions have been already identified upon hydroxyl radical reactivity (Song et al., 2008). In contrast, the N-deisopropyl TP was not identified even though it was identified as the major TP upon indirect photochemical transformation in presence of fulvic acids (Chen et al., 2012).

No stereoselectivity in MTP degradation was observed in any abiotic experiments. Stereoselective degradation of MTP, leading to a (S)-enrichment was exclusively observed under biotic conditions, confirming the specificity of EF variations to biodegradation processes. Similarly to field studies, the predominant TP was always MTPA and the ER of MTPA was increased during all aerobic batch degradation studies (Table C3). The sum of MTPA and MTP was not constant during experiments on the basis of peak area, leading to a decrease of the mass balance over time. There is a trend for further MTPA degradation (see Fig. SC7) in contrast to previous study reporting MTPA stability (Rubirola et al., 2014).

Enantiomeric fractionation (ER_t/ER_0) was plotted against the MTP residual fraction (C_t/C_0) according to the Rayleigh equation for all biotic experiments. For water / sediment microcosms, the linear fit to the Rayleigh approximation was obtained under both dark and light conditions ($R^2 > 0.99$ and > 0.98 , respectively) while for batch experiments with nitrifying sludges, a convincing fit $R^2 > 0.98$ was observed in spite of more complex matrices and higher spiked concentrations (Fig. C3b). The corresponding enantiomeric enrichment factors ϵ_{ER} were -57 %, -38 % and -20%, respectively, which is in the same order of magnitude as the first ϵ_{ER} reported in the literature for enzymatic hydrolysis of mecoprop-methyl, dichlorprop-methyl, and dimethyl-methyl succinate by lipases (from -25.9 to -194.1%, Jammer et al. 2014). This is the first time that a convincing fit ($R^2 > 0.98$) to the Rayleigh plot was obtained under conditions close to field ones, supporting a linear relationship between EF variation and the biodegradation extent of MTP. Both enantiomers followed the same

kinetic order with close kinetic rate constants values (Table C3) and probably obey the same degradation mechanisms. In these conditions, the ER-conversion relationship does not depend on reaction conditions but mainly depends on reaction time. This is in contrast with the enantioselective transformation of O-desmethylvenlafaxine (O-DMV) for which different kinetic orders were obtained for both enantiomers. An identical degradation mechanism for both O-DMV enantiomers was therefore not guaranteed preventing from a good fit to Rayleigh equation (R^2 0.96, Gasser et al., 2012). These results support enantiomeric fractionation as a good candidate for quantitative assessment of biodegradation of MTP as long as validity conditions are filled such as low concentrations of contaminant and same kinetic order and transformation mechanisms for both enantiomers.

Recently, it has been stated (Jammer et al., 2014) that the Rayleigh equation loses ground in WWTPs because if WWTP is assumed to behave as a continuously ideal stirred tank reactor, the expression of ER is given by a non-Rayleigh expression, $ER_t = (1 + k_2\tau)/(1 + k_1\tau)$ where E1, E2 are the concentrations of the MTP enantiomers, k_1 and k_2 their first order kinetic rate constant and τ is the residence time. When $k \gg 1 \text{ d}^{-1}$, a good fit of the data to the Rayleigh equation is not expected because ER_t does not depend on τ any longer. However, when $k \ll 1 \text{ d}^{-1}$, which might be the case of MTP in WWTP because lower k values are expected in field conditions than under controlled and optimized laboratory conditions where a $k = 1.1 \text{ d}^{-1}$ (average values for both enantiomers) was obtained, ER_t still depends on τ and the Rayleigh equation is still valid for WWTPs, as demonstrated by the results of this study (Fig. C3a). Even if this point deserves further investigation with a higher number of experimental data required, these preliminary results suggest that EF could be used as a relevant indicator of WWTPs biodegradation efficiency.

III.3. Biotransformation mechanisms of MTP

MTP biodegradation batches in nitrifying sludge were carried at non relevant environmental concentration (1 mg/L) to identify possible intermediates and their stereochemistry in order to establish MTP biodegradation pathways. This search for intermediates was based on a previously reported list of identified MTP (bio)transformation products (Rubirola et al., 2014; Li et al., 2014; Barclay et al., 2012). This list included α -HMTP, O-DMTP, MTPA, α -ketometoprolol, 4-(2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy)phenol and deaminated metoprolol. Suspect screening was performed by extracting from the HR-full scan chromatograms the exact mass of protonated expected TP ($[M+H]^+$) with a mass window of ± 5 ppm. After 7 d of

incubation, only O-DMTP was detected in very small amounts together with MTPA (see Fig. C4).

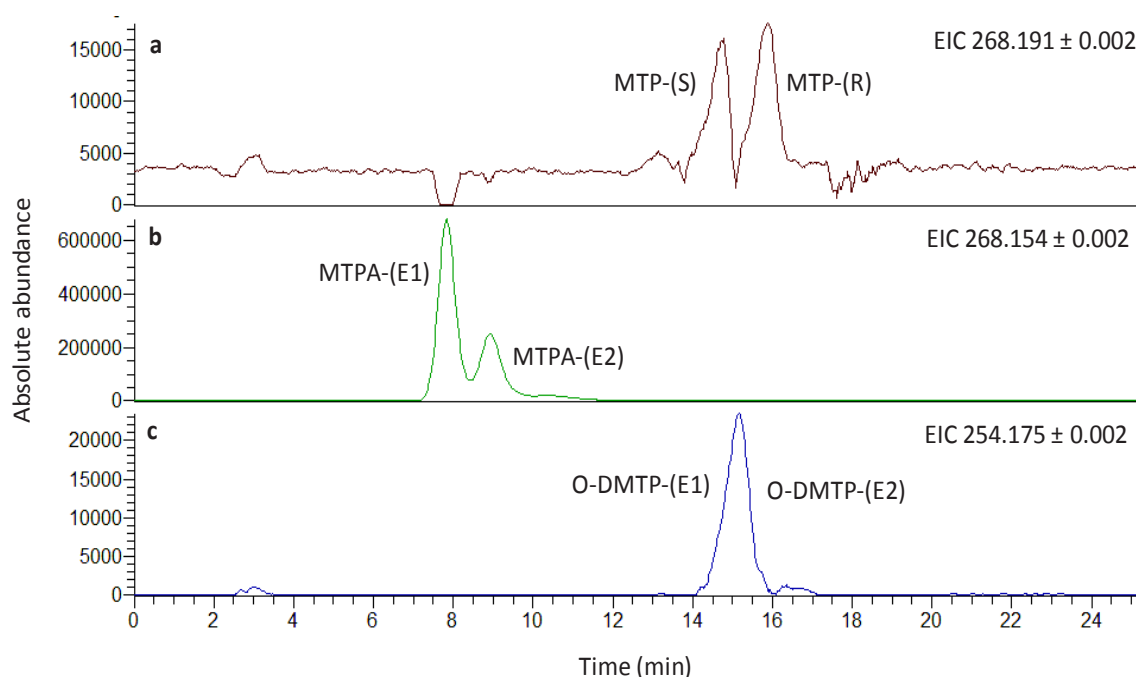


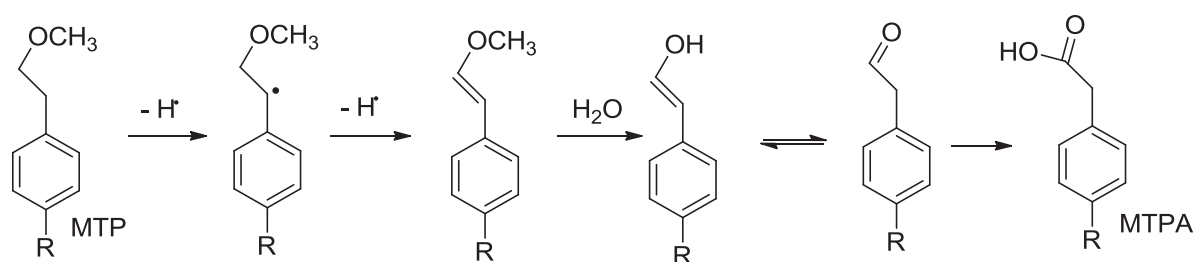
Fig. C4. LC-HRMS extracted Ion Chromatograms (EIC) corresponding to the chiral analysis of a sample after 7 d MTP incubation in nitrifying sludge where MTP, MTPA and O-DMTP were detected but not α -HMTP.

α -HMTP was never detected even though this TP was contemplated more stable than O-DMTP. This result is consistent with the full degradation of α -HMTP in investigated WWTPs and with the very scarce detection of α -HMTP in surface water (Langford et al., 2011). Consequently, benzylic hydroxylation might not occur in WWTP. This conclusion is also supported by the lack of involvement of AMO activity in the biodegradation mechanism of MTP whereas the reactions catalyzed by AMO are likely to be hydroxylation and this enzyme has already been involved in benzylic hydroxylation of the antibiotic trimethoprim, for instance (Eichhorn et al., 2005).

O-dealkylation appeared to be the only MTP transformation pathway in operation. However, in contrast to N-dealkylation, O-dealkylation was reported to be not favored under environmental conditions (Berkner and Thierbach, 2014). A clear illustrative example is codeine for which O-demethylated TP has never been identified out of eight identified TPs in biological wastewater treatment (Wick et al., 2011). One exception is venlafaxine (VEN) for which O-demethylvenlafaxine (ODV) was identified as the major TP both in biological activated sludge (Gasser et al., 2012) and in water /sediment system (this study). However,

VEN transformation kinetics were much slower than the MTP ones ($k_{\text{VEN-(S)}} = 0.012 \text{ d}^{-1}$ whereas $k_{\text{MTP-(S)}} = 0.12 \text{ d}^{-1}$ in dark and $k_{\text{VEN-(S)}} = 0.036 \text{ d}^{-1}$ whereas $k_{\text{MTP-(S)}} = 0.18 \text{ d}^{-1}$ in light, Table SC6) and the O-dealkylation reaction was not enantioselective (see Fig. SC8, SC9 and SC10). This latter result advocated to different biodegradation mechanisms between VEN and MTP.

A deeper investigation into the chiral profiles of O-DMTP revealed an (S)-enantiomer enrichment (see Fig. C4) while an (R)-enrichment was expected upon the assumptions that O-DMTP originated from MTP degradation and that (S) and (R) enantiomers of MTP and O-DMTP eluted in the same order as it was observed in the case of enantiomers of VEN and ODV using the same Chirobiotic V column (Gasser et al., 2012). This observation might be accounted for a further enantioselective transformation of O-DMTP into MTPA in which the transformation of (R)-enantiomer would prevail. Incubation of O-DMTP in nitrifying sludge revealed that this oxidation reaction was not stereoselective due to the formation of racemic MTPA (see Fig. SC11). The transformation of O-DMTP into MTPA was too rapid to allow for the proper detection of O-DMTP. This result supports a second route for MTPA formation. Oxidative dealkylation of alkyl-alkyl and aryl-alkyl ethers is catalyzed by a wide variety of oxidative enzymes, presumably including monooxygenase (White et al., 1996). VEN is featured by the asymmetry of the alkyl-aryl ether bond while MTP is featured by the symmetry of the alkyl-alkyl ether bond. In the former case, alkyl-O-cleavage was expected to dominate through hydroxylation at the terminal-C as the initial transformation step leading to unstable hemiacetal and the alcohol in aqueous solution because, the aryl-O bond is stronger than the alkyl-O bond due to resonance. In the latter case, hydroxylation of the sub-terminal carbon might represent one option to account for MTPA formation even though this mechanism is not reported in the literature to the best of our knowledge. A more sound assumption might be hydrogen abstraction at the benzylic position. This radical specie might evolve into a vinyl ether intermediate followed by the hydrolysis to the enol and further oxidation of the aldehyde to the acid (MTPA) as described in Scheme C1.



Scheme C1. Proposed biotransformation pathway of MTP into MTPA.

In the absence of identification of the aldehyde, the precise mechanism of the ether cleavage step remains uncertain. However, benzylic α -hydroxylation has been acknowledged as highly enantioselective reaction and involved a radical formation as a first intermediate of the reaction (Adam et al., 2000). This knowledge is very much in favor of the benzylic radical pathway to account for MTPA formation. Finally, incubation of α -HMTP in nitrifying sludge led to the identification of α -ketometoprolol and 4-(2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy)phenol as major TPs of α -HMTP (see Fig. SC12). The formation of α -ketometoprolol was expected since a ketone group is a potential oxidation product of a secondary alcohol (Arterburn, 2001) while the formation of the phenol derivative remained unexplained.

IV. Conclusions

- An efficient LC-HRMS chiral analytical method for the trace (ng/L) determination of MTP and three of its major metabolites in WWTP influent and effluent has been developed and validated with good quality parameters including $R_s > 1.4$ and MQL down to the ng/L range.
- MTP enantioselectivity bears the signature of biodegradation since MTP enantiomeric fraction (EF) only appeared to evolve significantly once entering in WWTPs. A rather good linear relationship trend ($R^2 > 0.98$) between MTP removal in WWTP and EF variations of MTP between influent and effluent has been observed. EF of MET might be used as an indicator of biological WWTPs well-functioning.
- A good fit ($R^2 > 0.98$) of the aerobic biodegradation of MTP to the Rayleigh dependency was obtained in batch experiments including nitrifying sludge and water / sediment system because the transformation mechanisms of both MTP enantiomers are probably identical.
- A suggestion of MTP transformation pathway involving a benzylic radical and vinyl ether intermediates possibly accounts for the enantioselective MTP biodegradation in the environment.
- Quantitative relationships between the extent of MTP biodegradation and the enantiomeric enrichment of MTP are demonstrated even though further field studies (i.e. in river downstream of WWTP discharges) are needed to confirm the possibility to use enantiomeric fractionation as a quantitative marker of biodegradation in environment.
- Studies on the capacity of rivers to self-eliminate pharmaceutical residues without resorting to obtain contaminant mass balance by using sophisticated sampling tools are anticipated.

Acknowledgements

This research benefited from the support of the Chair VEOLIA ENVIRONNEMENT-HydroSciences: Risk analysis relating to emerging contaminants in water bodies. David Benanou from Veolia Research and Innovation is thanked for his support in this research. David Rosain and Rosita Ngangoula from HydroSciences are thanked for their technical assistance.

Appendix A: Supplementary data

References

- Acuña, V., Von Schiller, D., Garcia-Gala, M.J., Rodriguez-Mozaz, S., Corominas, L., Petrovic, M., Poch, M., Barcelo, D., Sabater, S., 2015. Occurrence and in-stream attenuation of wastewater-derived pharmaceuticals in Iberian rivers. *Sci. Total Environ.* 503-504, 133-141.
- Adam, W., Lukacs, Z., Harmsen, D., Harmsen, D., Saha-Möller, C., Schreier, P., 2000. Biocatalytic asymmetric hydroxylation of hydrocarbons with the topsoil-microorganism *Bacillus Megaterium*. *J. Org. Chem.* 65, 878-882.
- Arterburn, J., 2001. Selective oxidation of secondary alcohols. *Tetrahedron* 57, 9765–9788.
- Bagnall, J., Evans, S., Wort, M., Lubben, T., Kasprzyk-Hordern, B., 2012. Using chiral liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface and wastewater at the enantiomeric level. *J Chromatogr. A* 1249, 115-129.
- Barber, L., Keefe, S., Brown, G., Furlong, E., Gray, J., Kolpin, D., Meyer, M., Sandstrom, M., Zaugg, S., 2013. Persistence and potential effects of complex organic contaminant mixtures in wastewater-impacted streams. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2177-2188.
- Barclay, V., Tyrefors, N., Johansson, I., Pettersson, C., 2012. Chiral analysis of metoprolol and two of its metabolites, α -hydroxymetoprolol and deaminated metoprolol, in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1269, 208-217.
- Berkner, S., Thierbach, C., 2014. Biodegradability and transformation of human pharmaceutical active ingredients in environmentally relevant test systems. *Environ. Sci. Pollut.* 21, 9461-9467.
- Bombach, P., Richnow, HH., Kästner, M., Fischer, A., 2010. Current approaches for the assessment of in situ biodegradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 839-852.

- Chen, Y., Li, H., Wang, Z., Li, H., Tao, T., Zuo, Y., 2012. Photodegradation of selected β -blockers in aqueous fulvic acid solutions: kinetics, mechanism, and product analysis. *Water Res.* 46, 2965-2972.
- Dawas-Massalha, A., Gur-Reznik, S., Lerman, S., Sabbah, I., Dosoretz, CG., 2014. Co-metabolic oxidation of pharmaceutical compounds by a nitrifying bacterial enrichment. *Biores. Technol.* 167, 336-342.
- Eichhorn, P., Fergusson, L., Pérez, S., Aga, D., 2005. Application of ion trap-MS with H/D exchange and QqTOF-MS in the identification of microbial degradates of trimethoprim in nitrifying activated sludge. *Anal. Chem.* 77, 4176-4184.
- Elsner, M., Jochmann, M., Hofstetter, TB., Hunkeler, D., Bernstein, A., Schmidt, TC., Schimmelmann, A., 2012. Current challenges in compound-specific stable isotope analysis of environmental organic contaminants. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2471-2491.
- Escher, B., Bramaz, N., Richter, M., Lienert, J., 2006. Comparative ecotoxicological hazard assessment of beta-blockers and their human metabolites using a mode-of-action based test battery and a QSAR approach. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7402-7408.
- Fono, L., Kolodziej, E., Sedlak, D., 2006. Attenuation of wastewater-derived contaminants in an effluent-dominated river. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7257-7262.
- Gabet-Giraud, V., Miege, C., Jacquet, R., Coquery, M., 2014. Impact of wastewater treatment plants on receiving surface waters and a tentative risk evaluation; the case of estrogens and beta blockers. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 1708-1721.
- Gasser, G., Pankratov, I., Elhanany, S., Werner, P., Gun, J., Gelman, F., Lev, O., 2012. Field and laboratory studies of the fate and enantiomeric enrichment of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine under aerobic and anaerobic conditions. *Chemosphere* 88, 98-105.
- Hansch, C., Mekapati, S.B., Kurup, A., Verma, R.P., 2004. QSAR of cytochrome P450. *Drug. Metab. Rev.* 36, 105-156.
- Harner, T., Wiberg, K., Norstrom, R., 2000. Enantiomer fractions are preferred to enantiomer ratios for describing chiral signatures in environmental analysis. *Environ. Sci. Technol.* 34, 218-220.
- Helbling, D., Johnson, D., Honti, M., Fenner, K., 2012. Micropollutant biotransformation kinetics associate with WWTP process parameters and microbial community characteristics. *Environ. Sci. Technol.* 46, 10579-10588.
- Hernández, F., Sancho, J., Ibáñez, M., Abad, E., Portolés, T., Mattioli, L., 2012. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1251-1264.

- Jammer, S., Voloshenko, A., Gelman, F., Lev, O., 2014. Chiral and isotope analyses for assessing the degradation of organic contaminants in the environment: Rayleigh dependence. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3310–3318.
- Kasprzyk-Hordern, B., Kondakal, V., Baker, D., 2010. Enantiomeric analysis of drugs of abuse in wastewater by chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 4575-4586.
- Kasprzyk-Hordern, B., & Baker, D. R., 2012. Enantiomeric profiling of chiral drugs in wastewater and receiving waters. *Environmental science & technology.* 3, 1681-1691.
- Kunkel, Uwe., and Michael, Radke., 2008. Biodegradation of acidic pharmaceuticals in bed sediments: insight from a laboratory experiment. *Environmental science & technology.* 19, 7273-7279.
- 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.
- Langford, K., Thomas, 2011. Input of selected human pharmaceutical metabolites into the Norwegian aquatic environment. *J. Environ. Monitor.* 13, 416-421.
- Li, Z., Maier, M., Radke, M., 2014. Screening for pharmaceutical transformation products formed in river sediment by combining ultrahigh performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry with a rapid data-processing method. *Anal. Chim. Acta* 810, 61-70.
- Lutz, S., Van Meerveld, H., Waterloo, M., Broers, H., Van Breukelen, B., 2013. A model-based assessment of the potential use of compound-specific stable isotope analysis in river monitoring of diffuse pesticide pollution. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 17, 4505-4524.
- MacLeod, S., Sudhir, P., Wong, C., 2007. Stereoisomer analysis of wastewater-derived beta-blockers, selective serotonin re-uptake inhibitors, and salbutamol by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. A* 1170, 23-33.
- Mistry, B., Leslie, J.L., Eddington, N.D., 2001. Enantiomeric separation of metoprolol and α -hydroxymetoprolol by liquid chromatography and fluorescence detection using a chiral stationary phase *J. Chromatogr. B* 758, 153-161.
- Murthy, S., Wendel, L., Martin, S., 1990. Enantioselective and diastereoselective aspects of the oxidative metabolism of metoprolol. 40,1637-1644.
- Nödler, K., Hilleband, O., Idzik, K., Strathmann, M., Schiperski, F., Zirlwagen, J., Licha, T., 2013. Occurrence and fate of the angiotensin II receptorantagonist transformation product valsartan acidin the water cycle: A comparative study with selected b-blockers and the persistent anthropogenic wastewater indicators carbamazepine and acesulfame. *Water Res.* 47, 6650-6659.

- Pérez, S., Barceló, D., 2007. Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. *TrAC Trends Anal Chem* 26, 494-514.
- 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.* 1-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- Pirovano, A., Brandmaier, S., Huijbregts, M., Ragas, A., Veltmana, K., Hendriks, J., 2015. The utilisation of structural descriptors to predict metabolic constants of xenobiotics in mammals. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 247-258.
- Radke, M., Maier, M., 2014. Lessons learned from water/sediment-testing of pharmaceuticals. *Water Res.* 55, 63-73.
- Ramil, M., El Aref, T., Fink, G., Scheurer, M., & Ternes, T. A., 2009. Fate of beta blockers in aquatic-sediment systems: sorption and biotransformation. *Environmental science & technology.* 3, 962-970.
- Riml, J., Wörman, A., Kunkel, U., Radke, M., 2013. Evaluating the fate of six common pharmaceuticals using a reactive transport model: Insights from a stream tracer test. *Sci. Tot. Environ.* 458-460, 344-354.
- Rubirola, A., Llorca, M., Rodriguez-Mozaz, S., Casas, N., Rodriguez-Roda, I., Barceló, D., Buttiglieri, G., 2014. Characterization of metoprolol biodegradation and its transformation products generated in activated sludge batch experiments and in full scale WWTPs. *Water Res.* 63, 21-32.
- Sathyamoorthy, S., Chandran, K., Ramsburg, A., 2013. Biodegradation and cometabolic modeling of selected beta blockers during ammonia oxidation. *Environ. Sci. Technol.* 47, 12835-12843.
- Scheer, M., Grote, A., Chang, A., Schomburg, I., Munaretto, C., Rother, M., Söhngen, C., Stelzer, M., Thiele, J., Schomburg, D., 2011. BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Res.* 39, D670-D676.
- Song, W., Cooper, W., Mezyk, S., Reaves, J., Peake, B., 2008. Free radical destruction of β -blockers in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1256-1261.
- Sui, Q., Huang, J., Deng, S., Chen, W., Yu, G., 2011. Seasonal variation in the occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products in different biological wastewater treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3341-3348.
- Thullner, M., Centler, F., Richnow, H.H., Fischer, A., 2012. Quantification of organic pollutant degradation in contaminated aquifers using compound specific stable isotope analysis – Review of recent developments. *Org. Geochem.* 42, 1440-1460.

- White, G., Russel, N., Tidswell, E., 1996. Bacterial scission of ether bonds. *Microbiol. Rev.* 60, 216-232.
- Wick, A., Wagner, M., Ternes, T., 2011. Elucidation of the transformation pathway of the opium alkaloid codeine in biological wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3375-3384.
- Writer, J., Antweiler, R., Ferrer, I., Ryan, J., Thurman, M., 2013. In-stream attenuation of neuro-active pharmaceuticals and their metabolites. *Environ. Sci. Technol.* 47, 9781-9790.

Supplementary Material

Table SC1. Characteristics and operating conditions of the WWTPs.

	WWTP1	WWTP2	WWTP3
Purification steps	M/B/N/D/P/MB	M/B/N/D/P	M/B/P
Population served (PE)	20 000	120 000	299 100
Average flow (m³/d)	1 566	9 311	33 980
DCO flow (kg/d)	26.8	254.1	1 070
Significant sources		1 hospital	
Sampling periods	3 April 14 (Spring)	4 September 14 (Summer)	4 September 14 (Summer)

M mechanical, *B* biological, *N* nitrification, *D* denitrification, *P* phosphorus removal, *MB* membrane bioreactor

Chiral analytical methods validation :

Subsequent quantification of chiral drugs in aqueous matrices was carried out using a 6-point multi-component internal standard calibration curve (0–100 µg/L) produced by serial dilution of a stock solution of compounds (1 mg/L). The relative calibration curve was prepared by calculating the ratios between the peak area of each substance and the peak area of the internal standard and was used to determine linearity, range and instrumental detection and quantification. Surrogates were not available for MTP metabolites so we used MTP-d₇ to correct for extraction losses and matrix effects of the metabolites. For venlafaxine (VEN), VEN-d₆ was used as internal standard.

The instrument quantification and detection limits (IQL and IDL) were estimated as the concentration of compound that gave a signal-to-noise ratio of 10:1 and 3:1 respectively. Method detection limits (MDL) and method quantification limits (MQL) for influent and effluent were deduced using Eqs. SC1 and SC2.

$$MDL = \frac{IDL \times 100}{ARR \times CF} \text{ Eq. SC1}$$

$$MQL = \frac{IQL \times 100}{ARR \times CF} \text{ Eq. SC2}$$

MDL, method detection limit; MQL, method quantification limit; IDL, instrumental detection limit; IQL, instrumental quantification limit; ARR, absolute recovery rate; CF, concentration factor (100 for influent and effluent).

Precision of the method was determined using calibration standards (at 10 and 100 µg/L). These were injected in triplicate each day over a three-day period. Precision was evaluated as the relative standard deviation (RSD) of replicate measurements.

The absolute recovered concentrations of the samples spiked before extraction were determined by using the absolute matrix-matched calibration curve spiked after extraction. This matrix-matched calibration curve was prepared by spiking an aliquot of the non-spiked influent or effluent extract with the desired amounts of standard solutions and with constant concentration of surrogates (100 µg/L). Absolute recoveries were then calculated using Eq. SC3.

$$\text{Absolute recovery rate} = \frac{\text{Absolute recovered concentration} - \text{Absolute native concentration}}{\text{Spiked concentration}} \times 100 \quad \text{Eq. SC3}$$

For calculation of the relative recoveries, the results were corrected with recovery of the spiked surrogate standard.

Table SC2 reports the different criteria used for detection of compounds. These criteria included 1) retention time (RT) with an allowed window of ± 0.5 min and, 2) an exact mass acquisition with a precision below 5 ppm in routine analysis. Fragment ions generated by the HCD cell could not be used as a criterion of identification because those fragment ions might not arise specifically from the targeted parent compounds and were not detected at low concentrations. MS/MS ions were only used as an additional proof of confirmation. For quantification purposes, parent ions corresponding to pseudo molecular $[M+H]^+$ ions were used and quantification was carried out by isotope dilution using stable isotope of MTP and VEN as internal standards.

Table SC2. Details for detection and quantification of targeted analytes using LC-HRMS.

Analyte	Formula [M+H] ⁺	RT ± 0.5 (min)	Theoretical mass [M+H] ⁺	Experimental mass [M+H] ⁺	Mass error Δppm	MS/MS ion mass
MTP-(S)	C ₁₅ H ₂₆ NO ₃	18.2	268.1907	268.1906	-2.4	191.107
MTP-(R)	C ₁₅ H ₂₆ NO ₃	19.6	268.1907	268.1906	-2.7	191.107
MTPA-(E1)	C ₁₄ H ₂₂ NO ₄	9.5	268.1543	268.1542	-2.6	226.107
MTPA-(E2)	C ₁₄ H ₂₂ NO ₄	10.5	268.1543	268.1541	-2.8	226.107
α-HMET-(E1)	C ₁₅ H ₂₆ NO ₄	19.3	284.1857	284.1855	-2.5	207.102
α-HMET-(E2)	C ₁₅ H ₂₆ NO ₄	20.9	284.1857	284.1854	-2.6	207.102
O-DMTP-(E1)	C ₁₄ H ₂₄ NO ₃	18.6	254.1750	254.1749	-3.0	212.128
O-DMTP-(E2)	C ₁₄ H ₂₄ NO ₃	20.3	254.1750	254.1748	-3.3	212.128
VEN-(S)	C ₁₇ H ₂₈ NO ₂	19.3	278.2114	278.2113	-2.5	260.201
VEN-(R)	C ₁₇ H ₂₈ NO ₂	21.4	278.2114	278.2113	-2.7	260.201

Extraction process of chiral drugs on HLB cartridge was found not to be enantioselective as it did not favor one enantiomer over the other. Relative recovery rates calculated for effluent were typically > 80% for all compounds (Table SC3). Concerning the influent, except for MTPA, the overall average relative recovery was 78% with a lowest and highest value of 60% and 95%, respectively. Lower reported relative recoveries of MTPA (around 15%) may be explained because this molecule is charged at environmental pH (pKa of 3.5, Rubirola et al., 2014) which prevented good extraction with HLB cartridges (Bäuerlein et al., 2012). Water samples were not acidified because Nikolai et al., 2006 tested water acidification to pH 2 prior to SPE extraction with HLB and this resulted in poorer recoveries for MTP in WWTP influent. The present method should rather be used for qualitative determination of MTPA in influent as the obtained extraction recoveries were not quantitative.

Table SC3. Relative recoveries (mean \pm RSD; n=5) of the targeted molecules in WWTP influent and effluent.

	Relative recoveries			
	Influents		Effluents	
		%RSD		%RSD
MTP-(S)	91	\pm 3	88	\pm 6
MTP-(R)	89	\pm 2	87	\pm 6
MTPA-(E1)	15	\pm 5	113	\pm 6
MTPA-(E2)	13	\pm 4	101	\pm 7
α -HMET-(E1)	66	\pm 8	98	\pm 3
α -HMET-(E2)	70	\pm 7	99	\pm 5
O-DMTP-(E1)	60	\pm 9	93	\pm 7
O-DMTP-(E2)	62	\pm 4	99	\pm 6
VEN-(S)	91	\pm 3	81	\pm 13
VEN-(R)	95	\pm 6	85	\pm 10

The IDL and IQL ranged from 0.1 to 0.3 $\mu\text{g/L}$ and from 0.5 to 1.1 $\mu\text{g/L}$ respectively for all compounds (Table SC4). Bagnall et al., 2012 reported similar instrumental limits using the same chromatographic column and QTOF-MS detection. Furthermore, except for MTPA, the MDL and MQL for sewage influent ranged from 3.3 to 9.0 ng/L and from 11.0 to 30.1 ng/L respectively. The MDL and MQL for sewage effluent, excluding MTPA, ranged from 1.5 to 2.9 ng/L and from 5.1 to 9.6 ng/L respectively. MDL and MQL were much higher for MTPA in effluent and influent mainly due to lower recoveries of this molecule as discussed above and higher ion suppression. In previous study (Kasprzyk-Hordern et al., 2010), it was found that the ESI responses for the studied contaminants were more suppressed at shorter retention times in wastewater samples. MTPA was eluted faster than other compounds which could

induce higher ion suppression. For the other compounds, limits of quantification and detection of the method were comparable than for previous analytical methodologies (Bagnall et al., 2012; Kasprzyk-Hordern et al., 2010; MacLeod et al., 2007; Rubirola et al., 2014).

Table SC4. Performance data including instrumental limits of detection (IDL) and quantification (IQL) ($\mu\text{g/L}$); method limits of detection (MDL) and quantification (MQL) (ng/L); and resolution (R_s) at two different concentrations (mean \pm SD; $n=3$).

Compound	RT (min)	Instrumental parameters							
		IDL ($\mu\text{g/L}$)	IQL ($\mu\text{g/L}$)	R_s					
				10 $\mu\text{g/L}$			100 $\mu\text{g/L}$		
MTP-(S)	18.2	0.1	0.5	1.4	\pm	0.1	1.3	\pm	0.1
MTP-(R)	19.6	0.2	0.6						
MTPA-(E1)	9.5	0.3	0.9	1.5	\pm	0.1	1.3	\pm	0.1
MTPA-(E2)	10.5	0.3	1.1						
α -HMET-(E1)	19.3	0.2	0.5	1.4	\pm	0.1	1.3	\pm	0.1
α -HMET-(E2)	20.9	0.2	0.7						
O-DMTP-(E1)	18.6	0.2	0.8	1.4	\pm	0.1	1.4	\pm	0.1
O-DMTP-(E2)	20.3	0.3	1.0						
VEN-(S)	19.3	0.2	0.5	1.8	\pm	0.1	1.7	\pm	0.1
VEN-(R)	21.4	0.2	0.7						

	Sewage influent				Sewage effluent			
	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	R_s		MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	R_s	
			10 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$			10 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$
MTP-(S)	3.5	11.5	1.5 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	1.5	5.1	1.3 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1
MTP-(R)	3.7	12.4			1.9	6.5		
MTPA-(E1)	39.6	132.1	1.4 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	4.0	13.2	1.5 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1
MTPA-(E2)	47.8	159.2			4.9	16.5		
α -HMET-(E1)	5.1	17.0	1.6 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	1.6	5.2	1.5 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1
α -HMET-(E2)	5.2	17.3			2.0	6.6		
O-DMTP-(E1)	9.0	30.1	1.5 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	2.4	7.9	1.5 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1
O-DMTP-(E2)	8.4	28.1			2.9	9.6		
VEN-(S)	3.3	11.0	1.8 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1	1.6	5.4	1.8 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1
VEN-(R)	3.5	11.8			1.9	6.4		

Both intra- and inter-day precisions, as indicated by relative standard deviation calculated from the analysis of 3 replicates over 3 days, were less than 10% (Table SC5) for all compounds which is suitable for environmental analysis, given the complexity of the matrices.

Table SC5. Inter- and intra-day precision (n = 3).

Analytes	Precision							
	Intra-day precision (%) (n=3)						Intra-day precision (%) (n=3)	
	10 µg/L			100 µg/L			10 µg/L	100 µg/L
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3		
MTP-(S)	1.1	0.3	0.7	0.6	1.1	1.4	1.0	0.6
MTP-(R)	1.3	2.6	2.6	1.0	0.5	1.3	1.4	0.9
MTPA-(E1)	5.1	5.6	2.5	0.8	0.7	0.9	8.4	2.1
MTPA-(E2)	4.2	9.2	5.4	2.2	1.1	0.5	7.3	1.8
α-HMET-(E1)	0.5	1.9	4.8	0.9	1.8	2.4	2.8	1.8
α-HMET-(E2)	8.1	9.0	7.1	1.7	1.3	2.3	2.9	2.8
O-DMTP-(E1)	2.4	3.7	1.4	0.9	1.5	0.8	0.6	1.7
O-DMTP-(E2)	1.9	4.4	2.7	1.0	2.1	0.5	1.6	0.9
VEN-(S)	3.8	1.2	1.8	0.9	1.1	0.9	0.3	0.2
VEN-(R)	3.8	2.7	1.1	1.8	1.0	1.9	0.6	1.7

Bagnall, J. P., Evans, S. E., Wort, M. T., Lubben, T., Kasprzyk-Hordern, B. (2012). Using chiral liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface and wastewater at the enantiomeric level. *J. Chromatogr. A* 1249, 115–29. doi:10.1016/j.chroma.2012.06.012.

Bäuerlein, P., Mansell, J., Ter Laak, T. (2012). Sorption behavior of charged and neutral polar organic compounds on solid phase extraction materials: which functional group governs sorption? *Environ Sci Technol.* 46(2), 954–61.

Kasprzyk-Hordern, B., Kondakal, V. V. R., Baker, D. R. (2010). Enantiomeric analysis of drugs of abuse in wastewater by chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1217(27), 4575–86. doi:10.1016/j.chroma.2010.04.073.

MacLeod, S. L., Sudhir, P., Wong, C. S. (2007). Stereoisomer analysis of wastewater-derived beta-blockers, selective serotonin re-uptake inhibitors, and salbutamol by high-

performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1170(1-2), 23–33. doi:10.1016/j.chroma.2007.09.010.

Nikolai, L. N., McClure, E. L., Macleod, S. L., Wong, C. S. (2006). Stereoisomer quantification of the beta-blocker drugs atenolol, metoprolol, and propranolol in wastewaters by chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1131(1-2), 103–9. doi:10.1016/j.chroma.2006.07.033.

Rubirola, a., Llorca, M., Rodriguez-Mozaz, S., Casas, N., Rodriguez-Roda, I., Barceló, D., Buttiglieri, G. (2014). Characterization of metoprolol biodegradation and its transformation products generated in activated sludge batch experiments and in full scale WWTPs. *Water Res.*, 63, 21–32. doi:10.1016/j.watres.2014.05.031

Table SC6. Apparent kinetic rate constant (k) and related half life ($T_{1/2}$) of the biodegradation of venlafaxine in water/sediment systems.

Batch		k (d ⁻¹)	T _{1/2} (d)
Dark	VEN-(S)	0.012 ± 0.001	56.815 ± 4.545
	VEN-(R)	0.013 ± 0.001	51.727 ± 4.138
Dark control	VEN-(S)	0.008 ± 0.001	92.420 ± 7.394
	VEN-(R)	0.008 ± 0.001	88.865 ± 7.109
Light	VEN-(S)	0.036 ± 0.003	19.148 ± 1.532
	VEN-(R)	0.036 ± 0.003	19.148 ± 1.532
Light control	VEN-(S)	0.018 ± 0.001	38.723 ± 3.098
	VEN-(R)	0.018 ± 0.001	39.161 ± 3.133

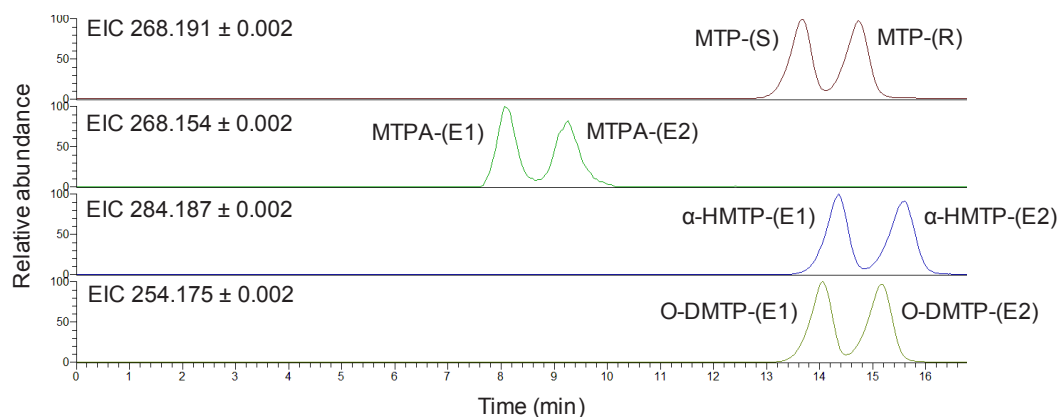


Fig. SC1. LC–HRMS Extracted Ion Chromatograms (EIC) corresponding to the analysis of racemic standard mixtures containing MTP (m/z 268.1907), MTPA (m/z 268.1543), α -HMTP (m/z 284.1857) and O-DMTP (m/z 254.1750) at 50 $\mu\text{g/L}$ each (injection volume: 10 μL).

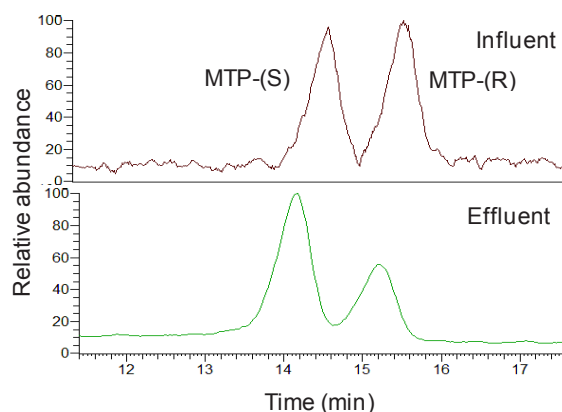


Fig. SC2. LC–HRMS Extracted Ion Chromatograms (EIC) of MTP (m/z 268.1907) corresponding to the analysis of WWTP2 influent and effluent extracts.

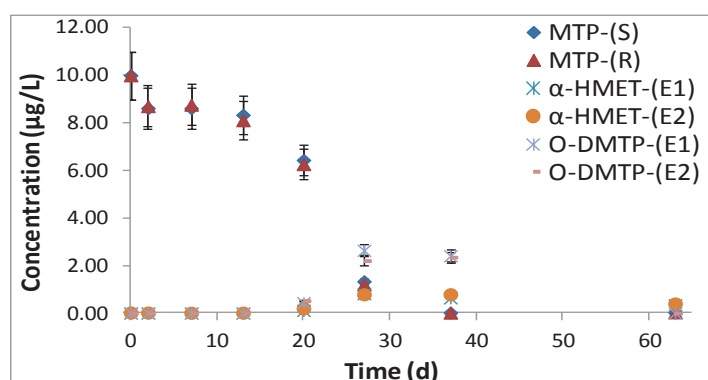


Fig. SC3. (S)-MTP and (R)-MTP concentration evolution and its TPs over time in batch biodegradation experiments performed in sterile water/sediment system incubated in light. Error bars represent the range of two replicates.

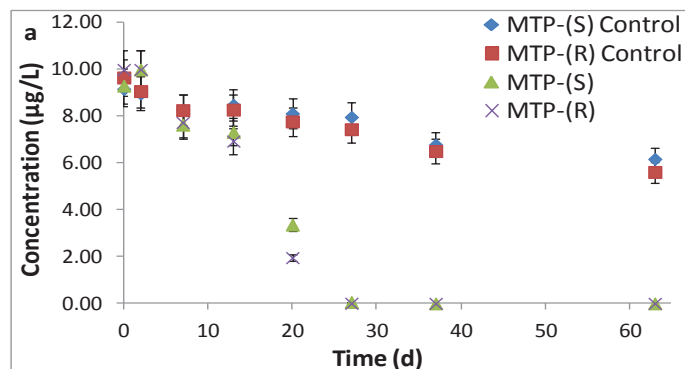


Fig. SC4. (S)-MTP and (R)-MTP concentration evolution over time in batch biodegradation experiments performed in sterile (control) and in water/sediment system incubated in dark. Error bars represent the range of two replicates.

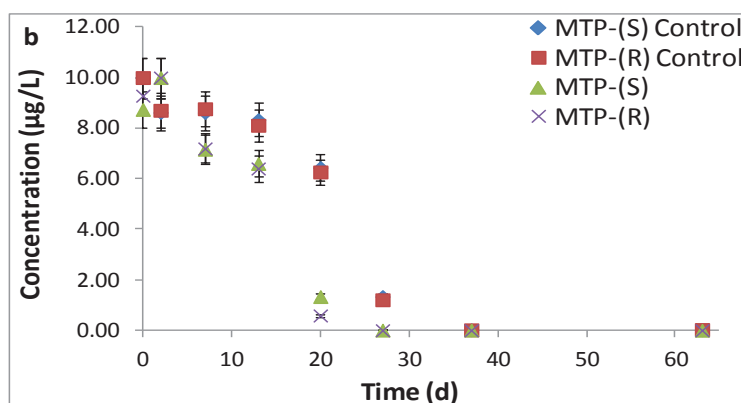


Fig. SC5. (S)-MTP and (R)-MTP concentration evolution over time in batch biodegradation experiments performed in sterile (control) and in water/sediment system incubated in light. Error bars represent the range of two replicates.

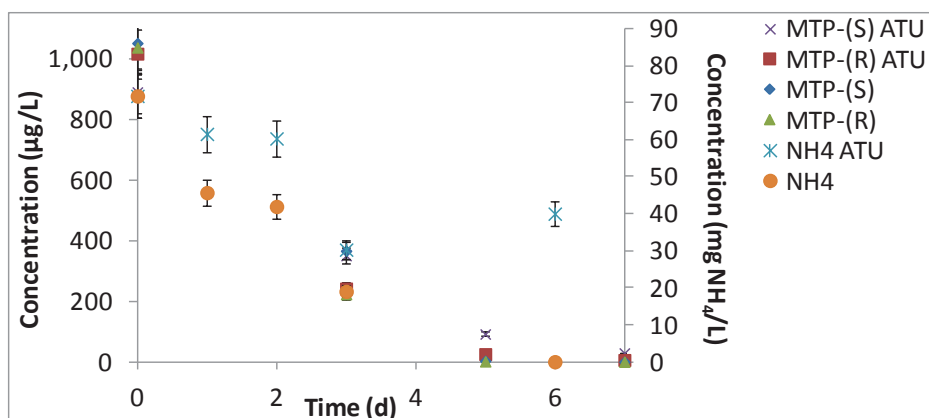


Fig. SC6. Ammonium, (S)-MTP and (R)-MTP concentration evolution over time in batch biodegradation experiments performed in nitrifying sludge without or with the presence of N-allylthiourea (ATU), a known inhibitor of ammonium monooxygenase. Error bars represent the range of two replicates.

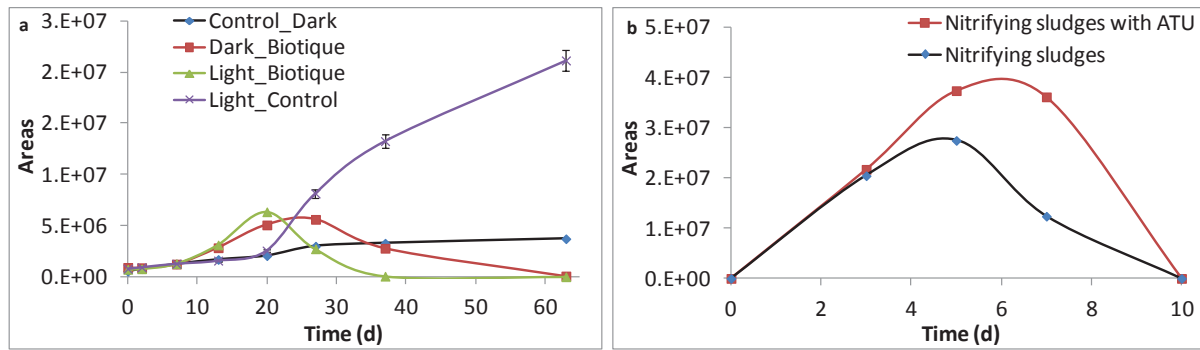


Fig. SC7. MTPA peak areas evolution over time in a) water/sediment and b) in nitrifying sludges batch biodegradation experiments. Error bars represent the range of two replicates.

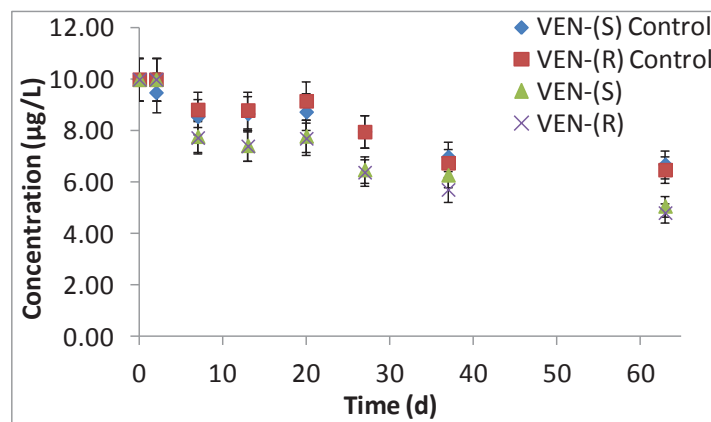


Fig. SC8. (S)-VEN and (R)-VEN concentration evolution over time in batch biodegradation experiments performed in sterile (control) and in water/sediment system incubated in dark. Error bars represent the range of two replicates.

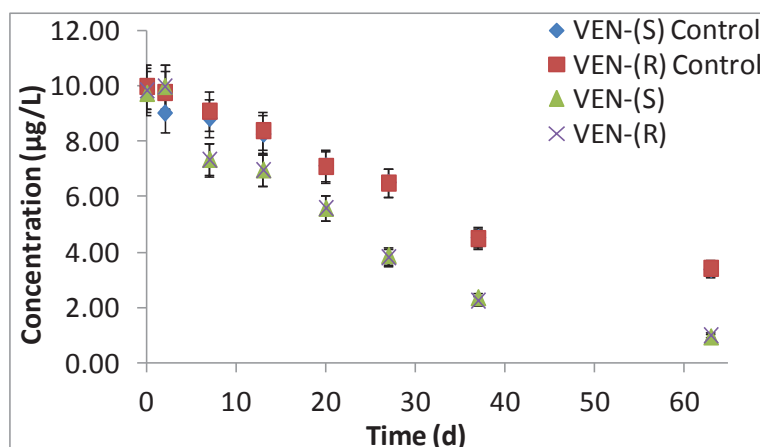


Fig. SC9. (S)-VEN and (R)-VEN concentration evolution over time in batch biodegradation experiments performed in sterile (control) and in water/sediment system incubated in light. Error bars represent the range of two replicates.

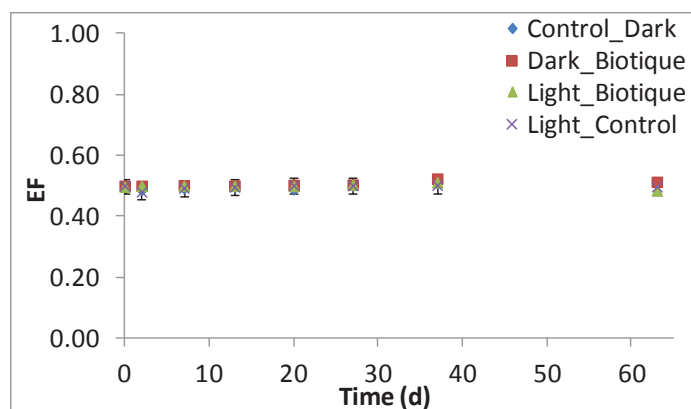


Fig. SC10. Venlafaxine enantiomeric fraction (EF) evolution over time in sterile (control) and in water/sediment system.

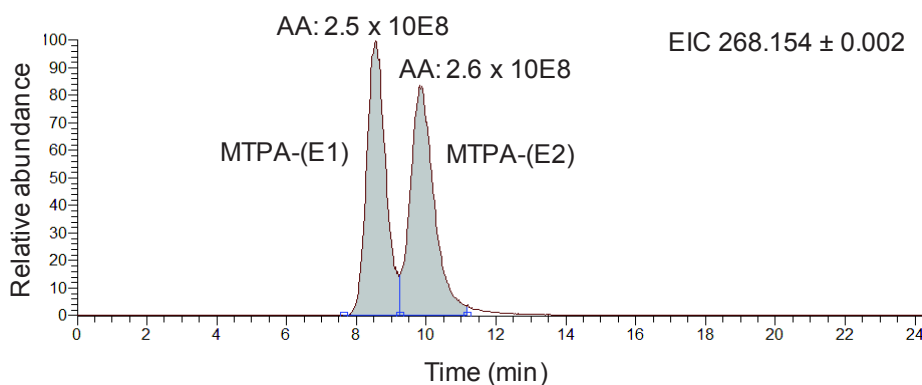


Fig. SC11. LC-HRMS Extracted Ion Chromatograms (EIC) corresponding to the chiral analysis of a sample obtained after 1 day incubation of O-DMTP in nitrifying sludge where racemic MTPA was identified.

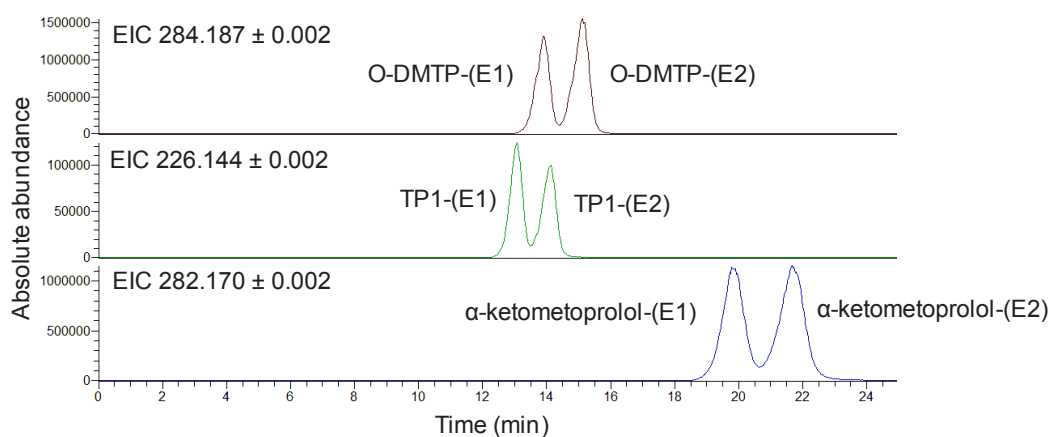


Fig. SC12. LC-HRMS Extracted Ion Chromatogram (EIC) corresponding to the analysis of a sample obtained after 1 d incubation of α -HMTP (m/z 284.1857) in nitrifying sludge where 4-(2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy)phenol (TP1) (m/z 226.1443) and α -ketometoprolol (m/z 282.1699) were identified.

Suite aux remarques des examinateurs de Water Research, des corrections ont été apportées à l'article précédent. Des analyses supplémentaires ont notamment été réalisées pour confirmer l'existence d'une corrélation linéaire entre l'élimination du MTP dans les STEP et l'enrichissement énantiomérique associé. Les concentrations et les ratios énantiomériques du MTP ont ainsi été mesurés dans les entrées et sorties de deux STEP supplémentaires à l'aide de la méthode analytique chirale décrite dans l'article précédent. Les caractéristiques de ces deux STEP sont reportées dans le Tableau 30.

Tableau 30. Caractéristiques des 2 STEP (STEP 4 et 5) supplémentaires sélectionnées pour l'étude du fractionnement énantiomérique (données 2014).

	STEP 4	STEP 5
Procédés	M/B	M/B/N/D/P
Equivalent habitants	466 667	32 083
Débit moyen en sortie (m³/j)	84 414	4 819
Débit DCO (kg/j)		123,2
Traitement d'effluents hospitaliers	Plusieurs hôpitaux	1 hôpital

M procédés physiques (filtration, décantation), B procédés biologiques de type boues activées, N nitrification, D dénitrification, P traitement du phosphore.

Les concentrations et les fractions énantiomériques EF ($C_{E1}/(C_{E1} + C_{E2})$) du MTP mesurées dans les entrées et sorties de ces deux STEP sont reportées dans le Tableau 31 et la Figure 43.

Tableau 31. Concentrations des énantiomères du MTP dans les entrées et sorties des STEP 4 et 5 (ng/L).

Composé	Concentrations (ng/L, moyenne ± écart type, n = 3)			
	STEP 4		STEP 5	
	Entrée	Sortie	Entrée	Sortie
MTP-(S)	46,5 ± 1,9	50,6 ± 2,6	221 ± 4	56,0 ± 2,8
MTP-(R)	50,6 ± 4,5	51,5 ± 0,8	220 ± 9	30,8 ± 2,4

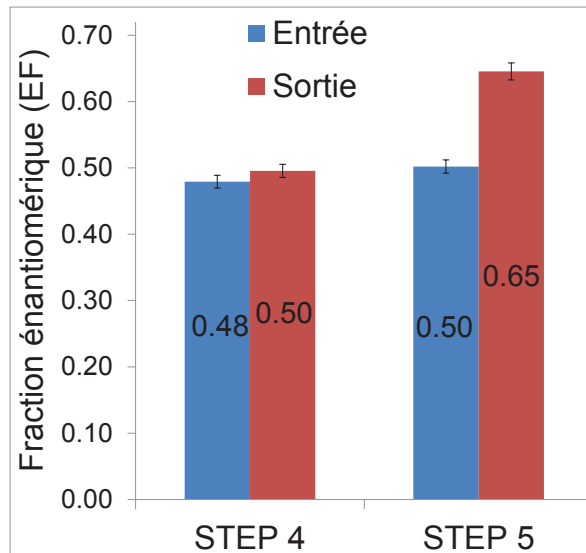


Figure 43. Fractions énantiomériques du métoprolol mesurées dans les entrées et sorties des STEP 4 et 5.

Dans la STEP 4, l'absence de fractionnement énantiomérique s'explique par le fait que le MTP n'est pas dégradé. Au contraire, un enrichissement significatif de l'énantiomère S du MTP est observé dans les effluents de la STEP 5 et est associé avec une élimination de 77 % du bêtabloquant au cours du traitement des eaux usées. La prise en compte de ces deux mesures supplémentaires, lors de l'application de l'équation de Rayleigh aux mesures réalisées dans les 5 STEP étudiées, conduit à la Figure 44.

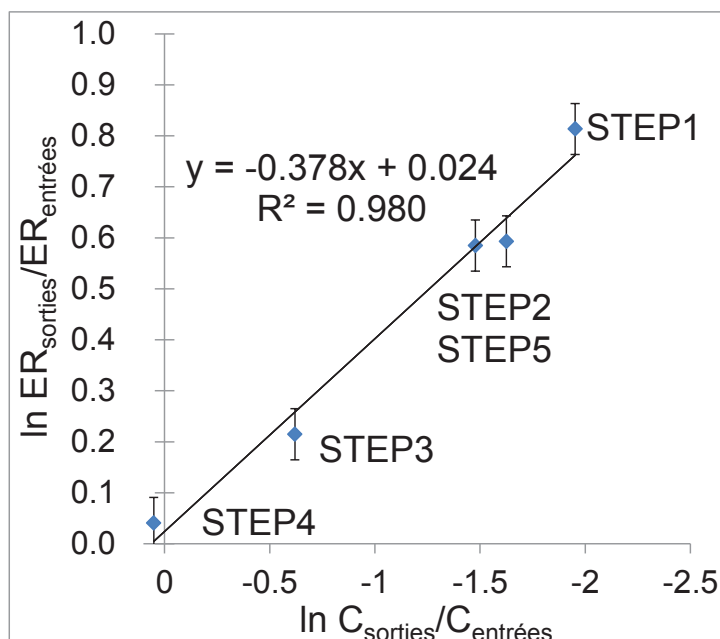


Figure 44. Application de l'équation de Rayleigh aux mesures des concentrations et des ratios énantiomériques du MTP réalisées dans les 5 STEP étudiées.

Avec

- $\ln ER_{\text{sorties}}/ER_{\text{entrées}} = \text{logarithme entre les ratios énantiomériques (E1/E2) du MTP mesurés dans les entrées et sorties des STEP.}$
- $\ln \text{Conc}_{\text{sorties}}/\text{Conc}_{\text{entrées}} = \text{logarithme entre les concentrations du MTP (somme des deux énantiomères) mesurées dans les entrées et sorties des STEP.}$

Ces résultats sont très encourageants car ils confirment, à l'aide de deux points supplémentaires, l'existence d'une relation linéaire ($R^2 > 0,98$) entre l'ampleur de la biodégradation du MTP dans les 5 STEP étudiés et le fractionnement énantiomérique associé. Les STEP qui ont enregistré les enrichissements énantiomériques les plus significatifs sont celles qui contiennent une étape de nitrification/dénitrification. L'élimination biologique très élevée du MTP dans la STEP 1 s'explique par la présence additionnelle d'un bioréacteur à membrane. Au contraire, la STEP 4 qui ne contient ni traitement de l'azote ni traitement du phosphore ne permet pas d'éliminer biologiquement le MTP. La STEP 3 qui traite seulement le phosphore mais non l'azote permet d'éliminer seulement 50 % du MTP. Ces résultats suggèrent que le MTP est en grande partie éliminé lors de l'étape de nitrification/dénitrification mais l'élimination du phosphore semble également contribuer à la dégradation du MTP.

Ces résultats supplémentaires seront inclus dans la nouvelle version de l'article soumise à Water Research.

L'application de l'équation de Rayleigh a ainsi conduit à une relation linéaire entre biodégradation du MTP et fractionnement énantiomérique à la fois dans les STEP et les microcosmes et peut donc constituer un bon indicateur pour quantifier la biodégradation du MTP *in situ*.

3. Evaluation du fractionnement énantiomérique à l'aide de la venlafaxine (VEN)

3.1. Description de la méthode d'analyse chirale de la VEN dans les matrices aqueuses

Les énantiomères de la VEN ont été extraits et analysés dans les entrées et effluents des 3 STEP sélectionnées initialement (STEP 1, 2 et 3) et dans les microcosmes en appliquant les mêmes méthodes que celles utilisées pour le MTP. Les paramètres de spectrométrie de masse utilisés pour détecter et quantifier les énantiomères de la VEN sont les suivants (Tableau 32) :

Tableau 32. Paramètres utilisés pour détecter et quantifier la VEN en LC-ESI⁺-HRMS.

Composé	Formule [M+H] ⁺	RT ± 0.5 (min)	Masse théorique [M+H] ⁺	Masse expérimentale [M+H] ⁺	Décalage de masse Δppm	Masse de l'ion MS/MS
VEN-(S)	C ₁₇ H ₂₈ NO ₂	19,3	278,2114	278,2113	2,5	260,201
VEN-(R)	C ₁₇ H ₂₈ NO ₂	21,4	278,2114	278,2113	2,7	260,201

Les paramètres de performance de la méthode d'analyse chirale de la VEN dans les entrées et sorties de STEP sont reportés dans le Tableau 33.

Tableau 33. Performances de la méthode d'analyse chirale LC-ESI⁺-HRMS de la VEN dans les influents et effluents de STEP.

Paramètres instrumentaux								
Fidélité								
Composé	Répétabilité (%) (n = 3 sur 3 jours)		Reproductibilité (%) (n = 3)		IDL μg/L	IQL μg/L	Rs	
	10 μg/L	100 μg/L	10 μg/L	100 μg/L			10 μg/L	100 μg/L
VEN-(S)	2,3	1,0	0,3	0,2	0,2	0,5	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1
VEN-(R)	2,5	1,6	0,6	1,7	0,2	0,7		

Effluents						
Composé	Rendement d'extraction absolu ^a (% , n = 5)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	Linéarité ^b	Rs	
					10 µg/L	100 µg/L
VEN-(S)	81 ± 13	1,6	5,4	> 0,99		
VEN-(R)	85 ± 10	1,9	6,4	> 0,99	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1

Entrées						
Composé	Rendement d'extraction absolu ^a (% , n = 5)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	Linéarité ^b	Rs	
					10 µg/L	100 µg/L
VEN-(S)	91 ± 3	3,3	11,0	> 0,99		
VEN-(R)	95 ± 6	3,5	11,8	> 0,99	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1

^aNiveau de dopage : 500 ng/L.

^bLinéarité calculée entre 100 et 2 000 ng/L (en concentrations équivalentes dans les influents et les effluents avant extraction).

La méthode chromatographique chirale développée permet une séparation des énantiomères de la VEN avec une résolution élevée (R_s) > 1 quelle que soit la matrice étudiée, ce qui représente un chevauchement des pics inférieur à 2 % (Figure 45a). L'étape d'extraction SPE n'est pas énantiosélective, comme attesté par les rendements d'extraction qui sont similaires pour les deux énantiomères de la VEN. Les rendements d'extraction sont satisfaisants car supérieures à 80 % pour les deux énantiomères et les deux matrices étudiées. Les limites de quantification et de détection de la méthode sont comprises entre 1,6 et 11,8 ng/L pour les deux matrices et sont donc appropriées pour l'analyse chirale de la VEN à l'état de traces sur le terrain. La répétabilité et la reproductibilité de la méthode sont satisfaisantes car inférieures à 5 %.

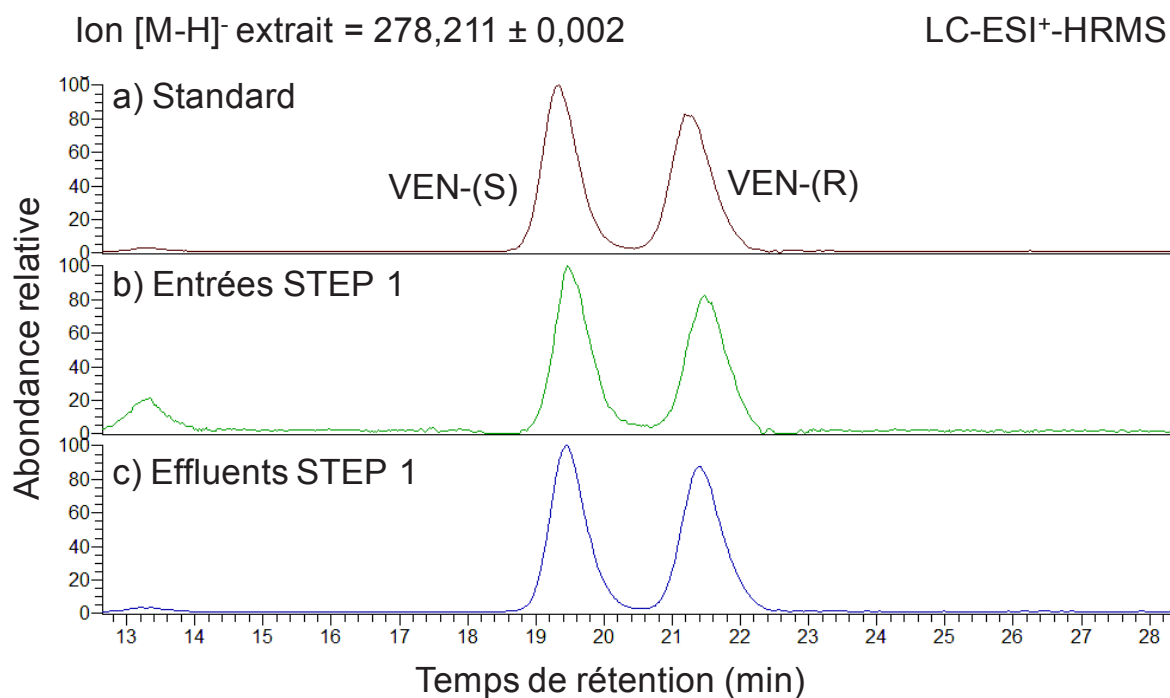
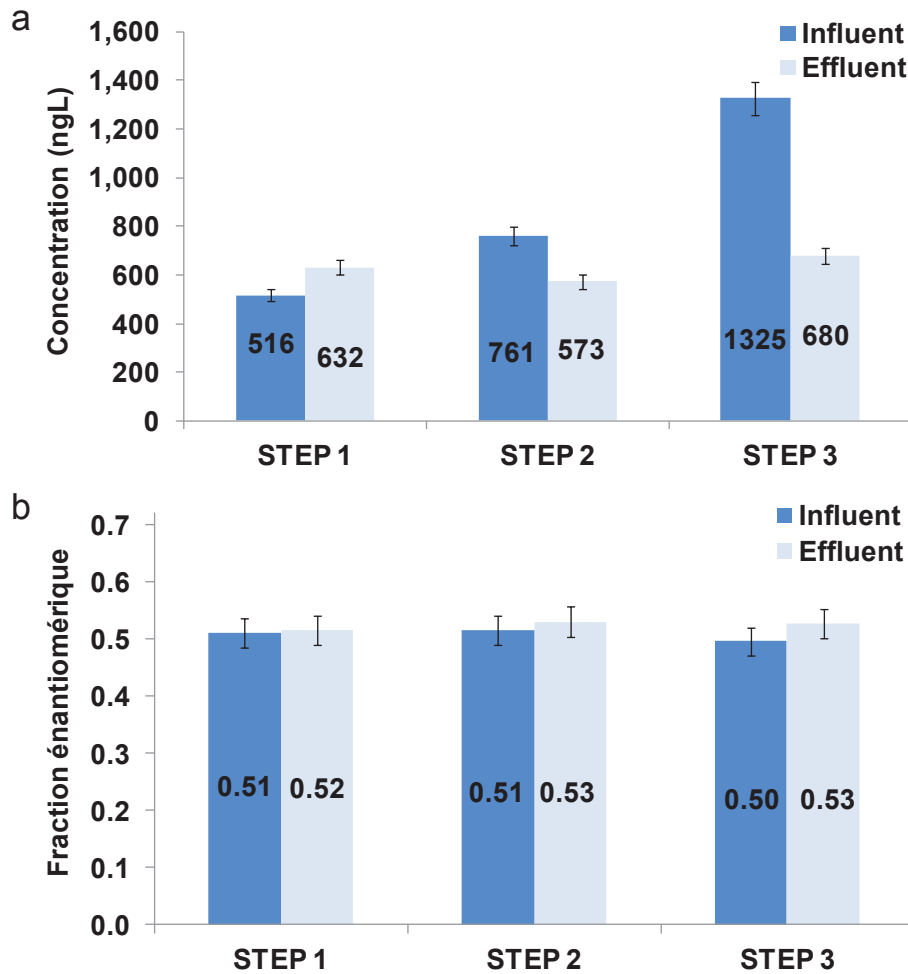


Figure 45. Chromatogrammes LC-MS correspondant aux analyses de la VEN (278,211) dans a) un échantillon étalon de VEN (50 $\mu\text{g/L}$) ; b) les entrées de la STEP 1 ; c) les effluents de la STEP 1.

3.2. Etude du fractionnement énantiomérique de la VEN dans les STEP

La méthode chirale validée a été appliquée pour analyser l'enrichissement énantiomérique de la VEN dans les trois STEP sélectionnées initialement (STEP 1, 2 et 3). Les concentrations et les fractions énantiomériques (EF) de la VEN mesurées sont présentées Figure 46. Les chromatogrammes obtenus pour les entrées et sorties de la STEP 1 sont présentés Figure 45b et c.



$$\text{Fraction énantiomérique} = \frac{C_{E1}}{C_{E1} + C_{E2}}$$

Figure 46. a) Concentrations (somme des deux énantiomères) et b) fractions énantiomériques de la VEN dans les influents et effluents des 3 STEP étudiées. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types mesurés sur un triplicata de mesures.

La VEN a été quantifiée à des niveaux de concentration élevés compris entre 450 et 1 325 ng/L et 573 et 680 ng/L dans les entrées et sorties des 3 STEP étudiées, respectivement. Ces niveaux de concentration sont du même ordre de grandeur que ceux reportés dans la littérature (Bagnall et al., 2012b; Gasser et al., 2012b; Kasprzyk-Hordern et al., 2010b; Li et al., 2013; Rúa-Gómez and Püttmann, 2012). Les taux d'atténuation de la VEN varient beaucoup entre les différentes STEP (25 % à 50 % entre les STEP 2 et 3 respectivement). Une augmentation des concentrations en VEN est également observée entre les entrées et effluents de la STEP 1. Ce phénomène a déjà été reporté dans la littérature (Gasser et al., 2012a; Kasprzyk-Hordern et al., 2010b) et s'explique par une déconjugaison, au cours du traitement des eaux usées, de la VEN présente sous forme conjuguée dans les influents. Concernant les sous-produits de dégradation, seul l'ODV a été

détecté par masse exacte avec un signal/bruit supérieur à 10 dans l'ensemble des échantillons étudiés similairement aux études réalisées précédemment (Li et al., 2013; Rúa-Gómez and Püttmann, 2012).

Les fractions énantiomériques de la VEN restent proches du racémique (0,5–0,53) dans les entrées et effluents des 3 STEP. La VEN ne se dégrade donc pas via une réaction stéréosélective durant les procédés de traitement des eaux usées. Le fractionnement énantiomérique n'a pas pu être étudié dans les STEP à l'aide de la VEN.

3.3. Etude du fractionnement énantiomérique de la VEN dans des microcosmes

L'existence d'un enrichissement énantiomérique lors de la biodégradation de la VEN a également été étudiée dans des microcosmes effluents/sédiments, en appliquant les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour l'étude du MTP (biotique, stérile, lumière, noir). La VEN racémique (1 µg) a été ajoutée au temps initial dans les microcosmes et des échantillons ont été prélevés périodiquement sur 65 jours pour analyser l'évolution des concentrations et des ratios énantiomériques de la VEN. Les résultats issus de ces analyses sont présentés en Figure 47 et Figure 48.

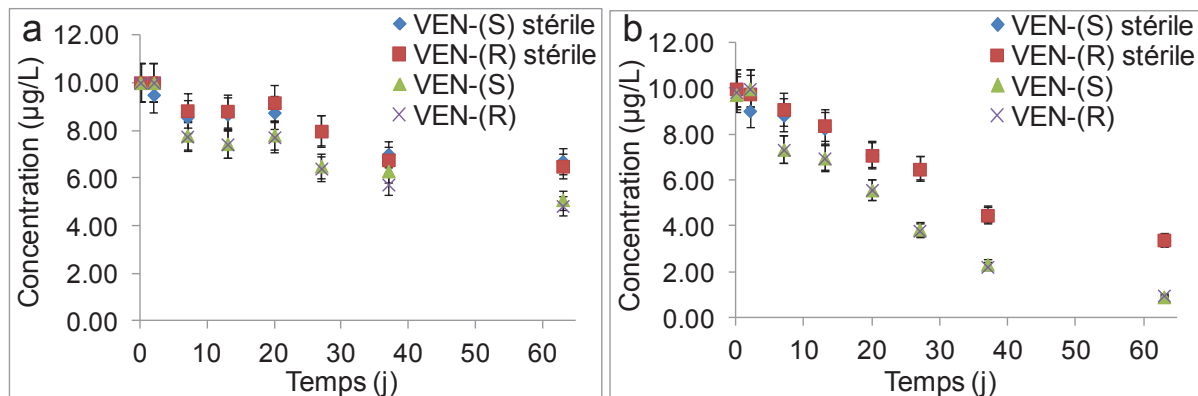


Figure 47. Evolution des concentrations des énantiomères de la venlafaxine (µg/L) dans les microcosmes incubés a) dans le noir et b) à la lumière.

Les faibles différences observées entre les profils des concentrations de la VEN obtenus dans les batchs stériles et ceux obtenus dans les batchs biotiques, quelque soit les conditions d'incubation (noir/lumière), suggère une faible contribution des processus de biodégradation dans l'élimination de la VEN.

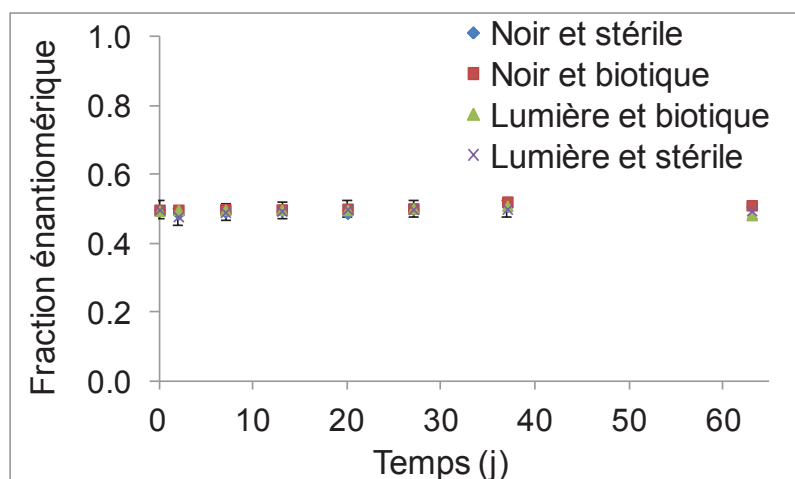


Figure 48. Evolution des fractions énantiomériques de la venlafaxine dans les différents microcosmes.

En parallèle, les mesures des fractions énantiomériques montrent l'absence d'enrichissement énantiomérique de la VEN dans l'ensemble des microcosmes réalisés, même après 65 jours d'incubation. Il est difficile de savoir si l'absence de fractionnement énantiomérique est due au fait que les processus de biodégradation sont trop faibles pour pouvoir générer des variations énantiomériques ou au fait qu'ils sont non stéréosélectifs. Quelque soit les raisons de l'absence des variations énantiomériques, les résultats sont sans appel : la VEN ne constitue pas un bon modèle pour étudier l'outil énantiomérique.

3.4. Conclusions sur la VEN

Le fait qu'aucune variation énantiomérique n'ait été observée lors de la biodégradation de la VEN dans les STEP ne signifie pas que cette molécule ne peut pas subir de biodégradation énantiosélective dans d'autres conditions environnementales. Un fractionnement énantiomérique de la VEN a d'ailleurs déjà été observé dans des rivières et des STEP (Bagnall et al., 2012b; Kasprzyk-Hordern et al., 2010b; Li et al., 2013). Cela signifie seulement que les communautés bactériennes présentes dans les 3 STEP sélectionnées durant la thèse dégradent la VEN selon un mécanisme différent de celui qui engendre un fractionnement énantiomérique dans les travaux cités. Les mécanismes réactionnels de dégradation de la VEN n'ont pas été étudiés durant la thèse car la priorité a été donnée à l'étude de la relation entre fractionnement énantiomérique et biodégradation du MTP. Les résultats obtenus avec la VEN soulignent néanmoins l'importance de comprendre les mécanismes qui se déroulent dans l'environnement pour appliquer adéquatement l'outil énantiomérique à la quantification des processus biologiques *in situ*.

Chapitre 4 : Discussion générale

1. Avantages et limites des deux outils évalués pour quantifier la biodégradation des PPSP en aval des STEP

Les données quantitatives, relatives aux processus de biodégradation des PPSP en aval des STEP, sont aujourd'hui peu disponibles en raison de l'absence d'outils de mesure adéquats. Ces données sont pourtant essentielles pour une meilleure évaluation et gestion des risques liés à la présence des PPSP dans l'environnement. Dans ce contexte, **l'objectif de cette thèse a été de développer des outils pour permettre de quantifier spécifiquement les processus de biodégradation des PPSP *in situ***. Deux outils ont été sélectionnés pour être évalués, à savoir **les fractionnements isotopique et énantiomérique**. Ils utilisent la même approche qui consiste à comparer l'enrichissement d'une espèce (isotopologue ou énantiomère) par rapport à une autre pour mettre en évidence l'existence de processus de biodégradation. Néanmoins, ils présentent des différences significatives qu'il est nécessaire d'appréhender pour interpréter correctement les résultats obtenus avec chacun d'entre eux. Les caractéristiques propres aux deux outils, telles qu'elles ont été décrites dans l'article de Gasser et al., 2012b et dans les différents travaux réalisés jusqu'à aujourd'hui, sont résumées dans le Tableau 34. Ce tableau a servi de base pour discuter des résultats obtenus au cours de la thèse afin de les ancrer dans un contexte de connaissances actuelles.

Tableau 34. Caractéristiques propres aux outils de fractionnements isotopique et énantiomérique lorsque ces derniers sont appliqués à l'étude de la biodégradation de contaminants.

Propriétés	Fractionnement isotopique	Fractionnement énantiomérique
Propriétés physico-chimiques	Les propriétés physico-chimiques des isotopologues sont similaires mais non identiques.	Les propriétés physico-chimiques des énantiomères sont identiques.
Cause d'enrichissement lors des réactions de dégradation	Lors de la dégradation d'une molécule, les liaisons chimiques auxquelles participent les isotopes légers sont plus facilement clivées. L'enrichissement isotopique de la molécule en isotopes lourds, dont l'ampleur n'est que de quelques ‰, ne concerne que les atomes proches des liaisons réactionnelles.	Des différences de reconnaissance enzymatique sont à l'origine de l'enrichissement énantiomérique. Le fractionnement énantiomérique concerne la molécule dans son ensemble et est significatif (plusieurs dizaines de %).
Approche quantitative	Le fractionnement isotopique, à travers l'application de l'équation de Rayleigh, a permis de quantifier la biodégradation de contaminants (HAP, solvants chlorés) à de fortes concentrations. La prépondérance des isotopes légers en comparaison aux isotopes lourds dans les molécules assure l'obtention d'une relation linéaire entre biodégradation et variations isotopiques lors de l'application de l'équation de Rayleigh.	Récemment, l'équation de Rayleigh a permis pour la première fois de quantifier à l'aide du fractionnement énantiomérique la biodégradation de pesticides au sein d'extraits enzymatiques (Jammer et al., 2014). Le fait que l'équation de Rayleigh conduite à une linéarité entre biodégradation et variations énantiomériques reste à être démontré dans des conditions proches de celles rencontrées in situ.

Elucidation des mécanismes réactionnels	Le calcul des effets isotopiques cinétiques ou l'approche 2D-CSIA permettent de distinguer et d'élucider des mécanismes réactionnels de dégradation.	Le fait que l'enrichissement énantiomérique soit spécifique d'un mécanisme réactionnel particulier reste à être démontré.
Appareils de mesure	Les analyses isotopiques requièrent des appareils de mesure spécifiques (excepté pour l'analyse du chlore).	Les analyses chirales sont réalisables sur des appareils conventionnels type GC-MS ou LC-MS.
Sensibilité d'analyse	Les analyses sont limitées aux molécules volatiles qui ont une faible masse molaire (en raison de l'effet dilution) (nombre de carbones < 15).	Les analyses peuvent être réalisées sur des molécules ayant une masse molaire élevée.

Lors de la sélection des outils, le fractionnement isotopique apparaissait comme un outil prometteur car il avait déjà permis de quantifier, à travers l'équation de Rayleigh, la biodégradation de contaminants organiques *in situ* à des concentrations élevées (Kuder et al., 2013; Meckenstock et al., 2004; Wiegert et al., 2012). **Notre objectif consistait donc à déterminer si le fractionnement isotopique pouvait être extrapolé à l'étude quantitative de la biodégradation des PPSP à l'état de traces en aval de STEP.** Les mesures isotopiques nécessitent l'usage d'appareils spécifiques, de type GC-IRMS, qui sont très coûteux et donc peu disponibles dans les laboratoires. Une méthode récente permet néanmoins de mesurer la composition isotopique du chlore à l'aide d'appareils conventionnels de type GC-MS (Aeppli et al., 2010). En raison de ces contraintes analytiques, les travaux se sont attachés exclusivement à l'étude du fractionnement isotopique du chlore comme indicateur quantitatif de biodégradation des PPSP chlorés.

Lors de la sélection des outils, le fractionnement énantiomérique avait déjà été utilisé pour prouver l'existence de processus de biodégradation dans l'environnement, mais seulement en termes qualitatifs. Seule une étude, réalisée sur des pesticides au sein d'extraits enzymatiques, avait démontré que le modèle de Rayleigh pouvait conduire à une relation linéaire entre biodégradation et variations énantiomériques (Jammer et al., 2014). **Ces premiers résultats prometteurs méritaient d'être confirmés à l'aide d'autres molécules chirales et dans des conditions d'étude plus proches de celles rencontrées en aval des STEP.**

Les deux méthodes sélectionnées sont donc complémentaires et s'adressent chacune à des classes de molécules différentes. Afin d'étudier ces deux outils, trois PPSP chlorés (le triclosan, le triclocarban et le diclofénac) et deux PPSP chiraux (le métoprolol et la venlafaxine) ont été sélectionnés. Les travaux ont associé des analyses d'occurrence sur le terrain et des études cinétiques et mécanistiques en laboratoire. Les analyses ont été réalisées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS). Grâce à l'utilisation de la haute résolution, les métabolites des molécules d'étude, dont les étalons ne sont pas disponibles dans le commerce, peuvent être identifiés avec fiabilité, même au sein d'échantillons environnementaux complexes. La haute résolution est donc d'une grande aide pour l'élucidation des mécanismes de dégradation, qui constitue une étape obligatoire pour le développement des outils de fractionnements isotopique et énantiomérique. Disposer d'un équipement LC-HRMS était donc essentiel pour réaliser cette étude.

Lors de l'étude du fractionnement isotopique du chlore, plusieurs difficultés sont apparues. Tout d'abord, rappelons que la rupture (ou la formation) d'une liaison chimique à laquelle participe un chlore est nécessaire pour engendrer des variations isotopiques de cet atome (Tableau 34) (Hofstetter et al., 2008). Le fractionnement isotopique du chlore est donc dédié à l'étude des composés chlorés qui se biodégradent via une réaction de déchloration (ou une réaction de chloration, mais celle-ci reste limitée en aval des STEP). Des analyses ont été réalisées au sein d'échantillons environnementaux prélevés en aval de STEP pour s'assurer, en premier lieu, que les trois PPSP chlorés sélectionnés se dégradent majoritairement via cette réaction spécifique. Si la déchloration du triclosan (TCS) et du triclocarban (TCC) a été confirmée dans les sédiments, les métabolites déchlorés du diclofénac n'ont été identifiés dans aucune des matrices étudiées. La biodégradation du diclofénac ne peut donc être étudiée à l'aide du fractionnement isotopique du chlore. Des informations sur la nature des réactions de biodégradation des PPSP chlorés sont nécessaires pour évaluer si le fractionnement isotopique du chlore peut constituer un indicateur de biodégradation pertinent pour cette classe de micropolluants.

De plus, l'ampleur du fractionnement isotopique généré lors d'une réaction de biodégradation est totalement dépendante des mécanismes réactionnels de dégradation. Si ce phénomène est d'intérêt pour élucider les mécanismes réactionnels, il complique l'utilisation de l'outil isotopique à des fins quantitatives. Ainsi, les seuls mécanismes de déchloration qui engendrent un fractionnement isotopique du chlore significatif sont ceux qui impliquent une rupture des liaisons C–Cl lors de l'étape cinétiquement limitante de la réaction (ex : substitution nucléophile) (Kuder et al., 2013). Une étude bibliographique préalable a démontré que les composés aromatiques chlorés, dont font parties les 3 molécules d'étude, sont fortement susceptibles de se déchlorer *in situ* via un mécanisme de substitution nucléophile du chlore par la cobalamine (Smith, 1993). Des variations isotopiques significatives du chlore étaient donc attendues. Or, les mesures isotopiques réalisées sur le TCS, lors de sa déchloration en présence de cobalamine, ont démontré l'absence de fractionnement isotopique du chlore. En s'appuyant sur les résultats issus de deux articles publiés récemment (Cooper et al., 2015; Payne et al., 2015b) et les nôtres, nous avons formulé l'hypothèse que le TCS pourrait se dégrader selon un mécanisme de transfert d'électron dissociatif du Co(I) de la cobalamine vers l'atome de chlore (Figure 49). Dans le cas où ce mécanisme serait confirmé, l'absence de fractionnement isotopique du chlore pourrait être expliquée par le fait que la rupture de la liaison C–Cl ne constitue pas l'étape cinétiquement limitante de la réaction. Néanmoins, ces observations remettent à nouveau en question la pertinence d'utiliser le fractionnement isotopique du chlore pour étudier la biodégradation de PPSP aromatiques chlorés.

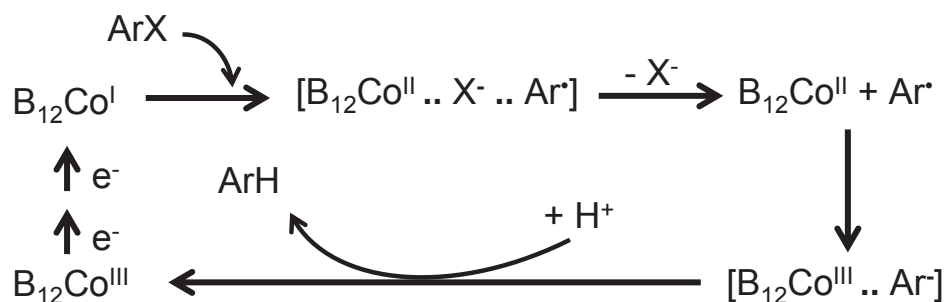


Figure 49. Mécanisme de transfert d'électron proposé pour expliquer la déchloration réductive des composés aromatiques chlorés en présence de cobalamine (Cooper et al., 2015).

Enfin, concernant le TCC, les études mécanistiques ont montré que ce composé se biodégrade selon deux mécanismes de déchloration distincts et compétitifs. Lorsque plusieurs mécanismes coexistent, sans que l'un d'entre eux ne soit majoritaire, l'outil isotopique ne peut pas être utilisé comme indicateur quantitatif de biodégradation.

Le fractionnement isotopique du chlore n'a pu être appliqué à la quantification de la biodégradation d'aucune des trois molécules d'étude *in situ*, même si l'existence d'une relation linéaire entre biodégradation et variations isotopiques a été confirmée pour le TCC et le DCF en laboratoire. **Ces résultats indiquent, à l'aide de 3 PPSP aromatiques modèles, que l'analyse isotopique du chlore seule, semble compliquée pour étudier la biodégradation des PPSP chlorés.** Il est difficile d'évaluer si le fractionnement isotopique du chlore peut être adapté à l'étude de la biodégradation d'autres PPSP que ceux analysés car les connaissances sur la nature et les mécanismes de biodégradation des PPSP chlorés sont limitées. Une des perspectives d'utilisation du fractionnement isotopique du chlore pourrait concerner les réactions de chloration de micropolluants via des haloperoxydases ou chloroperoxydases. Ces réactions seraient apparemment associées à un important fractionnement isotopique du chlore ($\epsilon_{Cl} = -12 \text{ ‰}$; Aeppli et al., 2010). Les enzymes de chloration citées ci-dessus sont des enzymes de champignons majoritairement présents dans les sols. Ainsi, le fractionnement du chlore pourrait, par exemple, servir à étudier le devenir de micropolluants dans les sols contaminés après l'épandage de boues de STEP.

Les difficultés rencontrées durant la thèse ne remettent pas en cause l'outil isotopique dans son ensemble. Elles démontrent que l'analyse isotopique du chlore est peu adaptée pour l'étude de la biodégradation des PPSP chlorés, en raison des contraintes réactionnelles fortes (déchloration, substitution nucléophile) nécessaires pour observer un fractionnement isotopique du chlore. Ces observations peuvent être attribuées à la faible présence du chlore

dans les molécules qui limite la probabilité qu'un atome de chlore subisse un fractionnement isotopique lors d'une réaction de biodégradation.

Dans ce contexte, l'analyse simultanée des variations isotopiques de plusieurs éléments chimiques (2D-CSIA voire 3D-CSIA) apparaît plus adaptée à l'étude quantitative des processus de biodégradation de contaminants, comme le soulignent plusieurs publications récentes (Cretnik et al., 2013; Kuder et al., 2013; Wiegert et al., 2012; Zwank et al., 2005).

En premier lieu, le fait d'étudier plusieurs éléments chimiques multiplie les chances d'observer un fractionnement isotopique significatif pour au moins l'un des éléments étudiés, en particulier pour ceux qui sont très représentés dans les molécules (carbone). Le fractionnement isotopique du carbone s'applique ainsi à l'étude de nombreux mécanismes et voies de dégradation (Meckenstock et al., 2004). A noter que l'effet dilution limite l'application du fractionnement isotopique du carbone à l'étude de la biodégradation de molécules de petite taille (nombre de carbones < 15), ce qui inclut déjà un grand nombre de PPSP. Les approches 2D-CSIA et 3D-CSIA permettraient donc de quantifier la biodégradation d'un plus grand nombre de PPSP que lorsqu'un seul élément chimique est étudié.

La mesure de l'enrichissement d'un élément par rapport à un autre permet également d'identifier plus facilement, sans mesures de concentration, les mécanismes réactionnels de biodégradation qui se déroulent sur le terrain. Ces informations sont essentielles pour utiliser de manière adéquate le fractionnement isotopique comme indicateur quantitatif de biodégradation *in situ*. Elles permettent notamment de choisir avec fiabilité le facteur d'enrichissement à appliquer.

Néanmoins, l'approche 2D-CSIA nécessite l'usage d'appareils analytiques spécifiques de type GC-IRMS. En effet, les analyses isotopiques des autres éléments que le chlore ne sont pas réalisables sur des systèmes analytiques conventionnels. En plus de la faible disponibilité des appareils GC-IRMS dans les laboratoires, des études supplémentaires sont nécessaires pour vérifier s'ils peuvent permettre de mesurer un fractionnement isotopique pour des molécules présentes à l'état de traces (de l'ordre du ng/L). L'application de l'outil isotopique à l'étude de la biodégradation des PPSP reste donc principalement limitée par des freins analytiques et les faibles connaissances des mécanismes réactionnels de dégradation des PPSP. Des avancées dans le domaine des analyses isotopiques sont nécessaires pour démocratiser l'utilisation de cet outil.

Le fractionnement énantiomérique est un outil moins mature que le fractionnement isotopique. Les connaissances étaient limitées concernant la capacité de l'outil énantiomérique à quantifier les processus de biodégradation en aval des STEP. Le fait que l'équation de Rayleigh conduise à une relation linéaire entre biodégradation et fractionnement énantiomérique restait à être démontré dans des conditions proches de celles rencontrées sur le terrain. En effet, la condition qui garantit une relation linéaire pour l'outil isotopique, à savoir que l'un des isotopes est largement prépondérant par rapport à l'autre, n'est pas respectée pour l'outil énantiomérique. Une relation linéaire entre variations énantiomériques et biodégradation est toutefois attendue si les concentrations des molécules étudiées sont très inférieures aux constantes de Michaelis-Menten relatives à leurs réactions de biodégradation (Jammer et al., 2014), ce qui est, à priori, souvent le cas dans l'environnement. De plus, le lien entre fractionnement énantiomérique et mécanismes réactionnels est peu connu. Ainsi, les réactions auxquelles peut s'appliquer l'outil énantiomérique, à savoir les réactions stéréosélectives, restaient et restent toujours à être découvertes.

Les résultats obtenus au cours de la thèse sur l'outil énantiomérique sont très encourageants. Une relation linéaire entre la biodégradation du métoprolol et les variations énantiomériques a ainsi été observée dans des microcosmes effluents/sédiments, mais également dans plusieurs STEP. **Le fractionnement énantiomérique est donc susceptible de constituer un bon indicateur quantitatif de biodégradation du métoprolol en aval des STEP.** Les conditions nécessaires à l'obtention d'une relation linéaire sont respectées, même pour les expériences en laboratoire pour lesquelles le métoprolol a été dopé à 10 µg/L. La plupart des PPSP sont présents dans le milieu environnemental à des concentrations inférieures à 10 µg/L, ce qui prouve que la contrainte des concentrations faibles n'est pas limitante dans le cas des micropolluants.

L'outil énantiomérique répond aux objectifs fixés puisque :

- **Il est spécifique des réactions de biodégradation** : la dégradation du métoprolol dans les batchs réalisés en conditions stériles n'a pas conduit à un fractionnement énantiomérique. Ainsi, pour quantifier la biodégradation d'un PPSP chiral sur le terrain, l'utilisation de composés traceurs pour compenser l'effet dilution n'est plus nécessaire.
- **Il est plus facile à mettre en œuvre que les méthodes actuelles.** En effet, la quantification de la biodégradation des molécules chirales est réalisée à partir des ratios énantiomériques : les mesures des concentrations absolues ne sont pas nécessaires. Ce dernier point est un avantage significatif pour les études *in situ*

puisque l'on s'affranchit des contraintes d'échantillonnage engendrées par les variations des concentrations des PPSP en sortie de STEP. Ainsi, pour évaluer la biodégradation d'un PPSP chiral en aval de STEP, il n'est plus nécessaire d'utiliser les méthodes complexes de Lagrangian, les échantillonneurs passifs ou les méthodes de superposition des concentrations et des débits. De plus, au contraire des analyses isotopiques, les analyses énantiomériques ont été simplifiées suite au développement de colonnes chirales adaptées.

Des études supplémentaires restent nécessaires pour valider les résultats obtenues durant la thèse *in situ* en aval des STEP et identifier à quelles autres molécules chirales ils peuvent être extrapolés. Pour adapter l'outil énantiomérique à l'étude d'autres molécules que le métoprolol, il est essentiel de rationaliser le lien qui existe entre mécanismes réactionnels et enrichissement énantiomérique dans l'environnement. Malgré le manque de recul sur le fractionnement énantiomérique, cet outil semble être aujourd'hui le plus accessible pour quantifier la biodégradation des PPSP en aval des STEP.

2. Placer les résultats issus de la thèse dans une politique globale d'évaluation et gestion des risques liés à la présence des PPSP en aval des STEP

Les travaux réalisés, au cours de la thèse, ont permis d'approfondir l'état des connaissances sur l'utilisation des outils de fractionnements isotopiques et énantiomériques comme indicateurs quantitatifs de la biodégradation des PPSP. Au-delà de ces connaissances nouvelles propres aux outils, le but de cette discussion est d'analyser si les travaux réalisés répondent à l'objectif initial qui est de mieux évaluer les risques engendrés par les rejets de PPSP en aval de STEP.

2.1. Evaluation de la capacité du milieu naturel à éliminer les PPSP et calibration des modèles de prédiction d'exposition via la quantification des processus de biodégradation

Le fait de quantifier la biodégradation des PPSP en aval des STEP permet de définir les taux d'atténuation biologique *in situ* des composés étudiés. Ces informations ont deux fonctions importantes :

- **Les taux d'atténuation biologiques sont importants pour estimer l'intensité de biodégradation des PPSP en tenant compte des caractéristiques du milieu naturel.** Ils aident à la prédiction des concentrations environnementales des PPSP, à travers la calibration des modèles de prédiction d'exposition. Les valeurs d'exposition sont des données essentielles dans la stratégie d'évaluation des risques.
- **Mesurer les taux d'atténuation permet également d'évaluer la variabilité de l'ampleur des processus de biodégradation en fonction des sites étudiés et au cours du temps.** Ces informations peuvent aider à identifier les conditions optimales qui permettent d'éliminer les PPSP et de cibler ainsi les sites ou les périodes à fort risque de contamination.

La Figure 50 illustre la manière dont les outils de fractionnements isotopique et énantiomérique peuvent contribuer à l'évaluation des risques engendrés par les PPSP en aval des STEP.

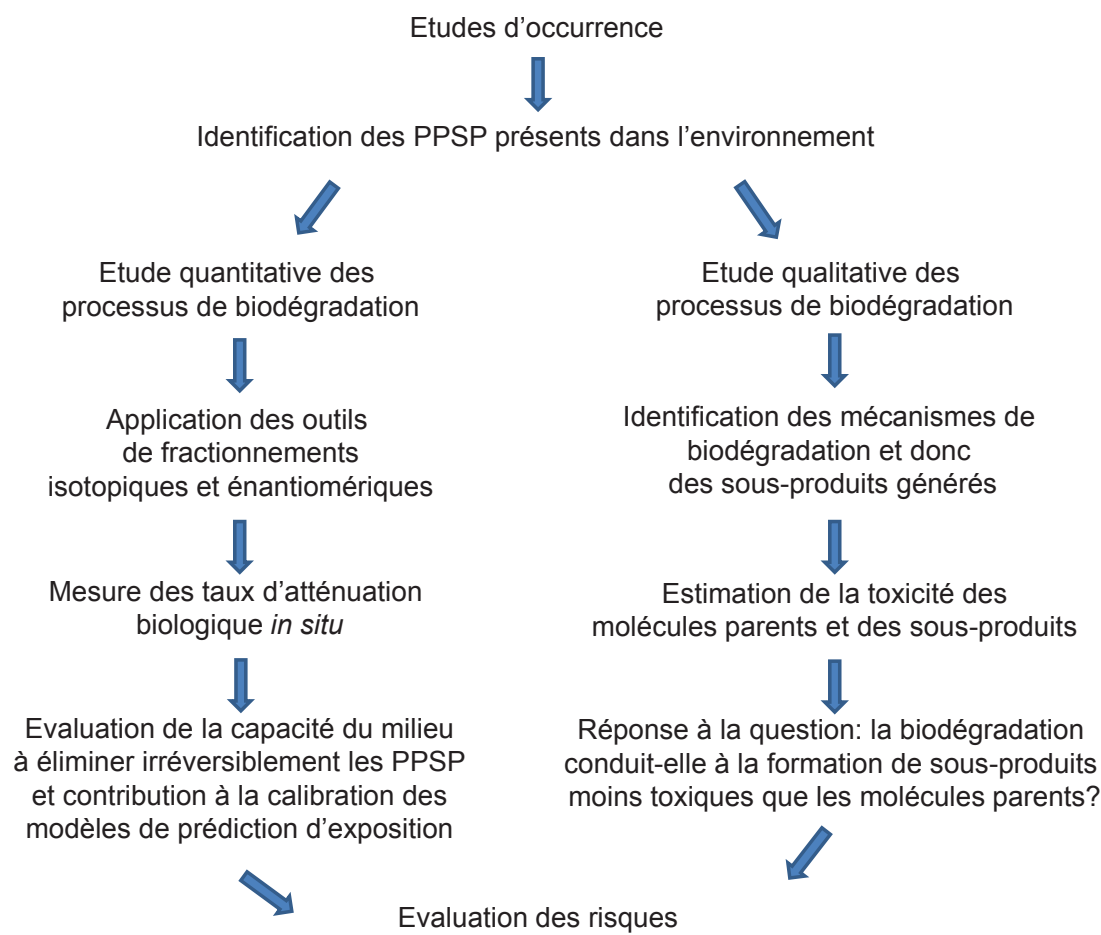


Figure 50. Contribution des outils de fractionnements isotopique et énantiomérique dans l'évaluation des risques engendrés par les PPSP en aval des STEP.

Le développement d'indicateurs quantitatifs de biodégradation représente donc un véritable enjeu environnemental. Les expériences menées durant la thèse montrent que le fractionnement énantiomérique constitue un outil d'intérêt pour quantifier la biodégradation des molécules chirales. Le fractionnement énantiomérique a été pour l'instant validé sur le métoprolol seul mais les travaux réalisés ont permis d'initier une méthodologie pour rechercher de nouvelles molécules d'étude. Le fractionnement isotopique du chlore seul n'est pas un outil actuellement adapté à l'étude des PPSP aromatiques chlorés en aval de STEP. Néanmoins, une fois les limites analytiques levées, l'outil isotopique (à travers l'approche 2D-CSIA notamment) peut être d'intérêt pour étudier et quantifier la biodégradation de divers PPSP. L'application des deux outils étudiés à des échantillons réels est essentielle pour fournir les informations quantitatives sur les processus de biodégradation qui permettront d'affiner les modèles de prédiction et d'évaluer au mieux la capacité des milieux à éliminer les PPSP.

Le reproche qui peut être fait concernant les outils développés est qu'ils ne s'appliquent pas à la quantification de la biodégradation de l'ensemble des PPSP. C'est en effet une réalité puisque l'outil qui semble mature aujourd'hui ne peut s'appliquer qu'à certains PPSP chiraux. Le nombre de molécules auxquelles peut s'appliquer l'approche isotopique multiéléments reste, quant à lui, à être estimé. Néanmoins, les taux d'atténuation utilisés dans les modèles de prédiction aujourd'hui correspondent en général à des taux mesurés en laboratoire qui ne prennent pas en compte la variabilité inter-sites (Alder et al., 2010). Cette variabilité est pourtant très élevée en aval des STEP. **Les PPSP auxquels s'appliquent les outils de fractionnements isotopique et énantiomérique, même s'ils n'englobent pas l'ensemble des molécules commercialisées, peuvent déjà constituer un pool de molécules modèles pour estimer et comprendre la variabilité du potentiel d'atténuation biologique des différents sites en aval des STEP.** Pour estimer les taux d'atténuation des composés qui ne peuvent être étudiés à l'aide des deux outils de fractionnement, les molécules modèles peuvent être utilisées. Pour ce faire, les taux d'atténuation mesurés pour les molécules modèles peuvent être extrapolés aux autres composés, pour qui l'ampleur de biodégradation varie plus en fonction des conditions environnementales qu'en fonction de la structure moléculaire. Dans ce cas, la variabilité de biodégradation inter molécules peut être évaluée au préalable en laboratoire.

2.2. Vérification du fait que les processus de biodégradation conduisent à la formation de sous-produits moins toxiques que les molécules mères via l'identification des sous-produits de biodégradation

Les informations quantitatives sur la biodégradation ne suffisent pas pour évaluer les risques liés à la présence des PPSP dans l'environnement. **En parallèle à la quantification des processus de biodégradation, il faut également vérifier que ces processus conduisent à la formation de sous-produits moins toxiques pour évaluer avec fiabilité les impacts.**

Lors de l'étude des outils isotopique et énantiomérique durant la thèse, les sous-produits de dégradation des trois PPSP chlorés et des deux molécules chirales sélectionnés ont donc été identifiés et analysés ce qui a conduit à une amélioration des connaissances sur les voies et mécanismes de transformation de ces contaminants.

Concernant les PPSP chlorés, l'analyse des produits de transformation s'est focalisée sur ceux issus des mécanismes de déchloration, puisque ce sont ces mécanismes que l'on souhaitait quantifier à l'aide du fractionnement isotopique du chlore. Cette réaction de déchloration est connue pour générer des sous-produits généralement moins toxiques car

l'atome de chlore est souvent identifié comme étant le principal responsable de la toxicité générée par les composés chlorés. Les métabolites issus de la déchloration du TCC et du TCS ont été recherchés dans l'environnement lors des études d'occurrence.

Nos travaux mettent en évidence, pour la première fois, une réaction de déchloration du TCS en DCS dans les sédiments de rivière. Concernant le TCC, la déchloration de ce biocide avait déjà été mise en évidence dans des études préalables. Néanmoins, **les travaux réalisés durant la thèse ont permis d'élucider les mécanismes de déchloration du TCC en DCC et d'apporter une contribution sur les mécanismes qui opèrent en milieux aérobie et anaérobie.** Les résultats obtenus sur le TCC et le TCS sont déterminants pour évaluer au mieux les risques engendrés par ces deux biocides, figurant parmi les contaminants prioritaires aux Etats-Unis (Halden, 2014) et suivis de près depuis peu en Europe (Botta and Dulio, 2014). D'un point de vue écologique plus général, ces travaux sur les métabolites du TCS et du TCC suggèrent un potentiel du milieu naturel à résister aux risques de contamination même si des études de toxicité approfondies sur les métabolites sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Concernant les molécules chirales, le MTPA a été identifié comme étant le métabolite majoritaire du MTP dans les STEP et les microcosmes similairement aux résultats obtenus dans d'autres études précédentes (Rubirola et al., 2014). Des tests réalisés sur *V. fischeri* ont démontré que le MTPA est moins toxique que le MTP (Rubirola et al., 2014). Ces résultats confirment que la biodégradation du MTP en MTPA permet de réduire les risques générés par ce composé pharmaceutique. Le développement d'indicateurs quantitatifs adaptés est maintenant nécessaire pour évaluer l'ampleur de ces réactions de biodégradation en aval des STEP.

Conclusions et perspectives

Le but de la thèse a consisté à contribuer au développement d'indicateurs quantitatifs de biodégradation des PPSP en aval des STEP, dans le but d'améliorer l'évaluation des impacts liés à la présence des PPSP dans l'environnement. **Deux outils ont été étudiés pour répondre à cet objectif, à savoir les fractionnements isotopiques et énantiomériques. Les résultats obtenus démontrent, à l'aide de trois molécules modèles (triclocarban, triclosan et diclofénac), que le fractionnement isotopique du chlore seul ne semble pas approprié à l'étude de la biodégradation des PPSP chlorés.** Ils s'expliquent soit par le fait que les PPSP ne se biodégradent pas via une réaction de déchloration, soit par le fait que les mécanismes sous-jacents à la déchloration des composés étudiés n'engendrent pas de fractionnement isotopique du chlore. Une approche isotopique multiéléments (2D-CSIA) serait plus appropriée mais nécessite des avancées dans le domaine analytique pour pouvoir être appliquée, à des coûts abordables, à des études à de faibles concentrations. **Les résultats obtenus sur le fractionnement énantiomérique sont, quant à eux, très encourageants car ils démontrent, dans le cas du métoprolol, la capacité de l'outil à quantifier les processus de biodégradation en microcosmes et dans les STEP.** Des études futures sont essentielles pour extrapoler l'outil énantiomérique à l'étude d'autres composés et à des applications en rivière.

Les perspectives d'application des outils étudiés sont diverses et des travaux futurs peuvent être envisagés.

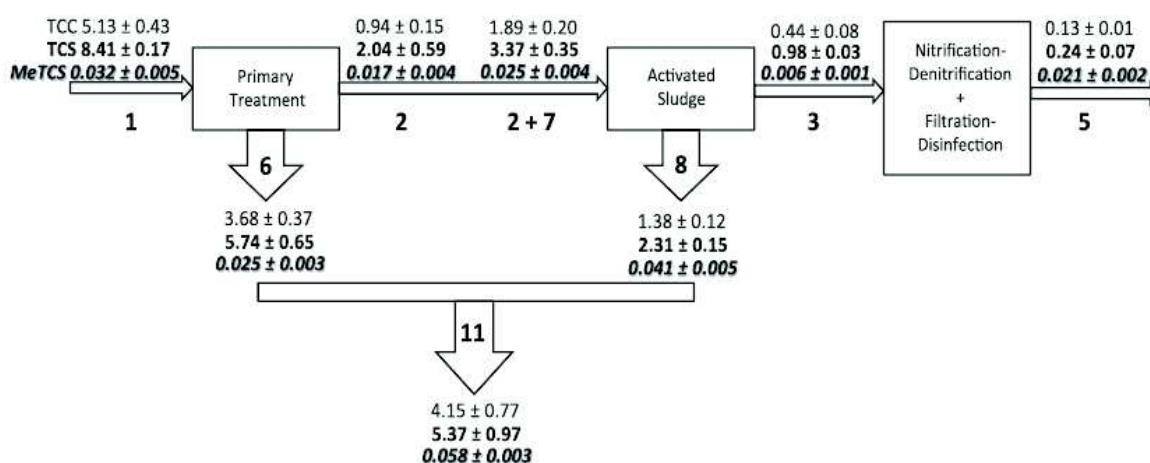
Tout d'abord, **les outils de fractionnements isotopiques et énantiomériques peuvent être appliqués pour contribuer à l'évaluation des impacts des PPSP en aval des STEP**, à travers la calibration des modèles de prédiction d'exposition et l'estimation du potentiel de biodégradation des milieux naturels. Les informations générées peuvent aider les pouvoirs publics à prioriser les contaminants à réguler et à identifier les sites et les périodes à fort risque de contamination. Elles peuvent aussi aider les opérateurs privés responsables de la gestion des réseaux d'eaux usées, tels que Veolia, à :

- Orienter leurs stratégies de réduction à la source.
- Orienter l'optimisation des procédés de traitement des eaux.
- Adapter les recommandations qui sont faites aux collectivités locales.
- Mettre en place des systèmes de surveillance des réseaux d'assainissement ciblés sur les PPSP les plus dangereux.

Pour ce faire, les informations quantitatives sur la biodégradation doivent être croisées avec des informations sur la toxicité des composés étudiés et de leurs sous-produits de transformation.

En plus de contribuer à l'évaluation des risques dans l'environnement, ces outils peuvent également être utilisés directement par les exploitants de STEP.

En effet, les indicateurs quantitatifs de biodégradation des PPSP peuvent constituer des outils précieux pour évaluer l'efficacité d'abattement biologique des processus des STEP vis-à-vis des produits pharmaceutiques. Pour estimer aujourd'hui cette efficacité, des bilans de masse des PPSP doivent être réalisés. Les composés doivent alors être quantifiés en entrée et sortie des différents procédés que l'on souhaite évaluer à la fois dans les boues et les matrices aqueuses. L'article de (Lozano et al., 2013b) présente un exemple de bilans de masse réalisés dans une STEP sur le triclocarban (TCC), le triclosan (TCS) et le méthyl-triclosan (MeTCS) (Figure 51).



1, 2, 3, 5 correspondent à des échantillons liquides et 6,7,8,11 correspondent à des échantillons de boues.

Figure 51. Bilans de masse réalisés pour le TCC, le TCS et le MeTCS dans les phases liquides (kg/j) et les boues (kg/j) d'une STEP. Chaque valeur représente une moyenne de 5 mesures (Lozano et al., 2013b).

Ces bilans de masse sont très complexes à réaliser, de par le nombre important de mesures à effectuer. Notons qu'évaluer l'efficacité des traitements en se basant sur des mesures de concentrations absolues peut également conduire à des erreurs d'appréciation. L'augmentation des concentrations de VEN observées entre les entrées et sorties de plusieurs STEP (Kasprzyk-Hordern & Baker, 2012) implique l'effet d'un phénomène de déconjugaison qui masque la biodégradation de la VEN, si l'on s'en tient aux seules concentrations absolues, alors que les variations énantiomériques montrent que la VEN est réellement biodégradée dans les STEP.

Les indicateurs quantitatifs de biodégradation sont donc d'un grand intérêt, permettant d'évaluer plus rapidement, sous 12 h, et de manière plus fiable la capacité des différents procédés de traitement d'une STEP à biodégrader les PPSP jugés prioritaires. Nos travaux réalisés sur le métoprolol justifient de l'aptitude de l'outil énantiomérique à quantifier l'élimination biologique du MTP dans les STEP. Même si tous les PPSP ne peuvent être étudiés à l'aide des outils sélectionnés, les informations quantitatives sur la biodégradation de plusieurs PPSP, jugées prioritaires dans les STEP, permettent déjà de comparer l'efficacité de différents procédés de traitement et de **cibler les procédés qui nécessitent d'être optimisés.** Si des actions sont entreprises, les indicateurs de biodégradation sont essentiels pour évaluer l'impact de celles-ci.

Bien évidemment, l'utilisation d'indicateurs quantitatifs de biodégradation peut aussi permettre **d'identifier rapidement des dérèglements biologiques des procédés de traitement** qui ont un impact direct sur l'élimination des PPSP et sont donc des outils de suivi très intéressants pour une meilleure réactivité des opérateurs.

Le développement d'indicateurs quantitatifs de biodégradation des PPSP peut ainsi aider à l'évaluation et la gestion des risques engendrés par les rejets des PPSP en aval des STEP mais également à l'évaluation et la gestion des risques dans les STEP. Un schéma récapitulatif (Figure 52) permet de visualiser à quels niveaux les indicateurs quantitatifs de biodégradation peuvent être utiles au sein, en aval et en amont des STEP.

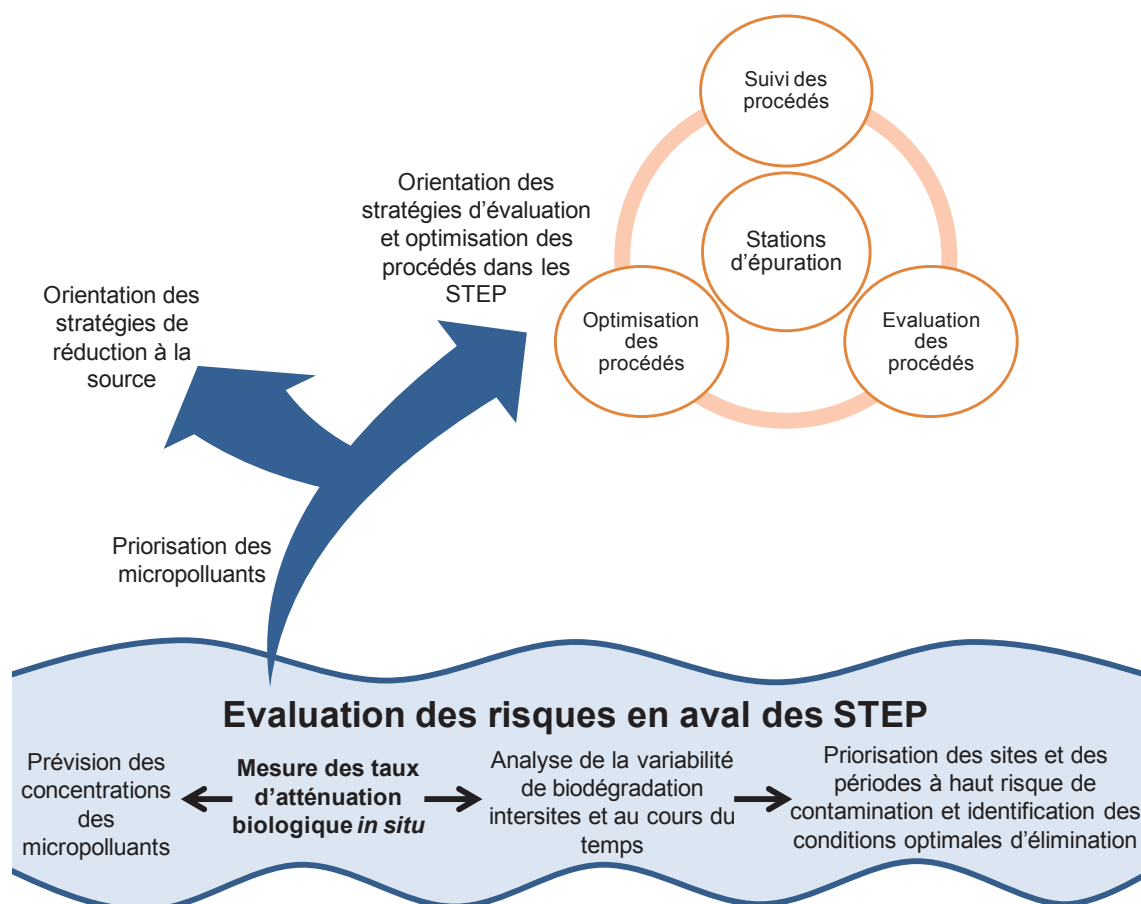


Figure 52. Fonctions des outils quantitatifs de biodégradation dans l'évaluation et la gestion des risques liés à la présence des PPSP au sein et en aval des STEP.

Les applications possibles des indicateurs de biodégradation sont donc multiples et répondent à des enjeux environnementaux importants dans le contexte actuel. Des efforts sont nécessaires et cruciaux pour continuer à développer les outils de fractionnements isotopiques et énantiomériques. Les stratégies d'évaluation et de gestion des risques *in situ* dans les rivières ou au sein des réseaux des eaux usées doivent bien évidemment s'accompagner d'une sensibilisation des différents acteurs qui interviennent dans la chaîne des produits pharmaceutiques (producteurs, prescripteurs, vendeurs, consommateurs) pour être efficaces et atteindre les objectifs fixés par la Directive Cadre sur l'Eau dans les meilleurs délais.

Références bibliographiques

- Abe, Y., Aravena, R., Zopfi, J., Shouakar-Stash, O., Cox, E., Roberts, J.D., Hunkeler, D., 2009. Carbon and Chlorine Isotope Fractionation during Aerobic Oxidation and Reductive Dechlorination of Vinyl Chloride and cis-1,2-Dichloroethene. *Env. Sci Technol.* 43, 101–107.
- Aboul-Enein, H.Y., Ali, I., 2000. Macrocyclic Antibiotics as Effective Chiral Selectors for Enantiomeric Resolution by Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. *Chromatographia* 52, 679–691.
- Adrian, L., Dudkova, V., Demnerova, K., Bedard, D.L., 2009. “ Dehalococcoides ” sp . Strain CBDB1 Extensively Dechlorinates the Commercial Polychlorinated Biphenyl Mixture Aroclor 1260. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4516–4524. doi:10.1128/AEM.00102-09
- Adrian, L., Szewzyk, U., Wecke, J., Gorisch, H., 2000. Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* 408, 580–583.
- Aelion, C.M., Höhener, P., Hunkeler, D., Aravena, R., 2010. *Environmental Isotopes in Biodegradation and Bioremediation*, CRC Press.
- Aeppli, C., Holmstrand, H., Andersson, P., Gustafsson, O., 2010. Direct compound-specific stable chlorine isotope analysis of organic compounds with quadrupole GC/MS using standard isotope bracketing. *Anal. Chem.* 82, 420–6. doi:10.1021/ac902445f
- Agyin-Birikorang, S., Miller, M., O’Connor, G.A., 2010. Retention-release characteristics of triclocarban and triclosan in biosolids, soils, and biosolids-amended soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1925–33. doi:10.1002/etc.251
- Aldekoa, J., Medici, C., Osorio, V., Pérez, S., Marcé, R., Barceló, D., Francés, F., 2013. Modelling the emerging pollutant diclofenac with the GREAT-ER model: Application to the Llobregat River Basin. *J. Hazard. Mater.* 263, 207–213. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.08.057
- Alder, A.C., Schaffner, C., Majewsky, M., Klasmeier, J., Fenner, K., 2010. Fate of beta-blocker human pharmaceuticals in surface water: comparison of measured and simulated concentrations in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Water Res.* 44, 936–48. doi:10.1016/j.watres.2009.10.002
- Allenmark, S., 1988. *Chromatographic enantioseparation, Methods and Applications.* Analytical Chemistry, Ellis Horwood.
- Anderson, P.D., D’Aco, V.J., Shanahan, P., Chapra, S.C., Buzby, M.E., Cunningham, V.L., DuPlessie, B.M., Hayes, E.P., Mastrocco, F.J., Parke, N.J., Rader, J.C., Samuelian, J.H., Schwab, B.W., 2004. Screening Analysis of Human Pharmaceutical Compounds in U.S. Surface Waters. *Environ. Sci. Technol.* 38, 838–849. doi:10.1021/es034430b
- Antonić, J., Heath, E., 2007. Determination of NSAIDs in river sediment samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1337–42. doi:10.1007/s00216-006-0947-7
- Arditsoglou, A., Voutsas, D., 2008. Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers. *Env. Pollut* 156, 316–24.

- Bagnall, J.P., Evans, S.E., Wort, M.T., Lubben, a T., Kasprzyk-Hordern, B., 2012a. Using chiral liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface and wastewater at the enantiomeric level. *J. Chromatogr. A* 1249, 115–29. doi:10.1016/j.chroma.2012.06.012
- Barber, L.B., Keefe, H., Brown, G.K., Furlong, E.T., Gray, J.L., Kolpin, D.W., Meyer, M.T., Sandstrom, M.W., Zaugg, S.D., 2013. Persistence and Potential Effects of Complex Organic Contaminant Mixtures in Wastewater-Impacted Streams. *Env. Sci Technol.* 47, 2177–2188.
- Barclay, V.K.H., Tyrefors, N.L., Johansson, I.M., Pettersson, C.E., 2012. Chiral analysis of metoprolol and two of its metabolites, α -hydroxymetoprolol and deaminated metoprolol, in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1269, 208–17. doi:10.1016/j.chroma.2012.09.090
- Barreiro, J.C., Vanzolini, K.L., Cass, Q.B., 2011. Direct injection of native aqueous matrices by achiral-chiral chromatography ion trap mass spectrometry for simultaneous quantification of pantoprazole and lansoprazole enantiomers fractions. *J. Chromatogr. A* 1218, 2865–70. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.064
- Barreiro, J.C., Vanzolini, K.L., Madureira, T.V., Tiritan, M.E., Cass, Q.B., 2010. A column-switching method for quantification of the enantiomers of omeprazole in native matrices of waste and estuarine water samples. *Talanta* 82, 384–91. doi:10.1016/j.talanta.2010.04.056
- Bartels, P., Tümpling, W., 2007. Solar radiation influence on the decomposition process of diclofenac in surface waters. *Sci. Total Environ.* 374, 143–55. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.11.039
- Beller, H.R., 2000. Metabolic indicators for detecting in situ anaerobic alkylbenzene degradation. *Biodegradation* 11, 125–39.
- Beller, H.R., Ding, W.H., Reinhard, M., 1995. Byproducts of Anaerobic Alkylbenzene Metabolism Useful as Indicators of in Situ Bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2864–2870. doi:10.1021/es00011a024
- Besse, J., Garric, J., 2008. Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicol Lett* 176, 104–23.
- Besse, J.P., 2010. Thesis: Impact environnemental des médicaments à usage humain sur le milieu récepteur: évaluation de l'exposition et des effets biologiques pour les écosystèmes d'eau douce.
- Bisceglia, K.J., Yu, J.T., Coelhan, M., Bouwer, E.J., Roberts, A.L., 2010. Trace determination of pharmaceuticals and other wastewater-derived micropollutants by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 558–64. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.062

- Board, A.R., Neste, V., Neste, V., Gantzer, C.J., Wackett, L.P., 1991. Reductive Dechlorination Catalyzed by Bacterial Transition-Metal Coenzymes. *Env. Sci Technol.* 25, 715–722.
- Boerma, J.S., Vermeulen, N.P.E., Commandeur, J.N.M., 2014. One-electron oxidation of diclofenac by human cytochrome P450s as a potential bioactivation mechanism for formation of 2'-(glutathion-S-yl)-deschloro-diclofenac. *Chem. Biol. Interact.* 207, 32–40. doi:10.1016/j.cbi.2013.11.001
- Bombach, P., Richnow, H.H., Kästner, M., Fischer, A., 2010. Current approaches for the assessment of in situ biodegradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 839–52. doi:10.1007/s00253-010-2461-2
- Boone, D.C., 2012. Thesis: The Development of Resistance to Antibiotics From Bacteria Exposed to Triclosan and Triclocarban in Lake Ontario.
- Borg, K.O., Carlsson, E., Hoffmann, K.J., Jönsson, T.E., And, H.T., Wallin, B., 1975. Metabolism of metoprolol-(3H) in man, the dog and the rat. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* 36, 125–135.
- 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.
- Bueno, M.J.M., Agüera, A., Hernando, M.D., Gómez, M.J., Fernández-Alba, A.R., 2009. Evaluation of various liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry operation modes applied to the analysis of organic pollutants in wastewaters. *J. Chromatogr. A* 1216, 5995–6002. doi:10.1016/j.chroma.2009.06.047
- Bueno, M.J.M., Gomez, M.J., Herrera, S., Hernando, M.D., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2012. Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot survey monitoring. *Environ. Pollut.* 164, 267–73. doi:10.1016/j.envpol.2012.01.038
- Bunge, M., Adrian, L., Kraus, A., Opel, M., Lorenz, W.G., Andreesen, J.R., Gorisch, H., Lechner, U., 2003. Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature* 421, 357–360.
- Butler, E., Whelan, M.J., Sakrabani, R., van Egmond, R., 2012. Fate of triclosan in field soils receiving sewage sludge. *Environ. Pollut.* 167, 101–9. doi:10.1016/j.envpol.2012.03.036
- Carmona, E., Andreu, V., Picó, Y., 2014. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: from waste to drinking water. *Sci. Total Environ.* 484, 53–63.
- Cerqueira, P.M., Boralli, V.B., Coelho, E.B., Lopes, N.P., Guimarães, L.F.L., Bonato, P.S., Lanchote, V.L., 2003. Enantioselective determination of metoprolol acidic metabolite in plasma and urine using liquid chromatography chiral columns: applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B* 783, 433–41.

- Cha, J., Cupples, A.M., 2009. Detection of the antimicrobials triclocarban and triclosan in agricultural soils following land application of municipal biosolids. *Water Res.* 43, 2522–30. doi:10.1016/j.watres.2009.03.004
- Cha, J., Cupples, A.M., 2010a. Triclocarban and triclosan biodegradation at field concentrations and the resulting leaching potentials in three agricultural soils. *Chemosphere* 81, 494–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.040
- Chen, J., Ahn, K.C., Gee, N.A., Ahmed, M.I., Duleba, A.J., Zhao, L., Gee, S.J., Hammock, B.D., Lasley, B.L., 2008. Triclocarban enhances testosterone action: a new type of endocrine disruptor? *Endocrinology* 149, 1173–9. doi:10.1210/en.2007-1057
- Chen, Y., Li, H., Wang, Z., Li, H., Tao, T., Zuo, Y., 2012. Photodegradation of selected β -blockers in aqueous fulvic acid solutions: kinetics, mechanism, and product analysis. *Water Res.* 46, 2965–72. doi:10.1016/j.watres.2012.03.025
- Chiaia-Hernandez, A.C., Krauss, M., Hollender, J., 2013. Screening of lake sediments for emerging contaminants by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization and electrospray ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 47, 976–86. doi:10.1021/es303888v
- Chu, S., Metcalfe, C.D., 2007. Simultaneous determination of triclocarban and triclosan in municipal biosolids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1164, 212–8. doi:10.1016/j.chroma.2007.07.024
- Clark, I., Fritz, P., 1997. *Environmental isotopes in hydrogeology*. Lewis Publishers.
- Cleuvers, M., 2005. Initial risk assessment for three beta-blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* 59, 199–205. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.11.090
- Clewell, H.J., Gentry, P.R., Gearhart, J.M., Allen, B.C., Andersen, M.E., 2001. Comparison of cancer risk estimates for vinyl chloride using animal and human data with a PBPK model. *Sci. Total Environ.* 274, 37–66. doi:10.1016/S0048-9697(01)00730-6
- Collet, A., Crassous, J., Dutasta, J.P., Guy, L., 2006. *Molécules chirales: stéréochimie et propriétés*. EDP Sciences.
- Coogan, M.A., Edziyie, R.E., La Point, T.W., Venables, B.J., 2007. Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. *Chemosphere* 67, 1911–8. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.12.027
- Cooper, M., Wagner, A., Wondrousch, D., Sonntag, F., Sonnabend, A., Brehm, M., Schüürmann, G., Adrian, L., 2015. Anaerobic microbial transformation of halogenated aromatics and fate prediction using electron density modeling. *Environ. Sci. Technol.* 49, 6018–6028. doi:10.1021/acs.est.5b00303
- Cretnik, S., Thoreson, K.A., Bernstein, A., Ebert, K., Buchner, D., Laskov, C., Haderlein, S., Shouakar-Stash, O., Kliegman, S., McNeill, K., Elsner, M., 2013. Reductive dechlorination of TCE by chemical model systems in comparison to dehalogenating bacteria: insights from dual element isotope analysis ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$). *Environ. Sci. Technol.* 47, 6855–63. doi:10.1021/es400107n

- Cunningham, V.L., Binks, S.P., Olson, M.J., 2009. Human health risk assessment from the presence of human pharmaceuticals in the aquatic environment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 53, 39–45. doi:10.1016/j.yrtph.2008.10.006
- Daneshvar, A., Svanfelt, J., Kronberg, L., Weyhenmeyer, G.A., 2010. Winter accumulation of acidic pharmaceuticals in a Swedish river. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 908–16. doi:10.1007/s11356-009-0261-y
- Dong, Z., Senn, D.B., Moran, R.E., Shine, J.P., 2013. Prioritizing environmental risk of prescription pharmaceuticals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 65, 60–7. doi:10.1016/j.yrtph.2012.07.003
- Dordick, J.S., Marletta, M.A., Klibanov, A.M., 1987. Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 31–36. doi:10.1002/bit.260300106
- Dzialowski, E.M., Turner, P.K., Brooks, B.W., 2006. Physiological and reproductive effects of beta adrenergic receptor antagonists in *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 503–10. doi:10.1007/s00244-005-0121-9
- Eap, C.B., Lessard, E., Baumann, P., Brawand-Amey, M., Yessine, M.A., O'Hara, G., Turgeon, J., 2003. Role of CYP2D6 in the stereoselective disposition of venlafaxine in humans. *Pharmacogenetics* 13, 39–47.
- Elsner, M., 2010. Stable isotope fractionation to investigate natural transformation mechanisms of organic contaminants: principles, prospects and limitations. *J. Environ. Monit.* 12, 2005–31. doi:10.1039/c0em00277a
- Elsner, M., Jochmann, M.A., Hofstetter, T.B., Hunkeler, D., Bernstein, A., Schmidt, T.C., Schimmelmann, A., 2012. Current challenges in compound-specific stable isotope analysis of environmental organic contaminants. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2471–91. doi:10.1007/s00216-011-5683-y
- EPA, n.d. TCC Consortium [WWW Document]. 2002. URL <http://www.epa.gov/chemrtk/tricloca/c14186cv.pdf>.
- Ereshefsky, L., Dugan, D., 2000. Review of the pharmacokinetics, pharmacogenetics, and drug interaction potential of antidepressants: focus on venlafaxine. *Depress. Anxiety* 12, 30–44.
- Evans, S.E., Kasprzyk-Hordern, B., 2014. Applications of chiral chromatography coupled with mass spectrometry in the analysis of chiral pharmaceuticals in the environment. *Trends Environ. Anal. Chem.* 1, 34–51. doi:10.1016/j.teac.2013.11.005
- Farré, M., Asperger, D., Kantiani, L., González, S., Petrovic, M., Barceló, D., 2008. Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyl triclosan in wastewater based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1999–2007. doi:10.1007/s00216-007-1779-9

- Fedurcova, A., Vancova, M., Mydlova, J., Lehotay, J., Krupcik, J., Armstrong, D.W., 2006. Interconversion of Oxazepam Enantiomers During HPLC Separation. Determination of Thermodynamic Parameters. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 29, 2889–2900.
- Feijtel, T., Boeije, G., Matthies, M., Young, A., Morris, G., Gandolfi, C., Hansen, B., Fox, K., Holt, M., Koch, V., Schroder, R., Cassani, G., Schowanek, D., Rosenblom, J., Niessen, H., 1997. Development of a geography-referenced regional exposure assessment tool for European rivers - great-er contribution to great-er #1. *Chemosphere* 34, 2351–2373. doi:10.1016/S0045-6535(97)00048-9
- Feinberg, M., 2001. Validation interne des méthodes d'analyse. *Tech. l'Ingénieur, Trait. Anal. Caractérisation* 1–23.
- Feito, R., Valcárcel, Y., Catalá, M., 2013. Preliminary data suggest that venlafaxine environmental concentrations could be toxic to plants. *Chemosphere* 90, 2065–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.09.028
- Ferreira da Silva, B., Jelic, A., López-Serna, R., Mozeto, A.A., Petrovic, M., Barceló, D., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere* 85, 1331–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.051
- Fonga, P.P., Hoy, C.M., 2002. Antidepressants (venlafaxine and citalopram) cause foot detachment from the substrate in freshwater snails at environmentally relevant concentrations. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 45, 145–153. doi:10.1080/10236244.2012.690579
- Fono, L.J., Kolodziej, E.P., Sedlak, D.L., 2006. Attenuation of wastewater-derived contaminants in an effluent-dominated river. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7257–62.
- Gasser, G., Pankratov, I., Elhanany, S., Werner, P., Gun, J., Gelman, F., Lev, O., 2012a. Field and laboratory studies of the fate and enantiomeric enrichment of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine under aerobic and anaerobic conditions. *Chemosphere* 88, 98–105. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.02.074
- Gautam, P., Carsella, J.S., Kinney, C.A., 2014. Presence and transport of the antimicrobials triclocarban and triclosan in a wastewater-dominated stream and freshwater environment. *Water Res.* 48, 247–56. doi:10.1016/j.watres.2013.09.032
- Gray, J.R., Lacrampe-Couloume, G., Gandhi, D., Scow, K.M., Wilson, R.D., Mackay, D.M., Sherwood Lollar, B., 2002. Carbon and Hydrogen Isotopic Fractionation during Biodegradation of Methyl tert-Butyl Ether. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1931–1938. doi:10.1021/es011135n
- Gurr, C.J., 2006. Harnessing natural attenuation of pharmaceuticals and hormones in rivers. *Environ. Sci. Technol.* 2872–2876.
- Halden, R.U., 2014. On the Need and Speed of Regulating Triclosan and Triclocarban in the United States. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3603–3611. doi:10.1021/es500495p

- Halden, R.U., Paull, D.H., 2004. Analysis of triclocarban in aquatic samples by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4849–55.
- Halden, R.U., Paull, D.H., 2005. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in U.S. water resources. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1420–6. doi:10.1021/es049071e
- Hannah, R., J. D'aco, V., Anderson, P.D., Buzby, M.E., Caldwell, Daniel J. Cunningham, Virginia L. Ericson, J.F., Johnson, A.C., Parke, N.J., Samuelian, J.H., Sumpter, J.P., 2009. Exposure assessment of α -ethinylestradiol in surface waters of the United States and Europe. *Pharm. Pers. Care Prod. Environ. Hazard/Risk Assess.* 28, 2725–2732.
- Harman, C., Brooks, S., Sundt, R.C., Meier, S., Grung, M., 2011. Field comparison of passive sampling and biological approaches for measuring exposure to PAH and alkylphenols from offshore produced water discharges. *Mar. Pollut. Bull.* 63, 141–148.
- Harrington, R.R., Poulson, S.R., Drever, J.I., Colberg, P.J.S., Kelly, E.F., 1999. Carbon isotope systematics of monoaromatic hydrocarbons: vaporization and adsorption experiments. *Org. Geochem.* 30, 765–775. doi:10.1016/S0146-6380(99)00059-5
- Hashim, N.H., Nghiem, L.D., Stuetz, R.M., Khan, S.J., 2011. Enantiospecific fate of ibuprofen, ketoprofen and naproxen in a laboratory-scale membrane bioreactor. *Water Res.* 45, 6249–58. doi:10.1016/j.watres.2011.09.020
- Hayes, J.M., 2004. An Introduction to Isotopic Calculations 1–10.
- Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5–17.
- Heidler, J., Sapkota, A., Halden, R.U., 2006a. Partitioning, persistence, and accumulation in digested sludge of the topical antiseptic triclocarban during wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3634–9.
- Hernández, F., Sancho, J. V, Ibáñez, M., Abad, E., Portolés, T., Mattioli, L., 2012. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1251–64. doi:10.1007/s00216-012-5844-7
- Higgins, C.P., Paesani, Z.J., Chalew, T.E.A., Halden, R.U., Hundal, L.S., 2011. Persistence of triclocarban and triclosan in soils after land application of biosolids and bioaccumulation in *Eisenia foetida*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 556–63. doi:10.1002/etc.416
- Hoffmann, K.J., Regårdh, D.C.G., Aurell, M., Ervik, M., Jordö, L., 1980. The Effect of Impaired Renal Function on the Plasma Concentration and Urinary Excretion of Metoprolol Metabolites. *Clin. Pharmacokinet.* 5, 181–191.
- Hofstetter, T., Wijker, C.R., Spahr, S., 2012. Isotopes: tracking pollutant sources and breakdown. *Eawag News* 73 12–17.
- Hofstetter, T.B., Berg, M., 2011. Assessing transformation processes of organic contaminants by compound-specific stable isotope analysis. *Trends Anal. Chem.* 30, 618–627. doi:10.1016/j.trac.2010.10.012

- Hofstetter, T.B., Schwarzenbach, P., Bernasconi, S.M., 2008. Assessing Transformation Processes of Organic Compounds Using Stable Isotope Fractionation. *Env. Sci Technol.* 7737–7743.
- Holliger, C., Wohlfarth, G., Diekert, G., 1999. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 383–398. doi:10.1016/S0168-6445(98)00030-8
- Holscher, T., Adrian, L., Helmut, G., 2003. Reductive Dehalogenation of Chlorobenzene Congeners in Cell Extracts of Dehalococcoides sp. Strain CBDB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2999–3001. doi:10.1128/AEM.69.5.2999
- Huang, C., 2003. Oxidative Transformation of Triclosan and Chlorophene by Manganese Oxides. *Env. Sci Technol.* 37, 2421–2430.
- Huang, Q., Zhang, K., Wang, Z., Wang, C., Peng, X., 2012. Enantiomeric determination of azole antifungals in wastewater and sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1751–60. doi:10.1007/s00216-012-5976-9
- 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. doi:10.1021/es3030148
- Hühnerfuss, H., Selke, S., Kallenborn, R., Kuhlmann, J., Weigel, S., 2006. Enzymatic transformation of chiral pharmaceuticals in the environment as revealed by enantioselective chromatography. *Organohalogen Compd.* 68, 17–20.
- Hühnerfuss, H., Shah, M.R., 2009. Enantioselective chromatography-a powerful tool for the discrimination of biotic and abiotic transformation processes of chiral environmental pollutants. *J. Chromatogr. A* 1216, 481–502. doi:10.1016/j.chroma.2008.09.043
- Hunkeler, D., Butler, B.J., Aravena, R., Barker, J.F., 2001. Monitoring Biodegradation of Methyl tert-Butyl Ether (MTBE) Using Compound-Specific Carbon Isotope Analysis. *Environ. Sci. Technol.* 35, 676–681. doi:10.1021/es001338w
- Hunkeler, D., Meckenstock, R.U., Sherwood Lollar, B., Schmidt, T.C., Wilson, J.T., 2008a. A Guide for Assessing Biodegradation and Source Identification of Organic Ground Water Contaminants using Compound Specific Isotope Analysis (CSIA).
- Hunkeler, D., Meckenstock, R.U., Sherwood Lollar, B., Schmidt, T.C., Wilson, J.T., 2008b. A Guide for Assessing Biodegradation and Source Identification of Organic Ground Water Contaminants using Compound Specific Isotope Analysis (CSIA).
- ITRC Environmental Molecular Diagnostics Team, 2011. Compound Specific Isotope Analysis, EMD Team Fact Sheet.
- Jacobs, M.N., Nolan, G.T., Hood, S.R., 2005. Lignans, bacteriocides and organochlorine compounds activate the human pregnane X receptor (PXR). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 209, 123–33. doi:10.1016/j.taap.2005.03.015

- Jammer, S., Voloshenko, a, Gelman, F., Lev, O., 2014. Chiral and isotope analyses for assessing the degradation of organic contaminants in the environment: Rayleigh dependence. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3310–8. doi:10.1021/es4039209
- Jenkins, R.L., Wilson, E.M., Angus, R.A., Howell, W.M., Kirk, M., 2003. Androstenedione and progesterone in the sediment of a river receiving paper mill effluent. *Toxicol. Sci.* 73, 53–9. doi:10.1093/toxsci/kfg042
- Jonsson, S., Schon, A., Isaksson, R., Pettersson, C., 1992. An Unexpected Temperature Effect Obtained on Enantiomer Separation Using CBH I-Silica as a Chiral Stationary Phase : Increase in Retention and Enantioselectivity at Elevated Column Temperature : A Chromatographic and Microcalorimetric Study. *Chirality* 4, 505–508.
- Kah, M., Brown, C.D., 2007. Prediction of the adsorption of ionizable pesticides in soils. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2312–22. doi:10.1021/jf063048q
- Kasprzyk-Hordern, B., 2010. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. *Chem. Soc. Rev.* 39, 4466–4503. doi:10.1039/c000408c
- Kasprzyk-Hordern, B., Baker, D.R., 2012. Enantiomeric profiling of chiral drugs in wastewater and receiving waters. *Environ. Sci. Technol.* 46, 1681–91. doi:10.1021/es203113y
- 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 South Wales, UK. *Water Res.* 42, 3498–518. doi:10.1016/j.watres.2008.04.026
- Kasprzyk-Hordern, B., Kondakal, V.V.R., Baker, D.R., 2010a. Enantiomeric analysis of drugs of abuse in wastewater by chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 4575–86. doi:10.1016/j.chroma.2010.04.073
- Kibbey, T.C.G., Paruchuri, R., Sabatini, D. a, Chen, L., 2007. Adsorption of beta blockers to environmental surfaces. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5349–56.
- Kliegman, S., McNeill, K., 2008. Dechlorination of chloroethylenes by cob(I)alamin and cobalamin model complexes. *Dalton Trans.* 9226, 4191–201. doi:10.1039/b801679h
- Kolhatkar, R., Kuder, T., Philp, P., Allen, J., Wilson, J.T., 2002. Use of Compound-Specific Stable Carbon Isotope Analyses To Demonstrate Anaerobic Biodegradation of MTBE in Groundwater at a Gasoline Release Site. *Environ. Sci. Technol.* 36, 5139–5146. doi:10.1021/es025704i
- Kuder, T., 2012. Introduction to Compound Specific Isotope Analysis (CSIA), in: Meeting of the Technical Support Project.
- Kuder, T., van Breukelen, B.M., Vanderford, M., Philp, P., 2013. 3D-CSIA: Carbon, Chlorine, and Hydrogen Isotope Fractionation in Transformation of TCE to Ethene by a *Dehalococcoides* Culture. *Environ. Sci. Technol.* 47, 9668–9677. doi:10.1021/es400463p
- Kuder, T., Wilson, J.T., Kaiser, P., Kolhatkar, R., Philp, P., Allen, J., 2005. Enrichment of Stable Carbon and Hydrogen Isotopes during Anaerobic Biodegradation of MTBE:

- Microcosm and Field Evidence. *Environ. Sci. Technol.* 39, 213–220. doi:10.1021/es040420e
- Kunkel, U., Radke, M., 2008. Biodegradation of acidic pharmaceuticals in bed sediments: insight from a laboratory experiment. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7273–9.
- Kunkel, U., Radke, M., 2012. Fate of pharmaceuticals in rivers: Deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions. *Water Res.* 46, 5551–65. doi:10.1016/j.watres.2012.07.033
- Kwon, J.W., Xia, K., 2012. Fate of triclosan and triclocarban in soil columns with and without biosolids surface application. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 262–9. doi:10.1002/etc.1703
- Lacey, C., Basha, S., Morrissey, A., Tobin, J.M., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater process streams in Dublin, Ireland. *Environ. Monit. Assess.* 184, 1049–62. doi:10.1007/s10661-011-2020-z
- Lahti, M., 2012a. Thesis: The Fate Aspects of Pharmaceuticals in the Environment. Biotransformation, Sedimentation and Exposure of Fish.
- Lajeunesse, A., Blais, M., Barbeau, B., Sauv e, S., Gagnon, C., 2013. Ozone oxidation of antidepressants in wastewater -Treatment evaluation and characterization of new by-products by LC-QToFMS. *Chem. Cent. J.* 7, 15. doi:10.1186/1752-153X-7-15
- Lennard, M.S., 1985. Note metoprolol and three of its metabolites in urine and liver microsomes by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 342, 199–205.
- Li, H., Helm, P.A., Paterson, G., Metcalfe, C.D., 2011. The effects of dissolved organic matter and pH on sampling rates for polar organic chemical integrative samplers (POCIS). *Chemosphere* 83, 271–80. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.071
- Li, Z., Gomez, E., Fenet, H., Chiron, S., 2013. Chiral signature of venlafaxine as a marker of biological attenuation processes. *Chemosphere* 90, 1933–8. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.10.033
- Li, Z., Maier, M.P., Radke, M., 2014. Screening for pharmaceutical transformation products formed in river sediment by combining ultrahigh performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry with a rapid data-processing method. *Anal. Chim. Acta* 810, 61–70. doi:10.1016/j.aca.2013.12.012
- Lozano, N., Rice, C.P., Ramirez, M., Torrents, A., 2013b. Fate of triclocarban, triclosan and methyltriclosan during wastewater and biosolids treatment processes. *Water Res.* 47, 4519–27. doi:10.1016/j.watres.2013.05.015
- MacLeod, S.L., Sudhir, P., Wong, C.S., 2007. Stereoisomer analysis of wastewater-derived beta-blockers, selective serotonin re-uptake inhibitors, and salbutamol by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1170, 23–33. doi:10.1016/j.chroma.2007.09.010
- MacLeod, S.L., Wong, C.S., 2010. Loadings, trends, comparisons, and fate of achiral and chiral pharmaceuticals in wastewaters from urban tertiary and rural aerated lagoon treatments. *Water Res.* 44, 533–44. doi:10.1016/j.watres.2009.09.056

- Madsen, E.L., 2005. Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 439–446.
- Maier, M.P., De Corte, S., Nitsche, S., Spaett, T., Boon, N., Elsner, M., 2014. C & N isotope analysis of diclofenac to distinguish oxidative and reductive transformation and to track commercial products. *Environ. Sci. Technol.* 48, 2312–20. doi:10.1021/es403214z
- Mancini, S.A., Ulrich, A.C., Lacrampe-Couloume, G., Sleep, B., Edwards, E.A., Lollar, B.S., 2003. Carbon and Hydrogen Isotopic Fractionation during Anaerobic Biodegradation of Benzene. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 191–198. doi:10.1128/AEM.69.1.191-198.2003
- Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2010. Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination. *J. Sep. Sci.* 33, 1760–6. doi:10.1002/jssc.200900873
- Maurer, M., Escher, B.I., Richle, P., Schaffner, C., Alder, a C., 2007. Elimination of beta-blockers in sewage treatment plants. *Water Res.* 41, 1614–22. doi:10.1016/j.watres.2007.01.004
- McGourty, J.C., Silas, J.H., Lennard, M.S., Tucker, G.T., Woods, H.F., 1985. Metoprolol metabolism and debrisoquine oxidation polymorphism- population and family studies. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 20, 555–566.
- McKinney, C.R., McCrea, J.M., Epstein, S., Allen, H.A., Urey, H.C., 1950. Improvements in Mass Spectrometers for the Measurement of Small Differences in Isotope Abundance Ratios. *Rev. Sci. Instrum* 21, 724–730.
- Meckenstock, R.U., Morasch, B., Griebler, C., Richnow, H.H., 2004. Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *J. Contam. Hydrol.* 75, 215–55. doi:10.1016/j.jconhyd.2004.06.003
- Meckenstock, R.U., Morasch, B., Kästner, M., Vieth, A., Hans Hermann, R., 2002. Assessment of Bacterial Degradation of Aromatic Hydrocarbons in the Environment by Analysis of Stable Carbon Isotope Fractionation. *Water, Air Soil Pollut.* 2, 141–152.
- Meckenstock, R.U., Morasch, B., Schink, B., Annweiler, E., Michaelis, W., Richnow, H.H., 1999. ¹³C/¹²C isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. *Environ. Microbiol.* 1, 409–414.
- Meggio, R.E., Schnoor, J.L., Hu, D., 2013. Dechlorination of PCBs in the rhizosphere of switchgrass and poplar. *Environ. Pollut.* 178, 312–21. doi:10.1016/j.envpol.2013.02.035
- Mermillod-Blondin, F., Mauclaire, L., Montuelle, B., 2005. Use of slow filtration columns to assess oxygen respiration, consumption of dissolved organic carbon, nitrogen transformations, and microbial parameters in hyporheic sediments. *Water Res.* 39, 1687–98. doi:10.1016/j.watres.2005.02.003
- Metcalfe, C.D., Chu, S., Judt, C., Li, H., Oakes, K.D., Servos, M.R., Andrews, D.M., 2010. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 79–89. doi:10.1002/etc.27

- Miao, X.S., Koenig, B.G., Metcalfe, C.D., 2002. Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 952, 139–147. doi:10.1016/S0021-9673(02)00088-2
- Miller, T.R., Colquhoun, D.R., Halden, R.U., 2010. Identification of wastewater bacteria involved in the degradation of triclocarban and its non-chlorinated congener. *J. Hazard. Mater.* 183, 766–72. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.07.092
- Miller, T.R., Heidler, J., Chillrud, S.N., DeLaquil, A., Ritchie, J.C., Mihalic, J.N., Bopp, R., Halden, R.U., 2008a. Fate of triclosan and evidence for reductive dechlorination of triclocarban in estuarine sediments. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4570–6. doi:10.1021/es702882g
- Moran, M.J., Zogorski, J.S., Squillace, P.J., 2007. Chlorinated Solvents in Groundwater of the United States. *Environ. Sci. Technol.* 41, 74–81. doi:10.1021/es061553y
- Morasch, B., Richnow, H.H., Schink, B., Vieth, A., Meckenstock, R.U., 2002. Carbon and Hydrogen Stable Isotope Fractionation during Aerobic Bacterial Degradation of Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5191–5194. doi:10.1128/AEM.68.10.5191-5194.2002
- Morin, P., 2009. Separation of chiral pharmaceutical drugs by chromatographic and electrophoretic techniques. *Ann. Pharm. Françaises* 67, 241–250.
- Motwani, H. V, Qiu, S., Golding, B.T., Kylin, H., Törnqvist, M., 2011. Cob(I)alamin reacts with sucralose to afford an alkylcobalamin: relevance to in vivo cobalamin and sucralose interaction. *Food Chem. Toxicol.* 49, 750–7. doi:10.1016/j.fct.2010.11.037
- Munaron, D., Tapie, N., Budzinski, H., Andral, B., Gonzalez, J.L., 2012. Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 114, 82–92. doi:10.1016/j.ecss.2011.09.009
- Murthy, S., Wendel, L., Martin, S., 1990. Enantioselective and diastereoselective aspects of the oxidative metabolism of metoprolol 40, 1637–1644.
- NF T90-210, 2009. Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire.
- Nguyen, L.A., He, H., Pham-Huy, C., 2006. Chiral Drugs : An Overview. *Int. J. Biomed. Sci.* 85–100.
- Nikolai, L.N., McClure, E.L., Macleod, S.L., Wong, C.S., 2006. Stereoisomer quantification of the beta-blocker drugs atenolol, metoprolol, and propranolol in wastewaters by chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1131, 103–9. doi:10.1016/j.chroma.2006.07.033
- Payne, K.A.P., Quezada, C.P., Fisher, K., Dunstan, M.S., Collins, F.A., Sjuts, H., Levy, C., Hay, S., Rigby, S.E.J., Leys, D., 2015a. Reductive dehalogenase structure suggests a mechanism for B12-dependent dehalogenation. *Nature* 517, 513–516.

- Poiger, T., Buser, H., Müller, M., 2001. Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: pathway, field measurements, and mathematical modeling. *Env. Toxicol Chem* 20, 256–263.
- Price, O.R., Munday, D.K., Whelan, M.J., Holt, M.S., Fox, K.K., Morris, G., Young, A.R., 2009. Data requirements of GREAT-ER: modelling and validation using LAS in four UK catchments. *Environ. Pollut.* 157, 2610–6. doi:10.1016/j.envpol.2009.05.010
- Pycke, B., Roll, I., Brownawell, B., Kinney, C.A., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Halden, R.U., 2014a. Transformation products and human metabolites of triclocarban and triclosan in sewage sludge across the United States. *Env. Sci Technol.* 48, 7881–7890.
- Radke, M., Ulrich, H., Wurm, C., Kunkel, U., 2010. Dynamics and attenuation of acidic pharmaceuticals along a river stretch. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2968–74. doi:10.1021/es903091z
- Ramil, M., El Aref, T., Fink, G., Scheurer, M., Ternes, T.A., 2010. Fate of beta blockers in aquatic-sediment systems: sorption and biotransformation. *Environ. Sci. Technol.* 44, 962–70. doi:10.1021/es9027452
- Regårdh, C.G., Ek, L., Hoffmann, K.J., 1979. Plasma levels and beta-blocking effect of alpha-hydroxymetoprolol-metabolite of metoprolol-in the dog. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 7, 471–9.
- Ribeiro, A., Castro, P.L., Tiritan, M., 2012. Environmental Fate of Chiral Pharmaceuticals: Determination, Degradation and Toxicity, in: *Environmental Chemistry for a Sustainable World*. Springer, pp. 3–45. doi:10.1007/978-94-007-2439-6_1
- Ribeiro, A.R., Afonso, C.M., Castro, P.M.L., Tiritan, M.E., 2012. Enantioselective HPLC analysis and biodegradation of atenolol, metoprolol and fluoxetine. *Environ. Chem. Lett.* 11, 83–90. doi:10.1007/s10311-012-0383-1
- Richmond, S.A., Lindstrom, J.E., Braddock, J.F., 2001a. Assessment of Natural Attenuation of Chlorinated Aliphatics and BTEX in Subarctic Groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4038–4045. doi:10.1021/es0108133
- Richnow, H.H., Annweiler, E., Michaelis, W., Meckenstock, R.U., 2003. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer monitored by ¹³C/¹²C isotope fractionation. *J. Contam. Hydrol.* 64, 59–72.
- Rostkowski, P., Horwood, J., Shears, J.A., Lange, A., Oladapo, F.O., Besselink, H.T., Tyler, C.R., Hill, E.M., 2011. Bioassay-directed identification of novel antiandrogenic compounds in bile of fish exposed to wastewater effluents. *Environ. Sci. Technol.* 45, 10660–7. doi:10.1021/es202966c
- Rúa-Gómez, P.C., Püttmann, W., 2012. Occurrence and removal of lidocaine, tramadol, venlafaxine, and their metabolites in German wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 19, 689–99. doi:10.1007/s11356-011-0614-1
- Rubirola, A., Llorca, M., Rodríguez-Mozaz, S., Casas, N., Rodríguez-Roda, I., Barceló, D., Buttiglieri, G., 2014. Characterization of metoprolol biodegradation and its

- transformation products generated in activated sludge batch experiments and in full scale WWTPs. *Water Res.* 63, 21–32. doi:10.1016/j.watres.2014.05.031
- Sabaliunas, D., Webb, S.F., Hauk, A., Jacob, M., Eckhoff, W.S., 2003. Environmental fate of Triclosan in the River Aire Basin, UK. *Water Res.* 37, 3145–54. doi:10.1016/S0043-1354(03)00164-7
- Sadezky, A., Löffler, D., 2008. Proposal of an environmental indicator and classification system of pharmaceutical product residues for environmental management. Knappe Project.
- Sadowsky, D., McNeill, K., Cramer, C.J., 2014. Dehalogenation of aromatics by nucleophilic aromatic substitution. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10904–11. doi:10.1021/es5028822
- Sapkota, A., Heidler, J., Halden, R.U., 2007a. Detection of triclocarban and two co-contaminating chlorocarbanilides in US aquatic environments using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environ. Res.* 103, 21–9. doi:10.1016/j.envres.2006.03.006
- Schaffer, M., Börnick, H., Nödler, K., Licha, T., Worch, E., 2012. Role of cation exchange processes on the sorption influenced transport of cationic β -blockers in aquifer sediments. *Water Res.* 46, 5472–82. doi:10.1016/j.watres.2012.07.013
- Scheytt, T., Mersmann, P., Leidig, M., Pekdeger, A., Heberer, T., 2004. Transport of pharmaceutically active compounds in saturated laboratory columns. *Ground Water* 42, 767–73.
- Schiavone, S., Coquery, M., 2011. Guide d'échantillonnage et de pré-traitement des sédiments en milieu continental pour les analyses physico-chimiques de la dce.
- Schlüsener, M.P., Hardenbicker, P., Nilson, E., Schulz, M., Viergutz, C., Ternes, T.A., 2015. Occurrence of venlafaxine, other antidepressants and selected metabolites in the Rhine catchment in the face of climate change. *Environ. Pollut.* 196, 247–56. doi:10.1016/j.envpol.2014.09.019
- Schmidt, T.C., Zwank, L., Elsner, M., Berg, M., Meckenstock, R.U., Haderlein, S.B., 2004. Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 283–300. doi:10.1007/s00216-003-2350-y
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P., Imboden, D., 2003. *Environmental Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Scrivanti, A., Vicentini, B., Beghetto, V., Chessa, G., Matteoli, U., 1998. Hydrodehalogenation of aromatic chlorides with NaBH₄, in the presence of Ni(0) catalysts. *Inorg. Chem. Commun.* 1, 246–248.
- Selke, S., Hühnerfuss, H., 2009. Detection and stereoselective analysis of the three metoprolol metabolites in STP-effluent samples. *Org. Geochem.* 71, 447–451.
- Singer, H., Müller, S., Tixier, C., Pillonel, L., 2002. Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater

- Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4998–5004. doi:10.1021/es025750i
- Slater, G.F., Ahad, J.M.E., Sherwood Lollar, B., Allen-King, R., Sleep, B., 2000. Carbon Isotope Effects Resulting from Equilibrium Sorption of Dissolved VOCs. *Anal. Chem.* 72, 5669–5672. doi:10.1021/ac000691h
- Smith, M.H., 1993. Thesis: reductive dechlorination of chlorophenols by Vitamin B12.
- Smith, M.H., Woods, S.L., 1994. Comparison of reactors for oxygen-sensitive reactions : reductive dechlorination of chlorophenols by vitamin B12s. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4107–4111.
- Sood, S., Choudhary, S., Wang, H.C.R., 2013. Induction of human breast cell carcinogenesis by triclocarban and intervention by curcumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438, 600–6. doi:10.1016/j.bbrc.2013.08.009
- Souchier, M., Benali-Raclot, D., Benanou, D., Boireau, V., Gomez, E., Casellas, C., Chiron, S., 2014. Screening triclocarban and its transformation products in river sediment using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry. *Sci. Total Environ.* 502C, 199–205. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.108
- Souchier, M., Casellas, C., Ingrand, V., Chiron, S., 2016. Insights into reductive dechlorination of triclocarban in river sediments: Field measurements and in vitro mechanism investigations. *Chemosphere* 144, 425–432. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.08.083
- Stanley, J.K., Ramirez, A.J., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., 2007. Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere* 69, 9–16. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.080
- Taujale, S., Zhang, H., 2012. Impact of interactions between metal oxides to oxidative reactivity of manganese dioxide. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2764–71. doi:10.1021/es204294c
- Taylor, D.R., Maher, K., 1992. Chiral separations by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sc.* 30, 67–84.
- Ternes, T. a, Herrmann, N., Bonerz, M., Knacker, T., Siegrist, H., Joss, A., 2004. A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (Kd) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Res.* 38, 4075–84. doi:10.1016/j.watres.2004.07.015
- Tissier, C., Morvan, C., Bocquené, G., James, A., Grossel, H., Marchand, M., 2005. Les substances prioritaires de la directive cadre sur l'eau (DCE).
- Tran, N.H., Urase, T., Kusakabe, O., 2009. The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds. *J. Hazard. Mater.* 171, 1051–7. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.06.114
- Triebkorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H.R., Schwaiger, J., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: cytological effects

- in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 68, 151–66. doi:10.1016/j.aquatox.2004.03.015
- Varga, M., Dobor, J., Helenkár, A., Jurecska, L., Yao, J., Zárny, G., 2010. Investigation of acidic pharmaceuticals in river water and sediment by microwave-assisted extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Microchem. J.* 95, 353–358. doi:10.1016/j.microc.2010.02.010
- Vazquez-Roig, P., Kasprzyk-Hordern, B., Blasco, C., Picó, Y., 2014. Stereoisomeric profiling of drugs of abuse and pharmaceuticals in wastewaters of Valencia (Spain). *Sci. Total Environ.* 494–495, 49–57. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.098
- Veldhoen, N., Skirrow, R.C., Osachoff, H., Wigmore, H., Clapson, D.J., Gunderson, M.P., Van Aggelen, G., Helbing, C.C., 2006. The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquat. Toxicol.* 80, 217–27. doi:10.1016/j.aquatox.2006.08.010
- Venkatesan, A.K., Pycke, B.F.G., Barber, L.B., Lee, K.E., Halden, R.U., 2012. Occurrence of triclosan, triclocarban, and its lesser chlorinated congeners in Minnesota freshwater sediments collected near wastewater treatment plants. *J. Hazard. Mater.* 229–230, 29–35. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.05.049
- Vulliet, E., Cren-Olivé, C., Grenier-Loustalot, M.F., 2009. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Environ. Chem. Lett.* 9, 103–114. doi:10.1007/s10311-009-0253-7
- Walker, S.E., Dickhut, R.M., Chisholm-Brause, C., Sylva, S., Reddy, C.M., 2005. Molecular and isotopic identification of PAH sources in a highly industrialized urban estuary. *Org. Geochem.* 36, 619–632. doi:10.1016/j.orggeochem.2004.10.012
- Wang, C.F., Tian, Y., 2015. Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. *Environ. Pollut.* 206, 195–201. doi:10.1016/j.envpol.2015.07.001
- Wang, L., Xu, H., Cooper, W.J., Song, W., 2012. Photochemical fate of beta-blockers in NOM enriched waters. *Sci. Total Environ.* 426, 289–95. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.03.031
- Wang, S., Wang, X., Poon, K., Wang, Y., Li, S., Liu, H., Lin, S., Cai, Z., 2013a. Removal and reductive dechlorination of triclosan by *Chlorella pyrenoidosa*. *Chemosphere* 92, 1498–505. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.067
- Wang, X.K., Jiang, X.J., Wang, Y.N., Sun, J., Wang, C., Shen, T.T., 2014. Occurrence, distribution, and multi-phase partitioning of triclocarban and triclosan in an urban river receiving wastewater treatment plants effluent in China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 7065–7074. doi:10.1007/s11356-014-2617-1
- Wiedemeier, T.H., Rifai, H.S., Newell, C.J., Wilson, J.T., 1999. Natural attenuation of fuels and chlorinated solvents in the subsurface. John Wiley & Sons, Inc.

- Wiegert, C., Aeppli, C., Knowles, T., Holmstrand, H., Evershed, R., Pancost, R.D., Macháčková, J., Gustafsson, Ö., 2012. Dual carbon-chlorine stable isotope investigation of sources and fate of chlorinated ethenes in contaminated groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 46, 10918–25. doi:10.1021/es3016843
- Wiegert, C., Mandalakis, M., Knowles, T., Polymenakou, P.N., Aeppli, C., Macháčková, J., Holmstrand, H., Evershed, R.P., Richard, D., 2013b. Carbon and Chlorine Isotope Fractionation During Microbial Degradation of Tetra- and Trichloroethene Supporting Information. *Env. Sci Technol.* 47, 6449–6456.
- Williams, A., 1996. Review Opportunities for Chiral Agrochemicals. *Pestic. Sci.* 46, 3–9.
- Winderl, C., Schaefer, S., Lueders, T., 2007. Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker. *Environ. Microbiol.* 9, 1035–46. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01230.x
- Wong, C.S., Pakdeesusuk, U., Morrissey, J.A., Lee, C.M., Coates, J.T., Garrison, A.W., Mabury, S.A., Marvin, C.H., Muir, D.C.G., 2007. Enantiomeric composition of chiral polychlorinated biphenyl atropisomers in dated sediment cores. *Env. Toxicol Chem* 26, 254–263.
- 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, 9781–90. doi:10.1021/es402158t
- Writer, J.H., Barber, L.B., Ryan, J.N., Bradley, P.M., 2011. Biodegradation and attenuation of steroidal hormones and alkylphenols by stream biofilms and sediments. *Environ. Sci. Technol.* 45, 4370–6. doi:10.1021/es2000134
- Writer, J.H., Keefe, S.K., Ryan, J.N., Ferrer, I., Thurman, M.E., Barber, L.B., 2011. Methods for evaluating in-stream attenuation of trace organic compounds. *Appl. Geochemistry* 26, S344–S345. doi:10.1016/j.apgeochem.2011.03.071
- Writer, J.H., Ryan, J.N., Keefe, S.H., Barber, L.B., 2012. Fate of 4-nonylphenol and 17 β -estradiol in the Redwood River of Minnesota. *Environ. Sci. Technol.* 46, 860–8. doi:10.1021/es2031664
- Wu, C., Spongberg, A.L., Witter, J.D., 2009a. Adsorption and degradation of triclosan and triclocarban in soils and biosolids-amended soils. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4900–5. doi:10.1021/jf900376c
- Yazdankhah, S.P., Scheie, A.A., Høiby, E.A., Lunestad, B.T., Heir, E., Fotland, T.Ø., Naterstad, K., Kruse, H., 2006. Triclosan and Antimicrobial Resistance in Bacteria: An Overview. *Microb. Drug Resist.* 12, 83–90. doi:10.1089/mdr.2006.12.83.
- Ying, G.G., Yu, X.Y., Kookana, R.S., 2007a. Biological degradation of triclocarban and triclosan in a soil under aerobic and anaerobic conditions and comparison with environmental fate modelling. *Environ. Pollut.* 150, 300–5. doi:10.1016/j.envpol.2007.02.013

- Yu, C.P., Chu, K.H., 2009. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products along the West Prong Little Pigeon River in east Tennessee, USA. *Chemosphere* 75, 1281–6. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.03.043
- Yu, T., Gan, Y., Zhou, A., Yu, K., Liu, Y., 2014. Investigation of Stable C and Cl isotope effects of trichloroethene and tetrachloroethylene during evaporation at different temperatures. *J. Earth Sci.* 25, 735–740. doi:10.1007/s12583-014-0461-3
- Yueh, M.F., Li, T., Evans, R.M., Hammock, B., Tukey, R.H., 2012. Triclocarban mediates induction of xenobiotic metabolism through activation of the constitutive androstane receptor and the estrogen receptor alpha. *PLoS One* 7, e37705. doi:10.1371/journal.pone.0037705
- Zhang, C., Kenny, J.R., Le, H., Deese, A., Ford, K.A., Lightning, L.K., Fan, P.W., Driscoll, J.P., Halladay, J.S., Hop, C.E.C.A., Khojasteh, S.C., 2011. Novel mechanism for dehalogenation and glutathione conjugation of dihalogenated anilines in human liver microsomes: evidence for ipso glutathione addition. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1668–1677. doi:10.1021/tx2002228
- Zhang, S., Zhang, Q., Darisaw, S., Ehie, O., Wang, G., 2007. Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. *Chemosphere* 66, 1057–69. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.06.067
- Zhao, J.L., Ying, G.G., Liu, Y.S., Chen, F., Yang, J.F., Wang, L., 2010a. Occurrence and risks of triclosan and triclocarban in the Pearl River system, South China: from source to the receiving environment. *J. Hazard. Mater.* 179, 215–22. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.02.082
- Zipper, C., Suter, M.J., Gruhl, M., Kohler, H.E., 1998. Changes in the Enantiomeric Ratio of (R)- to (S)- Mecoprop Indicate in Situ Biodegradation of This Chiral Herbicide in a Polluted Aquifer 32, 2070–2076.
- Zorrilla, L.M., Gibson, E.K., Jeffay, S.C., Crofton, K.M., Setzer, W.R., Cooper, R.L., Stoker, T.E., 2008. The effects of triclosan on puberty and thyroid hormones in male Wistar rats. *Toxicol. Sci.* 107, 56–64. doi:10.1093/toxsci/kfn225
- Zwank, L.U.C., Berg, M., Elsner, M., Schmidt, T.C., Schwarzenbach, R.P., Haderlein, S.B., 2005. New Evaluation Scheme for Two-Dimensional Isotope Analysis to Decipher Biodegradation Processes: Application to Groundwater Contamination by MTBE. *Env. Sci Technol.* 39, 1018–1029.