

N° ordre : 3314

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1
ECOLE DOCTORALE SCIENCE DU VIVANT, GEOSCIENCES,
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

Par **Anne TOGOLA**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

SPECIALITE : BIOGEOCHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT

PRESENCE ET DEVENIR DES SUBSTANCES PHARMACEUTIQUES DANS LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES

Soutenue le 11 décembre 2006

Après avis de :

| | | |
|----------------------------|---|------------|
| Mme M.F. GRENIER-LOUSTALOT | Directrice de recherche CNRS, Vernaison | Rapporteur |
| Mme C. CASELLAS | Professeur, Université de Montpellier 1 | Rapporteur |

Devant la commission d'examen composée de :

| | | |
|----------------------------|--|--|
| M. J.M. SCHMITTER | Professeur, Université Bordeaux 1 | Président et rapporteur de soutenance |
| Mme M.F. GRENIER-LOUSTALOT | Directrice de recherche CNRS, Vernaison | Rapporteur |
| Mme C. CASELLAS | Professeur, Université de Montpellier 1 | Rapporteur |
| Mme H. BUDZINSKI | Directrice de recherche CNRS, Université Bordeaux 1 | Examineur |
| M. C. GAGNON | Chercheur, Centre Saint-Laurent, Montréal | Examineur |

REMERCIEMENTS

Je remercie madame Grenier-Loustalot, directrice du laboratoire central d'analyse du CNRS et Mme C. CASELLAS Professeur à l' Université de Montpellier 1, de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs de thèse et d'avoir apporté leurs observations avisées à ce manuscrit.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à monsieur Schmitter, enseignant-chercheur à l'Institut Européen de Chimie de Bordeaux (IECB) et à Monsieur Gagnon, directeur de recherche Chercheur au Centre Saint-Laurent (Montréal), pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je voudrais par-dessus tout remercier Hélène Budzinski, directrice du laboratoire LPTC d'avoir dirigé cette thèse. Elle a su faire me donner ma chance et m'accorder sa confiance malgré mon parcours «chaotique ». Elle m'a transmis son savoir-faire au quotidien Nous avons partagé tant de choses pendant ses années, du chromatogramme inespéré sur un GC-MS, au repas (inespéré lui aussi) à Guérande, en passant par la pêche aux moules dans le Bassin d'Arcachon...

Ces années passées à ses cotés resteront je le souhaite une étape importante, tant d'un point de vue scientifique qu'humain.

Je souhaiterais bien sûr remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées au LPTC pendant ce doctorat. Je pense bien évidemment dans un premier lieu à Jacqueline Bellocq, Karyn Le Menach, Sylvie Augagneur et Laurent Peluhet, les permanents du groupe, mais également à Nathalie Tapie, Kévin Cailleaud, Sophie Lardy, Johann Legrand, ainsi qu'à tous les autres membres du laboratoire, qui ont réussi à résister à mon légendaire (et surestimé) mauvais caractère...

Merci à H. Etcheber, Marielle Ollivier et André Ficht, aux membres du LEMA, des centres IFREMER de Toulon et de Nantes qui m'ont apporté un soutien technique sur de nombreuses campagnes d'échantillonnage

Enfin, un mots pour mes parents, ma famille, Raphaël et mes amis (Marie, Laurent, Delphine et les autres...) qui ont su me soutenir à travers ces années : promis je n'en ferai pas une autre !!!!

A TOUS, MERCI

SOMMAIRE

| | |
|--|--------------|
| REMERCIEMENTS..... | |
| SOMMAIRE | |
| LISTE DES FIGURES..... | |
| LISTE DES TABLEAUX | |
| LISTE DES ANNEXES | |
| LISTE DES PUBLICATIONS..... | |
| INTRODUCTION GENERALE..... | 1 |
| CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 5 |
| I- Les substances pharmaceutiques..... | 7 |
| I-1 Classification des médicaments | 7 |
| I-2 Origines des composés..... | 10 |
| I-3 Dégradation des composés..... | 14 |
| I-4 Propriétés physico-chimiques et partition entre phases dissoute et particulaire..... | 18 |
| I-5 Présence dans les milieux aquatiques | 20 |
| I-6 Données de toxicité | 25 |
| I-7 Etat de la législation..... | 31 |
| I-8 Programmes de recherche | 34 |
| II- Les Techniques analytiques développées | 37 |
| II-1 Techniques d'extraction | 37 |
| II-2 Techniques d'analyses..... | 44 |
| III- Objectifs des travaux | 53 |
| CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES | 55 |
| I- Composés étudiés | 56 |
| I-1 Choix des substances | 56 |
| II- Sites d'études..... | 60 |
| II-1 Suivis des stations d'épuration..... | 60 |
| II-2 Estuaires..... | 64 |
| II-3 Méthodes de prélèvements | 69 |
| III- Dosages des composés étudiés (Publications 1 et 2)..... | 71 |
| III-1 Dosage des substances pharmaceutiques | 71 |
| III-2 Quantification des substances pharmaceutiques..... | 72 |
| III-3 Protocoles d'extraction des échantillons..... | 77 |
| IV- Etude de la bioaccumulation dans les organismes aquatiques..... | 84 |
| IV-1 Etude en laboratoire..... | 84 |
| IV-2 Mesures dans le milieu naturel..... | 85 |
| V- Utilisation des POCIS | 86 |
| V-1 Généralités | 86 |
| V-2 Protocole expérimental en laboratoire | 89 |
| V-3 Expérimentations environnementales | 89 |
| CHAPITRE 3 : SYNTHESE | 93 |

| | |
|---|------------|
| I- Techniques développées pour l'étude des substances pharmaceutiques | 95 |
| I-1 Analyse des substances pharmaceutiques..... | 95 |
| I-2 Application aux matrices solides (Publication 3) | 98 |
| II- Présence des composés pharmaceutiques..... | 99 |
| II-1 Contamination des estuaires atlantiques étudiés..... | 99 |
| II-2 Cas du bassin versant de l'Hérault (Publication 4) | 100 |
| II-3 Introduction d'un effluent de station d'épuration dans le milieu naturel : cas de la Jalle d'Eysines (Publication 5) | 102 |
| II-4 Calanque de Cortiou | 106 |
| III- Spécificité de l'estuaire de Seine (Publication 6)..... | 110 |
| III-1 Niveaux moyens de contamination..... | 110 |
| III-2 Dégradation dans l'écosystème estuarien..... | 113 |
| III-3 Caractérisation des apports..... | 114 |
| III-4 Composés pharmaceutiques dans le milieu marin | 119 |
| IV- Partition solide / liquide. (Publication 3) | 120 |
| V- Devenir des composés dans les organismes aquatiques..... | 121 |
| V-1 Résultats en laboratoire | 121 |
| V-2 Présence dans le milieu naturel..... | 122 |
| VI- Les POCIS, Echantillonneurs intégratifs, publication 7..... | 123 |
| VI-1 Résultats en laboratoire | 123 |
| VI-2 Expérimentations sur la Meuse..... | 126 |
| VI-3 Expérimentation sur la Seine : | 129 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... | 133 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 139 |
| ANNEXES..... | 159 |
| PUBLICATIONS | 183 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure I- 1 : Voies d'introduction des substances pharmaceutiques. | 11 |
| Figure I- 2 : Exemple de rémanence du diazépam et de la carbamazépine, d'après Löffler et al., 2005. | 19 |
| Figure I- 3 : Comparaison de l'effet mélange sur différents composés, d'après Cleuvers, 2004. | 28 |
| Figure I- 4 : Bioaccumulation du diclofénac chez la truite, d'après Schwaiger et al., 2004. | 30 |
| Figure I- 5: Gamme de performance des fibres en fonction du poids moléculaire des analytes. (Notes SUPELCO n° 10942, http://www.sigmaaldrich.com)..... | 40 |
| Figure I- 6 : Schéma de principe du POCIS. | 42 |
| Figure I- 7 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem. | 48 |
| Figure I- 8: Principe de l'electrospray | 49 |
| Figure I- 9: Effet d'extinction matricielle sur le dosage de la carbamazépine par HPLC-MS-MS (Metcalfé et al., 2003). | 50 |
| | |
| Figure II-1 : Structure chimique des AINS. | 56 |
| Figure II-2 : Structures chimiques des antidépresseurs. | 57 |
| Figure II-3 : Structure chimique des composés étudiés | 58 |
| Figure II-4 : Structure chimique des bronchodilatateurs..... | 58 |
| Figure II-5 : Structure chimique de la caféine. | 58 |
| Figure II- 6: Localisation de la station d'Eysines et des points de prélèvements sur la Jalle de Blanquefort. | 61 |
| Figure II-7 : Localisation de la Calanque de Cortiou et des sites de prélèvements (SED, EAU)..... | 62 |
| Figure II- 8 : Points d'échantillonnage du bassin versant de l'Hérault. | 63 |
| Figure II- 9 : Impact de la station d'épuration de Lodève : points d'échantillonnage.... | 63 |
| Figure II-10 : Vue générale de l'estuaire de Seine. | 65 |
| Figure II-11 : Ensemble des points d'échantillonnage suivis sur la Seine, campagnes affluents (Mai 2005 et novembre 2005). | 66 |
| Figure II-12 : Ensemble des points d'échantillonnage suivis sur la Baie de Seine (Campagnes RNO, juin et novembre 2004). | 67 |
| Figure II-13 : Estuaire de la Gironde, points d'échantillonnage. | 68 |
| (a) : Estuaire de la Gironde, campagne septembre 2002 | 68 |
| (b) : Gironde + Garonne, campagne 2005 | 68 |
| Figure II-14 : Estuaire de l'Adour, points d'échantillonnage (novembre 2005)..... | 68 |
| Figure II-15 : Bouteille Niskin pour les prélèvements d'eau | 69 |
| Figure II-16 : Descriptif d'une benne Reineck (Photo IFREMER)..... | 69 |
| | |
| Figure II-17 : Chromatogramme obtenu pour un mélange de composés neutres. | 73 |
| (1) Caféine, (2) Pyrène, (3) Amitryptiline d6, (4) Amitryptiline, (5) Imipramine, (6)Doxépine, (7) Carbamazépine, (8) Diazépam d5, (9) Diazépam, (10) Nordiazépam d5, (11) Nordiazépam. | 73 |
| Figure II-18 : Chromatogramme obtenu pour un mélange de composés acides. | 74 |
| (1) Aspirine, (2) Ibuprofène, (3) Paracétamol, (4) Gemfibrozil, (5) Terbutaline, (6) Salbutamol, (7) Naproxène, (8) Clenbutérol, (9) Kétoprofène, (10) Diclofénac (11) 1-hydroxypyrrène, (12) Diazépam-d5, (13) Diazépam..... | 74 |
| Figure II-19 : Equations de calcul pour l'étalonnage interne. | 75 |
| Figure II-20 : Rendements d'extraction obtenus pour les étalons internes pressentis (n=6)..... | 76 |
| Figure II-21 : Validation de la quantification par les étalons internes (n=6), composés neutres. | 76 |
| Figure II-22 : Validation de la quantification par les étalons internes (n=6), composés acides. | 76 |

| | |
|--|-----|
| Figure II-23 : Validation de la quantification des étalons internes par les étalons « seringue » (n = 6)..... | 77 |
| Figure II-24 : Rendement de l'extraction sur cartouche C18 des composés neutres (n=5)..... | 78 |
| Figure II-25 : Rendement de l'extraction sur cartouche HLB des composés acides (n=5)..... | 79 |
| Figure II-26 : Rendement de l'extraction sur cartouche MCX de l'ensemble des composés (niveau de concentration : 500 ng.l ⁻¹ , 1 l extrait, n=6), abréviations : Cf. tableau II-2. | 80 |
| Figure II-27 : Rendement d'extraction obtenus sur la bile supplémentée (500 ng.ml ⁻¹), n=3. | 81 |
| Figure II-28 : Rendement d'extraction des matrices particulières (sans purification)(n=3). | 82 |
| Figure II-29 : Rendement d'extraction des matrices sédimentaires (sans purification) (n=3)..... | 83 |
| Figure II-30 : Comparaison des rendements d'extraction entre purification sur cartouche PSA et NH ₂ , matrice : sédiment dopé (500 ng.g ⁻¹), n=3..... | 83 |
| Figure II-31 : Rendements d'extraction (MCX + PSA) sur des échantillons supplémentés de moules (500 ng.g ⁻¹ , n=3)..... | 84 |
| Figure II-32 : Dispositif expérimental d'exposition des moules..... | 85 |
| Figure II-33 : Equations de calcul utilisées pour les POCIS..... | 86 |
| Figure II-34 : Dispositif complet d'échantillonnage..... | 87 |
| Figure II-35 : POCIS holder : dispositif de fixation des 3 POCIS..... | 87 |
| Figure II-36 : Echantillonneur POCIS. | 87 |
| Figure II-37 : Validation du protocole d'extraction de la phase des POCIS (n=3)..... | 88 |
| Figure II-38 : Montage expérimental en milieu contrôlé. | 90 |
| Figure II-39 : Déploiement des échantillonneurs en milieu contrôlé. | 90 |
| Figure II-40 : Dispositif expérimental en milieu naturel. | 91 |
| Figure II-41 : Barrage de Poses, estuaire de Seine. | 92 |
| | |
| Figure III- 1: Rendements d'extraction (en fonction du pH et du solvant d'extraction) (n=3)..... | 96 |
| Figure III- 2: Présence des composés pharmaceutiques dans la Lergue. W1 : point amont de la station, W2 : point d'introduction de la station, W3 et W4, points en aval du rejet. | 100 |
| Figure III- 3: Suivi des éléments majeurs dans la Lergue. W1 : point amont de la station, W2 : point d'introduction de la station, W3 et W4, points en aval du rejet. (Résultats exprimés en mg.l ⁻¹ , sauf nitrate, µg.l ⁻¹). | 100 |
| Figure III- 4: Suivi des substances pharmaceutiques dans l'Hérault. W5, amont confluence ; W4 : confluence Lergue et Hérault ; W6 : aval confluence. | 101 |
| Figure III- 5: Suivi des substances pharmaceutiques dans les eaux de captage. | 101 |
| Figure III- 6: Suivi des substances pharmaceutiques dans la Jalles d'Eysines, février 2005. | 103 |
| Figure III- 7: Suivi des substances pharmaceutiques dans la Jalles d'Eysines, juillet 2004. | 103 |
| Figure III- 8: Concentrations mesurées dans la Jalles d'Eysines, juillet 2003, exprimées en ng.g ⁻¹ | 104 |
| Figure III- 9: Répartition entre les deux phases dans la Jalles d'Eysines, concentrations exprimées en ng.l ⁻¹ , campagne de juillet 2003. | 105 |
| Figure III- 10 : Concentrations en anti-inflammatoires dans la calanque de Cortiou (n=3), campagne octobre 2004..... | 106 |
| Figure III- 11: Concentrations en antidépresseurs et hypolipémiant dans la calanque de Cortiou, campagne octobre 2004..... | 107 |
| Figure III- 12: Concentrations exprimées en ng.g ⁻¹ de particules, Calanque de Cortiou, campagne d'octobre 2004. | 108 |

| | |
|---|-----|
| Figure III- 13: Concentrations dans les particules exprimées en ng.l^{-1} , Calanque de Cortiou, campagne d'octobre 2004. | 108 |
| Figure III- 14 : Concentrations mesurées dans l'estuaire (barrage de Poses) au cours des 11 campagne de prélèvements effectuées entre mars 2002 et février 2006 (valeurs de chaque prélèvement en histogrammes, droite de tendance en pointillé). | 111 |
| Figure III- 15: Suivi des substances pharmaceutiques tout au long de l'estuaire, du pK 202 (barrage de Poses) à la Baie de Seine. Concentrations exprimées en ng.l^{-1} , 22 points de prélèvements, triplicats, campagne d'octobre 2003. | 113 |
| Figure III- 16: Suivi des substances pharmaceutiques dans l'estuaire de Seine, conditions hivernales, mars 2002. | 114 |
| Figure III- 17: Suivi des substances pharmaceutiques dans les affluents de l'estuaire de Seine, avril 2005 (concentrations exprimées en ng.l^{-1}). | 114 |
| Figure III- 18: Suivi des substances pharmaceutiques dans les affluents de l'estuaire de Seine, avril 2005 (apports exprimés en g.jour^{-1}). | 114 |
| Figure III- 19: Répartition des apports selon les contributeurs : Poses amont, affluents et stations d'épuration, campagne d'avril 2005. Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2. | 115 |
| Figure III- 20: Concentrations en composés pharmaceutiques dans l'effluent de la station d'épuration de Rouen, suivi de 24 h. | 117 |
| Figure III- 21: Variabilité de la carbamazépine mesurée à Poses, exprimée en ng.l^{-1} . Prélèvements effectués entre mars 2002 et février 2006. | 117 |
| Figure III- 22: Variabilité de la carbamazépine mesurée à Poses, exprimée en g.j^{-1} . Prélèvements effectués entre mars 2002 et février 2006. | 118 |
| Figure III- 23: Variabilité des substances pharmaceutiques mesurées à Poses, suivi pendant 52h, 4 prélèvements. Pour les abréviations, voir Tableau III- 2. | 118 |
| Figure III- 24: Evolution de la concentration en substance pharmaceutiques au cours d'un cycle de marée, point fixe, pont de Tancarville, campagne de mai 2004. | 119 |
| Figure III- 25 : Présence des composés pharmaceutiques dans la Baie de Seine (Campagne Réseau National d'observation, décembre 2004). | 119 |
| Figure III- 26 : Répartition entre phase dissoute et phase particulaire : estuaire de Seine. | 120 |
| Figure III- 27 : Concentrations des composés pharmaceutiques dans la phase particulaire en estuaire de Seine, exprimées en ng.g^{-1} , poids sec. | 121 |
| Figure III- 28 : Accumulation de la carbamazépine chez la moule <i>Mytilus edulis</i> , exposition en laboratoire. | 122 |
| Figure III- 29 : Cinétique de dégradation des composés pharmaceutiques. | 123 |
| Figure III- 30 : Répartition phase / membrane en 48h d'exposition (n=3). Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2. | 124 |
| Figure III- 31 : Effet de la concentration sur le taux d'échantillonnage (n=3). Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2. | 124 |
| Figure III- 32 : Effet de la température sur le taux d'échantillonnage. Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2. | 125 |
| Figure III- 33 : Effet de la salinité sur le taux d'échantillonnage (n=3). Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2. | 125 |
| Figure III- 34 : Variabilité du taux d'échantillonnage (21°C, 0 ‰, n=9). Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2. | 126 |
| Figure III- 35 : Accumulation dans les POCIS après 3 jours d'exposition. Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2. | 130 |
| Figure III- 36 : Comparaison des concentrations mesurées et calculées après 3 jours d'exposition (n=3). Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2. | 130 |
| Figure III- 37 : Comparaison des concentrations dans les POCIS à 3 et 34 jours d'exposition : facteurs d'accumulation. Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2. | 131 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau I- 1 : Classification chimique des analgésiques..... | 8 |
| Tableau I- 2 : Classification des antibiotiques par mode d'action..... | 10 |
| Tableau I- 3 : Données de consommations exprimées en tonnes par an..... | 12 |
| Tableau I- 4 : Variabilité des apports à une station d'épuration, exprimée en mg/jour/1000 habitants en Italie, d'après Castiglioni <i>et al.</i> 2006..... | 13 |
| Tableau I- 5 : Taux d'élimination moyen mesurés dans diverses stations d'épuration. | 16 |
| Tableau I- 6 : Données de présence dans les effluents de station d'épuration ($\mu\text{g.l}^{-1}$). | 20 |
| Tableau I- 7 : Données de présence dans les eaux de rivières ($\mu\text{g.l}^{-1}$). | 21 |
| Tableau I- 8 : Etat de contamination des eaux destinées à la boisson (ng.l^{-1})..... | 23 |
| Tableau I- 9 : Dosage des composés pharmaceutiques dans les particules, mesure qualitative d'après Castiglioni <i>et al.</i> , 2006..... | 24 |
| Tableau I- 10 : Concentrations détectées dans les boues de station d'épuration pour la caféine, la carbamazépine et ses métabolites (Exprimées en ng.g^{-1} , poids sec). | 24 |
| Tableau I- 11 : Données de toxicité aiguë. | 27 |
| Tableau I- 12 : Mesures de composés pharmaceutiques dans les organismes aquatiques, d'après Brooks <i>et al.</i> , 2005..... | 29 |
| Tableau I- 13 : Phases polymériques utilisées pour les cartouches SPE..... | 39 |
| Tableau I- 14 : Présentation des différentes fibres commercialisées (SUPELCO). | 39 |
| Tableau I- 15 : Limites de quantification obtenues en SPME (échantillons naturels). .. | 41 |
| Tableau I- 16 : Méthodes et rendements obtenus sur matrices solides. | 44 |
| Tableau I- 17 : Limites de détection des techniques spectroscopiques exprimées en ng.l^{-1} d'échantillon. DAD : Détecteur à barrette de diode, FLUO : Spectrofluorimètre ; UV : Ultraviolet..... | 46 |
| Tableau II- 1: Quantité de caféine par type de consommation..... | 59 |
| Tableau II- 2 : Caractéristiques physico- chimiques des composés étudiés (Daughton et Jones-Lepp, 2001)..... | 59 |
| Tableau II- 3: Ions (m/z) caractéristiques des spectres de masse obtenus par CG-SM. La masse molaire (M) est exprimée en g.mol^{-1} | 73 |
| Tableau II- 4 : Limites de détection obtenues sur divers types d'échantillons naturels (prise d'essai indiquée entre parenthèses). | 81 |
| Tableau II- 5 : Conditions expérimentales testées pour les POCIS..... | 89 |
| Tableau III- 1 : Rendements d'extraction des différents protocoles développés..... | 97 |
| Tableau III- 2 : Limites de détection obtenues sur les matrices aqueuses. | 97 |
| Tableau III- 3 : Gamme de concentrations mesurées sur les différents estuaires. | 99 |
| Tableau III- 4 : Concentrations exprimées en ng.g^{-1} de sédiment (Poids sec)..... | 109 |
| Tableau III- 5 : Gamme de concentrations mesurées dans l'estuaire de Seine. Echantillonnage de mars 2002 à février 2006. Moyenne [valeur minimale-valeur maximale], exprimées en ng.l^{-1} . Mesures sur 11 campagnes..... | 110 |
| Tableau III- 6 : Estimation des quantités de comprimés passant le barrage de Poses par jour, en considérant les doses moyennes par comprimé et un débit moyen de $410 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$ | 111 |
| Tableau III- 7 : Gamme de concentrations mesurées dans l'estuaire de Seine. Echantillonnage de mars 2002 à Février 2006. Moyenne [valeur minimale-valeur maximale], exprimées en ng.l^{-1} , sur 11 campagnes de prélèvements. | 112 |
| Tableau III- 8 : Concentrations exprimées en ng.l^{-1} dans la Meuse sur les deux mesures, avril 2005. (moyenne de triplicats)..... | 126 |
| Tableau III- 9 : Concentrations dans les POCIS exposées dans la Meuse exprimées en ng.g^{-1} de phase après 5 jours d'exposition (Moyenne de triplicats) | 127 |
| Tableau III- 10 : Calcul de la concentration dans l'eau à partir de celle mesurée dans les POCIS : Concentrations exprimées en ng.l^{-1} dans la Meuse sur les deux mesures (Moyenne de triplicats). | 128 |
| Tableau III- 11 : Evaluation de la concentration dans l'eau par extrapolation de la concentration dans les POCIS : Application en milieu contrôlé. | 129 |

LISTE DES ANNEXES

| | |
|---|-----|
| ANNEXE 1 : Etudes de la Jalles d'Eysines | 161 |
| ANNEXE 2 : Mesures dans la Calanque de Cortiou..... | 163 |
| ANNEXE 3 : Etude du bassin versant de l'Hérault..... | 165 |
| ANNEXE 4 : Etudes de l'estuaire de Seine, campagnes saisonnières | 167 |
| ANNEXE 5 : Études qualitatives en Estuaire de Seine | 169 |
| ANNEXE 6 : Mesures en Baie de Seine..... | 171 |
| ANNEXE 7 : Etudes de l'estuaire de la Gironde..... | 173 |
| ANNEXE 8 : Etudes de l'estuaire de l'Adour..... | 175 |
| ANNEXE 9 : Conditions d'analyses en GC-MS..... | 177 |
| ANNEXE 10 : Spectres de masse obtenus par impact électronique (GC-MS) | 179 |
| ANNEXE 11 : Gammes de linéarité (GC-MS) | 181 |

LISTE DES PUBLICATIONS

| | |
|--|------------|
| PUBLICATION 1 : Analytical development for the analysis of pharmaceuticals in water samples using SPE and GC/MS..... | 185 |
| PUBLICATION 2 : Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples | 201 |
| PUBLICATION 3 : Analytical developments for the determination of pharmaceuticals in solid matrices: sediments, particles and sludge | 217 |
| PUBLICATION 4 : Présence de résidus de médicaments dans les différents compartiments du milieu aquatique | 235 |
| PUBLICATION 5: Consequences of Treated Water Recycling as Regards Pharmaceuticals and Drugs in Surface and Ground Waters of a Medium-sized Mediterranean Catchment | 245 |
| PUBLICATION 6 : Behaviour of pharmaceuticals after their introduction in surface waters: Case of Jalles d'Eysines river (FRANCE) | 265 |
| PUBLICATION 7: Occurrence of pharmaceuticals in aquatic systems: 4 year monitoring of the Seine estuary | 281 |
| PUBLICATION 8 : Development of Polar Organic Integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems | 299 |

INTRODUCTION GENERALE

De nombreuses substances chimiques sont présentes dans les écosystèmes aquatiques, réceptacles ultimes des substances anthropiques. Quelles soient d'origines industrielles, agricoles ou pharmaceutiques, ces substances xénobiotiques, étrangères à l'organisme, sont plus ou moins bien connues en ce qui concerne leur devenir dans le milieu (rémanence ou dégradation), leur toxicité (à long ou court terme, aiguë ou chronique) soit de manière plus globale, leur impact sur les écosystèmes.

Les composés sont étudiés au fur et à mesure de la découverte de leur rémanence dans le milieu ou de leurs effets sur des organismes naturels. Par exemple, la mortalité des huîtres dans les exploitations ostréicoles dans les années 80 a été reliée à la présence du tributylétain contenu dans les peintures anti-salissures, produit désormais fortement réglementé (Alzieu *et al.*, 1989 ; Alzieu, 1998). Les substances industrielles sont quant à elles suivies en fonction de l'importance des volumes produits et des risques professionnels d'exposition. Les problématiques concernant les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les polychlorobiphényles, les pesticides chlorés ont été soulevées à maintes reprises, à la fois lors d'accidents de grande ampleur (intoxications aiguës, catastrophes industrielles), (Masuda, 2005 ; Ross, 2004) et lors d'études épidémiologiques sur les travailleurs exposés (Binet *et al.*, 2002 ; Karakaya *et al.*, 1999).

L'apparition de phénomènes préoccupants, comme notamment des phénomènes d'imposex ou plus généralement des perturbations des fonctions endocrines chez des organismes aquatiques, qui ne pouvaient être reliés à la présence de contaminants « classiques » a fait germer de nombreux questionnements dans la communauté scientifique. En l'absence d'identification de composés présents en forte concentration et surtout connus pour ces effets endocriniens, des premières études se sont intéressées aux effets à faibles doses de certains composés (Dietrich et Prietz, 1999 ; Moore et Waring, 2001 ; Tyler *et al.*, 1998). Elles ont permis de mettre en évidence l'impact non négligeable que pouvaient avoir des composés présents à de faibles concentrations (ng.l^{-1}) mais de manière constante.

De nos jours, de nouvelles classes de composés retiennent l'attention. Ces produits, synthétisés pour le bien être ou la santé des consommateurs, ne présentent aucune des caractéristiques précédemment citées : pas de toxicité aiguë importante, pas de productions de très grande ampleur... Ils ne sont donc pas *de facto* identifiés comme composés à risque. C'est ainsi que les études portant sur de nombreux composés ont débuté, connus sous le terme global de "Personal Care and Pharmaceutical Products (PCPP)" (Produits pharmaceutiques, d'hygiène et de beauté).

Parmi les composés à usage thérapeutique, les hormones stéroïdiennes restent marginales, compte tenu de leur usage limité et des doses thérapeutiques très faibles (de 30 μg à 300 mg, selon les composés et l'usage thérapeutique). Elles sont néanmoins la classe la plus étudiée de ce groupe de contaminants émergents, de part leur capacité à exercer des effets sur les organismes aquatiques à des niveaux de concentrations proches, voire en dessous des seuils de détection. En effet, des études montrent que des effets toxiques peuvent avoir lieu pour des concentrations aussi faibles que 0,5 ng.l^{-1} pour l'éthinylœstradiol (Larsson *et al.*, 1999).

Ces premières études ciblées sur les hormones stéroïdiennes ont été progressivement étendues aux composés pharmaceutiques au sens large. Ces composés sont soumis à une autorisation de mise sur le marché lors de leur

synthèse, mais celle-ci est très limitée quant à ses exigences environnementales : données physico-chimiques, tests de toxicité aiguë et chronique... Des améliorations ont été apportées pour les composés plus récemment introduits sur le marché : des tests de toxicité sur les organismes sont à présent développés mais toujours dans l'optique de l'utilisation humaine (au niveau des doses d'exposition et des effets toxiques recherchés). Les questions de rémanence dans le milieu naturel, de toxicité chronique pour les organismes aquatiques ne sont pas soulevées par ce biais.

De nombreux pays s'intéressent à cette nouvelle problématique. L'Allemagne, les Pays-Bas, la Suède, ont été les premiers à se préoccuper de la présence de ces composés dans les systèmes aquatiques et de leurs effets sur les organismes. Au delà d'un problème environnemental, c'est un problème sanitaire qui a vu le jour, dû aux difficultés d'approvisionnement en eau de plus en plus marquées qui incitent à la surveillance des systèmes aquatiques, qu'ils soient ou non directement destinés à la consommation humaine. Les thématiques autour de la potabilisation de nouvelles ressources soulèvent d'autant plus la problématique autour de la contamination de ces réseaux. En effet, certaines régions du monde, exposées à une pénurie en eau de plus en plus marquée, développent des techniques de réutilisation des eaux usées (Aertgeerts et Angelakis, 2003 ; US Environmental Protection Agency, 2001), pour l'agriculture (Blumenthal *et al.*, 2001), pour l'industrie (systèmes de refroidissement) et maintenant pour réalimenter les nappes phréatiques destinées à la consommation humaine (Ecosse, 2001).

Les nombreux efforts faits à l'échelle européenne notamment avec la Directive Cadre Eau, vont dans ce même sens d'une évaluation de la qualité environnementale des différentes ressources en eau disponibles, à plus ou moins long terme, pour la survie des espèces aquatiques mais aussi pour la consommation humaine.

Il apparaît donc que les substances pharmaceutiques doivent être prises en compte dans cette démarche d'amélioration de la qualité de l'eau destinée ou non à la consommation humaine. Actuellement, les données relatives à leur présence, leurs effets potentiels restent très partielles et ne permettent pas une réelle évaluation du risque que ces substances peuvent représenter et donc des mesures à prendre pour limiter leur présence dans les milieux aquatiques.

Les objectifs de ce travail ont donc été d'apporter des outils permettant de quantifier ces substances dans les milieux naturels et de documenter leur présence, leur origine et leur devenir dans les milieux aquatiques français.

La présentation des travaux s'articule selon la structure suivante. Le chapitre 1 présente une synthèse des connaissances actuelles sur la problématique des substances pharmaceutiques (utilisation, présence dans l'environnement, toxicité) et fait un point sur l'état de l'art sur les techniques d'échantillonnage, d'extraction, d'analyse utilisées pour leur mesure. Les sites d'études et les techniques développées pour les différentes analyses sont présentés dans le chapitre 2. Le chapitre 3 est consacré à la synthèse des résultats acquis au cours des différentes études. Pour finir, ces résultats ont donné lieu à la rédaction de différentes publications présentées à la fin du manuscrit.

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Les substances pharmaceutiques dans l'environnement

Comparativement aux polluants organiques persistants, ces composés sont relativement méconnus d'un point de vue environnemental. Les substances pharmaceutiques ne sont que depuis très récemment considérées comme des polluants potentiels de l'environnement, étudiées sous le terme global de « contaminants émergents ».

Le chapitre suivant s'attache à décrire les principales classes pharmaceutiques, d'un point de vue chimique et thérapeutique (modes d'action). Après la description des principales sources potentielles de composés dans l'environnement, un état des lieux des connaissances sur ces composés, en termes de dégradabilité, de niveaux de présence dans les systèmes naturels mais aussi de toxicité est présenté.

Les différentes techniques analytiques développées et appliquées à ces substances font l'objet de la deuxième partie de cette étude bibliographique.

I-Les substances pharmaceutiques

Les substances pharmaceutiques représentent un ensemble de composé, en augmentation croissante. L'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) délivre environ 650 nouvelles autorisations de mise sur le marché chaque année. De plus, même si ces molécules sont synthétisées dans un but thérapeutique, les données physico-chimiques sont difficilement accessibles au public.

Le chapitre suivant s'attache à faire un état des lieux des connaissances actuelles en ce qui concerne leurs propriétés, leur toxicité. Il présente ensuite un état de l'art de leur présence et de leur devenir dans les stations d'épuration et dans les milieux aquatiques.

I-1 Classification des médicaments

Les médicaments peuvent être classés selon leur classe thérapeutique ou selon leur classe chimique (par rapport à la molécule de base servant à leur synthèse, ou par rapport à la première molécule thérapeutique dont ils sont dérivés).

a) Les analgésiques

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

Parmi les analgésiques, le groupe des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) agit en inhibant de manière réversible ou irréversible une ou les deux isoformes de la cyclo-oxygénase (COX 1 et 2), qui catalysent la synthèse de différentes prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Ces composés sont communément utilisés dans le traitement des inflammations, des fièvres et parfois dans les traitements des maladies rhumatismales.

Comme ces anti-inflammatoires inhibent de façon non spécifique la synthèse de prostaglandines, la majeure partie des effets secondaires sont liés aux fonctions physiologiques de ces prostaglandines, que ce soit au niveau des reins (problèmes de filtration glomérulaire), au niveau de l'estomac, ou au niveau du foie. Les principales classes chimiques sont présentées dans le Tableau I- 1. Si les d'anti-inflammatoires non stéroïdiens appartiennent à plusieurs classes chimiques, la plus importante reste celle des dérivés aryl-carboxyliques, qui comprend les composés les plus utilisés (ibuprofène, naproxène...).

Le mode d'action du paracétamol n'est pas totalement connu. Il semble consister en une inhibition des cyclo-oxygénases du système nerveux central et ne pas avoir d'effets anti-inflammatoires.

| Classe chimique | Exemple de composé | Mode d'action |
|----------------------------|---------------------------------------|---|
| Dérivés pyrazolés | Phénylbutazone | Inhibiteurs non sélectifs COX 1 et 2 |
| Dérivés indoliques | Indométacine | |
| | Sulindac | |
| Dérivés aryl-carboxyliques | Ibuprofène | |
| | Naproxène | |
| | Kétoprofène | |
| | Acide tiaprofénique | |
| | Diclofénac | |
| | Etodolac | |
| Oxicams | Piroxicam | |
| | Ténoxycam | |
| Fenamates | Acide niflumique | |
| | Acide méfénamique | |
| Coxibs | Rofécoxib | Inhibiteurs sélectifs COX 2 |
| Salicylés | Acide acétylsalicylique (aspirine) | Inhibiteur des prostaglandines |

Tableau I- 1 : Classification chimique des analgésiques.

b) Les antipsychotiques

Ces molécules, très utilisées dans les pays européens, sont importantes, compte tenu de leur toxicité avérée, y compris sur les consommateurs (effets secondaires importants). Différentes grandes classes chimiques ont des propriétés thérapeutiques afférentes aux perturbations psychiques. On distingue généralement 4 classes :

- ❖ Les inhibiteurs de la mono-amine oxydase (IMAO)
- ❖ Les composés tricycliques dérivés de l'imipramine
- ❖ Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS)
- ❖ Les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSNA)

Les IMAO inhibent la dégradation de la noradrénaline par la MAO et augmentent ainsi la concentration de noradrénaline dans la fente synaptique.

Les antidépresseurs imipraminiques inhibent la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine au niveau central. Les tricycliques ont aussi une action anticholinergique et adrénolytique alpha et une action antihistaminique (amitryptiline). Les composés agissent sur le système nerveux central en diminuant l'activité, soit en bloquant les canaux sodiques voltage-dépendants des neurones excitatrices, (carbamazépine), soit en augmentant l'effet inhibiteur du neurotransmetteur GABA par liaison sur un site spécifique des récepteurs correspondants (diazépam, de la famille des benzodiazépines).

D'autres composés agissent en tant qu'inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSNA) ou sélectifs de la sérotonine (ISRS), neurotransmetteurs qui interviennent dans de nombreux mécanismes hormonaux et neuronaux. Parmi eux, la fluoxétine, la paroxétine (ISRS) et la venlafaxine (IRSNA) sont les plus utilisées.

c) Les bêtabloquants

Ils représentent une classe majeure au sein de la pharmacopée de part leur intérêt thérapeutique démontré dans les principaux domaines de la pathologie cardiovasculaire : hypertension, insuffisance coronaire, insuffisance cardiaque.

Les bêtabloquants s'opposent aux effets bêta-adrénergiques des catécholamines par antagonisme compétitif au sein des récepteurs. Ils se fixent spécifiquement sur le récepteur bêta, empêchant l'activation de ceux-ci par leurs stimulants physiologiques ou pharmacologiques. Cela entraîne une baisse de la fréquence cardiaque et de la force contractile au niveau du cœur, une tendance à la broncho-constriction, une vaso-constriction vasculaire périphérique et, au niveau métabolique, une diminution de la mobilisation des graisses et une baisse de la sécrétion d'insuline.

Parmi ces composés, le propranolol, l'aténolol, sont parmi les plus utilisés. Néanmoins, les bêtabloquants ont une autre utilisation, illégale, en tant qu'agents dopants "sans visée thérapeutique" (loi du 23 mars 1999, code de la santé publique).

d) Les hypolipémiants

Le développement de ces composés a suivi l'évolution des comportements alimentaires avec l'augmentation des maladies cardiovasculaires, essentiellement dans les pays occidentaux.

Le nombre de classes chimiques présentant ces propriétés thérapeutiques hypolipémiantes sont réduites. Deux grandes classes représentent la majorité des produits : les fibrates et les statines. Les deux familles sont utilisées pour diminuer la concentration de cholestérol (statines et fibrates) et de triglycérides (fibrates) dans le plasma sanguin.

Les statines agissent en inhibant l'action de l'enzyme HMG-CoA (3-hydroxyméthylglutaril coenzyme A réductase) intervenant dans la synthèse du cholestérol. La diminution du cholestérol intracellulaire entraîne l'augmentation de l'expression des récepteurs LDL (Low Density Lipoproteins : lipoprotéines de faible densité : molécules responsables du transport du cholestérol) dans les membranes hépatocytaires et donc la capture du cholestérol LDL du plasma sanguin.

e) Les bronchodilatateurs

Les bêta-2-agonistes agissent par liaison et stimulation des récepteurs bêta 2, ce qui provoque la stimulation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'augmentation d'AMPc va induire l'activation de protéines kinases qui vont déclencher une cascade de réactions de phosphorylation de protéines régulatrices du tonus musculaire lisse. Les anticholinergiques provoquent une bronchodilatation par antagonisme compétitif de l'acétylcholine au niveau des récepteurs cholinergiques bronchiques. La théophylline permet le relâchement du muscle lisse par inhibition de la phosphodiesterase et accumulation d'AMP cyclique. De même que les bêtabloquants, les bronchodilatateurs sont considérés et utilisés comme des produits dopants (loi du 23 mars 1999, code de la santé publique).

f) Les anti-néoplasiques et anti-tumoraux

Ces composés cytostatiques ont été synthétisés pour interagir avec la prolifération cellulaire. Il existe différents modes d'action : le tamoxifène par exemple va créer une inhibition compétitive au niveau des récepteurs

œstrogéniques pour la lutte contre le cancer du sein ; il peut y avoir aussi inhibition de la synthèse de la purine et de la pyrimidine (par exemple le méthotrexate).

g) Les antibiotiques

Il existe un nombre très important de substances à action antibiotique. Les familles thérapeutiques sont déterminées en fonction de leur mode d'action, comme le résume le Tableau I- 2.

| Modes d'action | Composés |
|---|--|
| Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne | D-cyclosérine, bacitracine, bêta-lactamines, glycopeptides |
| Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique | polymyxines |
| Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique | macrolides, lincosamides, streptogramines, phénicolés, oxazolidinones (action sur la sous-unité 50S) tétracyclines, aminoglycosides, acide fusidique (action sur la sous-unité 30S) |
| Antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques | ansamycines, quinolones, fluoroquinolones, sulfamides, diaminopyridines |
| Antibiotiques agissant par inhibition compétitive (antimétabolites) | sulfamides |

Tableau I- 2 : Classification des antibiotiques par mode d'action.

I-2 Origines des composés

Les composés pharmaceutiques une fois consommés (usage vétérinaire ou humain), vont se retrouver dans les écosystèmes naturels par différentes voies d'accès, comme le résume la Figure I-1. Les composés pharmaceutiques non utilisés vont se retrouver directement dans les décharges et pourront se retrouver dans l'environnement aquatique par le phénomène de lessivage. Utilisés, que ce soit pour l'usage humain ou vétérinaire, les composés sont excrétés sous leur forme initiale ou en tant que métabolites, sous forme libre ou conjuguée (Halling-Sorensen *et al.*, 1998). Ces rejets sont majoritairement traités dans les stations épuration et l'effluent traité se retrouve dans les eaux de surface du milieu naturel.

Les boues produites par ces traitements, ou les lisiers issus de l'élevage peuvent être stockés (parfois en vue d'être incinérés) ou épandus sur les sols (Hektoen *et al.*, 1995 ; Pfeifer *et al.*, 2002 ; Tolls, 2001). Les phénomènes de ruissellement vont alors entraîner une remobilisation des composés pharmaceutiques (Pedersen *et al.*, 2003 ; Pedersen *et al.*, 2005) vers les milieux aquatiques, notamment les eaux de surface, mais aussi, indirectement dans les eaux souterraines (Ternes *et al.*, 2002).

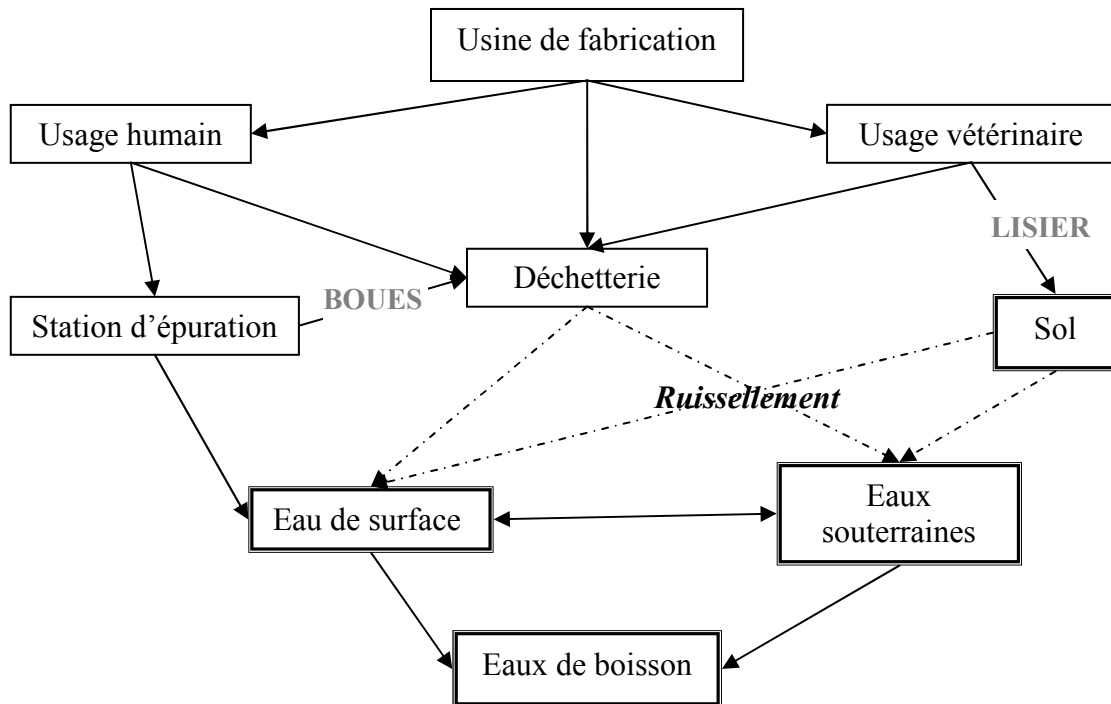


Figure I- 1 : Voies d'introduction des substances pharmaceutiques.

Il est important d'identifier, de manière quantitative et qualitative, les principales sources de contamination et les voies prédominantes d'introduction de ces composés pharmaceutiques dans l'environnement. Le chapitre suivant s'attache à décrire les sources principales d'apports aux systèmes aquatiques, des données de consommation aux différentes voies d'introduction : les stations d'épuration, dédiées à un usage urbain ou spécifiques (hôpitaux) mais aussi les sources plus ponctuelles et moins bien définies (autres usages des composés pharmaceutiques).

a) Données de consommation

La connaissance des volumes de composés consommés est importante car elle renseigne les quantités susceptibles d'être rejetées dans le milieu naturel afin de mieux appréhender leur présence potentielle dans le milieu. Ces données sont relativement difficiles à obtenir, car elles représentent une valeur commerciale très importante. L'AFFSE (Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale) obtient chaque année de chaque laboratoire la quantité fabriquée de chaque produit. Ces produits étant souvent des mélanges de plusieurs substances actives, avec des conditionnements variables, le travail de recensement pour estimer la quantité totale de chaque substance active est très laborieux et n'a donc été effectué que de manière très ponctuelle, pour certains produits (Boulanger, 2005). Le problème est le même dans de nombreux pays, limitant les données accessibles, comme le montre le Tableau I- 3, présentant les valeurs disponibles à l'heure actuelle.

| Composés | Classe thérapeutique | Angleterre (2000) (a) | Allemagne (1995-1997) (b) | Australie (c) | France (d) |
|---------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|---------------|------------|
| Paracétamol | Analgésique | 2000 | - | 295 | 2294 |
| Aspirine | AINS | 770 | > 500 | 20 | 880 |
| Ibuprofène | AINS | - | 105-180 | 14 | 166 |
| Erythromycine | Antibiotique | 27 | - | 11 | |
| Kétoprofène | AINS | - | 0,7 | 4 | |
| Diclofénac | AINS | 26 | 75 | 4 | 39 |
| Pénicilline V | Antibiotique | 22 | 140 | 9 | |

Tableau I- 3 : Données de consommations exprimées en tonnes par an.

(a) (Webb, 2001)

(b) (Hirsch *et al.*, 1999 ; Ternes *et al.*, 1998a ; Ternes, 2001a)

(c) (Khan et Ongerth, 2004)

(d) (Janex *et al.*, 2002)

b) Les sites de fabrication

Il n'existe que très peu de données concernant les émissions vers le milieu naturel de composés par les usines de fabrication. Si on sait que des résidus de synthèse, comme les solvants, sont parfois rejetés (Dunn *et al.*, 2004), il est généralement admis que les émissions de composés thérapeutiques sont proches de zéro dans le mode de fonctionnement normal des sites de fabrication, comme en témoignent les dispositions drastiques concernant les bonnes pratiques de fabrication et la régulation des émissions produites par les industries pharmaceutiques, aussi bien au niveau des solvants que des résidus de composés (Velagaleti *et al.*, 2002).

c) Les stations d'épuration

Comme indiqué précédemment, les stations d'épuration sont le premier réceptacle des rejets humains de substances pharmaceutiques. On y retrouve les rejets issus des agglomérations avec la consommation individuelle de chaque habitant, et les rejets plus spécifiques des structures hospitalières, qui seront développés dans le paragraphe suivant.

Les apports urbains sont très variables, selon les modes de consommation) voir par région (Bussi, 2000). D'autre part, selon les saisons, la consommation en substances, et donc les apports à la station vont varier, comme le montre le Tableau I- 4.

La plus grande variabilité provient des différences d'usage entre les groupes thérapeutiques ce qui nécessite des études par groupe chimique pour connaître leur devenir lors du passage en station d'épuration et la quantité de composés réellement introduite dans le milieu. Il est ainsi difficile de comparer la consommation en anti-inflammatoires dont la dose active varie entre 100 et 1000 mg et celle d'antidépresseurs, prescrits à des doses 10 fois moins importantes.

| Composés | Classe thérapeutique | Apports hivernaux | Apports estivaux | Différence (%) |
|----------------|----------------------|-------------------|------------------|----------------|
| Aténolol | Bêtabloquant | 494 | 345 | -30 |
| Furosémide | Diurétique | 101 | 85 | -16 |
| Ranitidine | Anti-histaminique | 87 | 128 | + 47 |
| Ciprofloxacine | Antibiotique | 490 | 259 | - 47 |
| Ibuprofène | AINS | 122 | 20 | - 84 |

Tableau I- 4 : Variabilité des apports à une station d'épuration, exprimée en mg/jour/1000 habitants en Italie, d'après Castiglioni *et al.* 2006.

L'apport des stations d'épuration au milieu naturel peut être considérable : une série de mesures effectuées sur les effluents liquides apportés à la station d'épuration de Berlin (1 million d'habitants + 12 000 lits hospitaliers) a permis d'estimer à 2 kg de carbamazépine et 4,4 kg de diclofénac l'apport hebdomadaire de ces composés au milieu naturel (Heberer et Feldmann, 2005).

d) Les hôpitaux

Les composés émis via les rejets hospitaliers sont de natures très variées. En plus des composés habituellement trouvés, des composés plus spécifiques, et d'usages plus restreints sont trouvés.

Les agents anti-tumoraux, certains antiviraux, les anti-néoplasiques, les produits d'aide au diagnostic comme les agents de contraste pour IRM (Imagerie à Résonance Magnétique), les agents de contraste radiographique, les produits désinfectants (Kümmerer *et al.*, 1997 ; Kümmerer, 2001a; 2001b) sont trouvés beaucoup plus spécifiquement dans les rejets hospitaliers et surtout dans des quantités importantes quand on les rapporte au nombre d'individus traités par les hôpitaux. Certains antibiotiques comme par exemple la fluoroquinolone sont émis en très grosses quantités par les systèmes hospitaliers, ce qui peut présenter des risques spécifiques (Emmanuel *et al.*, 2005 ; Hartmann *et al.*, 1998). Les rejets émis par les hôpitaux sont conséquents. Si on considère en moyenne que la consommation domestique d'eau est d'environ 100 litres/personne/jour (Halling-Sorensen *et al.*, 1998) la consommation en milieu hospitalier est estimée à 968 litres/lit/jour aux Etats-Unis et 750 litres/lit/jour en France (Emmanuel *et al.*, 2005). Généralement, ces effluents hospitaliers subissent un premier traitement dans une station d'épuration interne au complexe, avant de rejoindre les réseaux urbains et les stations d'épuration classiques.

e) L'usage vétérinaire

L'utilisation des substances pharmaceutiques a encore plus rapidement évolué dans le domaine vétérinaire que dans le domaine de la médecine humaine. Les nouvelles techniques d'élevage intensif, favorisant le développement d'infections diverses chez les animaux ont motivé l'utilisation souvent excessive de médicaments de toutes sortes : antifongiques, antiparasitaires, antibiotiques, et ce dans tous les types d'élevage (piscicultures, aviculture, élevages ovins, bovins et porcins...) (Gräslund et Bengtsson, 2001).

Outre cette utilisation thérapeutique, on trouve une utilisation dite zootechnique. En effet, il a été observé que l'adjonction de faibles quantités d'antibiotiques à l'alimentation pendant la période de croissance des animaux favorisait un gain de poids non négligeable (Corpet, 2000). Cet apport permet l'élimination d'une partie de leur flore intestinale ce qui diminue d'autant leur consommation en énergie (et donc en nourriture). Les antibiotiques sont également utilisés comme agent "anti-stress" (notamment dans l'élevage en batterie) (Corpet, 2000). Cette utilisation vétérinaire va introduire les composés dans les écosystèmes aquatiques par des voies directes (effluents des fermes aquacoles (Shao, 2001), épandage des lisiers... (Gräslund et Bengtsson, 2001 ; Halling-Sorensen *et al.*, 1998).

f) Autres origines

Certains composés, compte tenu de leurs capacités thérapeutiques, ont été utilisés en tant que biocides. La warfarine utilisée en thérapeutique humaine, est aussi employée comme rodenticide (action anti-coagulante). Le paracétamol, analgésique reconnu en médecine humaine, est également utilisé comme nourriture d'appât toxique pour stopper la prolifération des serpents bruns arboricoles (*Boiga irregularis*) (Johnston *et al.*, 2002). Enfin, l'acide acétylsalicylique (aspirine) possède de multiples usages en tant qu'agent kératolytique, et agent conservateur dans l'industrie agroalimentaire (Drewes *et al.*, 2002). Ces exemples montrent les utilisations multiples et transversales des substances pharmaceutiques, ce qui implique d'éventuelles autres voies de contamination que les stations d'épuration ou l'épandage des lisiers agricoles.

En parallèle des apports anthropiques de substances pharmaceutiques, il existe des apports naturels dans l'environnement. Concernant les sources diffuses d'œstrogènes dans l'environnement, une étude (Schulman *et al.*, 2002) faisant un bilan des différentes sources d'œstrogènes dans le milieu naturel a conclu que la part relative qui incombe au traitement thérapeutique contribue pour moins de 5 % à la contamination environnementale.

Ces sources, diffuses, sont difficilement identifiables et concourent à la contamination globale des écosystèmes.

I-3 Dégradation des composés

Le paragraphe précédant montre la diversité des apports de substances pharmaceutiques au milieu. Quel que soit ces voies, ces composés organiques vont être dégradés, soit dans les stations d'épuration, en subissant les différentes étapes de traitement des eaux usées, soit une fois introduits dans le milieu, par des phénomènes naturels (photodégradation, biodégradation...).

a) Dégradation dans les stations

Si l'on considère les apports aux stations d'épuration (Chapitre I-2-c), leur rôle apparaît primordial dans la régulation des apports aux écosystèmes aquatiques dans lesquels les effluents traités se déversent. La difficulté de compréhension concernant les phénomènes de dégradation dans les stations d'épuration réside dans le fait que ces phénomènes dépendent des composés, des techniques de traitements, mais aussi des conditions climatiques.

Les stations d'épuration conventionnelles agissent à différents niveaux, par plusieurs étapes successives : le traitement primaire, consistant en une séparation mécanique de la phase liquide et des grosses matières en suspension et déchets solides, le traitement secondaire correspondant à une étape de floculation physico-chimique associée à une étape de décantation et parfois à un traitement biologique utilisant des boues activées pour biodégrader les composés encore présents. Quand il est présent, le traitement tertiaire peut prendre différentes formes : traitements UV, chloration, ozonation... (www.cieau.com). Le traitement en station d'épuration va permettre d'une part l'élimination des particules ainsi que de tous les composés qui y seront adsorbés, et d'autre part, une dégradation des composés présents dans la phase dissoute. La phase particulaire est efficacement isolée lors des traitements primaire et secondaire. Tous les composés ayant une forte affinité pour les particules seront donc éliminés. La norme française implique que la concentration en matière en suspension en sortie n'excède pas les 35 mg.l⁻¹, avec une efficacité minimale de 90 % de particules retenues (www.cieau.com).

Le temps de résidence dans la station est primordial pour la dégradation des composés organiques. Or, ce temps de résidence diminue quand la pluviométrie augmente à cause de la saturation des installations de traitements (Tauxe-Wuersch, 2005 ; Tauxe-Wuersch *et al.*, 2005), qui évacuent alors des eaux non totalement traitées. Les stations ayant dissocié la récupération des eaux de ruissellement des rejets urbains ont partiellement pallié ce problème. Les conditions climatiques vont donc agir à différents niveaux. L'intensité des précipitations va jouer sur le temps de résidence des composés dans la station et donc sur leur élimination.

Enfin, l'efficacité même des différents traitements est très variable selon les composés étudiés. Si l'on considère des composés comme l'ibuprofène, de 12 à 45% des composés introduits sont éliminés par la sédimentation primaire (Tauxe-Wuersch *et al.*, 2005) et de 20 à 43 % par le traitement biologique. L'efficacité augmente avec le temps de résidence, avec la formation de deux isomères de l'hydroxy-ibuprofène (Quintana *et al.*, 2005), eux même facilement dégradables. Les traitements de floculation physico-chimique totalement abiotiques sont peu efficaces sur ce type de molécules. Dans certaines conditions, l'utilisation de boues activées entraîne la disparition de 97 % de l'ibuprofène en moins de 6h (Buser *et al.*, 1999).

Pour le kétoprofène, la sédimentation primaire permet en moyenne l'élimination de 15 à 32 % des composés selon le temps de résidence. Le traitement physico-chimique élimine en moyenne 20 % (entre 5 et 36 %) du composé. La dégradation de ce composé reste très variable, même pour des techniques de traitements très similaires : on a montré des dégradations de 17 % (Drewes *et al.*, 2002) à 75 % (Golet *et al.*, 2001). Concernant les traitements biologiques, leur effet reste limité avec moins de 30 % d'élimination (Joss *et al.*, 2005). Ce composé est très résistant dans les stations d'épuration, mais il est par contre sensible à la photodégradation, et sera donc partiellement dégradé dans le milieu (Lin et Reinhard, 2005).

Concernant le naproxène, une étude à différentes étapes du traitement montre que les traitements physiques (coagulation/floculation/sédimentation) n'éliminent pas le naproxène de l'eau traitée (Boyd *et al.*, 2003). Lors du traitement biologique, il y a transformation du composé parent en O-desméthyl-naproxène, métabolite non stable avec un taux d'élimination de 49 %. En revanche, les

techniques d'oxydation (chloration et ozonation) semblent efficaces pour réduire la concentration en naproxène (Quintana *et al.*, 2005).

La carbamazépine est l'exemple d'un composé pharmaceutique excessivement rémanent et résistant aux différents traitements des stations d'épuration. Même sur des stations équipées de traitements biologiques modernes, la carbamazépine n'est pas éliminée des eaux traitées (Joss *et al.*, 2005). Des taux d'élimination inférieurs à 7 % de l'apport sont communément constatés (Golet *et al.*, 2001). Le diclofénac est lui aussi très peu sensible aux divers traitements (Quintana *et al.*, 2005).

A l'inverse, le paracétamol et l'aspirine sont très fortement éliminés par les stations d'épuration équipées d'un traitement biologique. On a montré jusqu'à 98 % de dégradation pour le paracétamol (Golet *et al.*, 2001). De ce fait, ces composés sont très rarement trouvés dans les eaux de surface.

Le Tableau I- 5 fait l'état des lieux des taux moyens d'élimination mesurés pour quelques composés entre l'entrée et la sortie des stations d'épuration et montre les importantes variations mesurées selon les études.

| Composés | Taux d'élimination | Références |
|---------------|--------------------|---|
| Ibuprofène | 80- 90 % | (Andreozi <i>et al.</i> , 2003 ; Heberer, 2002a ; Heberer, 2002b ; Joss <i>et al.</i> , 2005 ; Koutsouba <i>et al.</i> , 2003 ; Stamatelatos <i>et al.</i> , 2003 ; Tauxe-Wuersch, 2005 ; Ternes <i>et al.</i> , 2004b) |
| Naproxène | 40 -88 % | |
| Paracétamol | >99 % | |
| Kétoprofène | 17- 75 % | |
| Diclofénac | 17-75 | |
| Gemfibrozil | 46-69 % | |
| Salbutamol | 94 % | |
| Carbamazépine | 0- 35 % | |

Tableau I- 5 : Taux d'élimination moyen mesurés dans diverses stations d'épuration.

b) Dégradation lors du traitement des eaux de boisson

De nouvelles techniques, au niveau des stations de traitement des eaux de boissons ou lors du traitement tertiaire des stations d'épuration, sont en développement, pour réussir à éliminer entre autre chose ces composés rémanents. Elles ont été étudiées, notamment dans le cadre du programme POSEIDON (Golet *et al.*, 2001).

L'ozone est un oxydant fort utilisé comme désinfectant. Pour des composés comme l'ibuprofène et le diazépam, l'efficacité de l'ozonation peut atteindre 80 %. L'ozone réagit très vite avec la carbamazépine et forme plusieurs produits stables à l'ozonation mais pouvant être oxydés par des radicaux hydroxyles. Certains de ces composés ont été identifiés. Pour la carbamazépine et le diclofénac, l'utilisation pour de l'eau à pH 7-8 d'une concentration d'ozone à 1 mg.l⁻¹ ramène la demi-vie de ces composés très rémanents à moins de 0,5 seconde (Huber *et al.*, 2003).

L'utilisation du dioxyde de chlore (ClO₂) est une autre nouvelle technique de désinfection des eaux de boisson. Certains composés comme le diclofénac, le paracétamol, le naproxène sont dégradés, mais globalement cette technique reste peu efficace pour les médicaments comme la carbamazépine, l'ibuprofène et le kétoprofène (Metcalf *et al.*, 2003 ; Pinkston et Sedlak, 2004).

En ce qui concerne le paracétamol, une étude des effets de la chloration (Bedner et MacCrehan, 2006) a permis l'identification de produits de dégradation, principalement le chloro-4-acétamidophénol et le dichloro-4-acétamidophénol correspondant à une première voie de transformation, mais aussi le 1,4-benzoquinone et le N-acétyl-p-benzoquinone imine via une deuxième voie de transformation, tous reconnus pour leur toxicité et beaucoup plus rémanents et hydrophobes que le composé parent.

Ces nouvelles techniques restent encore à l'état expérimental et nécessitent de plus amples études, notamment concernant la formation de composés, métabolites des substances pharmaceutiques, parfois plus rémanents et plus toxiques que les composés parents.

c) Dégradation dans le milieu naturel

Il n'existe que de rares études portant sur la dégradation des composés pharmaceutiques une fois présents dans les eaux (Buser et Müller, 1998 ; Buser *et al.*, 1998; 1999 ; Lam *et al.*, 2003 ; Lam *et al.*, 2004 ; Lam et Mabury, 2005 ; Lam *et al.*, 2005 ; Poiger *et al.*, 2001 ; Velagaleti, 1997).

Dans les eaux de surface, les contaminants sont susceptibles de subir une dégradation photochimique directe, mais aussi un grand nombre de réactions photochimiques indirectes, comme des réactions avec les radicaux oxygène ($^1\text{O}_2$), les groupements hydroxyle (-OH), les peroxydes (-OOR), la matière organique photo-excitée ou d'autres espèces réactives (Mill, 1999). Des phénomènes de biodégradation peuvent aussi se produire, mais à une moindre échelle comparativement à ceux qui se déroulent dans les stations d'épuration.

Dans les eaux de rivières, certains composés ont une dégradation assez rapide, comme le kétoprofène, le propanolol, le gemfibrozil et l'ibuprofène. Pour ces composés la biodégradation joue un rôle supérieur à celui de la photodégradation. Pour les œstrogènes, la biodégradation joue un rôle essentiel, notamment en biotransformant 80 % de l'oestradiol en oestrone, et ce en moins de 20 min .

Pour certains produits, comme le naproxène et le diclofénac la photolyse joue un rôle plus important que les phénomènes de biodégradation (Lin et Reinhard, 2005 ; Packer *et al.*, 2003), produisant de nombreux photoproduits, parfois plus toxiques que les composés parents (Isidori *et al.*, 2005). Des études ont montré l'importante photodégradation de la fluoxétine et ont pu identifier certains photoproduits associés à des voies de dégradation, formés notamment par défluorination de la molécule initiale (Lam et Mabury, 2005).

D'autres produits comme la carbamazépine semblent subir une très faible dégradation dans le milieu naturel (Andreozzi *et al.*, 2002).

I-4 Propriétés physico-chimiques et partition entre phases dissoute et particulaire

Si les études sur les antibiotiques vétérinaires se multiplient, de part la problématique de l'épandage des lisiers (Golet *et al.*, 2002b ; Thiele-Bruhn, 2003 ; Tolls, 2001), les données sur l'étude des interactions entre substances pharmaceutiques à usage humain, phase particulaire et sédiments restent peu nombreuses. La majorité des études s'en tiennent à une étude dans les stations d'épuration, au niveau du rôle des boues activées (Stamatelatou *et al.*, 2003), mais il existe peu de renseignements sur les possibilités de stockage dans les sédiments (Löffler *et al.*, 2005), le rôle du sol lors des épandages ou sur le devenir dans les particules....

a) Phase particulaire

L'adsorption aux particules se fait par deux voies principales : interactions hydrophobes ou interactions électrostatiques (Sedlak et Pinkston, 2001). Ces phénomènes n'ont jusqu'à aujourd'hui été étudiés que dans les stations d'épuration : il n'existe pas d'études sur la présence de composés pharmaceutiques dans la phase particulaire des eaux naturelles.

En ce qui concerne les interactions électrostatiques, bien que beaucoup de composés comportent les groupements fonctionnels permettant ce genre d'interaction (fonction amine, acide, phénolique...), ces mécanismes ne semblent pas jouer un rôle significatif dans l'élimination de substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration, sauf pour certains antibiotiques.

Pour ce qui est des interactions hydrophobes, le coefficient de partage octanol/eau (Kow) est un bon indicateur de l'affinité entre composés et phase solide. Compte tenu des conditions présentes dans les stations d'épuration, seules les substances avec un coefficient de partage supérieur à 100 peuvent être efficacement adsorbées. Or dans les classes pharmaceutiques, seuls les stéroïdes semblent remplir cette condition (Sedlak *et al.*, 2000). L'adsorption particulaire n'est donc pas une voie majoritaire d'élimination des médicaments dans les stations d'épuration.

b) Phase sédimentaire

Si très peu de mesures concernant le compartiment sédimentaire ont été effectuées dans le milieu naturel, en raison en partie des difficultés analytiques engendrées par la complexité des matrices solides, il existe certaines études focalisées sur le devenir des composés pharmaceutiques, (Löffler *et al.*, 2005).

La carbamazépine présente une affinité moyenne pour le sédiment, ce qui est cohérent avec sa lipophilie moyenne (log Kow 2,25) et sa présence sous forme non chargée dans l'environnement moyenne. Sa forte rémanence peut donc poser un risque d'accumulation dans les sédiments. Une étude (Stamatelatou *et al.*, 2003) a montré qu'il existait une adsorption très rapide de ce composé dans les sols à haute teneur en matière organique (supérieur à 10 %). La carbamazépine présente un temps de dégradation supérieur à 328 jours dans les sédiments, en condition oxygène.

Cette même étude montre que le diazépam est présent et très stable dans le sédiment, principalement grâce aux interactions non-ioniques. Via l'utilisation de mésocosmes contaminés et de composés radiomarqués, il a ainsi été montré (Figure I- 2) que le diazépam, l'acide clofibrique et la carbamazépine sont très rémanents dans les sédiments (Löffler *et al.*, 2005).

L'ibuprofène, très rapidement dégradé par des phénomènes de décarboxylation, va être transformé en produits de dégradation volatils, principalement du CO₂, et n'a donc aucune interaction avec la phase sédimentaire (Stamatelatos *et al.*, 2003).

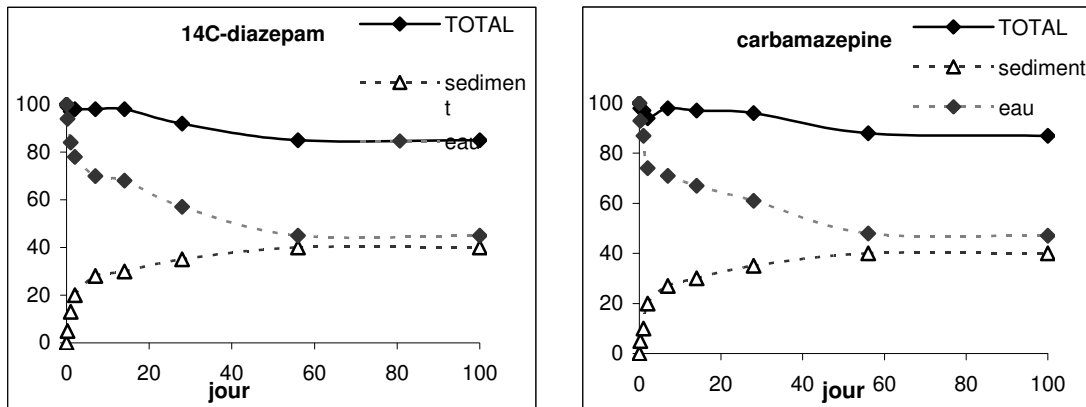


Figure I- 2 : Exemple de rémanence du diazépam et de la carbamazépine, d'après Löffler *et al.*, 2005.

c) Spécificité des rejets de stations d'épuration

Des études récentes essaient d'appréhender des phénomènes d'interaction entre les différentes substances. Comme montré précédemment, la carbamazépine et le paracétamol ont une capacité d'adsorption assez faible. Mais si l'on ajoute des surfactants non-ioniques (mélange de nonylphénols éthoxylés) ou cationiques (chlorure de cétylpyridinium), régulièrement retrouvés dans les rejets de stations d'épuration, on augmente la teneur en carbone organique, et donc le K_{oc} (Coefficient de partage avec le carbone organique) apparent. De ce fait, on augmente l'adsorption particulaire, de manière plus marquée pour la carbamazépine qui possède un K_{ow} supérieur à celui du paracétamol (Hari *et al.*, 2005).

I-5 Présence dans les milieux aquatiques

Les substances pharmaceutiques ont été détectées dans les effluents hospitaliers, les effluents de stations d'épuration, les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de boisson. Leur présence a été étudiée dans plusieurs pays : le Brésil, (Stumpf *et al.*, 1999), le Canada (Stumpf *et al.*, 1999), l'Angleterre (Thomas et Hilton, 2004), la France (Ferrari *et al.*, 2003), l'Allemagne (Heberer, 2002b ; Ternes *et al.*, 1998b ; Ternes et Hirsch, 2000), la Grèce (Koutsouba *et al.*, 2003), mais aussi en Italie (Castiglioni *et al.*, 2004), en Espagne (Farré *et al.*, 2001), en Suisse (Buser *et al.*, 1998 ; Golet *et al.*, 2002a ; Tauxe-Wuersch *et al.*, 2005), en Suède (Andreozzi *et al.*, 2003), aux Etats-Unis (Kolpin *et al.*, 2002)...

a) Eaux de station d'épuration

Ce sont dans les stations d'épuration, compte tenu des niveaux de concentration que les composés pharmaceutiques ont été identifiés pour la première fois (Henschel *et al.*, 1997 ; Kümmerer *et al.*, 1997 ; Steger-Hartmann *et al.*, 1996 ; Stumpf *et al.*, 1996). Ce sont majoritairement les Etats-Unis, l'Europe, et le Canada qui ont développé ces mesures. Comme présenté précédemment, l'efficacité incomplète des traitements, variable selon les composés, les saisons et les techniques, entraîne une contamination importante et variable des effluents, qui sont rejetés dans les eaux de surface. Comme pour les concentrations à l'entrée des stations (Tableau I- 4) et compte tenu de l'importante variabilité dans le traitement, les concentrations mesurées dans les effluents vont varier, selon la capacité de la station, ses modes de traitements et les conditions climatiques, mais aussi les composés (Tableau I-6). Les concentrations mesurées sont généralement de l'ordre du $\mu\text{g.l}^{-1}$.

| Composés | Classe thérapeutique | Concentrations mesurées ($\mu\text{g.l}^{-1}$) |
|------------------|----------------------|--|
| Carbamazépine | Antidépresseur | 6,5 (Ternes, 1998) |
| Bézafibrate | Hypolipémiant | 4,6 (Ternes, 1998) |
| Gemfibrozil | | 1,5 (Ternes, 1998) |
| Ac. clofibrrique | | 1,6 (Stumpf <i>et al.</i> , 1996) |
| Salbutamol | | 0,17 (Ternes, 1998) |
| Terbutaline | Broncho-dilatateurs | 0,12 (Ternes, 1998) |
| Propranolol | Bêtabloquant | 0,29 (Ternes, 1998) |
| Metoprolol | | 22 (Ternes, 1998) |
| Iopromide | Agent de contraste | 11 (Ternes et Hirsch, 2000) |
| Iopamidol | | 15 (Ternes et Hirsch, 2000) |
| Ifosfamide | Antinéoplasique | 29 (Ternes, 1998) |
| Aspirine | Analgésique | 54 (Ternes, 1998) |
| Paracétamol | Anti-inflammatoire | 6 (Ternes, 1998) |
| Naproxène | AINS | 2,6 (Tixier <i>et al.</i> , 2003) |
| Kétoprofène | | 0,38 (Ternes, 1998) |
| Indométhacine | | 0,6 (Ternes, 1998) |
| Ibuprofène | | 4,6 (Tauxe-Wuersch <i>et al.</i> , 2005) |
| Diclofénac | | 2,5 (Drewes <i>et al.</i> , 2002) |

Tableau I- 6 : Données de présence dans les effluents de station d'épuration ($\mu\text{g.l}^{-1}$).

b) Eaux de rivières

Après les rejets de stations d'épuration, ce sont les rivières, lieux de déversements des effluents urbains, qui ont été les plus étudiées (Buser et Müller, 1998 ; Buser *et al.*, 1998 ; Christensen, 1998 ; Velagaleti, 1997).

De nombreuses études recensent les niveaux de concentration dans différents pays. Sur l'ensemble des études, un certain nombre de composés sont régulièrement détectés. Cette liste de composés est à mettre en parallèle des données de consommation et de dégradation. En effet, en fonction des apports au milieu (stations d'épuration et autres apports), phénomènes de dégradation (dans les stations ou dans le milieu), les concentrations vont varier dans les écosystèmes aquatiques.

Le Tableau I-7 présente quelques unes des données obtenues lors des principales études à travers le monde. Les ordres de grandeurs varient du ng.l^{-1} au $\mu\text{g.l}^{-1}$ selon les composés. Globalement, certaines classes sont systématiquement détectées, dont les anti-inflammatoires non stéroïdiens, à la fois fortement consommés et relativement rémanents et ce souvent au niveau du $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Kolpin *et al.*, 2004 ; Ternes *et al.*, 2001). Les composés d'usage plus contrôlés ou à dose plus faible (antidépresseurs, hormones stéroïdiennes,...) sont plus rarement détectés dans les eaux de surface, et dans des ordres de grandeur plus faibles, de l'ordre de la centaine de ng.l^{-1} (Ying *et al.*, 2002).

| Composés | Classe thérapeutique | Concentrations mesurées ($\mu\text{g.l}^{-1}$) |
|------------------|----------------------|--|
| Carbamazépine | Antidépresseur | 1,1 (Ternes, 1998) |
| Diazépam | | 0,06 (Boyd <i>et al.</i> , 2003) |
| Caféine | | 0,05 (Boyd <i>et al.</i> , 2003) |
| Bézafibrate | Hypolipémiant | 3,1 (Ternes, 1998) |
| Gemfibrozil | | 0,51 (Ternes, 1998) |
| Ac. clofibrrique | | 0,55 (Stumpf <i>et al.</i> , 1996) |
| Salbutamol | Broncho-dilatateurs | 0,19 (Bound et Voulvoulis, 2006) |
| Propranolol | Bêtabloquant | 0,59 (Ternes, 1998) |
| Metoprolol | | 22 (Ternes, 1998) |
| Iopromide | Agent de contraste | 0,09 (Sacher <i>et al.</i> , 2005) |
| Iopamidol | | 0,18 (Sacher <i>et al.</i> , 2005) |
| Aspirine | Anti-inflammatoire | 4,1 (Ternes, 1998) |
| Paracétamol | | 0,11 (Kolpin <i>et al.</i> , 2004) |
| Naproxène | AINS | 0,39 (Ternes, 1998) |
| Kétoprofène | | 0,12 (Ternes, 1998) |
| Indométhacine | | 0,2 (Ternes, 1998) |
| Ibuprofène | | 0,53 (Ternes, 1998) |
| Diclofénac | | 1,2 (Buser <i>et al.</i> , 1998) |

Tableau I- 7 : Données de présence dans les eaux de rivières ($\mu\text{g.l}^{-1}$).

c) Eaux de mer

Compte tenu des difficultés analytiques rencontrées quand il s'agit de doser des composés à des niveaux de l'ordre du ng.l^{-1} et du niveau de dilution du milieu marin, il n'existe encore que très peu d'études (Buser et Müller, 1998 ; Thomas et Hilton, 2004) sur la présence des substances pharmaceutiques dans ce milieu. Une étude dans la Mer du Nord a néanmoins permis de détecter l'acide clofibrique à une concentration de $7,8 \text{ ng.l}^{-1}$ (Buser et Müller, 1998) et la caféine à des concentrations inférieures à 10 ng.l^{-1} (Weigel, 2003).

d) Eaux souterraines

Les études de la contamination des eaux souterraines sont encore peu nombreuses (Heberer *et al.*, 1997 ; Heberer, 2002b ; Sacher *et al.*, 2001), notamment parce qu'elles restent difficiles à mettre en œuvre, compte tenu des difficultés d'échantillonnage (accessibilité) et des très faibles limites de détection nécessaire pour mesurer des concentrations faibles, inférieures au ng.l^{-1} .

Généralement, les effluents traités des stations d'épuration sont rejetés dans les eaux de surface, mais il peut arriver, dans les régions où l'eau est une denrée rare, que ces effluents servent à réalimenter des nappes après une simple étape de percolation à travers le sol, ou après un traitement tertiaire (chapitre I-3-a). Dans certains cas il a été observé une contamination des nappes suite à la percolation des eaux de pluies via des déchetteries anciennes enfouies, ce qui a entraîné une contamination des nappes profondes (Tauxe-Wuersch, 2005).

Il a été montré que le devenir dans les eaux profondes est comparable à ce qu'il se passe dans les eaux de surface.

Les composés comme l'ibuprofène, déjà fortement dégradés dans la station d'épuration finissent leur dégradation lors de l'étape de percolation et ne sont plus détectés dans les eaux souterraines (Kreuzinger *et al.*, 2004).

Au contraire, des composés comme la carbamazépine, faiblement dégradés dans la station d'épuration (moins de 10 % (Kreuzinger *et al.*, 2004)) , résistent à l'étape de percolation (5 % de dégradation supplémentaire) et vont donc se retrouver dans la nappe où leur décroissance va rester très faible (moins de 30 % d'élimination en 100 jours). Cette décroissance semble plus due au temps de demi-vie qu'à un réel processus de dégradation. Les concentrations mesurées dans les nappes peuvent alors s'avérer non négligeables, puisque Kreuzinger *et al.* en 2004 ont trouvé des teneurs en carbamazépine variant entre 110 et 980 ng.l^{-1} pour des eaux traitées par percolation depuis plus de 75 jours.

Une autre étude, menée en Allemagne et aux Etats-Unis indique que les nappes profondes sont moins impactées que les nappes superficielles qui montrent une contamination, notamment en carbamazépine (entre 160 et 360 ng.l^{-1}), en acide clofibrique (entre 20 et 60 ng.l^{-1}) et au diclofénac (15 à 40 ng.l^{-1}) (Drewes *et al.*, 2002) non négligeable.

Dans le même ordre d'idée, une étude menée en Arizona porte sur l'élimination des substances pharmaceutiques entre le bassin de rétention dans lequel la station d'épuration se déverse, la nappe superficielle (5 m sous le bassin) et la nappe profonde sous-jacente (40 m). Les résultats montrent que le passage à travers l'aquifère atténue la concentration de la majorité des substances, pour atteindre des valeurs inférieures aux limites de détection (de l'ordre du ng.l^{-1}) dans la nappe profonde (Sedlak et Pinkston, 2001).

e) Eaux de boisson

Les publications relatant la présence de composés pharmaceutiques dans les eaux de boissons restent peu nombreuses, mais se développent car les difficultés croissantes d'alimentation en eau encouragent le recyclage des eaux, entraînant ainsi un potentiel enrichissement en divers composés persistants.

Le Tableau I-8 présente quelques uns des résultats obtenus de part le monde, dans des eaux de boisson. Il faut noter que globalement, ce sont les composés les plus rémanents qui sont retrouvés dans les eaux de boisson. Dans les cas où des composés plus dégradables (aspirine, ibuprofène...), ou rarement mesurés (diazépam) sont retrouvés il a été identifié un défaut dans le réseau de traitement comme par exemple une trop grande proximité du rejet de l'effluent et du captage des eaux destinées à l'alimentation (Zuccato, 2000).

| Composés | Groupe | Conc. Max. ng.l ⁻¹ | Pays | Références |
|-----------------|------------------------------|-------------------------------|------------|--|
| Caféine | stimulant | 119 | Etats-Unis | (Stackelberg <i>et al.</i> , 2004) |
| Carbamazépine | antidépresseur | 258 | Etats-Unis | |
| Diclofénac | AINS | 6 | Allemagne | (Heberer, 2002a) |
| Gemfibrozil | hypolipémiant | 70 | Canada | (Tauber, 2003) |
| Ibuprofène | AINS | 120 | Etats-Unis | (Loraine et Pettigrove, 2005) |
| Phénazone | antipyrétique analgésique | 250 | Allemagne | (Zuehlke <i>et al.</i> , 2004) (Reddersen <i>et al.</i> , 2002) |
| | | 400 | Allemagne | |
| Propylphénazone | | 80 | Allemagne | |
| | | 120 | Allemagne | |

Tableau I- 8 : Etat de contamination des eaux destinées à la boisson (ng.l⁻¹).

f) Particules et sédiments

Peu de données qualitatives existent concernant la présence des composés pharmaceutiques dans le matériel solide. Une étude (Castiglioni *et al.*, 2006) présente une estimation qualitative (absence ou présence) de la contaminations des particules pour certains composés dans un effluent de station d'épuration. Le Tableau I-9 présente les résultats de cette étude, qui se focalise majoritairement sur les antibiotiques, plus lipophiles de part leurs caractéristiques physico-chimiques.

L'émission de particules étant légalement réduite dans les effluents de station d'épuration par les phénomènes de floculation et de sédimentation (en dessous de 35 mg.l⁻¹ pour la France, www.cieau.com), l'apport de composés vers le milieu naturel par cette voie reste faible. Toutefois, les particules ont un important potentiel de dissémination des composés adsorbés et peuvent jouer un rôle dans la toxicité de ces produits par leur introduction dans la chaîne alimentaire des organismes aquatiques (contamination par la voie trophique).

Concernant les déchets solides des stations d'épuration, les boues issues des diverses étapes de traitement, les phénomènes sont quelques peu différents grâce aux propriétés de ce type de matières solides, notamment de part leur extrême richesse en matière organique. Les concentrations détectées dans ce type d'échantillons sont loin d'être négligeables, comme le montre le Tableau I- 10.

| Composés | Classe thérapeutique | Présence |
|---------------------|----------------------|----------|
| Hydrochlorothiazide | | (+) |
| Spiramycine | | (+) |
| Clarithromycine | | (+) |
| Sulfaméthoxazole | Antibiotique | (-) |
| Erythromycine | | (+) |
| Ofloxacin | | (+) |
| Aténolol | | (+) |
| Ciprofloxacine | | (+) |
| Lincomycine | | (-) |
| Salbutamol | Bronchodilatateur | (-) |
| Enalapril | Vasodilatateur | (+) |
| Carbamazépine | Antidépresseur | (+) |
| Ibuprofène | AINS | (-) |
| Ranitidine | Anti-histaminique | (+) |
| Bézafibrate | Hypolipémiant | (+) |
| Furosémide | Diurétique | (-) |
| Œstrone | Hormone | (+) |

Tableau I- 9 : Dosage des composés pharmaceutiques dans les particules, mesure qualitative d'après Castiglioni *et al.*, 2006.

| Composés | Concentration ng.g ⁻¹ | Référence |
|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Carbamazépine | 258,1 ± 4,7 | (Mimeault <i>et al.</i> , 2005) |
| Carbamazépine-époxyde | nd | |
| Carbamazépine -DiOH | 7,5 ± 0,7 | |
| Carbamazépine -2 OH | 1,9 ± 1,1 | |
| Carbamazépine -3 OH | 1,6 ± 0,8 | |
| Carbamazépine -10 OH | nd | |
| Caféine | 7,6 | |
| | | |
| Paracétamol | 4,5 | (Khan et Ongerth, 2004) |
| Naproxène | 1,2 | |
| Ibuprofène | 3,4 | |
| Gemfibrozil | 1,2 | |

Tableau I- 10 : Concentrations détectées dans les boues de station d'épuration pour la caféine, la carbamazépine et ses métabolites (Exprimées en ng.g⁻¹, poids sec).

Compte tenu de la quantité de matière produite, ces concentrations peuvent représenter des kilogrammes de produits. Pour la France, la production de boues dépasse les 1 000 tonnes par an pour l'année 2005 (Brodersen *et al.*, 2002) et cette production est en constante augmentation.

I-6 Données de toxicité

Les substances pharmaceutiques ayant par définition un mode d'action spécifique, l'évaluation de leur toxicité demanderait une étude pour chaque type de composé. Malheureusement, le nombre de molécules concernées est très important : plus de 900 composés actifs différents ont été recensés pour l'Allemagne en 2001 (Kümmerer, 2001a; 2001b). Il est donc nécessaire d'obtenir un certain nombre d'informations théoriques afin d'effectuer une sélection pertinente des composés à cibler.

Les mécanismes d'action des composés, les sensibilités spécifiques des organismes-cibles, sont des premiers facteurs de sélection. Les données de présence (qualitative et quantitative) des composés dans le milieu sont un élément important à prendre en compte pour déterminer le risque d'exposition des organismes aux substances pharmaceutiques.

a) Données toxicologiques : mécanismes d'action

La compréhension de la toxicité des substances pharmaceutiques découle souvent des effets secondaires connus chez l'homme, et des homologies de structures entre l'homme et les organismes exposés.

Les effets secondaires du paracétamol semblent principalement dus à la formation de métabolites hépatotoxiques. Le paracétamol, couramment utilisé comme agent analgésique et antipyrétique induit la prolifération des cultures de cellules cancéreuses via les récepteurs œstrogéniques, mais ne montre pas d'activité œstrogénique chez les rongeurs (Harnagea-Theophilus *et al.*, 1999).

Un homologue de l'isoforme COX 2, une des cibles du paracétamol, a été découvert chez les poissons, dans les macrophages de la truite (*Oncorhynchus mykiss*) (Harnagea-Theophilus *et al.*, 1999 ; Zou *et al.*, 1999). Une autre étude a montré que 0,05 M (7,5 mg.l⁻¹) de paracétamol inhibe 50 % de la production de vitellogénine sur des cellules isolées de foie de truite (Harnagea-Theophilus *et al.*, 1999).

Concernant les antidépresseurs, il n'y a pas eu mise en évidence de l'existence de canaux sodiques voltage-dépendants, utilisés par la carbamazépine, chez le poisson ou les invertébrés inférieurs. Le mode d'action de la carbamazépine impliquant l'utilisation de ces canaux, la diminution de l'activité du système nerveux central, mode d'action de la carbamazépine n'est pas attendue chez les organismes inférieurs.

Par contre la présence du système GABA (acide gamma-aminobutyrique) inhibé par les benzodiazépines (ex : diazépam) a été mis en évidence chez le poisson (*Oncorhynchus mykiss*,) et interviendrait dans le contrôle de la sécrétion de prolactine (Prunet *et al.*, 1993). D'autre part, le diazépam cause une diminution de l'activité acétylcholinestérase sur le crustacé *Artemia parthenogenetica* pour une concentration de 7,04 mg.l⁻¹ (Nunes *et al.*, 2006). De plus, il peut inhiber la capacité de régénération du cnidaire *Hydra vulgaris*, à partir d'une concentration de 10 µg.l⁻¹ (Pascoe *et al.*, 2003).

La sérotonine existe aussi chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés, mais avec des fonctions différentes (Fong *et al.*, 1998 ; Foran *et al.*, 2004). Il semble que les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine puissent perturber les fonctions endocrines de certains organismes comme la sphaerie striée (*Sphaerium*

striatinum) (Fong *et al.*, 1998) et le medaka (*Oryzias latipes*). La fluoxétine est de plus connue pour stimuler la reproduction (stimulation de la parturition) des invertébrés. Certaines études rapportent une augmentation de la fécondité chez la moule zébrée pour une exposition à 36 µg.l⁻¹ de fluoxétine (Fong, 1998) et une augmentation de la production d'œufs chez le crustacé *Ceriodaphnia dubia* après exposition à 56 µg.l⁻¹ (Brooks *et al.*, 2003b). La fluoxétine semble agir en augmentant la biodisponibilité de la sérotonine, qui régule l'oogenèse et la ponte chez les invertébrés. Des daphnies exposées à 36 µg.l⁻¹ ont 3 fois plus de progénitures par ponte que les daphnies témoins (Flaherty et Dodson, 2005).

Concernant l'action des bêtabloquants, des bêta-adrénorécepteurs ont aussi été identifiés dans le foie et les muscles de poisson (*Oncorhynchus mykiss*), avec une importante similitude de séquence avec ceux des vertébrés, supposant un rôle similaire à celui observé chez les humains (Nickerson *et al.*, 2001).

Des dommages dans les cellules neuronales et musculaires de têtards de *Xenopus laevis* ont été montrés après une exposition à la caféine (Sakamoto *et al.*, 1993).

Pour les hypolipémiants, il a été mis en évidence que les statines affectaient la synthèse hormonale chez les insectes (Debernard *et al.*, 1994). Les fibrates stimulent l'absorption cellulaire des acides gras, leur conversion en dérivés de l'acétyl-Coenzyme A et leur catabolisme par oxydation, ce qui entraîne une diminution de la production des lipides de faible densité (VLDL : Very Low Density Lipids). Leur activité pharmacologique est due à l'activation de la prolifération des péroxysomes, qui intervient par activation de récepteurs nucléaires (PPAR : Peroxisomes Proliferator Activated Receptors) et entraîne une activation transcriptionnelle de divers gènes, dont ceux codant pour certains isoformes des cytochromes (CYP 4A1 et CYP 4A3 notamment). Ceux-ci génèrent du peroxyde d'hydrogène, entraînant une hyperproduction de ce produit toxique pour l'organisme.

Des dommages hépatiques ont été observés après exposition chronique aux fibrates chez le rat (Qu *et al.*, 2001) ainsi que des phénomènes de prolifération massive de péroxysomes (Hoivik *et al.*, 2004). Une hépatocancérogénicité a été observée chez les rongeurs mais pas chez l'homme (Cajaraville *et al.*, 2003).

Il a été noté une diminution significative de l'activité de la glutathion peroxydase après exposition du crustacé *Artemia parthenogenetica* à une concentration de 3,09 mg.l⁻¹ de clofibrate (Nunes *et al.*, 2006).

b) Toxicité aiguë

La majorité des informations actuellement présentes concerne la toxicité aiguë des substances pharmaceutiques. Le Tableau I- 11 présente quelques valeurs de CL₅₀ sur des organismes (La CL₅₀ est la concentration létale qui provoque 50% de mortalité dans la population d'organismes étudiée, pendant un temps donné, par administration unique).

Des effets de toxicité ont été étudiés sur des espèces végétales aquatiques. Les effets observés ont montré une inhibition de la photosynthèse par diminution des concentrations en chlorophylle a, b et caroténoïdes dans les végétaux exposés à l'atorvastatine, un hypolipémiant (Brain *et al.*, 2004).

Néanmoins, les seuils de concentrations nécessaires pour obtenir ces effets létaux sont très élevés, de l'ordre du mg.l^{-1} et sont donc rarement observés dans les milieux naturels.

| Composés | Espèce cible | Famille | CL ₅₀ | Référence |
|-----------------|----------------------------|------------|--------------------------|-------------------------|
| Carbamazépine | <i>Chironomus sp.</i> | Insecte | > 4 mg.l^{-1} | (Nentwig et al., 2004) |
| | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | Crustacé | 77,7 mg.l^{-1} | (Ferrari et al., 2003) |
| Ac. clofibrique | <i>Chironomes sp.</i> | Insecte | > 0,4 mg.l^{-1} | (Nentwig et al., 2004) |
| Diazépam | <i>Artemia sp.</i> | Insecte | 12,2 mg.l^{-1} | (Nunes et al., 2006). |
| Diclofénac | <i>Danio rerio</i> | Poisson | 480 $\mu\text{g.l}^{-1}$ | (Dietrich et al., 2002) |
| Atorvastatine | <i>Lemna gibba</i> | Macrophyte | 260 $\mu\text{g.l}^{-1}$ | (Brain et al., 2004) |
| Fluoxétine | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | Crustacé | 234 $\mu\text{g.l}^{-1}$ | (Brooks et al., 2003b) |
| | <i>Pimephales promelas</i> | Poisson | 705 $\mu\text{g.l}^{-1}$ | (Brooks et al., 2003b) |
| | <i>P. subcapitata</i> | Algue | 39 $\mu\text{g.l}^{-1}$ | (Brooks et al., 2003b) |
| Aspirine | <i>Daphnia magna</i> | Crustacé | 118 mg.l^{-1} | (Ferrari et al., 2003) |
| Paracétamol | <i>Daphnia magna</i> | Crustacé | 50 mg.l^{-1} | (Ferrari et al., 2003) |
| Naproxène | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | Crustacé | 66 mg.l^{-1} | (Isidori et al., 2005) |

Tableau I- 11 : Données de toxicité aiguë.

c) Toxicité chronique

En ce qui concerne les effets chroniques, les études n'en sont actuellement qu'à leurs balbutiements. Les difficultés résident dans la mesure de très faibles concentrations, dans la caractérisation des effets subléthaux et dans la mise en place d'études sur de longues périodes d'exposition. En effet, il est difficile de caractériser la toxicité chronique d'un composé qui peut de plus différer du mode d'action de la toxicité aiguë.

Une des premières études sur le poisson a été appliquée à la truite (*Oncorhynchus mykiss*), en exposant les organismes par l'eau au diclofénac (Schwaiger et al., 2004). Cette étude a montré que, au dessus de 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, quatre semaines d'exposition entraînent les premières altérations histopathologiques (au niveau des reins et des branchies) allant jusqu'à une dégradation de la fonctionnalité de ces organes (Hallare et al., 2004).

Concernant le naproxène, un autre anti-inflammatoire, des effets toxiques ont été montrés pour des concentrations variant de 0,33 mg.l^{-1} (*Ceriodaphnia dubia*, crustacé) à 31,82 mg.l^{-1} (*P. subcapitata*, algue), démontrant une fois de plus l'importance du choix de l'espèce ciblée pour la mise en œuvre des tests de toxicité (Isidori et al., 2005).

d) Toxicité de l'effet mélange :

S'il est déjà difficile d'estimer la toxicité chronique de chaque composé, les effets mélanges, potentiellement synergiques, sont encore plus difficiles à appréhender et de plus très peu étudiés.

Il a été prouvé qu'un mélange d'ibuprofène, de fluoxétine et de ciprofloxacine (antibiotique) possède une toxicité sur les plantes, le plancton et les poissons à des concentrations 100 à 200 fois plus faibles que celles utilisées pour les composés individuels (Renner, 2002).

En observant la différence entre effet individuel et effet en mélange (Cleuvers, 2004), on appréhende mieux la difficulté de compréhension des phénomènes (Figure I- 3). Cette étude montre que selon les composés, il n'est pas possible d'anticiper l'effet mélange des composés. Si le mélange carbamazépine/acide clofibrrique suit les lois d'additivité, le mélange de diclofénac et d'ibuprofène dépasse les prédictions et montre une toxicité supérieure à celle prédite sur la base d'une simple additivité des effets individuels.

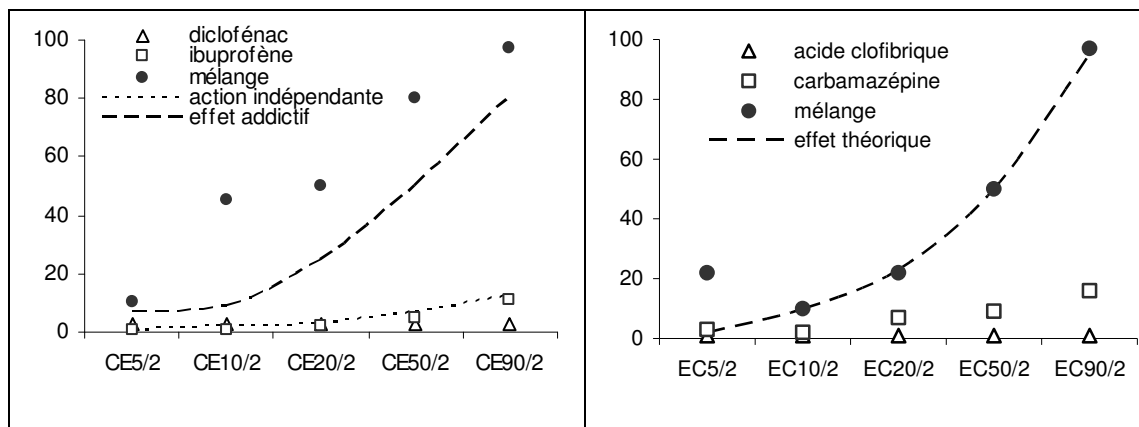


Figure I- 3 : Comparaison de l'effet mélange sur différents composés, d'après Cleuvers, 2004.

Chez l'humain, des phénomènes d'interférences entre médicaments ont été notés, comme l'action inhibitrice de l'ibuprofène sur l'action cardioprotectrice de l'aspirine ou l'action activatrice de la caféine sur certains analgésiques (Jones *et al.*, 2004).

Cette approche de l'effet mélange est essentielle quand on considère la complexité de la principale source de composés pharmaceutiques dans l'environnement : les effluents de stations d'épuration. En plus d'un nombre important de substances pharmaceutiques, nombres d'autres produits de synthèse, issus de la consommation humaine, agricole et industrielle sont présents dans ces rejets. De nouvelles approches regroupées sous le terme de « TIE » (Toxicity Identification and Evaluation) essaient d'appréhender le problème en identifiant la part toxique de chacun des produits présents, sans toutefois pouvoir réellement répondre actuellement à la question de l'effet mélange (Burnison *et al.*, 2003).

e) Toxicité des produits de dégradation :

Il a été montré dans les études de dégradation, concernant le milieu naturel, les stations de traitements des eaux de boisson comme les stations d'épuration, que de nombreux produits issus de la dégradation des composés pharmaceutiques peuvent être formés et être présents dans le milieu naturel (Miao *et al.*, 2005 ; Reddersen *et al.*, 2002 ; Ternes, 2001b ; Zurhelle *et al.*, 2000).

Dans certains cas, ces produits de dégradation sont plus toxiques que le composé parent. Si l'on considère le paracétamol, le traitement par chloration produit entre autre la 1,4-benzoquinone et la N-acétyl-p-benzoquinone imine. Or, si sur un test de toxicité aiguë (injection intra-péritonéale chez la souris), le paracétamol présente une DL₅₀ de 500 mg.kg⁻¹, les deux produits de dégradation montrent des DL₅₀ de respectivement 8,5 mg.kg⁻¹ et 20 mg.kg⁻¹, soit respectivement 59 et 25 fois plus faible (Bedner et MacCrehan, 2006). De plus, la 1,4-benzoquinone est connue aussi pour être un métabolite du benzène impliqué dans des effets génotoxiques et mutagènes, bien différents de l'hépatotoxicité connue du paracétamol (Bedner et MacCrehan, 2006).

De manière générale les difficultés pour étudier la toxicité sont de plusieurs ordres. D'une part, le choix du type de test à utiliser est problématique. Pour un même composé, les différents tests peuvent produire des résultats ne menant pas du tout aux mêmes conclusions : un test de cytotoxicité (activité 7-éthoxyrésorufine-O-déséthylase (EROD)) sur des hépatocytes de truite va mener pour le diclofénac à une CE₅₀ de 5605 µg l⁻¹ (Laville *et al.*, 2004) contre 480 µg l⁻¹ pour un test d'embryotoxicité chez le *Danio rerio* (Dietrich *et al.*, 2002).

f) Capacité de bioaccumulation des composés pharmaceutiques

Si le devenir métabolique des substances pharmaceutiques chez les humains est contrôlé pour les autorisations de mise sur le marché (AMM), peu d'études se sont attachées à étudier le devenir de ces composés chez les organismes aquatiques. En ce qui concerne les antibiotiques, leur capacité de bioaccumulation est connue, de part leur utilisation en aquaculture. Des normes de consommation, fixant la teneur maximale présente dans divers produits de consommation (viande, poisson, lait, œuf...) destinés à la consommation humaine sont fixées (règlement UE n° 2377/90). En ce qui concerne l'exposition dans le milieu naturel, les études n'en sont qu'à leurs premiers développements.

La fluoxétine, la sertraline et leurs métabolites, la norfluoxétine et le desméthylsertraline, ont été retrouvés dans des poissons aux Etats-Unis (Brooks *et al.*, 2005). Le Tableau I- 12 montre les concentrations retrouvées dans les organismes (pool par espèce, 3 espèces étudiées) montrant une capacité de bioaccumulation et des effets sur le système nerveux des poissons. L'accumulation de ces composés semble se faire préférentiellement dans les tissus cérébraux et le foie.

| Composés | Tissus cérébraux ng.g ⁻¹ poids sec | Foie ng.g ⁻¹ poids sec | Muscle ng.g ⁻¹ poids sec |
|---------------------|--|--------------------------------------|--|
| Fluoxétine | 1,58 ± 0,74 | 1,34 ± 0,65 | 0,11 ± 0,03 |
| Norfluoxétine | 8,86 ± 5,9 | 10,27 ± 5,73 | 1,07 ± 0,41 |
| Sertraline | 4,27 ± 1,4 | 3,59 ± 1,67 | 0,34 ± 0,09 |
| Desméthylsertraline | 15,6 ± 14,3 | 12,94 ± 10,45 | 0,69 ± 0,59 |

Tableau I- 12 : Mesures de composés pharmaceutiques dans les organismes aquatiques, d'après Brooks *et al.*, 2005.

Néanmoins, les études de transfert en milieu naturel de ces contaminants vers les organismes sont encore très peu nombreuses. On peut néanmoins citer différentes études démontrant la capacité de bioaccumulation des œstrogènes ainsi que de certains antibiotiques (Gomes *et al.*, 2004 ; Lai *et al.*, 2002).

L'utilisation du paracétamol comme poison contre les serpents (Johnston *et al.*, 2002) entraîne l'exposition d'espèces non cibles à de fortes concentrations via des tablettes cachées dans des souris, consommées par les serpents. Les espèces non cibles potentiellement affectées sont celles qui vont consommer les carcasses contaminées de souris et de serpents morts. Les dosages effectués dans les serpents montrent une accumulation de 30 % de la dose ingérée, soit entre 200 et 600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec. Il n'y a malheureusement pas eu de mesures dans les consommateurs (corbeaux, crabes, lézards...), mais la mortalité de ces espèces ne semble pas significativement différente entre période de traitement et période précédant l'utilisation du paracétamol comme poison.

Une autre étude s'est focalisée sur la capacité de bioaccumulation du diclofénac un anti-inflammatoire non stéroïdien, chez la truite arc-en ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Après exposition par l'eau à différentes concentrations de diclofénac, la concentration dans chaque organe est mesurée (Figure I- 4).

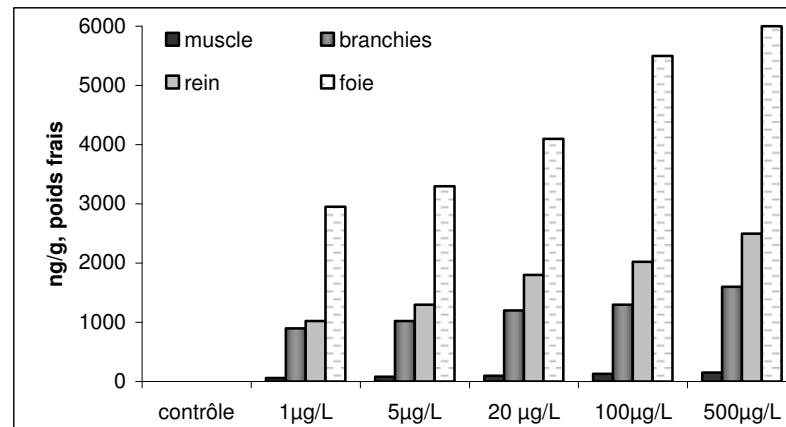


Figure I- 4 : Bioaccumulation du diclofénac chez la truite, d'après Schwaiger *et al.*, 2004.

g) Risque d'exposition pour les humains

Schwabb a défini les ADI ("acceptable daily intake") correspondant à l'apport journalier acceptable via deux sources potentielles d'exposition : l'eau de boisson et la consommation de poissons (Schwabb *et al.*, 2005). Ces apports sont calculés en majorant au maximum les valeurs (considérations de valeurs maximales dans les eaux de surface, absence de biodégradation dans le milieu et dans les stations de traitements de l'eau de boisson, pas de biotransformation par les poissons...). En considérant une consommation de 2 litres d'eau par jour, Schwabb conclut à l'absence de danger pour le consommateur, mais ces valeurs de toxicité sont calculées à partir des effets inhérents aux doses thérapeutiques. Qu'en est-il de l'exposition à des composés ciblés pour une classe d'âge ou un sexe particulier, comme les composés œstrogéniques ? Certaines classes peuvent nécessiter des évaluations supplémentaires comme les antinéoplasiques et les cytotoxiques (Tauxe-Wuersch *et al.*, 2005).

De plus des interactions peuvent avoir lieu avec des composés consommés dans un but thérapeutique : l'ibuprofène interfère avec les propriétés cardioprotectrices de l'aspirine, tandis que la caféine augmente les effets de certains analgésiques (Jones *et al.*, 2004).

I-7 Etat de la législation

Ce paragraphe présente la réglementation relative à l'évaluation du risque environnemental pour les médicaments à usage humain, et par comparaison, celle préexistante développée pour les antibiotiques vétérinaires.

a) La position des Etats-Unis

Le processus d'évaluation de l'impact environnemental des médicaments varie sensiblement entre l'Europe et les Etats-Unis.

Le devenir dans l'environnement des substances pharmaceutiques à usage humain est réglementé aux Etats-Unis depuis 1998.

(<http://epa.gov/ostwater/guide/pharm/techdev.html>).

Cette réglementation relève de la responsabilité de la FDA (Food and Drugs Administration) et s'intègre dans le contexte du National Environmental Policy Act. La procédure d'évaluation se définit par un processus en deux étapes. Dans un premier temps, l'industriel se doit d'estimer une concentration introduite dans l'environnement en s'appuyant sur des prévisions de production à 5 ans. Si la concentration prédite de la molécule mère ou l'un de ses métabolites s'avère inférieure à $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ au point d'entrée dans l'environnement (effluents de station), la molécule est considérée acceptable et aucune étude complémentaire n'est initiée. Dans ce cas, aucun contrôle n'est conduit pour confirmer la concentration environnementale après la commercialisation de la substance.

Si la concentration prédictive s'avère supérieure à $1 \mu\text{g.l}^{-1}$, une évaluation environnementale formelle est engagée. Cette partie inclut des données sur le devenir de la molécule et une batterie de tests écotoxicologiques. Les études comprennent habituellement les effets sur la respiration microbienne et la toxicité aiguë sur une algue, un invertébré et une espèce de poisson. Les études de toxicité chronique sont initiées sous certaines conditions notamment quand la molécule se bioaccumule. La FDA a révisé en 1997, sur la base de données collectées pendant 10 ans, la procédure d'évaluation en ne gardant que les paramètres les plus pertinents aboutissant ainsi à la rédaction d'un guide destiné aux industriels pour l'évaluation du risque environnemental (Jones *et al.*, 2004).

Les réflexions européennes apparaissent plus tardives et moins élaborées que celles des Etats-Unis.

b) La position de l'Union européenne

La dernière version du document rédigé par le Committee for Medicinal products for Human Use (CHMP), date du 20 janvier 2005.

Cette ligne directrice s'applique pour les médicaments à usages humains régis par la Directive 2001/83/EC et ne concerne que les nouvelles substances. La directive fait référence au risque environnemental induit par l'utilisation, le stockage et l'élimination des médicaments.

A la différence de la ligne directrice relative aux médicaments contenant des organismes génétiquement modifiés, le document n'impose aucune obligation pour l'industriel et ne considère pas le risque sanitaire.

L'évaluation du risque environnemental se présente comme une procédure avec des phases fractionnées successives qui s'avèrent concluantes quand des informations suffisantes indiquent l'innocuité du médicament pour l'environnement ou identifient et caractérisent de manière formelle les risques potentiels. L'évaluation du risque environnemental se découpe en deux phases.

La première phase évalue quantitativement l'exposition de l'environnement à la substance active et/ou ses métabolites. Cette appréciation se fait par l'intermédiaire d'une concentration prédite pour l'environnement (PEC). Si la phase I estime que la valeur de la PEC eau de surface reste inférieure à la limite de $0,01 \mu\text{g.l}^{-1}$ et qu'aucune préoccupation environnementale n'est apparente, la molécule est considérée comme ne présentant aucun risque environnemental "dans les conditions normales de prescription et d'usage".

Si la PEC dépasse la valeur limite, une phase II est engagée. La valeur de $0,01 \mu\text{g.l}^{-1}$ reste sujette à discussion entre les experts. En effet, cette limite d'action est fixée arbitrairement sur la base de données de toxicité aiguë et peut être révisée quand une quantité suffisante de données chroniques existe. Par exemple, certaines substances comme les hormones stéroïdiennes n'atteignent pas la valeur limite pour initier la phase suivante, malgré la toxicité avérée de ces molécules à de très faibles concentrations, ce qui nécessite une étude plus spécifique pour ce type de composés.

Dans la seconde phase, des informations sur les propriétés physico-chimiques, pharmacologiques et/ou toxicologiques sont requises et évaluées en relation avec l'ampleur de l'exposition environnementale. L'analyse porte également sur des études de dégradabilité, de persistance ou du potentiel de bioaccumulation de la substance active et/ou de ses métabolites.

c) Cas particulier des antibiotiques à usage vétérinaires

Les antibiotiques à usage vétérinaire bénéficient d'une réglementation largement plus avancée, montrant peut être la marche à suivre pour les composés d'usages humains.

Le risque environnemental fait l'objet d'un rapport détaillé et obligatoire dans les dossiers d'autorisation. La démarche, largement antérieure aux médicaments humains, apparaît incontournable. Etant donné l'absence de bénéfice thérapeutique attendu pour l'homme, un code communautaire relatif aux médicaments vétérinaires prévoit des dispositions pour inclure le risque environnemental dans la balance bénéfice/risque et refuser, le cas échéant, la délivrance d'une autorisation de mise sur le marché (directive 2004/28/CE, conseil du 31 mars 2004 modifiant la directive 2001/82/CE).

La ligne directrice intitulée « évaluation de risque environnemental pour les médicaments vétérinaires autres que les produits immunologiques ou contenant des organismes génétiquement modifiés », rédigée par the Committee for Veterinary Medicinal Products, date de janvier 1997 et s'impose à l'industriel depuis janvier 1998.

L'évaluation du risque environnemental se présente également comme une procédure avec des phases fractionnées successives s'avérant concluantes quand des informations suffisantes indiquent l'innocuité du médicament pour l'environnement ou identifient et caractérisent de manière formelle les risques potentiels.

La première phase tente d'évaluer le potentiel d'exposition de l'environnement par le produit, ses excipients ou ses métabolites. Les valeurs limites correspondantes aux PEC sont pour le sol : $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

La seconde phase poursuit l'analyse de l'exposition dans les différentes matrices et récupère les données disponibles sur les propriétés physico-chimiques, pharmacologiques et toxicologiques obtenues durant la conduite des essais requis par la Directive 81/852/EEC. On peut ensuite décider d'affiner les recherches sur un écosystème spécifique.

La phase II se divise également en partie A et B. La partie A commence par une évaluation détaillée du devenir et des effets potentiels de la molécule. Si cette étape n'indique aucun danger ou que la stratégie de gestion du risque proposée par l'industriel couvre tous les dangers et l'initiation de la partie B s'avère inutile. Cette dernière étape se définit par une étude détaillée des effets sur la faune et la flore dans les compartiments les plus affectés.

L'évaluation de risque environnemental doit prendre en considération les autres utilisations des substances actives notamment à travers les pesticides ou les compléments alimentaires destinés aux animaux.

Les études doivent tenir compte des dispositions d'utilisation et d'administration du produit, du taux d'excrétion de la substance active et de ses métabolites principaux et enfin de l'élimination des médicaments périmés.

d) La Directive Cadre Eau

L'objectif de la Loi Cadre sur l'eau (DCE), adoptée en 2000 par l'Union Européenne (Directive 2000/60/CE) est d'établir un cadre communautaire pour la protection des eaux intérieures de surface, de transition, côtières et souterraines, en vue de prévenir et de réduire leur pollution, de promouvoir leur utilisation durable, de protéger leur environnement, d'améliorer l'état des écosystèmes aquatiques et d'atténuer les effets des inondations et des sécheresses.

Un des buts est d'améliorer la qualité chimique des eaux en inversant, là où c'est nécessaire, la tendance à la dégradation de la qualité des eaux souterraines, et, pour les eaux de surface, en réduisant progressivement les rejets les substances répertoriées comme "prioritaires", les rejets devant être supprimés progressivement pour les substances répertoriées comme "prioritaires dangereuses". L'objectif est d'atteindre "le bon état des eaux et des milieux " d'ici 2015. En application de la directive cadre sur l'eau, une première liste révisable de 33 substances a été adoptée (annexe X définies par la décision 2455/2001) comprenant des métaux, des pesticides, des hydrocarbures. Cette liste est révisable tous les 4 ans, en fonction des avancées dans les études environnementales et écotoxicologiques, et le cas de certaines substances pharmaceutiques pourrait alors être reconsidéré.

I-8 Programmes de recherche

Durant ces dernières années, plusieurs programmes de recherche, portant sur la question des médicaments humains et vétérinaires dans l'environnement ont été financés par la commission Européenne ou dans le cadre de programmes nationaux. Ces programmes ont pour objectif d'apporter des connaissances nouvelles sur la présence et le devenir de ces produits dans l'environnement terrestre et aquatique, sur leurs effets sur les écosystèmes ainsi que sur les technologies d'élimination.

a) Programmes de recherche européens

Le programme ERAPHARM a pour objectifs l'amélioration des connaissances existantes et le développement de procédures pour l'évaluation du risque environnemental des produits pharmaceutiques à usage humain et vétérinaire par l'investigation des voies d'exposition non étudiées de l'environnement aquatique et terrestre et des facteurs et des processus affectant le devenir des substances pharmaceutiques dans les sols, les sédiments et les eaux superficielles. A terme, il devrait permettre la modélisation du devenir et le développement d'un système d'évaluation fondée sur des scénarios d'exposition. (www.erapharm.org).

Le programme ERAVMIS (Environmental Risk Assessment of Veterinary Medicines in Slurry), dans le cadre du 5^{ème} PCRD (Programme-cadre de recherche et de développement de la Communauté européenne, contrat N°. EVK1-CT-1999-00003) a pour objectif de développer des scénarii d'évaluation des risques de présence de résidus de produits vétérinaires dans les boues (slurry). Ces scénarii intègrent des informations concernant les pratiques vétérinaires et agricoles, les différences géographiques, géologiques et climatiques rencontrées en Europe. (www.silsoe.cranfield.ac.uk/ecochemistry/eravmis/).

Le programme POSEIDON a permis l'évaluation des technologies d'élimination des produits pharmaceutiques et des produits de soins personnels dans les eaux usées et les systèmes de potabilisation afin d'améliorer le recyclage indirect de l'eau potable. (www.eu-poseidon.com).

Le programme REMPHARMAWATER s'est orienté selon 2 axes. D'une part l'étude a porté sur l'identification et la quantification des composés présents dans les effluents et les boues de stations d'épuration de 4 pays (Italie, Grèce, Suède et France), leur devenir dans la station selon les traitements biologiques appliqués et leur devenir dans l'environnement en fonction des différents facteurs de dégradation (biotiques et abiotiques). D'autre part, cette étude s'est focalisée sur l'évaluation de l'impact écotoxicologique de ces produits pharmaceutiques trouvés dans les effluents sur des organismes biologiques (algues, invertébrés, poissons) (cds.unina.it/rmarotta/index.html).

Le programme SWIFT-WFD a pour objectifs l'élaboration d'outils de contrôle permettant de valider les méthodes de screening de la qualité de l'eau.

Les exigences en matière de surveillance de qualité de l'eau, liées à la mise en place de la Directive Cadre sur l'Eau dépendent directement des techniques disponibles capables de fournir des données fiables à un coût raisonnable. Le développement et la validation de méthodes de screening jouent un rôle clé, dans le cadre l'application de la Directive Européenne, pour le contrôle de la qualité chimique et biologique de l'eau. Ces méthodes de screening sont complémentaires

des analyses classiques de laboratoire. Par ailleurs, la Directive Cadre sur l'Eau (WFD : Water Framework Directive) constitue un outil performant de gestion des ressources en eau, si et seulement si, les données fournies sont de qualité comparable. (www.swift-wfd.com).

b) Programmes de recherche français

Les initiatives françaises restent plus limitées et ne sont généralement pas spécifiques aux substances pharmaceutiques.

Le Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable a financé une étude nationale, dans le cadre du Programme National d'Ecotoxicologie (PNETOX), intitulée PNETOX ENIMED (Effets Non Intentionnels des MEDicaments). Il s'agit d'une évaluation, en France, de l'impact des rejets de médicaments dans l'environnement avec pour objectif d'identifier et quantifier des substances représentatives de certaines classes pharmaceutiques dans des stations d'épuration puis d'évaluer les effets potentiels de ces substances sur des organismes non ciblés. (www.ecologie.gouv.fr).

Le programme SEINE AVAL initié par l'agence de l'eau Seine Normandie s'inscrit comme une étude multidisciplinaire en favorisant la recherche appliquée. Le programme scientifique Seine Aval souhaite faciliter la compréhension du fonctionnement de l'estuaire et aider à la prise de décisions publiques. Il constitue aujourd'hui l'un des outils principaux des acteurs et décideurs du "plan de gestion globale" impulsé en estuaire de Seine.

Dans ce programme un projet étudiant les nouveaux contaminants a été développé afin d'évaluer la potentielle contamination de cet estuaire soumis à une forte pression anthropique. (<http://seine-aval.crihan.fr/>).

A l'instar du programme SEINE AVAL existe le programme MEDICIS pour la Méditerranée, initié plus récemment. L'étude de la contamination par les médicaments intervient dans le cadre de deux actions : ARDECO (Apports régionaux de contaminants) et METROC (Apports des métropoles en contaminants). L'objet de l'action METROC est d'identifier l'état de la contamination chimique autour de la grande métropole marseillaise en vue de caractériser les dépôts sédimentaires, et de pouvoir ainsi localiser les limites géographiques au-delà desquelles la plupart des contaminants atteignent le bruit de fond rencontré en Méditerranée côtière. L'action ARDECO se focalise sur l'évaluation des apports des différentes sources identifiées pour le milieu marin : stations d'épuration, fleuves côtiers, rejets industriels, déversoirs d'orage, rejets portuaires... (www.ifremer.fr/medicis).

Les nouveaux programmes de recherche français de l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) s'intéressent eux aussi aux composés pharmaceutiques. Dans l'ANR "Ecotechnologies et Développement Durable" (PRECODD), le programme AMPERE (Analyse de Micropolluants Prioritaires et Emergents dans les Rejets des Eaux Superficielles) a été financé et piloté par le CEMAGREF (Centre National du Machinisme Agricole, du Génie Rural, des Eaux et Forêts), (www.gip-anr.fr).

II- Les Techniques analytiques développées

Les premières mesures de composés ont été développées dans un premier temps dans le domaine industriel, pour suivre la pureté des composés lors de leur fabrication, et dans le domaine biomédical, pour suivre les concentrations en composés au cours des thérapies ou en cas d'empoisonnement. Le développement de dosages dans des matrices de plus en plus complexes, à des concentrations de plus en plus faibles a nécessité l'utilisation de techniques de pointe, utilisant les dernières technologies disponibles. Les applications médicales comme environnementales ont entraîné la miniaturisation et l'automatisation des analyses. Le chapitre suivant s'attache à présenter les principales techniques employées pour ces mesures, leur spécificité, leurs avantages et leurs inconvénients, aussi bien en ce qui concerne les techniques d'extraction que les techniques d'analyse.

II-1 Techniques d'extraction

Les techniques d'extraction ont évolué, de l'extraction liquide-liquide, fastidieuse et encombrante, vers des techniques d'extraction liquide-solide : l'extraction sur cartouche (Heberer, 2002b ; Hirai *et al.*, 1997 ; Hirsch *et al.*, 1999 ; Ternes *et al.*, 1998a ; Ternes *et al.*, 1998b) progressivement miniaturisée et automatisée et les techniques dites de micro-extraction, telles que la micro-extraction en phase liquide (He et Lee, 1997 ; Ma *et al.*, 2006) et la micro-extraction en phase solide (Theodoridis *et al.*, 2000 ; Ulrich, 2000). Dernièrement, de nouvelles technologies ont été développées, concernant l'extraction passive des composés du milieu.

II-1-1 : L'extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est une des techniques d'extraction les plus employées jusqu'alors, surtout dans le domaine biomédical, pour les dosages dans les matrices biologiques liquides : plasma, sang, urine...

Cette technique permet d'extraire les composés d'une matrice aqueuse vers un solvant organique non miscible à l'eau par agitation dans une ampoule à décanter. Cette technique, très couramment utilisée, est certes simple à mettre en œuvre mais ne permet pas une automatisation de l'extraction et est très consommatrice de solvants organiques. De plus l'extraction liquide-liquide induit de nombreuses manipulations (agitation, reconcentration, évaporation), pouvant entraîner de faibles rendements par pertes de composés et des risques de contamination de l'échantillon (Alpendurada, 2000).

II-1-2 : La Micro-Extraction en Phase Liquide (LPME)

Adaptée de l'extraction liquide-liquide, cette nouvelle technique se décline selon 2 axes :

-Technique de la microgoutte (single liquid drop) : une goutte de phase organique est maintenue grâce à une seringue dans un grand volume d'échantillon aqueux (Ma *et al.*, 2006). Après extraction, la goutte organique peut être directement analysée.

-Technique de la membrane à liquide non supporté (unsupported liquid membrane) : une phase aqueuse est séparée de la phase aqueuse donneuse par une couche de solvant organique. Les analytes transitent de l'échantillon (aqueux) vers la phase réceptrice (aqueuse) par l'intermédiaire d'une phase organique déposée entre les deux.

-Technique de membrane à liquide supporté (supported liquid membrane) : elle repose sur le même principe que la précédente mais les différentes phases sont physiquement séparées par une membrane polymérique poreuse, sous la forme d'un film ou d'une fibre creuse. L'échantillon est en flux continu, la phase aqueuse réceptrice peut être stagnante ou non et la phase organique est stagnante.

Cette technique, encore très expérimentale, est encore à ce jour au stade de développement, surtout en ce qui concerne les problèmes d'automatisation et de reproductibilité. De plus, des études comparatives (Quintana *et al.*, 2004) ont déjà montré une capacité d'extraction nettement moins efficace que pour la SPE ou la SPME.

II-1-3 : L'extraction en phase solide (SPE :Solid Phase extraction)

L'extraction en phase solide permet d'extraire les composés d'intérêts de matrices liquides par adsorption des composés sur une phase. Une fois déposés, les composés sont récupérés par élution avec un solvant organique dont l'affinité avec les molécules adsorbées est suffisante pour les décrocher de la phase et ainsi les éluer. L'intérêt principal de cette technique d'extraction est la reconcentration des composés d'intérêt d'un volume initial pouvant aller jusqu'à plusieurs litres d'eau dans un extrait organique de quelques millilitres de solvant.

Cette technique a été développée à la fois dans le domaine biomédical, permettant une automatisation des analyses mais aussi dans le domaine environnemental, pour pouvoir traiter des volumes d'échantillons plus importants, ce qui est nécessaire pour les eaux naturelles montrant des teneurs de l'ordre du ng.l^{-1} au $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Le nombre de phases disponibles est de plus en plus important, avec les progrès effectués dans le domaine de la chimie de synthèse. Les premières phases historiquement utilisées sont les phases de silice greffées C18. Peu sélectives, elles permettent l'extraction d'un très grand nombre de composés, dont les substances pharmaceutiques. Les solvants utilisés sont très nombreux, le plus couramment utilisé car le plus généraliste restant le méthanol (Ternes, 2001b). Cette phase intéressante par sa large gamme de composés retenus, pose de ce fait un problème de manque de spécificité : beaucoup de composés interférents sont eux aussi retenus et rendent l'utilisation pour des matrices complexes (effluents...) difficile. Leur faible capacité de rétention et leur colmatage rapide compliquent l'application à de grands volumes ou à des échantillons chargés en matière organique.

Rapidement, de nouvelles phases polymériques (Tableau I- 13) ont été fonctionnalisées par des groupements polaires, synthétisées de manière à améliorer le contact avec l'échantillon aqueux pendant la percolation en mettant en œuvre des caractéristiques mixtes hydrophiles et hydrophobes, démontrant une meilleure mouillabilité et une plus grande sélectivité. La sélectivité peut de plus être optimisée par exemple en jouant sur le pH de l'échantillon et la nature et le pH des solvants. L'ajout d'étapes de rinçage des cartouches et d'élution des interférents permet d'augmenter la spécificité et par la même, la sensibilité de cette technique d'extraction.

| Nom commercial | structure | | |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Oasis HLB | N-vinylpyrrolidone | Divinylbenzène |
| Oasis MCX | N-vinylpyrrolidone | Divinylbenzène | -SO ₃ H |
| DVB, Envi-Chrom P | styrène | Divinylbenzène | |

Tableau I- 13 : Phases polymériques utilisées pour les cartouches SPE.

Les phases et les solvants utilisés pour l'extraction des composés pharmaceutiques sont très nombreux et varient selon les classes chimiques à mesurer. Pour les phases ce sont les classiques C18 et les adsorbants polymériques OASIS HLB et MCX qui sont devenus les plus couramment employés tandis que le méthanol, l'acétate d'éthyle et l'acétone restent les solvants les plus couramment utilisés (Golet *et al.*, 2001 ; Löffler et Ternes, 2003 ; Öllers *et al.*, 2001).

Ces cartouches sont utilisées pour les étapes d'extraction, mais pour les matrices les plus complexes, une seconde étape de purification est parfois nécessaire. Dans ce cas, ce sont des cartouches type NH₂, silice ou plus récemment PSA (phase éthylènediamine-N-propyl, échangeuse d'anions plus forte que NH₂, utilisée pour les composés polaires trop retenus sur les NH₂ comme les pesticides (Kaihara *et al.*, 2000)) qui sont employées. Leur utilisation est encore anecdotique pour les composés pharmaceutiques puisque les dosages dans les matrices solides (particules, sédiments, tissus biologiques) sont encore peu nombreux pour les études environnementales. Les méthodes analytiques employées à ce jour comme par exemple la LC/MS/MS (présentées dans le chapitre « techniques d'analyses ») sont extrêmement sensibles mais soumises aux problèmes d'interférences matricielles (Metcalf *et al.*, 2003) ce qui devrait favoriser le développement de ces étapes de purification supplémentaires.

II-1-4 : La Micro-Extraction en Phase Solide (SPME : Solid Phase Micro-Extraction)

Découlant de la SPE, la micro-extraction en phase solide est une technique qui consiste en l'adsorption ou l'absorption des composés sur une fibre, puis à leur désorption, directement dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse ou par l'intermédiaire d'une chambre de vaporisation pour la chromatographie en phase liquide (Kumazawa *et al.*, 2000 ; Volmer et Hui, 1998).

Il existe plusieurs types de fibres de silice fondue, enduites de différents films de différentes épaisseurs. Le Tableau I- 14 présente la grande diversité de fibres présentes actuellement sur le marché. Selon leurs propriétés elles sont adaptées aux différents composés en fonction de leur hydrophobicité, de leur volatilité... (Notes d'application Supelco, <http://www.sigmaaldrich.com>).

| Enrobage | Epaisseur de film (µm) |
|--|------------------------|
| Polydimethylsiloxane (PDMS) | 100 - 30 - 7 |
| Polymethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) | 65 - 60 |
| Polyacrylate (PA) | 85 |
| Carboxen®/ Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) | 75-85 |
| Carbowax®/Templated resin (CW/TPR) | 50 |
| Carbowax®/Divinylbenzene (CW/DVB) | 65-70 |
| Divinylbenzene/Carboxen®/PDMS (DVB/CAR/PDMS) | 50/30 |

Tableau I- 14 : Présentation des différentes fibres commercialisées (SUPELCO).

Les fibres PDMS sont non polaires, plus adaptées aux composés lipophiles. Au contraire, les fibres PA, CW-DVB et CW-TPR sont des fibres polaires plus utilisées pour les analytes polaires comme les pesticides (Möder *et al.*, 1999) Les fibres mixtes PDMS-DVB, DVB/CAR/PDMS, CAR/PDMS ont un comportement intermédiaire (Notes SUPELCO n° 10942, <http://www.sigmaaldrich.com>).

L'utilisation des fibres dépend aussi de la gamme de poids moléculaires des analytes d'intérêt qui va déterminer leur volatilité (Figure I- 5).

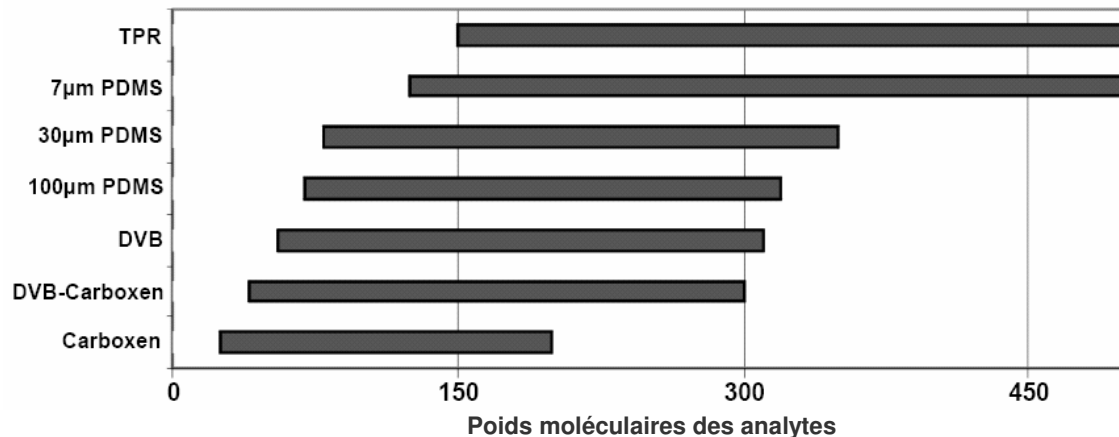


Figure I- 5: Gamme de performance des fibres en fonction du poids moléculaire des analytes. (Notes SUPELCO n° 10942, <http://www.sigmaaldrich.com>).

La SPME est une technique rapide, nécessitant peu de matériel et très sélective qui peut être appliquée à de nombreux milieux : aussi bien l'air, les eaux de surface que les effluents de station d'épuration, les sols

Elle est utilisée pour de très nombreux polluants de l'environnement : polychlorobiphényles (Pedro Landín, 2001), composés phénoliques, hydrocarbures aromatiques polycycliques (Juergen, 2000) et plus spécifiquement les composés volatils [BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylène) (Potter et Pawliszyn, 1992), composés organiques volatils (Nilsson *et al.*, 1998), arômes...].

L'application aux composés pharmaceutiques a jusqu'ici été plus développée dans le domaine de la toxicologie biomédicale, avec le dosage dans le sang, le plasma et les urines (Hall et Brodbelt, 1997 ; Kumazawa *et al.*, 1997 ; Salgado-Petinal *et al.*, 2005 ; Ulrich, 2000). La SPME est aussi utilisée dans le domaine du développement thérapeutique, pour comprendre le mode de fonctionnement de certaines substances, comme les interactions entre substances médicamenteuses et protéines plasmatiques (Theodoridis *et al.*, 2000).

D'un point de vue environnemental, l'utilisation de la SPME est plus récente, suite aux développements de techniques analytiques de plus en plus performantes. En effet, le principe de la SPME nécessite de travailler sur un volume d'échantillon réduit, ce qui, dans le cas de milieux faiblement contaminés, pose un problème de seuil de détection. Quelques études commencent à utiliser cette technique pour les échantillons environnementaux tout en notant des difficultés compte tenu des limites de détection. Mais les avancées dans le domaine analytique avec l'utilisation notamment de la spectrométrie de masse en tandem, permettent aujourd'hui d'envisager la SPME comme une technique d'avenir, comme le montrent les limites de quantification présentées dans le Tableau I- 15.

| Composés | Classe thérapeutique | LQ (ng.l ⁻¹) | Appareillage | Références |
|--------------------|----------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| Ac. tolfénamique | AINS | 290 | GC/MS/MS | (Carpinteiro <i>et al.</i> , 2004a) (Rodriguez, 2004) |
| | | 12 | GC/MS | |
| Diclofénac | | 440 | GC/MS/MS | |
| | | 20 | GC/MS | |
| Ibuprofène | | 430 | GC/MS/MS | |
| | | 18 | GC/MS | |
| Kétoprofène | | 40 | GC/MS | |
| Naproxène | 360 | GC/MS/MS | (Lamas <i>et al.</i> , 2004) | |
| | 15 | GC/MS | | |
| Citalopram | ISRS | 15 | | GC/MS |
| Fluoxétine | | 17 | | GC/MS |
| Fluvoxamine | | 75 | | GC/MS |
| Sertraline | | 17 | | GC/MS |
| Denlafaxine | | 27 | GC/MS | |
| Diéthylstilbestrol | Stéroïdes | 6,9 | GC/MS/MS | (Mitani <i>et al.</i> , 2005) (Carpinteiro <i>et al.</i> , 2004b) |
| | | 0,2 | GC/MS/MS | |
| Ethinylœstradiol | | 10,5 | GC/MS/MS | |
| | | 3 | GC/MS/MS | |
| Mestranol | | 3 | GC/MS/MS | |
| Oestradiol | | 7,4 | GC/MS/MS | |
| | | 0,7 | GC/MS/MS | |
| Oestriol | | 11,7 | GC/MS/MS | |
| Oestrone | | 2,7 | GC/MS/MS | |
| | 1 | GC/MS/MS | | |
| Ephédrine | Bronchodilatateur | 3000 | CE/UV * | (Fang <i>et al.</i> , 2006) |

Tableau I- 15 : Limites de quantification obtenues en SPME (échantillons naturels).

* : Electrophorèse Capillaire / Détecteur UV

II-1-5 : Les systèmes intégratifs

Issue de la technologie de l'extraction en phase solide, un nouveau type de produits est actuellement en plein développement. Le principe, découlant du phénomène d'affinité entre phase adsorbante et composés, est plus un système d'échantillonnage qu'un mode d'extraction. Les systèmes d'échantillonnage sont disposés dans le milieu aqueux où ils vont capter les molécules et les retenir sur la phase adsorbante sur l'ensemble de la durée de l'exposition, ce qui va concentrer les composés par rapport aux concentrations réelles du milieu. De plus, ce mode d'échantillonnage permet d'avoir une vision de la contamination d'un milieu, intégrée sur une période de temps (correspondant au temps d'immersion de l'outil) et non pas uniquement à un instant donné, comme pour l'échantillonnage discret de l'eau, par définition ponctuel.

Il existe différents types d'échantillonneurs intégratifs. Les SPMD (Semi-Permeable Membrane Devices) ont été créées par l'USGS (United State Geological Survey) dans les années 90, pour l'étude des contaminants apolaires : polychlorobiphényles (PCB) (Prest *et al.*, 1995b), hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Prest *et al.*, 1995a), pesticides organochlorés (Petty *et al.*, 1995) ...

Ces outils consistent en un tube fait de polyéthylène de faible densité rempli d'une substance lipidique de haut poids moléculaire, le plus souvent de la trioléïne. Seuls les composés dissous et non ionisés diffusent au travers de la membrane pour s'accumuler dans la trioléïne s'ils possèdent un coefficient de partage octanol /eau (log Kow) supérieur à 3. Ces outils sont applicables aussi bien en milieu aqueux qu'en milieu atmosphérique (Bennett et Metcalfe, 1996 ; Prest et Jacobson, 1995).

Les SPMD, qui sont les premiers outils à avoir été créés (Bennett et Metcalfe, 1996 ; Prest et Jacobson, 1995 ; Prest *et al.*, 1995b), sont de ce fait les plus avancés au point de vue des recherches et des développements applicatifs, notamment avec l'utilisation de composés de référence introduits dans la trioléïne pour permettre de suivre et de quantifier pour chaque échantillonneur le taux d'adsorption une fois l'échantillonneur introduit dans le milieu (Booij *et al.*, 2002 ; Booij *et al.*, 2003).

A côté de ces SPMD adaptées aux composés hydrophobes, il existe des outils spécifiques pour l'adsorption des contaminants organiques plus polaires : les POCIS (Polar Organic Compounds Integrative Sampler) (Alvarez, 1999)

Les POCIS sont constituées d'une phase adsorbante solide retenue entre deux disques de polyéthersulfone (PES). Le schéma de principe est montré dans la Figure I- 6. Il existe à ce jour 2 types de phases : une pour les pesticides (un mélange de 3 phases : Isolute ENV +, Polystyrène/Divinylbenzène et Ambersorb), et une plus spécifique des substances pharmaceutiques (Oasis HLB®) (Alvarez *et al.*, 2004a ; Alvarez *et al.*, 2004b ; Alvarez *et al.*, 2005).

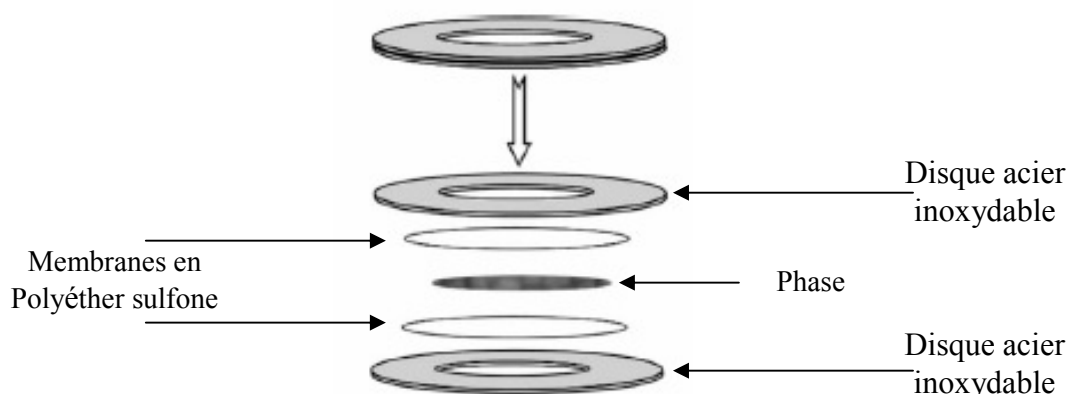


Figure I- 6 : Schéma de principe du POCIS.

Les avantages potentiels de ces nouveaux procédés sont multiples. Comme expliqué précédemment, l'intérêt de ces nouveaux outils réside dans leur capacité à adsorber les composés sur une grande période de temps ce qui permet de s'affranchir de l'aspect ponctuel des prélèvements discrets dans le milieu : la quantité présente sur le préleveur correspond à la moyenne des concentrations sur la durée totale d'exposition.

De plus, les propriétés accumulatrices de ces outils permettent d'envisager la détection de produits présents dans le milieu à des concentrations inférieures aux limites de détection analytiques dans le cas des prélèvements ponctuels, comme les métabolites de certains produits, ou les stéroïdes, souvent présents dans l'environnement à des concentrations inférieures au ng.l^{-1} , non détectables mais identifiées comme toxiques (Petty *et al.*, 2004). L'analyse ne portera en effet pas sur quelques litres d'eau mais sur la quantité accumulée de produits au cours

du temps et donc correspondant à des dizaines voir des centaines de litres d'eau, pour une faible quantité de phase.

Ainsi, trente deux contaminants ont été détectés par l'utilisation de ces POCIS dans une rivière du New Jersey alors que l'échantillonnage ponctuel ne permettait d'en détecter qu'entre neuf et vingt-quatre, montrant l'intérêt de ce type d'échantillonnage (Alvarez *et al.*, 2005). Ces outils, très novateurs, sont encore en développement, car ils nécessitent encore des études en laboratoire, pour comprendre les phénomènes d'adsorption ainsi que le rôle des facteurs physico-chimiques qui vont les modifier. L'objectif des études en laboratoire est notamment de pouvoir prévoir, en fonction des conditions du milieu, le taux d'échantillonnage (ou Rs) pour chaque composé, correspondant au nombre de litres d'eau épurés de composés par unité de temps, afin de pouvoir utiliser ces échantillonneurs comme outils quantitatifs (Alvarez, 1999).

Hormis ces deux types d'échantillonneurs passifs, il existe un grand nombre d'autres outils, développés par différents laboratoires et organismes : rien que pour l'étude des composés organiques, on ne dénombre pas moins de 20 types différents, couvrant l'ensemble des composés organiques présents dans l'environnement, en fonction de leur degré d'hydrophobicité (Vrana *et al.*, 2005)

II-1-6 : Le dosage dans les phases solides

Seules quelques rares études se sont intéressées aux substances pharmaceutiques dans les matrices solides et ont donc développé des protocoles spécifiques. La principale difficulté réside dans l'obtention d'un extrait organique purifié, sans trop de composés interférents provenant de la matrice et gênant l'analyse des échantillons.

Les protocoles développés comportent généralement une première étape d'extraction liquide/solide, soit par fluide supercritique (Pedersen *et al.*, 2005), soit par ultrasons (Löffler, 2005), soit plus récemment par ASE (Extraction assistée par solvant chauffé sous pression) (Mimeault *et al.*, 2005). Cette étape est parfois suivie d'une extraction en phase solide, jouant le rôle d'étape de purification avant l'analyse.

Le Tableau I- 16 recense les principales méthodes développées à ce jour pour l'extraction des matrices sédimentaires. L'extraction assistée par solvant chauffé sous pression semble donner les meilleurs résultats. Ce mode d'extraction, à la fois doux (pas de dégradation des analytes), efficace (association pression et léger chauffage) et automatique (passeur de 24 échantillons) présente un bon potentiel de développement.

L'extraction assistée par micro-ondes (Budzinski *et al.*, 2000 ; Eskilsson et Erland, 2000 ; Letellier *et al.*, 1999) souvent utilisée en remplacement de l'extraction par Soxhlet, longue et fastidieuse, n'a pas été appliquée pour l'extraction des substances pharmaceutiques dans les matrices solides.

| | Composés | Limite de détection (µg/kg) | Taux de récupération % | RSD % |
|--|---|-----------------------------|------------------------|-------|
| Extraction par fluide supercritique, GC-MS (Pedersen <i>et al.</i> , 2005) 5 g d'échantillon dopé | Caféine | 120 | 20 | 31 |
| | Carbamazépine | 80 | 108 | 13 |
| | Diazépam | 200 | 44 | 39 |
| | Fénofibrate | 160 | 69 | 8 |
| | Gemfibrozil | 80 | 17 | 37 |
| | Ibuprofène | 160 | 24 | 11 |
| | Stéroïdes hormonaux | 80-680 | 18-61 | 24-44 |
| Ultrasons, Evaporation SPE, LC-MS-MS (Löffler, 2005) 50 g sédiment dopé | Acide clofibrigue Ibuprofène et métabolites | | 40 - 102 | |
| | Carbamazépine Diazépam, Oxazépam | | 41 - 102 | |
| | Paracétamol | | 95 | |
| ASE, SPE, LC-MS-MS (Miao <i>et al.</i> , 2005) | Carbamazépine | 0,2 | 91 | 6 |
| | Carbamazépine et métabolites | 0,1 | 82-88 | 4-78 |
| | Caféine | 0,5 | 82 | 5,6 |

Tableau I- 16 : Méthodes et rendements obtenus sur matrices solides.

II-2 Techniques d'analyses

Associés à la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou à la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) en tant que techniques de séparation, il existe de nombreux types de détecteurs pouvant permettre la détection des substances pharmaceutiques dans les échantillons environnementaux. On peut considérer les techniques spectroscopiques (Ultraviolet, détecteur à barrette de diode, spectrofluorimétrie ...) mais aussi, actuellement en plein essor, les techniques de spectrométrie de masse, simple ou en tandem. Ce chapitre s'attache à décrire ces principales techniques, leurs caractéristiques, leur applicabilité aux échantillons naturels, mais aussi leurs limites.

II-2-1 : Séparation par Chromatographie Liquide Haute Performance

Les composés pharmaceutiques, composés polaires à très polaires, sont très efficacement séparés par chromatographie liquide haute performance (HPLC). La chromatographie est une technique dans laquelle les constituants d'un mélange se séparent en fonction des vitesses auxquelles ils sont entraînés à travers une phase stationnaire par une phase mobile.

Selon la phase stationnaire et la phase mobile choisies, les solutés sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne. De ce phénomène appelé rétention, il résulte que les solutés injectés se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés.

a) Colonnes chromatographiques

Il existe de nombreux types de colonne chromatographiques, remplies de différentes phases, développées selon plusieurs paramètres :

Chromatographie d'exclusion :

En jouant sur le diamètre des billes contenues dans la colonne, on peut plus ou moins ralentir les grosses molécules. Les plus petites, qui peuvent passer entre les billes migrent rapidement. A l'inverse, si on prend des billes poreuses, les petites molécules pénètrent dans la bille et y sont retardées alors que les plus grosses qui ne peuvent pas y pénétrer passent par la voie directe entre les billes et donc plus vite.

Chromatographie échangeuse d'ions :

En prenant des billes chargées, les molécules qui portent une charge opposée vont se fixer, les autres vont migrer. Quand toutes les molécules sont fixées, on augmente progressivement la force ionique du solvant, les molécules vont se séparer des billes les unes après les autres, chaque molécule se sépare selon sa propre force ionique ; les molécules elles vont donc se présenter indépendamment en fin de colonne.

Chromatographie d'affinité :

Les billes portent un anticorps greffé à leur surface. Seules les molécules, peu nombreuses, reconnues par cet anticorps, vont se fixer sur la bille. Les autres vont traverser la colonne. Pour désorber la molécule, il suffit d'augmenter la force ionique du solvant. On peut procéder de façon inverse pour isoler un anticorps, en disposant de billes greffées avec les molécules reconnues par l'anticorps.

Chromatographie de partage :

La chromatographie de partage est la technique la plus courante et permet la mise en oeuvre de deux types de phase stationnaire : soit une phase stationnaire normale (polaire) qui nécessite l'utilisation d'une phase mobile peu polaire (hydrocarbures), soit une phase stationnaire inverse ou greffée (non polaire) qui nécessite l'utilisation d'une phase mobile polaire (eau, méthanol, acétonitrile, tétrahydrofurane...). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.

Exemples de phases stationnaires :

- amine : - $(\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2$ (polarité forte)
- nitrile : - $(\text{CH}_2)_n - \text{C} \equiv \text{N}$ (polarité moyenne)
- alkyle : - $(\text{CH}_2)_7 - \text{CH}_3$ (apolaire) "colonne C8"
- alkyle : - $(\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3$ (apolaire) "colonne C18"
- phényle : - $(\text{CH}_2)_n - \text{C}_6\text{H}_5$ (apolaire)

Pour l'étude des substances pharmaceutiques, ce sont les phases inverses qui ont été utilisées (Van Bocxlaer *et al.*, 2000 ; Zwiener et Frimmel, 2004a).

b) Techniques de détection

Très fréquemment utilisés dans les dosages biomédicaux, les détecteurs spectroscopiques (spectrométrie UV, spectrofluorimétrie, détecteur à barrette de diode) ne sont pas assez sensibles pour atteindre les niveaux environnementaux (du ng.l^{-1} au $\mu\text{g.l}^{-1}$), comme le montrent les limites de détection du couplage présentées dans le Tableau I- 17.

| Composés | Ld DAD (ng.l ⁻¹) | Ld FLUO (ng.l ⁻¹) | Ld UV (ng.l ⁻¹) | Références |
|---------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---|
| Caféine | 30 | - | - | (Santos <i>et al.</i> , 2005 ; Sun <i>et al.</i> , 2003) |
| Carbamazépine | 20 | - | - | |
| Diclofénac | 140 | - | 3 000 | |
| Ibuprofène | 500 | 120 | 4 280 | |
| Kétoprofène | 10 | - | 1150 | |
| Naproxène | 10 | 30 | 7500 | |

Tableau I- 17 : Limites de détection des techniques spectroscopiques exprimées en ng.l⁻¹ d'échantillon. DAD : Détecteur à barrette de diode, FLUO : Spectrofluorimètre ; UV : Ultraviolet

La spectrométrie de masse est actuellement le mode de détection le plus utilisé dans les études environnementales (Brossa *et al.*, 2005 ; Cahill *et al.*, 2004 ; Castiglioni *et al.*, 2005 ; Gros *et al.*, 2006 ; Hernando *et al.*, 2004 ; Kovalczuk *et al.*, ; Mallet *et al.*, 2002 ; Mezcua *et al.*, 2006 ; Niessen, 1998 ; Roadcap *et al.*, 2003 ; Stolker *et al.*, 2004 ; Van Bocxlaer *et al.*, 2000 ; Zwiener et Frimmel, 2004b). Cette application est développée spécifiquement dans le chapitre II-2-3.

II-2-2 : Séparation par Chromatographie en Phase Gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est basée sur le partage de l'analyte entre une phase gazeuse mobile et une phase liquide immobilisée sur la surface d'un support inerte : la colonne. Le gaz porteur est un gaz inerte, typiquement l'hélium.

La chromatographie en phase gazeuse reste l'outil de prédilection pour le dosage des composés pharmaceutiques notamment grâce à la capacité importante de séparation obtenue grâce aux colonnes chromatographiques.

a) Colonnes chromatographiques

Les colonnes les plus couramment utilisées sont les colonnes creuses, appelées « colonnes capillaires ». Généralement en silice fondue, leur paroi interne est recouverte (par dépôt ou par greffage) d'une phase stationnaire d'épaisseur régulière (de 0,5 à 5 µm) ; elles sont de longueur variable (généralement de 5 à 60 m).

Les phases stationnaires apolaires (par ex. les phases 100% diméthylpolysiloxane) séparent le plus souvent les composés en fonction de leur point d'ébullition. Les composés typiquement séparés par ce type de phase sont les hydrocarbures linéaires (n-alcanes). En augmentant la polarité de la phase, en introduisant par exemple des groupes phényles et/ou cyanopropyles, la séparation est fortement influencée par les différences entre les moments dipolaires et par le transfert de charge (par ex. pour les phases de 5 – 50 % diphénylpolysiloxane). Les colonnes 5 % diphénylpolysiloxane, représentent un compromis permettant d'analyser de larges gammes de composés, y compris les composés pharmaceutiques.

b) Détecteurs associés

En ce qui concerne les détecteurs, si des détecteurs spécifiques sont parfois utilisés, comme le détecteur à capture d'électrons (ECD) pour le dosage de la fluoxétine, de la félodipine (Ahnoff, 1984), ou des benzodiazépines (Guan *et al.*,

1999 ; Levasseur *et al.*, 1985), l'utilisation de la spectrométrie de masse est largement dominante. Elle permet d'obtenir un outil à la fois quantitatif et qualitatif, autorisant des évaluations environnementales globales. Les couplages incluant la spectrométrie de masse sont développés dans le chapitre II-2-3.

II-2-3 : Couplage aux détecteurs de spectrométrie de masse

a) Détection par spectrométrie de masse simple

La spectrométrie de masse est un détecteur semi-universel : toute substance ionisable pourra être détectée. Ce détecteur a une très grande sensibilité et une gamme de linéarité de réponse de l'ordre de 10^3 (Tranchant, 1995). Le principe consiste dans une première étape à obtenir en phase gazeuse un ion moléculaire à partir d'une substance organique. Cet ion moléculaire va se fragmenter en différents fragments ionisés caractéristiques, puisque cette dissociation ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés, caractéristiques de la molécule. Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur. On obtient ainsi le spectre de masse de la molécule.

Fondamentalement, un spectromètre de masse comprend un système d'introduction de la substance (en l'occurrence le système chromatographique liquide ou gazeux), une source pour ioniser cette substance, un analyseur pour séparer les divers ions produits, un détecteur pour comptabiliser les ions et un système de traitement des données acquises.

b) Détection par spectrométrie de masse en tandem

Evolution de la spectrométrie de masse, la spectrométrie de masse en tandem est une méthode impliquant l'utilisation de plusieurs étapes d'analyse en masse. Les ions pénétrant dans le détecteur sont détectés et peuvent être sélectionnés dans le premier quadripôle (Q1), fragmentés dans le second par impact avec les molécules d'un gaz neutre (cellule de collision). Les ions produits (ions fils) sont enfin détectés dans le dernier quadripôle (Q3), globalement en mode de balayage ou spécifiquement en mode d'ions sélectionnés.

Il existe plusieurs modes d'utilisation de ces deux détecteurs en tandem selon les applications recherchées, comme le présente la figure 1-7. Le mode de balayage des ions fils (ou « daughter ») permet d'obtenir le spectre de fragmentation d'un ion sélectionné en Q1. Le mode de balayage des ions précurseurs permet de connaître l'ensemble des ions ayant produit un fragment sélectionné en Q3. Le mode de transitions sélectionnées (ou MRM, « multiple reaction monitoring mode ») correspond au mode SIM de la MS simple : il suit un fragment sélectionné provenant d'un ion parent particulier. Le mode fullscan est un mode de balayage aussi bien en Q1 qu'en Q3, sans aucune sélection.

Ce principe permet d'augmenter la sélectivité de l'analyse. Sans augmenter la sensibilité de l'appareillage, on peut ainsi abaisser les limites de détection analytiques en diminuant le bruit de fond et les interférences. La spectrométrie de masse en tandem a ainsi été fortement développée et utilisée pour l'étude des composés à l'état de traces, comme notamment les stéroïdes (Mitani *et al.*, 2005 ; Vanderford *et al.*, 2003), présents dans les écosystèmes à des concentrations souvent inférieures au ng.l^{-1} .

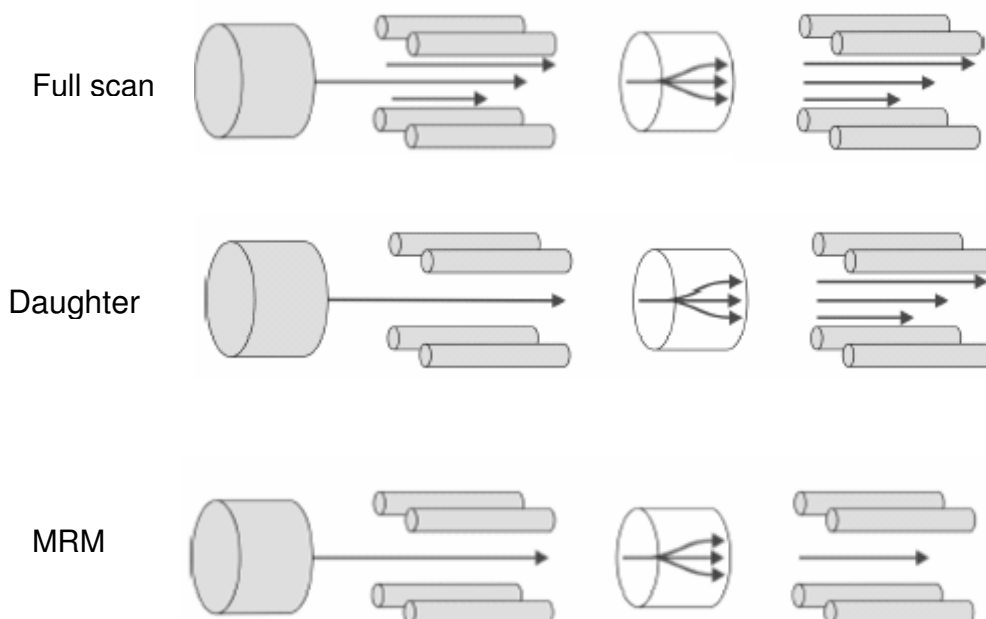


Figure I- 7 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem.

II-2-4 : Avantages et limites des couplages LC-MS et LC-MS-MS

a) Principes

Il existe différents types d'ionisation, plus ou moins adaptés à certains types de molécules.

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) :

C'est une technique d'ionisation en phase gazeuse. Elle est utilisée pour les composés moyennement polaires. L'échantillon en solution est nébulisé en fines gouttelettes, qui sont vaporisées dans un tube à haute température. Une haute tension est appliquée sur l'aiguille à la sortie du tube. Celle-ci crée une décharge qui provoque la formation d'ions multichargés, par une série de réactions chimiques avec les molécules de solvant et d'azote (gaz). Ces ions réagissent ensuite avec les molécules de l'échantillon et entre dans le détecteur de masse.

L'électrospray (ESI) :

Le processus électrospray est obtenu par l'application d'un champ électrique intense (106V/m) sur la solution d'électrolytes à analyser. Ce champ électrique va entraîner la polarisation du liquide et la séparation des charges positives et négatives. En mode d'ionisation positif (mode le plus couramment utilisé pour l'étude des biomolécules mis à part les acides nucléiques), le capillaire métallique chargé positivement va jouer le rôle d'anode, va attirer et neutraliser les charges négatives par oxydation de l'électrolyte, du solvant ou du capillaire métallique. Il va en résulter que les charges positives vont se concentrer à la pointe du capillaire. Le liquide va alors avoir tendance à s'allonger et former un cône appelé « le cône de Taylor ». Ce cône va s'étirer jusqu'à éclater en minces gouttelettes enrichies en ions positifs (Figure 1-8). En pratique l'électrospray standard est obtenu par l'infusion d'électrolytes à des débits compris entre 1 et 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ce phénomène est en règle générale assisté par un gaz coaxial (Gaz de nébulisation, en règle générale de l'azote) afin de stabiliser la production des gouttelettes.

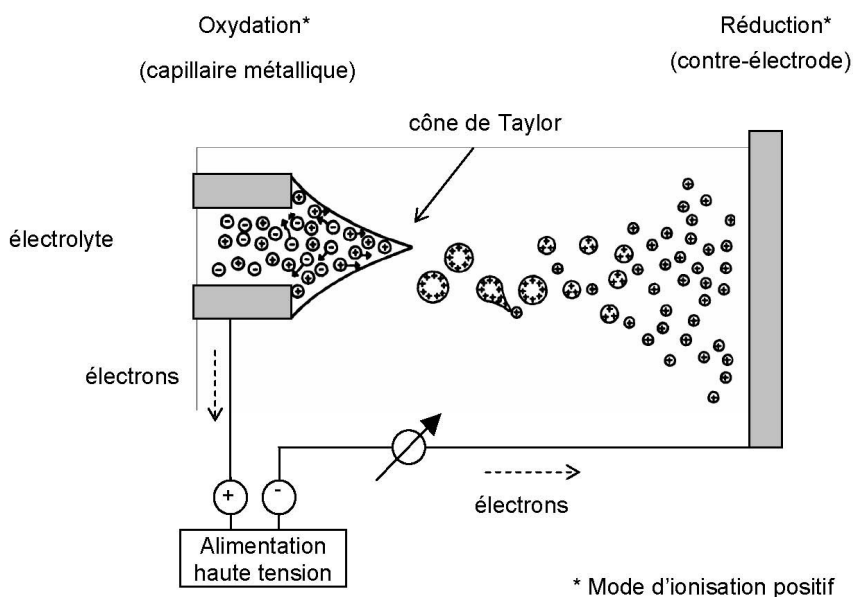


Figure I- 8: Principe de l'électrospray

L'électrospray est le mode d'ionisation le plus fréquemment utilisé pour l'étude des substances pharmaceutiques.

b) Avantages

L'utilisation de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse permet de faciliter la séparation des composés pharmaceutiques, polaires à très polaires tout en abaissant les limites de détection comparativement aux autres détecteurs. De plus, en utilisant ce type de couplage, la résolution chromatographique de l'HPLC n'est plus une contrainte. En effet, deux composés mal résolus peuvent être isolés grâce à la sélectivité de la masse.

c) Inconvénients

Toutefois, le couplage HPLC-MS nécessite de concilier le flux de la phase mobile en HPLC, qui est de l'ordre de 0,2 à 2 ml.min⁻¹, au vide poussé du spectromètre de masse. De plus, l'ionisation des macromolécules, des composés non volatils et très polaires pose problème.

Pour palier à ces difficultés, il faut augmenter la capacité de pompage au niveau de la source, éliminer le solvant de l'échantillon avant son introduction dans la chambre d'ionisation et réduire la taille des colonnes HPLC.

Dans certains cas, des phénomènes d'interférences matricielles limitent l'applicabilité de cette technique. L'effet matriciel est dû à un phénomène de compétition entre les ions des composés d'intérêts et les composants de la matrice (tissus biologiques, matière organique...) lors de l'étape de nébulisation et d'ionisation, conduisant à une extinction du signal (Metcalfé *et al.*, 2003). Ce phénomène (Figure I- 9) est plus important en HPLC-MS, à cause de l'étape de nébulisation nécessaire pour volatiliser l'échantillon après la séparation chromatographique.

Si l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem limite ce phénomène car on travaille en milieu plus dilué, il reste un obstacle encore important à l'utilisation de ces couplages, LC-MS ou LC-MS-MS pour les applications environnementales sur des matrices complexes (organismes, effluents de station d'épuration, boues...).

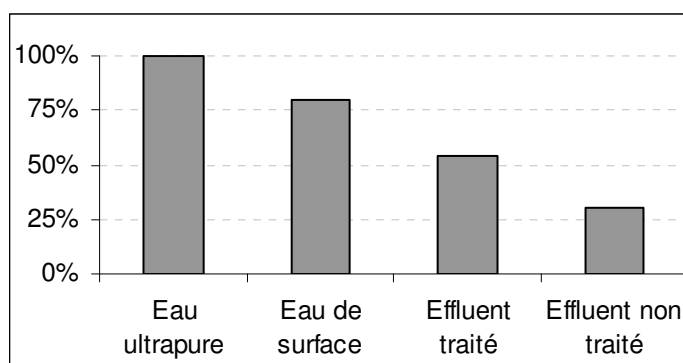


Figure I- 9: Effet d'extinction matricielle sur le dosage de la carbamazépine par HPLC-MS-MS (Metcalfé et al., 2003).

Néanmoins de nombreuses évolutions technologiques dans l'approche LC-MS visent à pallier les limites de cette technologie.

La technologie nanospray est une évolution de l'électrospray va donc être de former des gouttelettes plus petites et ceci en infusant des quantités d'analytes beaucoup plus petites. Le fait de diminuer le débit va permettre de diminuer la taille des gouttelettes émises au niveau du cône de Taylor, ce qui va augmenter la densité de charge de ces gouttelettes permettant ainsi une meilleure ionisation/désorption des molécules, ce qui équivaut à un gain substantiel de sensibilité

En ce qui concerne la chromatographie liquide, la technologie l'UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) représente un progrès majeur et permet désormais de bénéficier pleinement des principes chromatographiques fondamentaux pour mettre au point des séparations à l'aide de colonnes courtes, de granulométrie plus fine et /ou de débits plus élevés en augmentant à la fois la vitesse, la résolution et la sensibilité.

II-2-5 : Spécificités des couplages GC-MS et GC-MS-MS

a) Principes

Il existe différents modes d'ionisation utilisés pour la GC-MS, sélectionnés en fonction des attentes de l'opérateur et des molécules à analyser.

EI-MS : Impact électronique

L'ionisation est réalisée dans une chambre d'ionisation où règne un vide de 10^{-9} à 10^{-7} Torr. Un faisceau d'électrons est utilisé pour l'ionisation, et la collision soit éjecte un électron de la molécule, donnant une espèce M^+ , soit la casse en fragments caractéristiques. Selon l'énergie utilisée pour accélérer les électrons, il y aura plus ou moins de fragmentation. C'est la technique d'ionisation la plus fréquente pour l'analyse des substances pharmaceutiques, avec généralement une énergie appliquée de 70 eV.

CI-MS : Ionisation chimique

Cette méthode utilise un gaz réactif (à la pression d'environ 1 mm Hg) qui est ionisé par un faisceau d'électrons et donne une série d'ions qui à leur tour réagissent avec les substances à analyser. On peut utiliser divers gaz, parmi lesquels l'ammoniac, le méthane et l'isobutane. Il s'agit d'une méthode "douce", qui casse beaucoup moins les molécules que la précédente.

b) Utilisation de la dérivation

La dérivation est une technique qui permet l'analyse de composés qui ne peuvent pas être directement analysés sous leur forme originale, en synthétisant par réaction chimique un sous-produit dont les propriétés facilitent son analyse. Il peut y avoir différentes sortes de réaction de dérivation selon le but à atteindre et le mode d'analyse choisi. La dérivation peut permettre une meilleure détection des analytes, par l'ajout de fonction chromophores par exemple pour les techniques spectroscopiques (UV...).

La dérivation est actuellement beaucoup utilisée pour l'analyse des composés polaires, notamment les composés pharmaceutiques en chromatographie couplée en phase gazeuse. Elle permet d'améliorer les conditions de séparation des composés. Certains composés, notamment les composés pharmaceutiques comportant des fonctions carboxyliques, hydroxyles ou cétones, sont des molécules trop polaires et pas assez volatiles pour être analysées directement en chromatographie en phase gazeuse. Elles nécessitent alors une étape de dérivation de ces fonctions polaires, par acylation, silylation, estérification (Damasceno *et al.*, 2000 ; Shou *et al.*, 2004 ; Stashenko et Martinez, 2004)...

Pour les substances pharmaceutiques, la silylation est la procédure la plus fréquemment utilisée. Dans ce cas, un hydrogène actif (-OH, -NH, -SH) est remplacé par un groupe alkylsilyl- comme le triméthylsilyl- (TMS) (Carpinteiro *et al.*, 2004b ; Díaz-Cruz *et al.*, 2003).

Si la dérivation facilite l'analyse des composés pharmaceutiques, sont utilisation présentent plusieurs inconvénients. La réaction de dérivation groupement est parfois difficile à stabiliser. Pour une seule molécule, plusieurs formes dérivées peuvent coexister. En mode d'ion sélectionné (SIM ou MRM), cette diminution de l'abondance d'une seule espèce peut diminuer la sensibilité analytique (Damasceno *et al.*, 2000). De plus, l'analyse de matrices complexes peut interférer sur la dérivation et l'identification des spectres obtenus par comparaison à des bibliothèques de spectres est rendue plus difficile.

II-2-6 : Les techniques alternatives : Utilisation de la technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

C'est un test immunologique, développé dans les applications biomédicales et extrapolé pour les applications environnementales, notamment pour les pesticides. Un essai effectué pour le diclofénac a donné de premiers résultats encourageants (Deng *et al.*, 2003). La sélectivité de l'antigène est importante (réaction avec le diclofénac et les principaux métabolites du diclofénac, notamment le 5,4-hydroxy-diclofénac). La difficulté principale réside dans la faible sensibilité de ce procédé. Il a donc été effectué une étape de reconcentration des eaux par SPE, entraînant la présence de solvants organiques, ce qui a conduit à une surestimation des concentrations par des phénomènes non totalement élucidés. De même, une teneur en matière organique ou en acides humiques trop élevée, comme dans les effluents de station d'épuration entraîne les mêmes effets et nécessite une dilution de l'échantillon, parfois incompatible avec les faibles teneurs environnementales. Cette technique est donc applicable sur un certain type d'échantillons, présentant une concentration supérieure à 600 ng.l⁻¹, compte tenu de la limite de détection de la technique (60 ng.l⁻¹) et le facteur de dilution de 10, nécessaire pour éliminer les effets matriciels. Il faut aussi tenir compte du fait que cette technique quantifie de manière globale le diclofénac et ses métabolites, conjugués ou non (Deng *et al.*, 2003).

III-Objectifs des travaux

Les travaux de cette thèse se sont déroulés autour de deux axes.

Dans un premier temps, il s'est agi de se doter de procédures analytiques permettant de déterminer différents composés, de structures chimiques diverses. Le développement a été effectué sur différentes matrices environnementales : la phase dissoute (eau de surface, eau de mer, effluent de station d'épuration), la phase solide (particules, sédiments, boues de station d'épuration), mais aussi les matrices biologiques (bile, muscle, foie de poisson, moule...).

En parallèle, de nouveaux outils ont été expérimentés, comme les POCIS (Polar Organic Compounds Integrative Sampler) en tant qu'échantillonneurs intégratifs permettant la surveillance des milieux aquatiques. Ces développements ont été effectués dans un premier temps en laboratoire. Une fois ces outils optimisés et validés, ils ont été appliqués à des problématiques environnementales.

Une première évaluation de la qualité du milieu aquatique a été effectuée dans différents estuaires français. La Seine, mais aussi la Gironde, la Loire et l'Adour ont ainsi été étudiés.

La Seine, de part la très forte pression anthropique exercée par son bassin versant a fait l'objet d'un suivi pendant 4 années, permettant de mettre en évidence différents points : qualification et quantification des différentes sources de contamination, impact sur le milieu marin (Baie de Seine). La variabilité temporelle de la contamination, autant d'un point de vue quantitatif que qualitatif a été étudiée, par des suivis annuels, saisonniers, journaliers, voir heure par heure (effluents de station d'épuration). Différentes campagnes de prélèvement ont été menées dans l'estuaire de la Seine sur différents points localisés tout au long de l'estuaire (de Honfleur au barrage de Poses) et ce sur une dizaine de campagnes de prélèvements entre 2002 et 2004. Trois stations d'épuration ont été suivies en parallèle des eaux de surface : Tancarville, Elbeuf et Rouen.

En tant que source essentielle de la contamination, les rejets de station d'épuration ont été étudiés afin d'appréhender leur impact sur les écosystèmes aquatiques. Deux conditions ont été spécifiquement prises en compte : l'impact d'un effluent sur un petit cours d'eau, la Jalle d'Eysines (Blanquefort, Gironde) et l'impact de la station d'épuration de Marseille sur la zone de rejet de l'émissaire (calanque de Cortiou).

La contamination de la phase particulaire a été prise en compte sur certaines campagnes de prélèvements afin d'élucider le rôle de cette fraction dans la contamination globale des milieux aquatiques. De même, sur la Calanque de Cortiou, le niveau de contamination des sédiments a été quantifié, afin de mesurer l'impact réel de cet effluent sur la zone impactée.

Une investigation préliminaire a de plus été entreprise sur les capacités de bioaccumulation des organismes aquatiques en exposant en laboratoire des moules à un composé modèle : la carbamazépine. En parallèle, quelques mesures ponctuelles sur des poissons prélevés en Baie de Seine ont été effectuées.

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

I-Composés étudiés

I-1 Choix des substances

Les composés pharmaceutiques représentent plus de 900 substances actives, ayant des modes d'action et des effets thérapeutiques différents. Ils appartiennent à différentes classes chimiques et ont donc des propriétés physico-chimiques très variables. La sélection des composés s'est faite selon plusieurs critères.

Dans un premier temps, d'après les données bibliographiques préexistantes, les composés ayant une présence avérée dans les écosystèmes ont été sélectionnés. Les habitudes de consommation étant variables selon les pays, seules les publications concernant la consommation européenne ont été examinées. Comme précisé précédemment, il n'existe pas actuellement de véritable estimation complète de la consommation par des organismes comme l' Afssaps (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé). Les spécificités françaises ont été prises en compte grâce aux données de consommation et ont permis de sélectionner certains composés délivrés sans ordonnance : paracétamol, anti-inflammatoires non stéroïdiens...

Dans un second temps, des composés moins souvent identifiés, ou rencontrés à des niveaux de concentrations très faibles (diazépam, (Van der Ven *et al.*, 2004)) mais présentant une toxicité avérée envers les organismes aquatiques comme l'amitryptiline (Grzegorz et Guido, 2006) ou d'autres antidépresseurs (Brooks *et al.*, 2003a ; Cleuvers, 2005), ont été sélectionnés.

I-1-1 : Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

C'est la classe la plus fortement représentée dans cette étude, étant donnée leur forte consommation (souvent sans prescription médicale) et leur grande variabilité au niveau de leurs propriétés physico-chimiques, de leur dégradabilité... Les structures chimiques des 6 composés retenus sont présentées dans la Figure II-1: le paracétamol (PARA, Doliprane®, Efferalgan®), l'ibuprofène (IBU, Advil®), le naproxène (NAP, Apranax®), le diclofénac (DICLO, Voltarène®) et l'aspirine (ASP, Aspégic®).

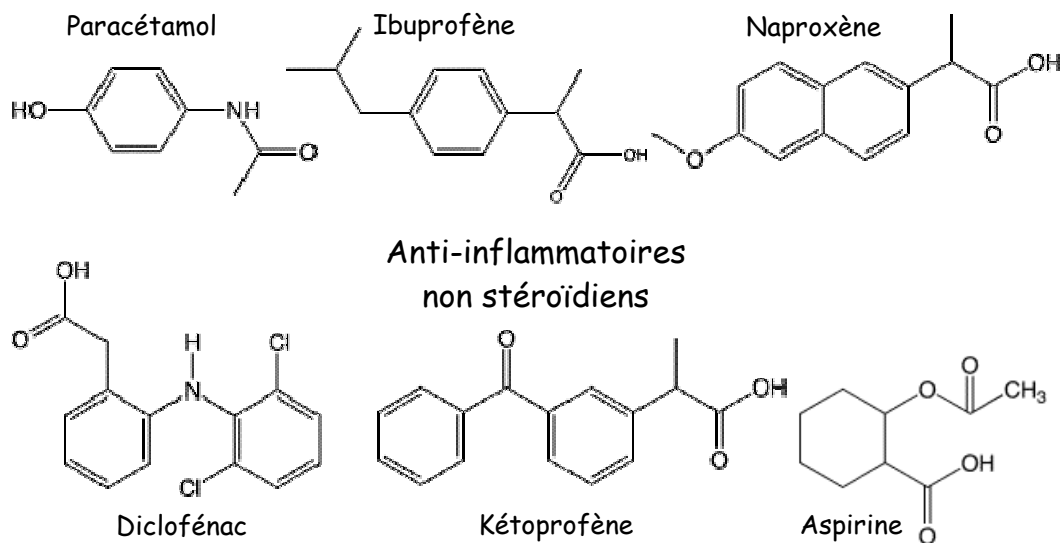


Figure II-1 : Structure chimique des AINS.

I-1-2 : Antidépresseurs

7 composés ont été étudiés parmi les nombreux antidépresseurs sur le marché (Figure II-2). L'imipramine (IMIP, Tofranyl®), l'amitryptiline (AMI, Laroxyl®) et la doxépine (DOX, Quitaxon ®) appartiennent à la classe chimique des composés imipraminiques tricycliques. Tous les composés de cette famille sont des dérivés de l'imipramine (dibenzoazépines). La carbamazépine (CBZ, Tégrétol®), aussi de la classe des dibenzoazépines a été principalement utilisée comme antidépresseur pour soigner les troubles bipolaires, en alternative au lithium. Ses usages principaux concernent actuellement son action anti-convulsivant (soin des épileptiques) et antinévralgique (névralgie faciale) (Bissuel et Marie-Cardine, 1991).

La fluoxétine (FLUOX, Prozac®), le diazépam (DZP, Valium®) et le nordiazépam (NDZP, Nordaz®) sont des antidépresseurs aux propriétés anxiolytiques, psycholeptiques et myorelaxantes.

Les ISRS (Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine), comme la fluoxétine ont montré une toxicité sur les organismes aquatiques, avec des effets sur la reproduction dès de faibles concentrations, de l'ordre de la dizaine de ng.l⁻¹ (Fong *et al.*, 1998 ; Foran *et al.*, 2004). La carbamazépine est l'un des composés les plus fréquemment mesurés dans les écosystèmes aquatiques aussi bien dans les effluents que dans les eaux de boisson (Andreozzi *et al.*, 2002 ; McDowell *et al.*, 2005 ; Miao *et al.*, 2005). Sa forte rémanence et sa résistance aux traitements d'épuration en font un composé essentiel à étudier.

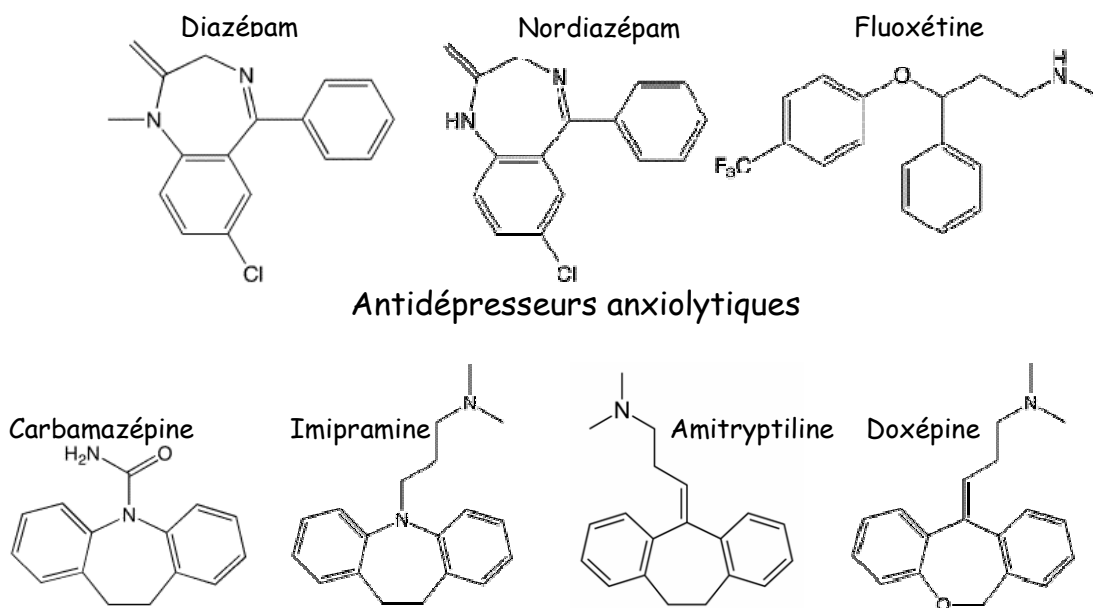


Figure II-2 : Structures chimiques des antidépresseurs.

I-1-3 : Les hypolipémiants

Parmi les hypolipémiants de la famille des fibrates, le gemfibrozil (GEMF, Lipur®) est l'un des composés les plus utilisés (Figure II-3). Les hypolipémiants sont reconnus pour avoir une toxicité forte même à de faibles doses, correspondant aux doses efficaces. Certains d'entre eux ont d'ailleurs dû être retirés du marché français comme la cérivastatine (famille des statines) en 2002 (laboratoire Bayer,

Ataltor®, Cholstat®), et le clofibrate (Lipavlon®, laboratoire Astrazeneca) en 1999. (<http://agmed.sante.gouv.fr>).

Le gemfibrozil a montré une capacité de bioaccumulation et un effet sur les stéroïdes hormonaux chez le poisson rouge (Mimeault *et al.*, 2005) et une hépatotoxicité chez le rat (Sausen *et al.*, 1995).

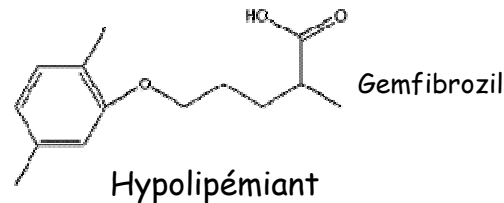


Figure II-3 : Structure chimique des composés étudiés

I-1-4 : Les bronchodilatateurs

Le salbutamol (SALB) et la terbutaline (TERB) (Figure II-4) ont été retrouvés dans les effluents de stations d'épuration aux Etats-Unis à des concentrations de respectivement 0,029 et 0,017 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Kolpin *et al.*, 2004).

Aux Etats-Unis, le salbutamol est le 11^{ème} composé pharmaceutique le plus consommé en 2005 (<http://www.rxlist.com/top200a.htm>).

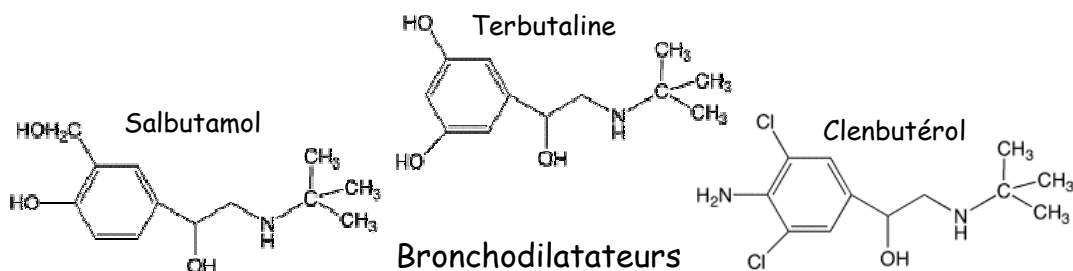


Figure II-4 : Structure chimique des bronchodilatateurs.

I-1-5 : Les autres composés

La caféine (CAF) (Figure II-5) est utilisée en tant que psychotonique et analeptique cardiaque et respiratoire. On va la retrouver soit seule, soit le plus souvent associée à d'autres composés comme le paracétamol et le dextropropoxyphène, pour le traitement des migraines aiguës. Néanmoins, la principale consommation de caféine provient de la consommation de boissons (Tableau II- 1) : café, mais aussi thé, chocolat, cola...

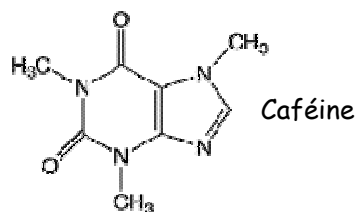


Figure II-5 : Structure chimique de la caféine.

| Type | Quantité | Quantité de caféine |
|----------------|-----------------|---------------------|
| Café | 1 tasse | 100- 150 mg |
| Café décaféiné | 1 tasse | 1 - 5 mg |
| Thé | 1 tasse | 60 - 70 mg |
| Cola | 1 boîte (33 cl) | 40 - 50 mg |
| Médicament | 1 comprimé | 200 – 400 mg |

Tableau II- 1: Quantité de caféine par type de consommation.

I-1-6 : Propriétés physico-chimiques

Un certain nombre de composés ont donc été choisi pour chacune des principales classes thérapeutiques. Ces composés possèdent des propriétés physico-chimiques très différentes (Tableau II- 2) aussi bien en ce qui concerne leur solubilité que leur lipophilie. Leur comportement dans les écosystèmes aquatiques va donc être très variable selon les composés considérés, aussi bien en ce qui concerne leur dégradabilité, leur stockage dans les sédiments que leur capacité de bioaccumulation dans les organismes aquatiques et leur toxicité.

| Composés | Masse molaire (g.mol ⁻¹) | pKa | Log Kow | Solubilité dans l'eau à 25°C (mg.ml. ⁻¹) |
|---------------------|--------------------------------------|------|---------|--|
| Aspirine (ASP) | 180 | 3,49 | 1,19 | 4,6 |
| Ibuprofène (IBU) | 206 | 4,91 | 3,97 | 0,049 |
| Paracétamol (PARA) | 151 | 9,38 | 0,46 | 14 |
| Gemfibrozil (GEMF) | 250 | - | 4,77 | 10 |
| Naproxène (NAP) | 230 | 4,15 | 3,18 | 0,015 |
| Diclofénac (DICLO) | 295 | 4,15 | 4,51 | 2,37 |
| Terbutaline (TERB) | 225 | - | 0,9 | 213 |
| Salbutamol (SALB) | 239 | - | - | 0,03 |
| Clenbutérol (CLEN) | 276 | - | 2 | - |
| Kétoprofène (KETO) | 254 | 4,45 | 3,12 | 0,051 |
| Caféine (CAF) | 194 | 10,4 | -0,07 | 22 |
| Fluoxétine (FLUOX) | 309 | 8,7 | 4,05 | 50 |
| Amitryptiline (AMI) | 277 | 9,4 | 4,92 | 9,71 |
| Doxépine (DOX) | 279 | - | 4,29 | 0,005 |
| Imipramine (IMIP) | 280 | 9,4 | 4,8 | 0,018 |
| Carbamazépine (CBZ) | 236 | - | 2,45 | 0,018 |
| Diazépam (DZP) | 284 | 3,4 | 2,82 | 0,050 |
| Nordiazépam (NDZP) | 270 | - | 2,93 | - |

Tableau II- 2 : Caractéristiques physico- chimiques des composés étudiés (Daughton et Jones-Lepp, 2001).

II-Sites d'études

Une partie importante de ce travail de thèse a consisté à documenter les niveaux de concentration dans les milieux aquatiques français. Pour cela, différents milieux, aux caractéristiques différentes, ont été choisis.

Tout d'abord, en tant que voie majoritaire d'introduction des composés pharmaceutiques dans les écosystèmes (Halling-Sorensen *et al.*, 1998 ; Heberer, 2002a ; Ternes, 2001b), les stations d'épuration sont un des milieux cibles de cette étude. Sur la Seine, 3 stations ont été suivies, possédant chacune des modes et des capacités de traitement différentes. Une étude spécifique en Mer Méditerranée a permis le suivi d'un rejet en mer et de sa dilution dans l'écosystème marin.

En tant que milieu récepteur, les estuaires constituent le deuxième axe de recherche. Ils constituent un milieu clef, une zone de transition entre les eaux douces, fortement soumise aux pressions anthropiques, et les eaux marines. Les estuaires de la Seine, la Gironde et l'Adour ont fait l'objet de suivis sur plusieurs années.

Les paragraphes suivants s'attachent à caractériser les différents milieux suivis et les campagnes de prélèvements qui y ont été effectuées.

II-1 Suivis des stations d'épuration

II-1-1 : Stations d'épuration de la Seine

Les trois stations d'épuration étudiées sur la Seine ont des caractéristiques différentes.

La station d'épuration de Tancarville est une petite station (1800 équivalents-habitants), dotée d'un système de boues activées en aération prolongée. Son rejet se fait directement dans la Seine, au niveau du pont de Tancarville.

La station d'épuration de l'agglomération d'Elbeuf (110 000 équivalents-habitants) est dotée d'un système de boues activées. Son rejet s'effectue directement dans la Seine, au niveau de la ville d'Elbeuf.

L'assainissement de l'agglomération de Rouen est principalement traité par la station d'épuration Emeraude de Petit-Quevilly, d'une capacité de traitement de 550 000 équivalents-habitants, et qui est équipée d'un traitement secondaire par boues activées. L'élimination de ces boues se fait par combustion (pour une majorité des déchets produits).

Ces trois stations ont été suivies en parallèle des eaux de surface sur toutes les campagnes de prélèvements effectuées en estuaire de Seine. Les effluents sont prélevés en sortie d'émissaire, lors de leur introduction dans le milieu naturel. Plus spécifiquement, la station d'épuration de Rouen a été suivie pendant 24h avec des prélèvements en continu par un système automatisé, réfrigéré et commandé en fonction du débit de l'effluent.

II-1-2 : Station d'épuration d'Eysines

La station d'épuration de Cantinolle de la ville d'Eysines est une des 10 stations d'épuration de la Communauté Urbaine de Bordeaux. Créée dans les années 80, cette station, prévue pour 50 000 équivalents habitants, traite au début de l'étude plus de 57 000 équivalents-habitants. Le rejet de la station s'effectue dans un petit cours d'eau, la Jalle de Blanquefort, affluent de la Garonne (Figure II-6).

La première étude, effectuée en mai 2003, a concerné uniquement le rejet direct, afin d'avoir un premier screening de l'émissaire. Suite à cette première mesure, 3 campagnes complètes ont été mise en place en juillet et septembre 2003 puis en février 2004. Les échantillons ont été prélevés en 7 sites repartis le long de la rivière : 1 en amont de la station, l'un correspondant à l'effluent brute et 5 points en aval du rejet : 30 m, 1 Km, 2 Km, 4 Km et 10 Km (Figure II- 6).

Parallèlement aux dosages de substances pharmaceutiques, la concentration en bore dissous a été déterminée. Le bore, utilisé comme agent azurant optique dans de nombreuses lessives, est présent sous forme de borate dans les effluents de station d'épuration. Ce composé à caractère conservatif peut donc être utilisé comme traceur du rejet : la diminution de sa concentration dans le milieu est due à la dilution du rejet dans la rivière (Neal *et al.*, 1998 ; Williams *et al.*, 2003). Les données physico-chimiques et les résultats bruts relatifs à ces campagnes sont présentées dans l'Annexe 1.

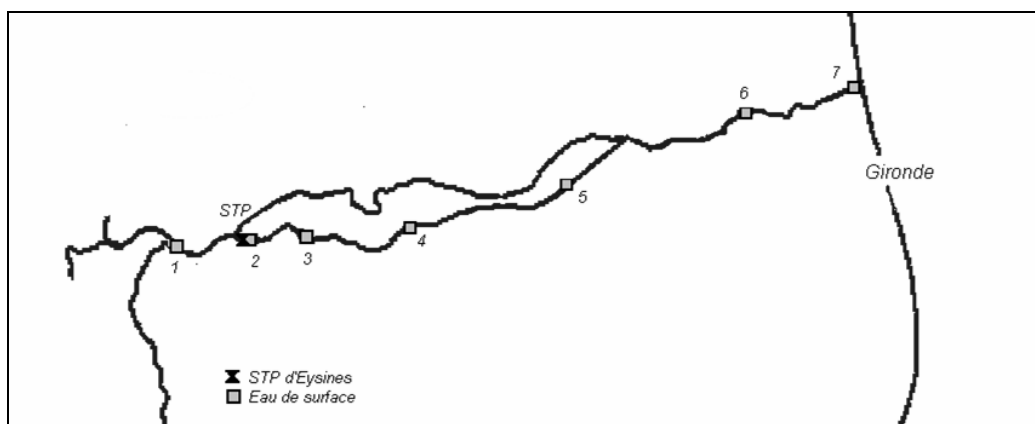


Figure II- 6: Localisation de la station d'Eysines et des points de prélèvements sur la Jalle de Blanquefort.

II-1-3 : Calanque de Cortiou

La station d'épuration de Marseille, créée en 1987 est l'unique station drainant toute la communauté urbaine de Marseille, assurant actuellement le traitement de 1 300 000 équivalents habitants. Cette installation, qui ne possède pas de traitement biologique a, compte tenu des avancées technologiques depuis sa construction, un mode de fonctionnement dépassé. Le rejet de cette station se fait par l'intermédiaire d'un émissaire ouvert sur la mer Méditerranée dans la Calanque de Cortiou (Figure II-7).

La campagne de prélèvements a eu lieu en novembre 2004, sur l'Europe, bateau océanographique côtier de l' IFREMER. Des prélèvements d'eau de surface ont été effectués autour de la zone de rejet. Dans la même zone, légèrement élargie, des sédiments ont été prélevés par carottage à l'aide d'une benne Reineck, permettant de conserver l'intégrité du sédiment de surface. Les donnée physico-chimiques ainsi que les résultats bruts relatifs à la campagne de prélèvements sont explicités dans l'annexe 2.

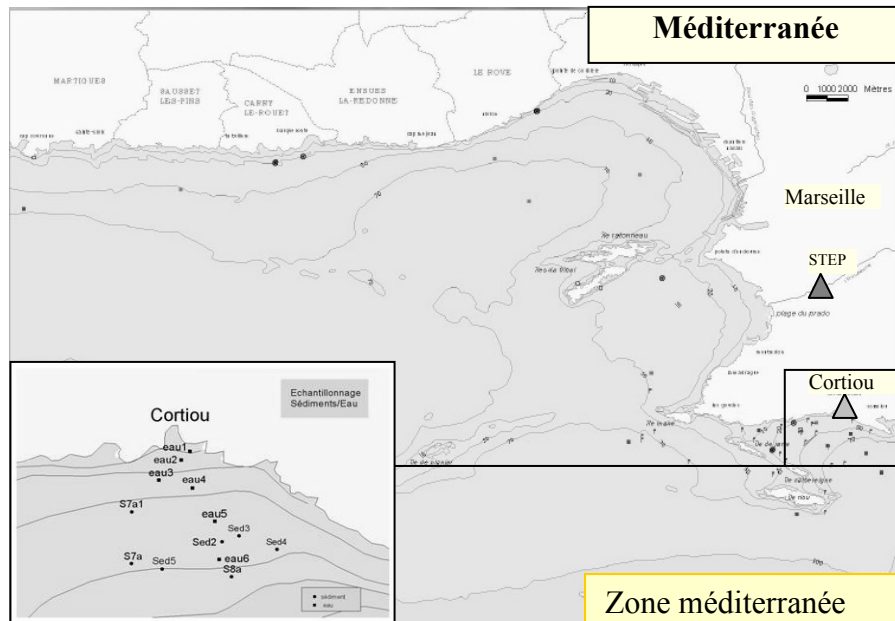


Figure II-7 : Localisation de la Calanque de Cortiou et des sites de prélèvements (SED, EAU).

II-1-4 : Bassin versant de l'Hérault

Cette étude très ponctuelle a fait suite à une première étude (Rabiet *et al.*, 2005) sur la contamination du bassin versant de l'Hérault par des effluents de station d'épuration. Ces premiers suivis avaient mis en évidence une contamination des eaux de captage par des eaux usées, notamment par une teneur en gadolinium supérieure à la normale (notion d'anomalie). L'étude des substances pharmaceutiques a été envisagée pour confirmer cette hypothèse, de manière plus sûre, les composés pharmaceutiques ne pouvant avoir qu'une provenance anthropique via l'émission de rejet de station d'épuration, contrairement au bore, aux nitrates, au gadolinium....

Dans un premier temps, deux stations d'épuration ont été analysées (S3 à St Tibéry et S15 à Lodève), ainsi que 2 points de rivière (P22 pour la Thongue et P 14 pour la Lergue). L'impact de la station d'épuration de Lodève (S15) a été mesuré sur la Lergue, dans laquelle la STEP se jette. Cette potentielle contamination est ensuite suivie dans l'Hérault, dont la Lergue est un affluent. En parallèle, 7 différents points de captage de la zone ont été analysés.

En plus des analyses de composés pharmaceutiques, les terres rares, dont le gadolinium, utilisé comme agent de contraste dans pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et les éléments majeurs ont été suivis.

La Figure II- 8 présente les points de prélèvements du suivi du bassin versant (STEP, rivières, eaux de captages) tandis que la Figure II- 9 présente les points de surface correspondant au suivi de la station de Lodève et à son impact sur la Lergue et l'Hérault : une station (W1) se positionne en amont de la station, 3 (W2, W3 et W4) sont en aval (W4 juste avant la confluence avec l'Hérault). W5 se situe sur l'Hérault en amont de la confluence et W6 en aval. Les données physico-chimiques relatives à ces campagnes ainsi que les résultats bruts sont présentés dans l'Annexe 3.

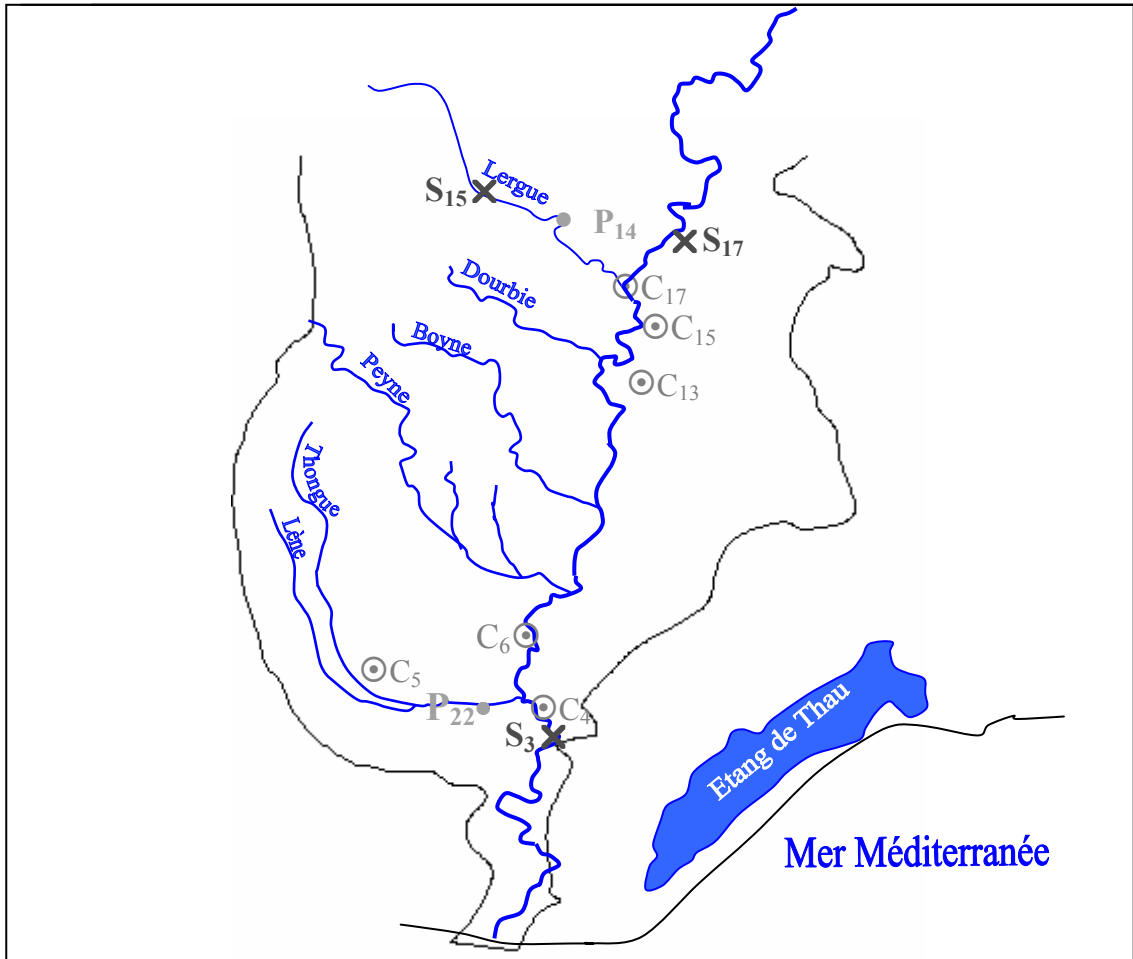


Figure II- 8 : Points d'échantillonnage du bassin versant de l'Hérault.

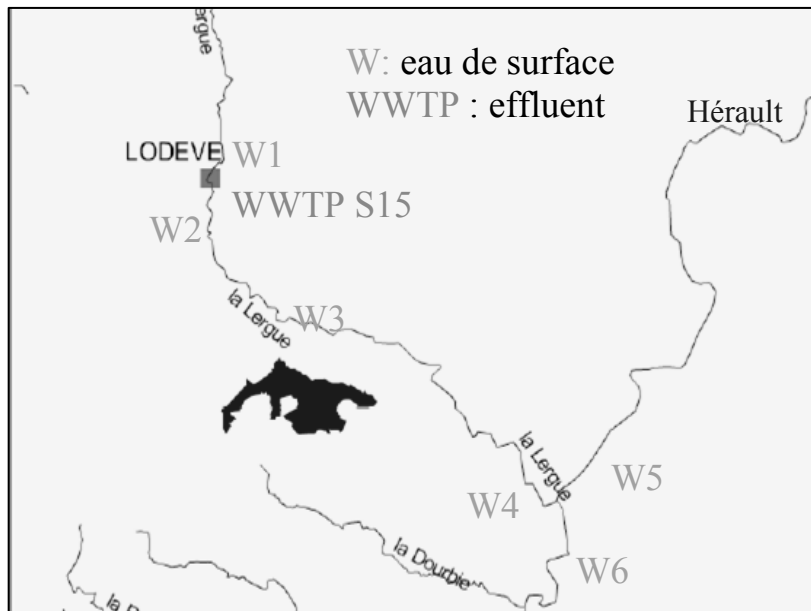


Figure II- 9 : Impact de la station d'épuration de Lodève : points d'échantillonnage.

II-2 Estuaires

Les estuaires en tant que zone de transition entre les eaux douces, fortement soumises aux pressions anthropiques de manière directe (rejet de station d'épuration) ou indirecte (lessivage des sols, eaux de ruissellement ...) et les eaux marines sont des systèmes à la fois sensibles et très importants. En effet, les estuaires sont souvent des zones de nurseries pour de nombreuses espèces exploitées de poissons.

Les estuaires atlantiques sont qualifiés de macrotidaux, c'est à dire sujets à des marées de très forte amplitude (> 5 mètres). Les forts marnages rencontrés sur la côte française atlantique entraînent la formation de zones de forte concentration de particules, appelées bouchon vaseux, en interaction avec des zones de dépôt, appelées vasières intertidales (qui se situent dans la zone de balancement des marées, couvertes à pleine mer, découvertes à basse mer).

Les estuaires sont des zones sensibles, de part leur grand intérêt écologique (nurseries), économique (zones de pêche) et l'importante pression anthropique qu'ils subissent. De plus, ils sont le lien avec le milieu marin, lui aussi très sensible. Ces échanges entre le milieu dulçaquicole et le milieu marin vont être fluctuants en fonction des phénomènes de marée et des conditions climatiques (périodes crue/étiage...). La présence massive de particules peut jouer sur la partition dissous/particulaire des substances pharmaceutiques. De plus, le compartiment bactérien, très important dans ces zones de fortes concentrations particulières, peut permettre la dégradation des substances de manière accrue.

Pour ces études, 3 estuaires français ont été étudiés :

- ❖ L'Estuaire de la Seine
- ❖ L'Estuaire de la Gironde
- ❖ L'Estuaire de l'Adour

Leurs principales caractéristiques hydrologiques et les campagnes d'échantillonnage effectuées sont présentées dans ce chapitre.

II-2-1 : Estuaire de Seine

La Seine et l'ensemble de ses tributaires sont caractérisés par un régime hydrologique de type océanique : c'est-à-dire un maximum de débit en hiver quand les températures sont basses et l'évaporation minimale, et un minimum en été. Les débits annuels moyens à Poses sont de l'ordre de $410 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ avec des variations très importantes au cours des dernières années par rapport à cette moyenne décennale : $900 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ en 2001, $590 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ en 2002, $386 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ en 2003, $410 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ en 2004 et $332 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ en 2005. Ces moyennes masquent de plus des situations de crue ($2\,280 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, mars 2001) et d'étiage ($60 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, octobre 2003) parfois très marquées. Les régimes hydrauliques des cours d'eau de l'ensemble du bassin de la Seine sont très similaires du fait des faibles contrastes de relief, de climat et de distribution lithologique (données Seine aval : <http://seine-aval.crihan.fr/>).

A l'échelle de l'Europe, la densité de population (en moyenne 230 hab. km^{-2}) place le bassin versant de la Seine parmi les plus peuplés après le bassin de la Tamise (600 hab. km^{-2}), de l'Escaut (580 hab. km^{-2}), de la Meuse (400 hab. km^{-2}) ou encore du Rhin (300 hab. km^{-2}).

Dans la partie aval de la Seine, on retrouve deux îlots de forte densité de population qui correspondent aux villes de Rouen et du Havre. Mais les 10 millions d'habitants que compte l'agglomération parisienne exercent déjà, dès l'amont, une forte pression anthropique sur la Seine, accentuée par ses faibles débits d'étiage.

Le plus bel exemple de pression est la station d'épuration d'Achères (la plus importante d'Europe) située en aval de Paris et qui traite les effluents domestiques d'environ 6 millions d'habitants de l'agglomération parisienne (avec une capacité de traitement de $2\,080\,000\text{ m}^3\cdot\text{j}^{-1}$).

Du point de vue hydrodynamique, la Seine est caractérisée par un débit moyen qui n'est pas de nature à entraver l'intrusion saline. Cette situation entraîne une sectorisation tripartite de l'Estuaire de Seine :

- le bas de l'Estuaire ou Estuaire marin où l'influence des eaux salées marines est constante. Il s'étend de la Baie de Seine jusqu'à l'aval de Honfleur (pk 365).
- l'Estuaire moyen correspondant à la zone de mélange des eaux douces et salées. Cette zone s'étend d'Honfleur (pk 365) aux environs de Vieux-Port (pk 324). Cette limite est fonction des amplitudes de marée et des conditions hydrologiques de la Seine (étiage, crue). L'Estuaire moyen est caractérisé par des grandes profondeurs (entre 4 et 7 mètres) qui permettent aux gros bateaux de remonter jusqu'au port de Rouen. Il est aussi le siège du bouchon vaseux.
- le haut Estuaire ou Estuaire fluvial est composé d'eau douce mais est soumis à l'influence de la marée dynamique. La limite amont de ce secteur est matérialisée par le barrage de Poses (pk 202) qui bloque artificiellement la propagation de la marée. Sa limite aval s'étend jusqu'à la limite de l'intrusion saline (eaux à 0,5 ‰) en amont de l'Estuaire moyen. L'Estuaire fluvial est caractérisé par des plus faibles profondeurs et son fonctionnement est plus assimilable à celui de la rivière que de l'estuaire. La Figure II-10 présente une vue générale de l'estuaire.

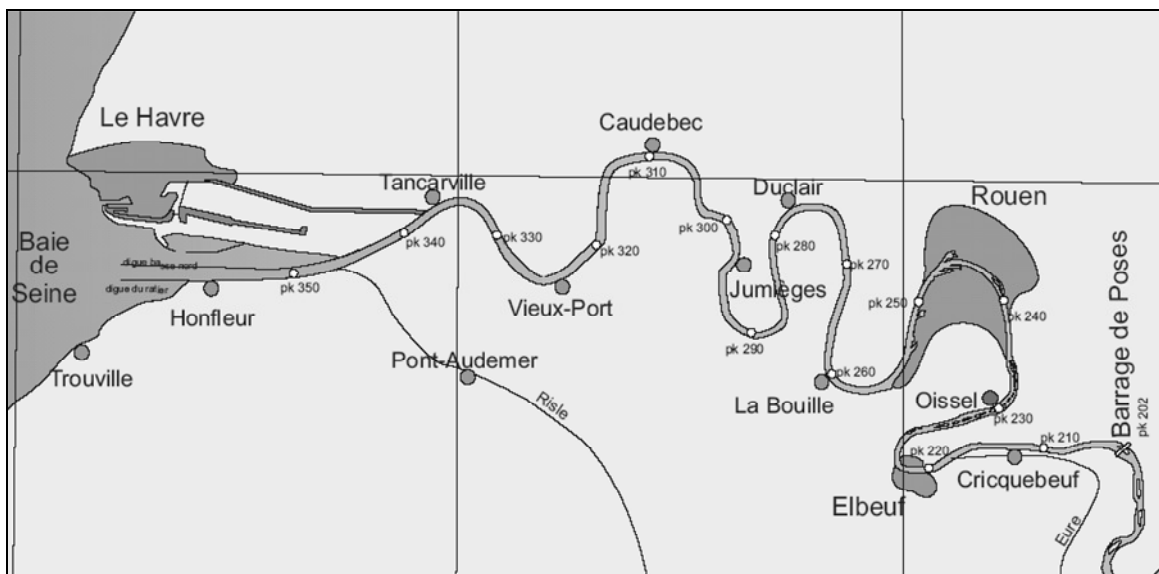


Figure II-10 : Vue générale de l'estuaire de Seine.

Une première série de missions, se déroulant tous les deux mois entre mars 2002 et mars 2003 ont permis un suivi de 3 points de l'estuaire (Poses, Caudebec en Caux et Honfleur) et de 3 stations d'épuration (Tancarville, Rouen "Emeraude", Saint Aubin lès Elbeuf). Les détails des campagnes de prélèvements (dates, caractéristiques physico-chimiques des échantillons, données brutes...) sont présentés dans l'annexe 4.

Les prélèvements des effluents de stations ont été faits au point de rejet dans l'Estuaire de Seine, à marée basse pour limiter les phénomènes de dilution avec l'eau de rivière.

En ce qui concerne l'eau de surface, les prélèvements ont été effectués soit par bateau (Maïmiti du port autonome de Rouen, Côte de la Manche de l'IFREMER) soit de pontons et ponts, soit des berges. Sauf précision, la majorité des prélèvements ont été effectués sous la surface (à 20 cm).

Deux autres campagnes visant à caractériser qualitativement et quantitativement les apports de composés pharmaceutiques à l'estuaire ont été menées en mai et novembre 2005. Les études ont concerné à la fois l'Estuaire (5 points d'eau de surface entre Poses et Honfleur), les 3 stations d'épurations déjà étudiées et les principaux affluents (Figure II-11). Les données de débits sont fournies par la DIREN, soit par des mesures directes, soit par extrapolation à partir des stations de références (annexe 5).

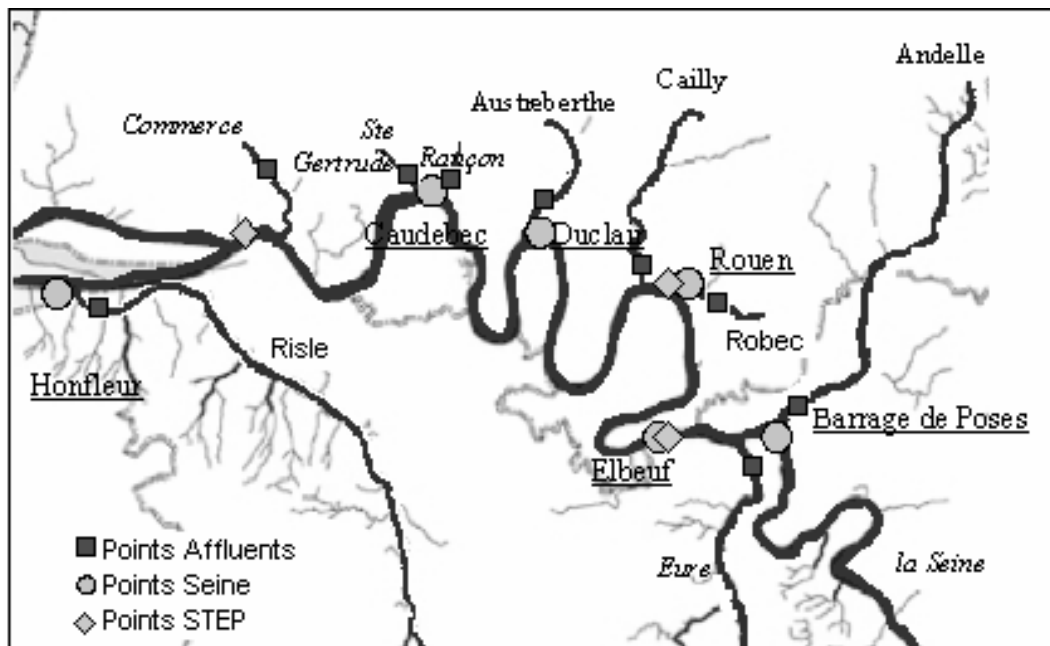


Figure II-11 : Ensemble des points d'échantillonnage suivis sur la Seine, campagnes affluents (Mai 2005 et novembre 2005).

4 campagnes se sont focalisées sur la présence de composés pharmaceutiques en Baie de Seine, et dans l'embouchure de l'Estuaire.

Les deux premières (SAZOOTOX1, mai 2004 et SAZOOTOX 2, juin 2004) concernent des prélèvements d'eau effectués en point fixe (Pont de Normandie) au cours d'un cycle complet de marée en fonction de l'évolution du gradient de salinité. L'eau est prélevée à l'aide d'une bouteille de prélèvement type Niskin 5 litres. Pour chaque point d'échantillonnage, un prélèvement d'eau est effectué en surface et un prélèvement d'eau est effectué en profondeur.

Les deux suivantes (RNO1, juin 2004 et RNO2, novembre 2004) sont associées aux campagnes du Réseau National d'Observation de l'IFREMER et correspondent à des prélèvements dans la Baie de Seine, de l'embouchure de l'Estuaire vers des points plus marins (Figure II-13). Les détails de ces campagnes sont présentés dans l'Annexe 6.

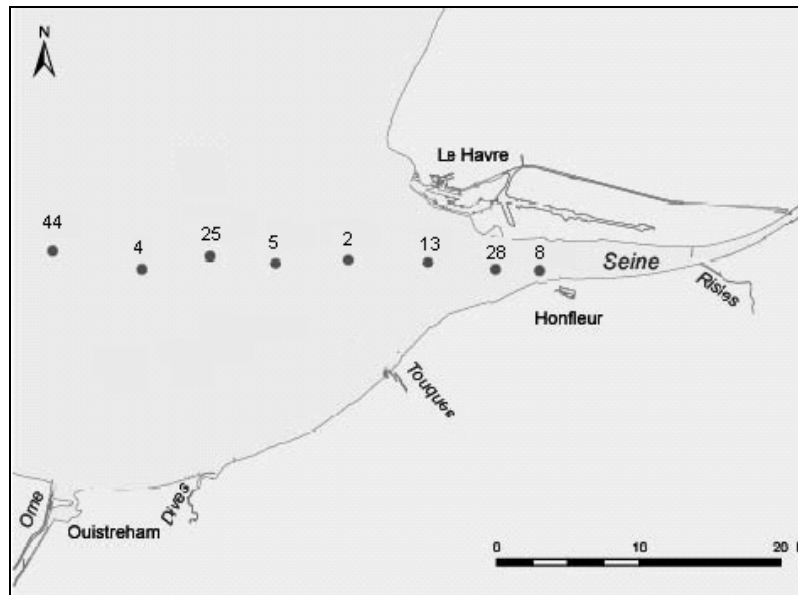


Figure II-12 : Ensemble des points d'échantillonnage suivis sur la Baie de Seine (Campagnes RNO, juin et novembre 2004).

II-2-2 : Estuaire de la Gironde

La Gironde qui réunit les fleuves Garonne et Dordogne est l'un des plus grands estuaires d'Europe. Les deux fleuves drainent un bassin de 71 000 km². Le débit moyen annuel d'eau douce est de 900 m³.s⁻¹. Le débit mensuel moyen varie très fortement, de l'hiver (1450 m³.s⁻¹ en janvier) à l'été (23,5 m³.s⁻¹ en août) avec des crues exceptionnelles atteignant 7 500 m³.s⁻¹. Les effets des débits fluviaux sont modulés par la marée de type macrotidal. A l'embouchure de l'Estuaire, l'amplitude de la marée dépasse 5,5 m durant les marées de vives-eaux.

L'Estuaire de la Gironde est un estuaire beaucoup moins anthropisé que celui de la Seine. L'importance de l'agriculture, aussi bien sur la Garonne (vigne, maïsiculture) que sur la Dordogne (maraîchers, maïsiculture) ainsi que les forts débits pour ces deux fleuves en font un système très différent de celui de la Seine (fortement soumis aux pollutions industrielles et urbaines).

Différentes campagnes ont été mises en œuvre pour l'étude de cette zone. En 2002, un suivi en bateau a été effectué de différents points de l'estuaire (Figure II-13) entre Bordeaux et le Verdon (Côte d'Aquitaine, jumelage aux campagnes RETROGIR). Les caractéristiques de ces prélèvements sont présentés dans l'annexe 7.

En 2005, une campagne de prélèvement a eu lieu sur la Garonne de l'amont de Toulouse à l'embouchure de l'estuaire de Gironde au Verdon (Figure II-13). La campagne a été effectuée des berges ; les prélèvements d'eau ont été faits des ponts et pontons (annexe 7).

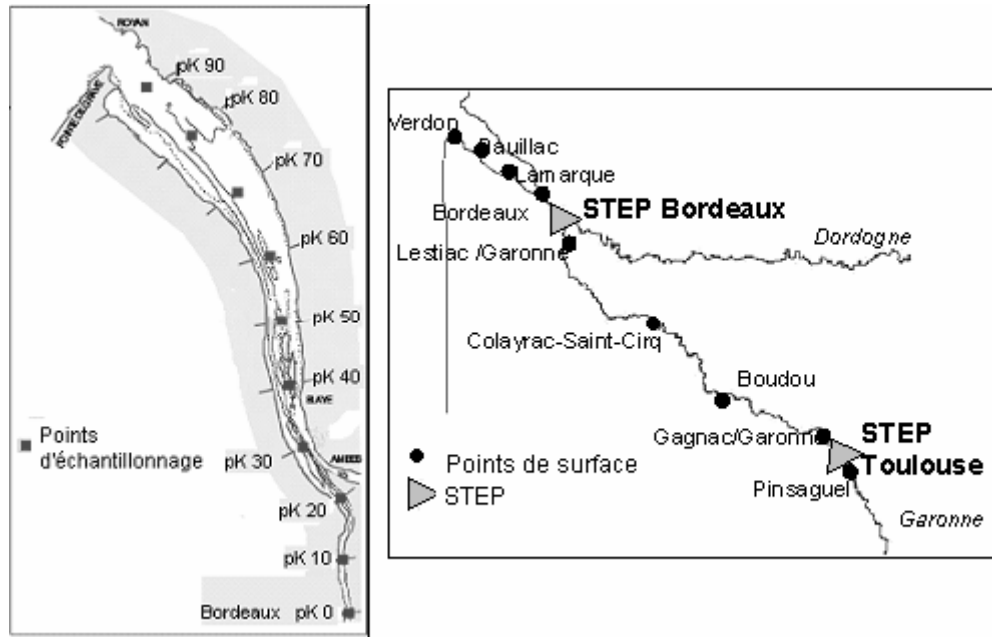


Figure II-13 : Estuaire de la Gironde, points d'échantillonnage.
 (a) : Estuaire de la Gironde, campagne septembre 2002
 (b) : Gironde + Garonne, campagne 2005

II-2-3 : Estuaire de l'Adour

Si le bassin de l'Adour et des Gaves représente 16 000 km², l'estuaire de l'Adour est un petit estuaire. Son débit est très variable, subissant la forte influence des fluctuations de débits des gaves (fontes des neiges) avec une moyenne annuelle autour de 240 m³.s⁻¹ et des valeurs extrêmes de 56 m³.s⁻¹ à 720 m³.s⁻¹. L'estuaire est fortement sensible à l'influence de la marée dynamique : en étiage, l'intrusion saline se fait sentir jusqu'à Urt.

L'estuaire de l'Adour a une importance socio-économique forte, avec le développement du tourisme (baignade, sports nautiques et pêche amateur) et d'un ensemble d'activités portuaires, industrielles, artisanales et commerciales complétées par une pêche professionnelle côtière et intra-estuaire importante.

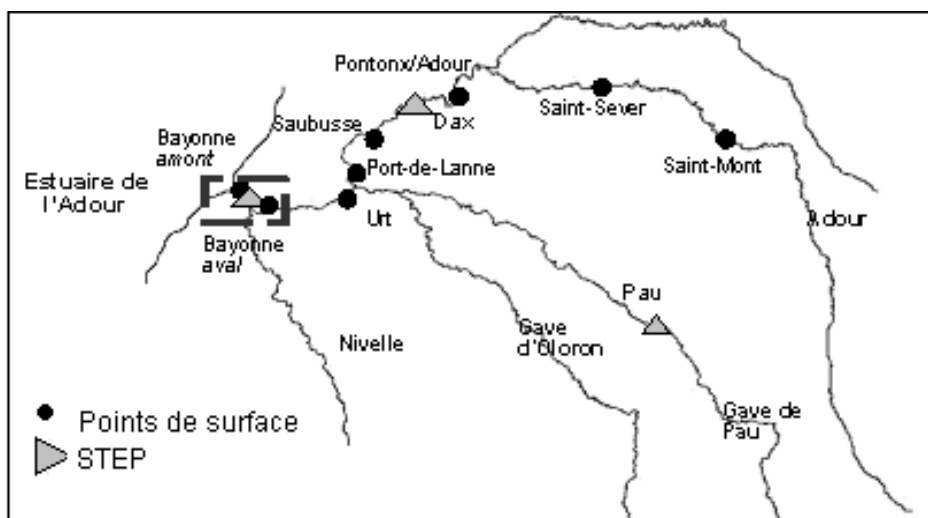


Figure II-14 : Estuaire de l'Adour, points d'échantillonnage (novembre 2005).

Une pression anthropique forte résulte de ce contexte multi-usages, en particulier sur la partie aval de l'estuaire de l'Adour caractérisée à la fois par la présence d'un des dix plus grands complexes portuaires nationaux et d'une agglomération de plus de 100 000 habitants permanents avec une augmentation exponentielle de la densité de population sur certaines périodes de l'année dans les villes de Bayonne, Dax...

Différentes campagnes ont été mises en œuvre pour l'étude de cette zone (Figure II-14). En septembre 2002, un premier suivi a été effectué en bateau (jumelage aux campagnes du LCABIE -Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, de l'université de Pau et des Pays de l'Adour-, et de l'agence de l'Eau Adour-Garonne) de différents points de l'estuaire. Ce premier échantillonnage a été complété en 2005, par un suivi de l'Adour de sa partie fluviale (amont de Saint-Mont) à l'embouchure de l'estuaire à Bayonne. Les caractéristiques des échantillons sont présentées dans l'annexe 8.

II-3 Méthodes de prélèvements

L'échantillonnage s'effectue soit au moyen d'un préleveur lesté (prélèvement à partir de pontons) soit en utilisant des bouteilles Niskin® pour les prélèvements en profondeur (Figure II-15).

Les prélèvements sont effectués dans des bouteilles de verre ambrées, préalablement calcinées (450°C, 6h). L'eau brute est prélevée et traitée dans les 48 h suivant l'échantillonnage. La filtration se fait sur des filtres en fibre de verre GF-F, de diamètre de pore 0,7 µm, préalablement calcinés (450°C, 6h). Pour éviter toute dégradation, les échantillons sont filtrés et extraits au plus vite, généralement dans les 48 h suivant le prélèvement.

Concernant les sédiments, ils sont prélevés par carottage (benne Reineck, Figure II-16).



Figure II-15 : Bouteille Niskin pour les prélèvements d'eau

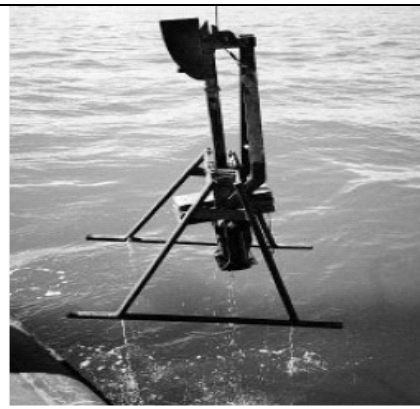


Figure II-16 : Descriptif d'une benne Reineck (Photo IFREMER).

III-Dosages des composés étudiés (Publications 1 et 2)

III-1 Dosage des substances pharmaceutiques

Les composés pharmaceutiques sont obtenus chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), de qualité analytique (pureté > 98 %) sous forme solide. Les composés pharmaceutiques deutérés (paracétamol *d4*, caféine *C13* amitryptiline *d6*, diazépam *d5* et nordiazépam *d5*) sont fournis par Eurisotop (Gif sur Yvette, France), sous forme d'une solution méthanolique (100 µg.ml⁻¹), sauf la caféine *C13*, sous forme solide.

Différents types de cartouches ont été utilisés pour les développements analytiques : C18 (Supelco, Saint Quentin Fallavier, France), OASIS HLB, 60 mg et OASIS MCX, 60 mg (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Les cartouches utilisées pour les étapes de purification (PSA, 200 mg et NH₂, 200 mg) proviennent de chez Varian (Courtaboeuf, France). Le matériel employé pour l'extraction en phase solide (cuve sous vide, ...) provient de chez Supelco (Saint Quentin Fallavier, France), tout comme les fibres SPME.

Tous les solvants sont de qualité HPLC (Multisolvent) et ont été fournis par ICS (Belin-Beliet, France), comme l'acide chlorhydrique (37 %, Ultra-pur, pour analyse de traces). L'eau ultrapure est obtenue grâce à un système Milli-Q (Millipore, Molsheim, France). L'hydroxyde de potassium (Rectapur, pureté > 85 %) est fourni par Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France) et l'iodure d'ammonium provient d'Acros Organics (Noisy le Grand, France).

Pour les échantillons naturels, les filtres en fibre de verre GFF utilisés pour les filtrations sont fournis par VWR International (Strasbourg, France) et Atlantic Labo (Eysines, France).

Concernant l'agent de dérivation utilisé, le MSTFA (N-Méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide, pureté > 98,5 %), il a été obtenu chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

III-2 Quantification des substances pharmaceutiques

Des méthodes d'analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse simple (GC-MS) ont été développées spécifiquement pour l'étude des substances pharmaceutiques. L'étape de dérivation nécessaire pour certains composés a été optimisée, ainsi que l'utilisation de l'étalonnage interne pour la quantification des composés. L'ensemble de ces développements ainsi que la validation de l'analyse par GC-MS en termes de reproductibilité, linéarité...est présenté dans le chapitre ci-dessous.

III-2-1 : Analyse par GC-MS

a) Dérivation

Selon leur structure chimique, les substances pharmaceutiques sont séparées en deux groupes : les composés acides, comportant des groupements acides..., plus polaires, qui nécessitent une étape de dérivation, et les composés neutres qui n'ont pas besoin de cette étape supplémentaire.

Ces deux classes sont donc analysées séparément. Les composés neutres sont analysés directement, après ajout du pyrène comme étalon d'injection (validation des taux de récupération). L'échantillon est ensuite repris. Après ajout du 1-hydroxypyrène comme étalon d'injection (validation des taux de récupération), on effectue l'étape de dérivation avant la deuxième injection.

Le protocole de dérivation utilisé pour les substances pharmaceutiques acides emploie le MSTFA (30 µl) comme agent de silylation. Ce réactif est ajouté à l'éluât reconcentré, mis à incuber 35 minutes à 65 °C.

La dérivation entraînant un conditionnement spécifique de la colonne chromatographique et un encrassement particulier du détecteur, les deux analyses sont réalisées indépendamment sur deux appareils similaires : des chromatographes Agilent Technologies 6890, équipés de colonnes capillaires HP5-MS, couplés à des spectromètres de masse Agilent Technologies 5973.

b) Conditions d'analyses

Les deux méthodes chromatographiques utilisées sont similaires et sont présentées dans l'annexe 9.

Concernant la détection en spectrométrie de masse, la quantification des composés se fait en mode de sélection d'ions, après caractérisation des spectres de masse de chaque composé en mode balayage (l'ensemble des spectres de masse est présenté en annexe 10, pour toutes les molécules). Les ions caractéristiques retenus pour l'analyse CG-SM sont présentés dans le Tableau II-3. Les chromatogrammes obtenus pour les différents composés neutres et acides sont présentés respectivement dans la Figure II-17 et la Figure II-18.

| Composés | M g.mol ⁻¹ | m/z | Composés | M g.mol ⁻¹ | m/z |
|---|--------------------------|---|------------------|--------------------------|---|
| <u>Composés acides (dérivés)</u> | | | | | |
| Aspirine | 180 | 195 [M _{TMS} -COO-CH ₃] | Diclofénac | 295 | 214 [M _{TMS} -COO-TMS-Cl] |
| Ibuprofène | 206 | 160 [M _{TMS} -COO-TMS] | Gemfibrozil | 250 | 201 [M _{TMS} -(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₃ -O] |
| Kétoprofène | 254 | 282 [M _{di-TMS} -COO-TMS] | Salbutamol | 239 | 369 [M _{tri-TMS} -CH ₂ -NHC(CH ₃) ₃] |
| Naproxène | 230 | 185 [M _{TMS} -COO-TMS] | Clenbutérol | 276 | 335 [M _{di-TMS} -CH ₂ (CH ₃) ₃] |
| Paracétamol | 151 | 206 [M _{TMS} -NH ₂] | Terbutaline | 225 | 356 [M _{tri-TMS} -CH ₂ -NHC(CH ₃) ₃] |
| Etalon de contrôle : | | | 1-Hydroxy-pyrène | 218 | 290 [M _{TMS}] |
| <u>Composés neutres (non dérivés)</u> | | | | | |
| Caféine | 194 | 194 [M ⁺] | Imipramine | 280 | 234, 58 [M-HN(CH ₃) ₂], [-CH ₂ -N(CH ₃) ₂] |
| Diazépam | 284 | 256 [M-CH ₂ N] | Doxépine | 279 | 58 [-CH ₂ -N(CH ₃) ₂] |
| Carbamazépine | 236 | 193 [M-NHCO] | Nordiazépam | 270 | 242 [M-HCO] |
| Amitriptyline | 277 | 58 [-CH ₂ -N(CH ₃) ₂] | | | |
| Etalon de contrôle : | | | Pyrène | 202 | 202 [M ⁺] |
| <u>Etalons internes de quantification</u> | | | | | |
| Diazépam d5 | 286 | 261 | Amitriptyline d6 | 287 | 64 |
| Nordiazépam d5 | 276 | 247 | | | |

Tableau II- 3: Ions (m/z) caractéristiques des spectres de masse obtenus par CG-SM. La masse molaire (M) est exprimée en g.mol⁻¹.

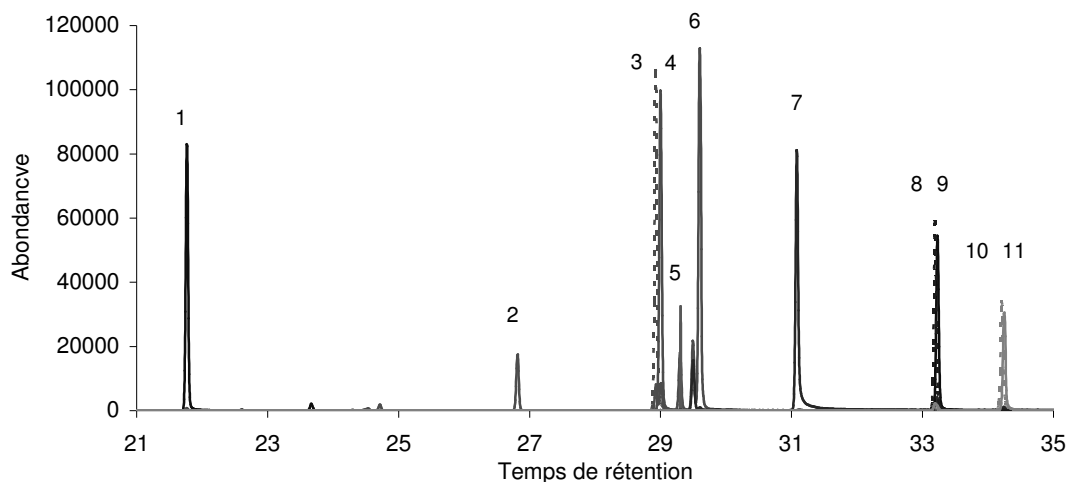


Figure II-17 : Chromatogramme obtenu pour un mélange de composés neutres. (1) Caféine, (2) Pyrène, (3) Amitriptyline d6, (4) Amitriptyline, (5) Imipramine, (6) Doxépine, (7) Carbamazépine, (8) Diazépam d5, (9) Diazépam, (10) Nordiazépam d5, (11) Nordiazépam.

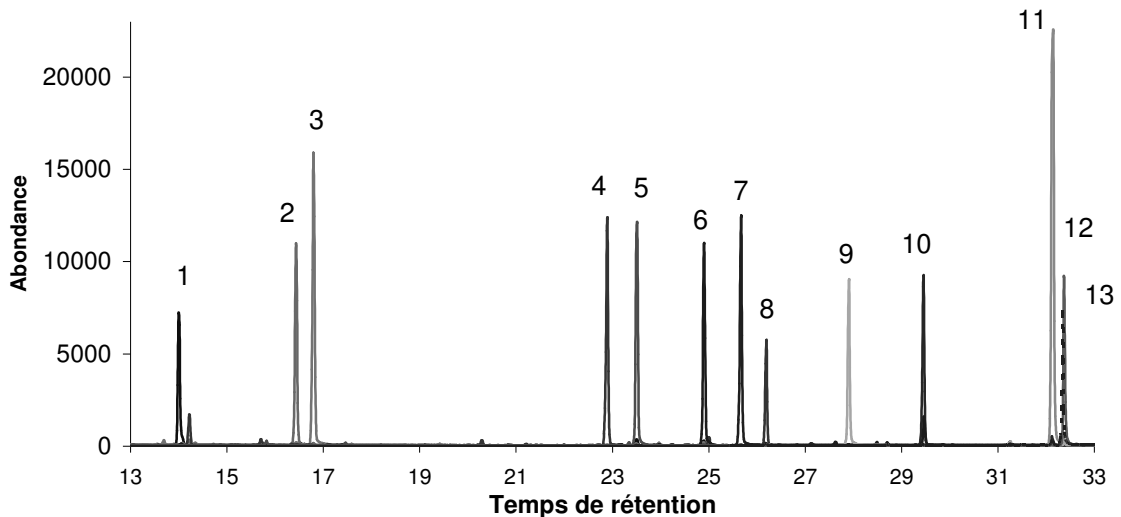


Figure II-18 : Chromatogramme obtenu pour un mélange de composés acides. (1) Aspirine, (2) Ibuprofène, (3) Paracétamol, (4) Gemfibrozil, (5) Terbutaline, (6) Salbutamol, (7) Naproxène, (8) Clenbutérol, (9) Kétoprofène, (10) Diclofénac (11) 1-hydroxypyrrène, (12) Diazépam-d5, (13) Diazépam.

c) Linéarité

Tous les composés montrent une réponse linéaire sur une gamme de 1 pg à 7 ng injectés (1 µl injecté). Une bonne linéarité est obtenue dans la gamme de concentration d'intérêt, aussi bien pour les composés neutres que pour la majorité des composés acides (Annexe 11). Les valeurs d'aires obtenues sont reproductibles (variabilité inférieures à 10 % sur l'ensemble de la gamme pour les composés neutres, inférieures à 17 % pour les composés acides). L'étape de dérivation diminue la reproductibilité de l'analyse, compte tenu des facteurs pouvant affecter cette étape : efficacité de la dérivation, état de l'appareillage analytique... En effet la dérivation entraîne un encrassement et une dégradation plus rapide du matériel analytique (système d'injection et colonne chromatographique), qui demande un contrôle et un entretien plus fréquent du matériel pour assurer une bonne qualité d'analyse. Certains composés comme le salbutamol ($R^2 = 0,9863$), la terbutaline ($R^2 = 0,9853$), le clenbutérol ($R^2 = 0,9908$) et le paracétamol ($R^2 = 0,99916$) montrent une linéarité et surtout une reproductibilité plus faible lors des tests. Ces phénomènes, dus à des problèmes de dérivation, déjà connus pour les 3 bronchodilatateurs (Damasceno *et al.*, 2000 ; Damasceno *et al.*, 2002), sont accentués dans les échantillons naturels et n'ont pu être résolus. Des essais, en utilisant un mélange plus complexe d'agent de dérivation (MSTFA + β -mercaptoéthanol + iodure d'ammonium), développé pour l'étude des stéroïdes (Budzinski *et al.*, 2006 ; Labadie et Budzinski, 2005) ont montré des résultats concluants pour ces trois composés. Par contre, pour les autres composés jusqu'ici correctement dérivés, on observe une diminution significative de sensibilité et de reproductibilité. Cette modification du protocole a donc été abandonnée.

d) Limites de détection

Sur les solutions de composés étalons, les limites de détection (rapport S/N = 3) varient entre 7 et 40 pg (1 µl injecté) dans les conditions optimales d'utilisation des appareils.

III-2-2 : Etalonnage internea) Principe

La majorité des analyses effectuées pendant cette étude ont été basées sur le principe de l'étalonnage interne. La technique d'étalonnage interne consiste à ajouter en quantité connue, en début de protocole d'extraction des composés non présents dans l'échantillon mais de structures proches de celles des analytes. Cette technique a pour but de quantifier les composés d'intérêts par rapport à la quantité d'étalons internes ajoutée, en s'affranchissant ainsi des pertes potentielles dues aux différentes étapes du protocole. Cette méthode de calcul peut être résumée par la formule suivante qui relie la quantité injectée d'un composé à l'aire de son pic chromatographique (Equation 1). Il est nécessaire de définir pour chaque composé i un facteur de réponse k_i pour pouvoir la quantité du composé présente. Ce facteur peut être déterminé par rapport à un étalon interne e (pour lequel $A_e = k_e \times M_e$), ce qui conduit à l'équation 2. Le facteur K_i est déterminé par l'utilisation d'une solution de référence, un mélange d'étalons, dans lesquels les concentrations respectives en analytes (i) et en étalons deutérés (e) sont connues. On obtient l'équation 3. Ensuite, pour chaque échantillon, on calcule alors M_i , la quantité d'analyte dans un échantillon inconnu par l'équation 4. L'ensemble des équations utilisées pour ces calculs est présenté dans la Figure II-19.

Le coefficient de réponse est une valeur spécifique pour chaque appareil et influencée par l'état du système analytique (encrassement...).

| | | | |
|---|--|------|-------------------------|
| <i>Equation 1</i> | $A_i = k_i \times M_i$ | et : | $A_e = k_e \times M_e$ |
| <p>A_i, aire du pic chromatographique du composé i et A_e, pour l'étalon e M_i, quantité du composé i et M_e, pour l'étalon e k_i, facteur de réponse du composé i k_e, facteur de réponse de l'étalon e</p> | | | |
| <i>Equation 2</i> | $\frac{A_i}{A_e} = K_i \times \frac{M_i}{M_e}$ | où | $K_i = \frac{k_i}{k_e}$ |
| <i>Equation 3</i> | $K_i = \frac{M_e A_i}{M_i A_e}$ | | |
| <i>Equation 4</i> | $M_i = \frac{A_i \times M_e}{K_i \times A_e}$ | | |
| Où M_e est la quantité d'étalon ajoutée à l'échantillon | | | |

Figure II-19 : Equations de calcul pour l'étalonnage interne.

b) Choix des étalons internes

Le choix de l'étalon interne doit répondre à différents facteurs : il ne doit pas être présent initialement dans l'échantillon à analyser, il doit avoir le même comportement que les composés recherchés, aussi bien lors de l'extraction que lors de l'analyse.

L'étude des composés pharmaceutiques en étant à ses débuts, le nombre d'étalons spécifiques pour ces composés est encore restreint. Plusieurs composés pouvaient correspondre à ces critères : le diazépam- d_5 , le nordiazépam- d_5 , le

paracétamol-*d4*, la caféine-*C13* et l'amitriptyline-*d6*. Pour ces 5 candidats, si ils permettent tous une bonne quantification des composés pharmaceutiques et ont un comportement chromatographique similaire, le comportement lors de l'étape d'extraction du paracétamol-*d4* et de la caféine-*C13* ne répond pas aux exigences fixées (Figure II-20), puisque ces deux composés ne sont pas correctement extraits lors de l'application du protocole SPE. Les différents tests effectués semblent montrer que les pertes ont lieu lors de l'étape d'évaporation de l'extrait sous flux d'azote, avant la reprise de l'échantillon dans les flacons d'injection.

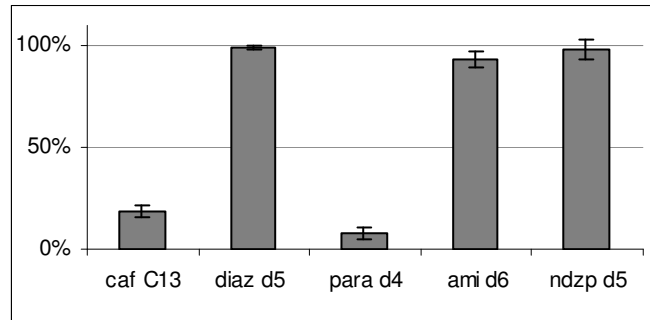


Figure II-20 : Rendements d'extraction obtenus pour les étalons internes pressentis (n=6).

3 composés deutérés ont donc été retenus pour cette étude : le diazépam-*d5*, le nordiazépam-*d5* et l'amitriptyline-*d6* (Eurisotop, Gif sur Yvette, France). Les résultats de la validation de la quantification des substances pharmaceutiques par ces étalons sont présentés dans la Figure II-21 et la Figure II-22, montrant des taux de quantification supérieurs à 74 % pour tous les composés avec une variabilité inférieure à 7 % sauf la terbutaline (20 %).

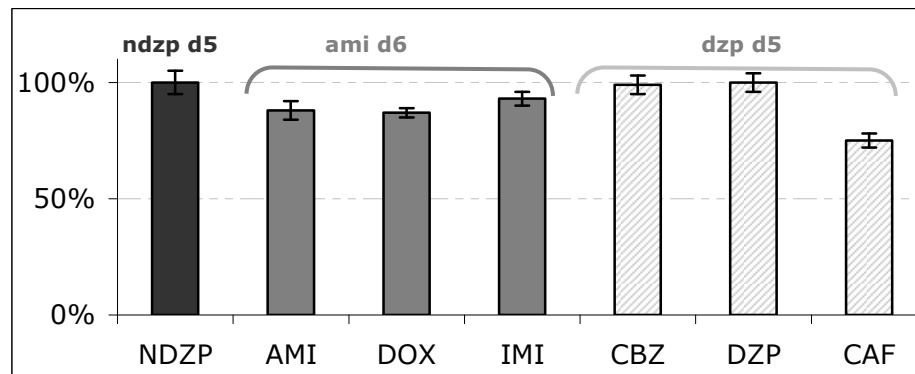


Figure II-21 : Validation de la quantification par les étalons internes (n=6), composés neutres.

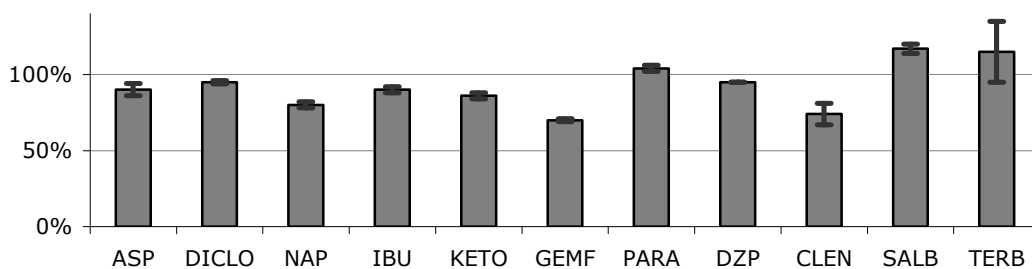


Figure II-22 : Validation de la quantification par les étalons internes (n=6), composés acides.

c) Choix des étalons seringue

En plus de ces étalons internes de quantification, 2 étalons sont ajoutés juste avant l'injection pour vérifier le rendement d'extraction des étalons internes de quantification. Ces étalons de contrôle ne subissent pas l'étape d'extraction mais uniquement l'analyse. Ils doivent donc avoir uniquement des propriétés chromatographiques proches de celles des étalons internes qu'ils servent à contrôler.

Dans cette étude, vu la difficulté d'obtention de médicaments deutérés, il a été choisi deux HAP : le pyrène et le 1-hydroxypyrene, le premier correspondant à l'analyse des composés neutres et le deuxième au suivi des composés acides. La Figure II-23 présente les rendements de quantification obtenus avec ces deux composés, montrant leur adéquation avec les étalons internes sélectionnés.

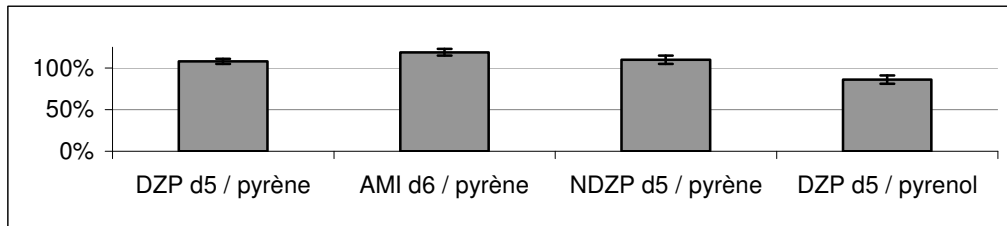


Figure II-23 : Validation de la quantification des étalons internes par les étalons « seringue » (n = 6).

d) Application aux échantillons naturels

La quantité d'étalon internes ajoutée gravimétriquement à chaque échantillon dépend du niveau de concentration attendu, et va varier selon les cas de quelques nanogrammes (eaux de captage par exemple) à quelques centaines de nanogrammes (rejets de station d'épuration). Dans tous les cas, le volume introduit ne dépasse pas 100 µl par litre d'échantillon, pour que la présence de méthanol (solvant de préparation des étalons internes) ne perturbe pas l'étape d'extraction : l'adaptation se fait par l'utilisation de solutions de plusieurs niveaux de concentration.

La quantité de solution seringue varie en fonction de la quantité d'étalons introduits en début d'extraction.

Ces ajustements, nécessaires pour obtenir les meilleurs résultats de quantifications (adéquation des niveaux de concentration des composés recherchés et des étalons introduits), n'introduisent aucun biais puisque tous les ajouts sont effectués gravimétriquement.

III-3 Protocoles d'extraction des échantillons

III-3-1 : Echantillons d'eau par Extraction en Phase Solide (SPE)

Dans le cas de l'extraction en phase solide, l'extraction est effectuée sur la phase dissoute. Les échantillons d'eau sont donc dans un premier temps filtrés sur des filtres en fibres de verre (diamètre de pores 0,7 µm) préalablement calcinés (450 °C, 6h).

Pour l'étape d'extraction, différents protocoles ont été progressivement développés au cours de la thèse.

a) Protocoles d'extractions séparés par classe de composés

Dans un premier temps, le protocole a été développé en séparant les composés neutres et les composés acides, compte tenu des conditions optimales validées sur les différents types de cartouches. Les volumes d'eau sont variables selon la nature de l'échantillon : pour les eaux de surface, on extrait 1 l d'échantillon, tandis que pour les eaux d'effluents de station d'épuration, l'extraction s'effectue sur 500 ml.

Pour les composés acides, l'extraction se fait après acidification des eaux à pH 2 avec de l'acide chlorhydrique, sur des cartouches OASIS HLB®. Pour les composés neutres, les eaux sont d'abord basifiées à pH 9 avec de l'hydroxyde de sodium avant le passage sur cartouche C18. L'ajustement du pH s'effectue en fonction des classes chimiques extraites : les composés acides sont mieux extraits en milieu acide et les composés neutres sont mieux extraits en milieu basique (Publication n°1). Par la suite, les deux extractions sont similaires. Les deux conditions sont obtenues par ajout volumétrique d'acide ou de base (± 1 ml d'une solution diluée, environ 3 M). L'ajustement est effectué en fonction de la nature des échantillons par contrôle avec un pH-mètre WTW®-526 (VWR International, Strasbourg, France).

Le conditionnement des cartouches se fait par trois éluions, successivement 3 ml d'un mélange acétate d'éthyle : acétone (50:50; v v), 3 ml d'acétate d'éthyle, puis 3 ml d'eau osmosée au pH de l'échantillon. Suite à ce conditionnement, l'échantillon est déposé sur les cartouches par aspiration sur cuve VACelut®, à un débit compris entre 12 et 18 ml par min.

Une étape de purification, constituée d'une éluion par 3 ml d'un mélange méthanol : eau (60:40; v:v) permet d'éliminer une partie des composés interférents. Elle est suivie d'1 h de séchage sous vide afin d'éliminer toutes les traces d'eau sur la cartouche.

L'éluion des composés d'intérêt se fait par deux éluions successives : dans un premier temps 9 ml d'acétate d'éthyle, suivis de 9 ml du mélange d'acétate d'éthyle : acétone (50:50; v:v). L'éluât est ensuite évaporé à sec sous flux d'azote et repris dans 50 à 100 μ l d'acétate d'éthyle. 2 μ l de cet extrait sont ensuite injectés en GC-MS.

Les rendements obtenus sont compris entre 55 et 90 % selon les composés aussi bien pour les composés neutres (Figure II-24) que pour les composés acides (Figure II-25). Seuls la doxépine et l'imipramine ne sont pas extraits de la matrice aqueuse par ce processus. Les deux figures montrent des résultats de rendement obtenus sur des échantillons d'eau ultrapure supplémentés à une concentration de 500 ng.l⁻¹.

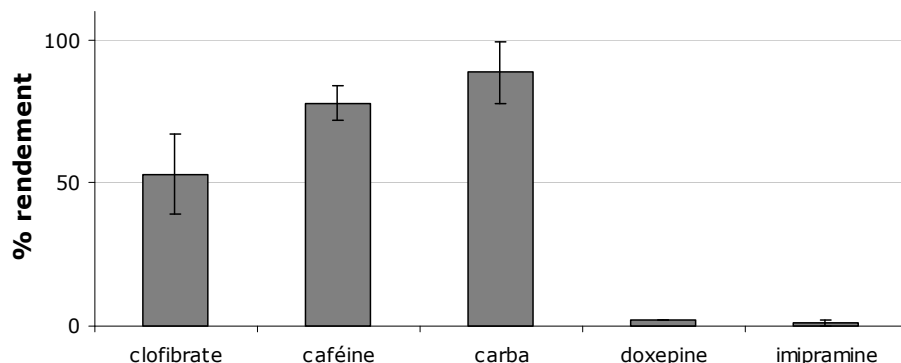


Figure II-24 : Rendement de l'extraction sur cartouche C18 des composés neutres (n=5).

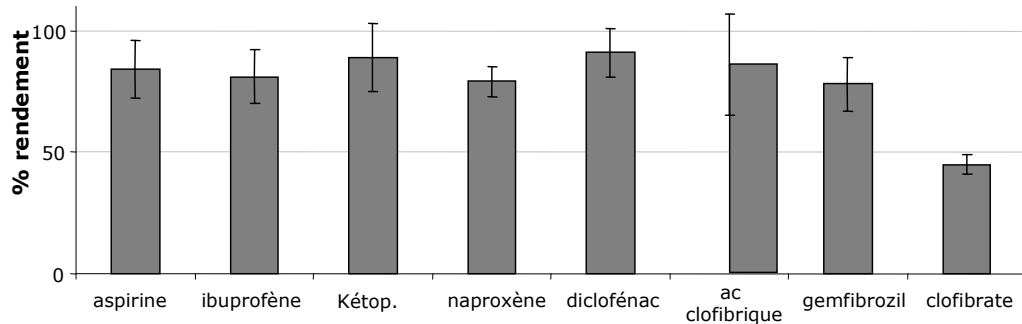


Figure II-25 : Rendement de l'extraction sur cartouche HLB des composés acides (n=5).

Concernant la répétabilité, elle est excellente sur la majorité des composés : entre 3 % (gemfibrozil) et 13 % (aspirine) pour les composés acides et entre 6 % (caféine) et 16 % (clofibrate) pour les composés neutres extraits. Le calcul de la reproductibilité, obtenue à partir de 10 échantillons indépendants, donne des résultats satisfaisants, avec des valeurs inférieures à 15 % sur l'ensemble des composés, hormis la caféine (21 %).

Les blancs d'extraction, effectués en parallèle de chaque série d'échantillons montrent des valeurs inférieures au ng (maximum de 2 ng pour la carbamazépine), montrant l'applicabilité de cette méthode aux échantillons, même à de très faibles teneurs en substances pharmaceutiques.

b) Protocole d'extraction combiné

Le protocole a par la suite évolué, grâce à l'utilisation d'un nouveau type de cartouche les OASIS MCX (Cation Exchange). Ce nouvel adsorbant a permis d'extraire l'ensemble des composés en une seule extraction.

L'échantillon d'eau est acidifié à pH 2. Le conditionnement des cartouches se fait par deux éluions, successivement 3 ml d'un mélange acétate d'éthyle : acétone (50:50; v:v), puis 3 ml d'eau osmosée à pH 2. Suite à ce conditionnement, l'échantillon est déposé sur les cartouches par aspiration sur cuve VACelut®, à un débit compris entre 12 et 18 ml par min. L'étape de purification a été supprimée. Le séchage s'effectue sous vide pendant 1 h afin d'éliminer toutes les traces d'eau sur la cartouche.

L'éluion des composés d'intérêt se fait par trois éluions successives : dans un premier temps 3 ml d'acétate d'éthyle, puis 3 ml du mélange d'acétate d'éthyle : acétone (50:50; v:v), suivis de 3 ml du mélange d'acétate d'éthyle : acétone : NH_4OH (49:49:2; v:v:v). L'éluât final est ensuite évaporé à sec et repris dans 50 à 100 μl d'acétate d'éthyle pour injection.

Les rendements obtenus par ce protocole combiné sont compris entre 54 % et 110 % avec des écart-types inférieurs à 10 %, hormis pour le clenbutérol (17 %), le salbutamol (14 %), la terbutaline (12 %) (

Figure II-26). Les blancs de protocoles effectués en parallèle des expérimentations sont tout à fait corrects et montrent une absence de contamination durant l'étape d'extraction, avec des niveaux de concentrations inférieurs à 0,5 ng, sauf pour la carbamazépine (1,5 ng).

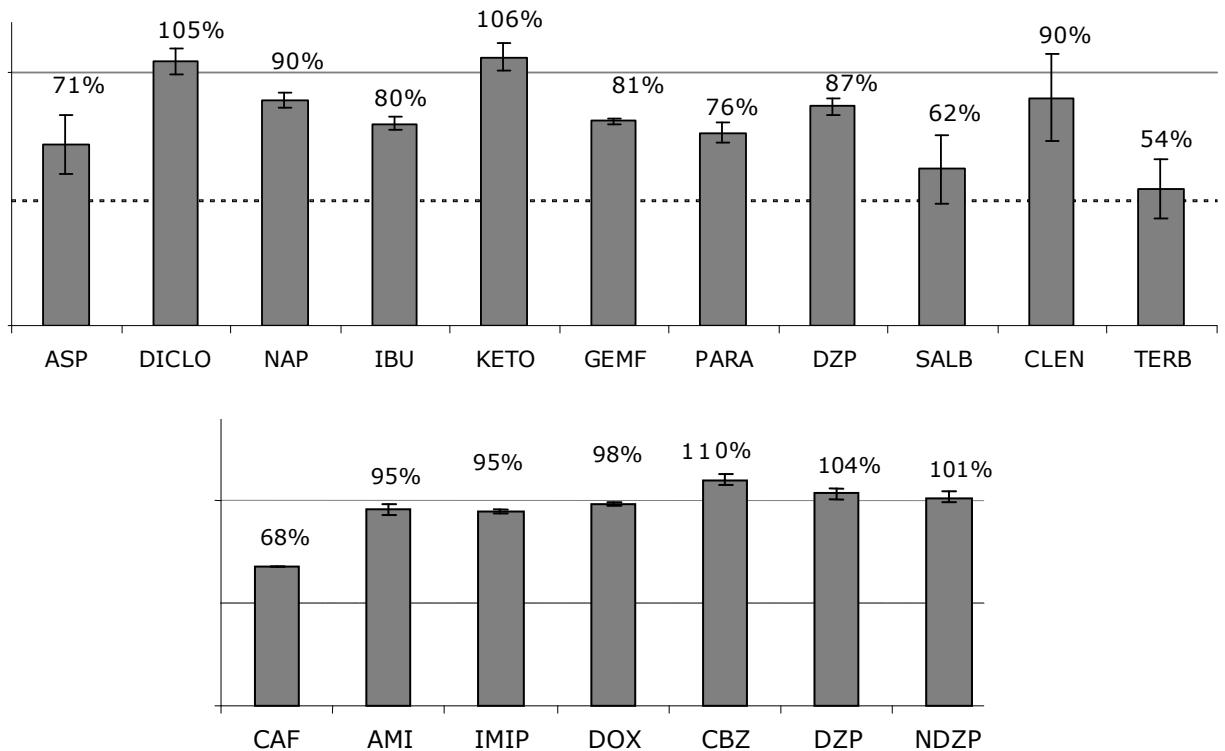


Figure II-26 : Rendement de l'extraction sur cartouche MCX de l'ensemble des composés (niveau de concentration : 500 ng.l-1, 1 l extrait, n=6), abrégations : Cf. tableau II-2.

Les calculs de reproductibilité ont été effectués grâce à 10 échantillons indépendants. Ils montrent des valeurs inférieures à 13 % de variabilité hormis pour le clenbutérol (26 %), le salbutamol (23 %), la terbutaline (19 %) et le paracétamol (17 %). Cette variabilité pour ces 4 composés, déjà évoquée dans la partie analyse GC-MS provient de difficultés rencontrées lors de l'étape de dérivation.

Ce protocole combiné a été appliqué à de nombreux échantillons aqueux de natures différentes : effluent de stations d'épuration, eau de surface, eau de mer, eau de captage. Sur ces échantillons, des limites de détection (rapport signal/ bruit < 3) ont été calculées (Tableau II- 4). Il n'existe pas de différence notable entre l'eau de mer et les autres types d'eau. La teneur en matière organique, la présence de composés interférents... (dans des matrices complexes comme les effluents de station par exemple) vont être les principaux facteurs influant sur la limite de détection.

| Composés | Eau de captage (1 l) | Eau de surface (1 l) | Effluent (0,5 l) |
|---------------|----------------------|----------------------|------------------|
| Amitryptiline | 0,7 | 2,2 | 3,4 |
| Aspirine | 0,2 | 2,1 | 7,8 |
| Caféine | 1,5 | 2,5 | 14,3 |
| Carbamazépine | 0,8 | 1,4 | 11,6 |
| Clenbuterol | 0,6 | 0,3 | 2,0 |
| Diazépam | 0,4 | 1,4 | 6,9 |
| Nordiazépam | 0,4 | 1,4 | 6,9 |
| Diclofénac | 0,9 | 0,7 | 4,5 |
| Doxépine | 0,7 | 2,1 | 8,3 |
| Gemfibrozil | 0,1 | 0,3 | 1,6 |
| Ibuprofène | 0,0 | 0,1 | 2,4 |
| Imipramine | 0,7 | 1,2 | 6,9 |
| Kétoprofène | 0,3 | 0,7 | 5,8 |
| Naproxène | 0,1 | 1,0 | 3,1 |
| Paracétamol | 5,3 | 8,5 | 17,5 |
| Salbutamol | 0,6 | 0,5 | 3,9 |
| Terbutaline | 0,6 | 0,3 | 3,5 |

Tableau II- 4 : Limites de détection obtenues sur divers types d'échantillons naturels (prise d'essai indiquée entre parenthèses).

Malgré le fait que ce soit une matrice biologique, la bile prélevée sur les poissons est traitée comme un échantillon d'eau. Les rendements d'extraction ont été validés sur des échantillons supplémentés. La purification inhérente à l'extraction en phase solide sur cartouche MCX suffit à la purification de l'échantillon. Il ne s'est pas avéré nécessaire de compléter cette extraction par une étape supplémentaire, comme pour les autres matrices biologiques.

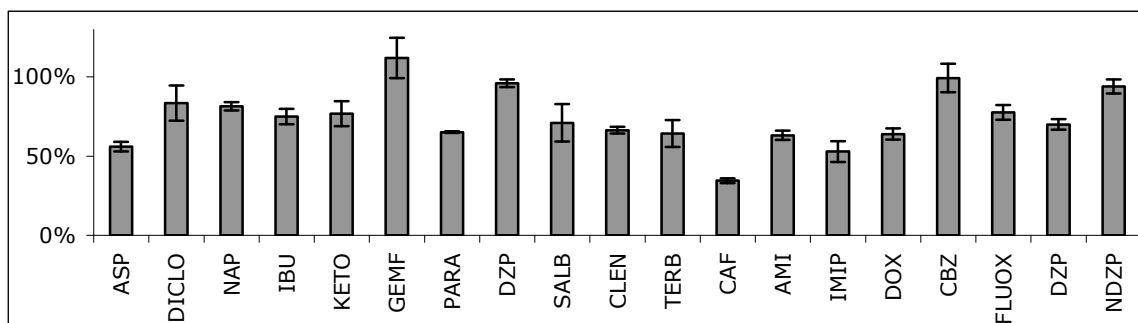


Figure II-27 : Rendement d'extraction obtenus sur la bile supplémentée (500 ng.ml-1), n=3.

III-3-2 : Echantillons "matrices solides" (publications 3 et 4)

Sont considérés comme matrices solides les sédiments, les particules dissociées de la phase dissoute par filtration ainsi que les matrices biologiques comme le muscle, le foie, hépato-pancréas de mollusques (hors fluides, comme la bile, l'urine, le sang et le plasma). Etant donnée la nature des matrices, des étapes supplémentaires de purification ont complété le protocole préalablement développé pour les matrices aqueuses.

a) **Modification du protocole « matrices aqueuses »**

Préparation des échantillons

Tous ces échantillons solides vont subir une étape de lyophilisation qui va permettre de connaître le poids sec de chaque échantillon, et de pouvoir ainsi les comparer entre eux, sans être gênés par le biais de leur taux d'humidité, parfois très variable. Les échantillons de sédiments sont ensuite tamisés (tamis de 2 mm) afin d'éliminer les cailloux, coquilles et autres débris indésirables. Les échantillons de matrices biologiques sont quant à eux broyés, homogénéisés avant d'être utilisés.

Extraction assistée par micro-ondes

La première étape d'extraction est une extraction assistée par micro-ondes, qui facilite le transfert des contaminants de la matrice au solvant d'extraction. Le mélange utilisé est constitué de 30 ml d'eau acidifiée à pH 2 et d'acétonitrile (30 : 70; v : v). L'extraction se fait pendant 10 min à 15 W. L'extrait est ensuite filtré sur coton de verre, avant évaporation du solvant par l'utilisation d'un système d'évaporation sous vide par chauffage (Rapidvap ®, 45 min, 80°C, 650 mbars).

Extraction en phase solide

L'extrait aqueux alors récupéré est complété à 50 ml par de l'eau osmosée à pH 2. L'échantillon aqueux ainsi obtenu est alors traité comme les phases dissoutes par une extraction en phase solide (protocole combiné sur cartouche OASIS MCX).

b) **Validation**

Pour les matrices particulières, les rendements sont compris entre 47 % et 115 % (sauf pour la terbutaline et le salbutamol) comme présenté Figure II-28. La purification intrinsèque à l'étape d'extraction en phase solide sur cartouche MCX suffit à assurer la purification de l'échantillon. Les limites de détection sur ce type de matrices sont comprises entre 1 ng (gemfibrozil, naproxène, paracétamol) et 9 ng (doxépine, imipramine).

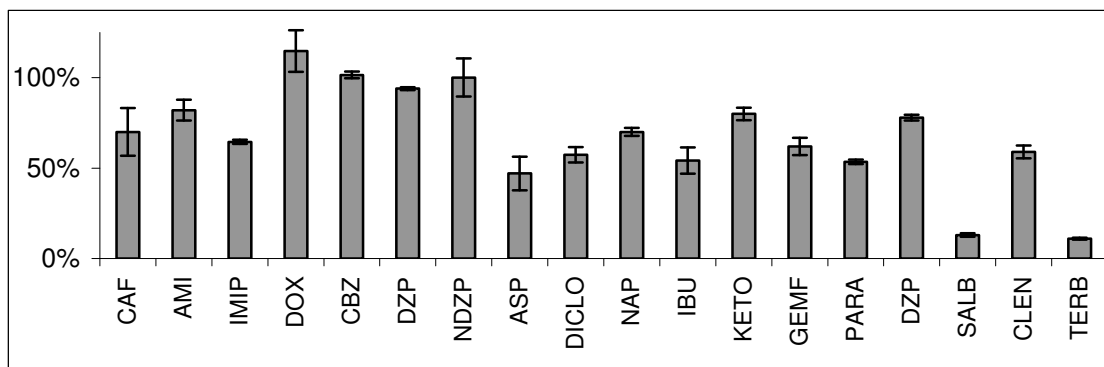


Figure II-28 : Rendement d'extraction des matrices particulières (sans purification)(n=3).

Les rendements d'extraction sur matrice sédimentaire sont supérieurs à 70% pour l'ensemble des composés (hormis l'aspirine et le salbutamol), avec des écart-types inférieurs à 20 % sur tous les composés (Figure II-29). Pour certains d'entre eux, des interférences apparaissent, notamment pour le paracétamol (rendement de 125 %).

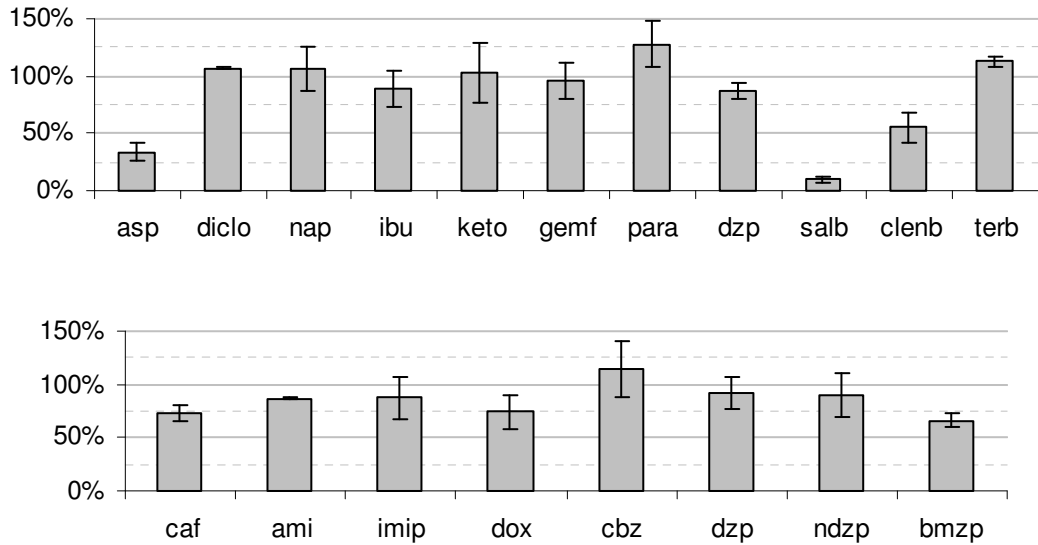


Figure II-29 : Rendement d'extraction des matrices sédimentaires (sans purification) (n=3).

Si l'extrait obtenu après SPE pour les phases dissoutes est directement utilisable, il n'en va pas de même sur les matrices plus complexes que sont les matrices solides. En effet, de nombreux constituants de ces matrices (pigments, matières grasses,...) peuvent interférer dans la détection des composés pharmaceutiques. Une seconde étape d'extraction en phase solide, plus spécifiquement purificatrice a donc été développée.

c) Purification en phase solide

Selon ce principe, ce sont les composés interférents qui restent retenus sur la cartouche. Différents types de cartouches ont été testés : silice greffée NH₂ et silice greffée PSA (Primary- Secondary Amine sorbent). Le protocole optimisé, permettant d'obtenir des rendements convenables pour l'ensemble des composés utilise les cartouches PSA (Figure II-30).

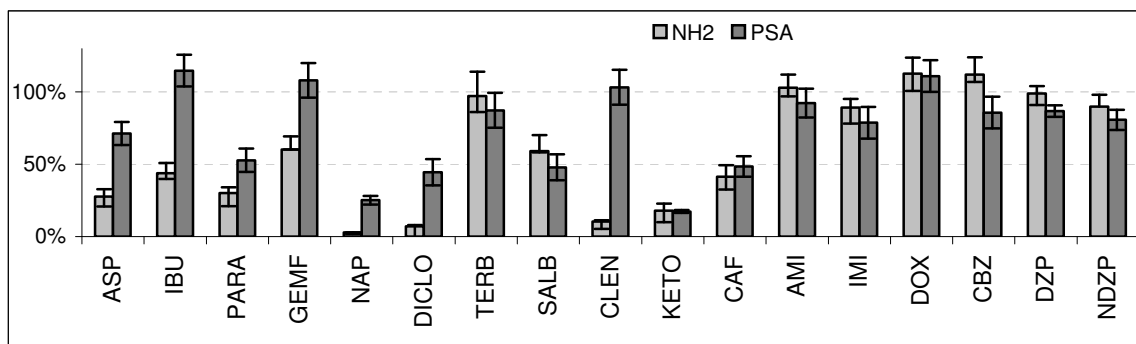


Figure II-30 : Comparaison des rendements d'extraction entre purification sur cartouche PSA et NH₂, matrice : sédiment dopé (500 ng.g⁻¹), n=3.

La phase PSA a un comportement similaire à la phase NH₂. La présence de deux groupements amine lui confère une capacité ionique supérieure à celle des NH₂ (1,4 meq.g⁻¹ contre 1,1 meq.g⁻¹ pour les NH₂). Sa forte teneur en carbone en fait une phase de choix pour les composés très polaires qui sont trop fortement retenus sur les phases NH₂.

Les cartouches sont préalablement conditionnées par 3 ml d'acétate d'éthyle puis 3 ml du mélange méthanol : acétate d'éthyle (20:80 ; v:v).

L'éluât précédemment obtenu est évaporé à sec sous flux d'azote et repris dans 2 ml d'un mélange méthanol : acétate d'éthyle (20:80 ; v:v). L'échantillon est ensuite déposé sur la cartouche et directement récupéré. La cartouche est finalement éluée par 6 ml du mélange puis 6 ml du mélange complété par du TEA (triéthyl-amine, 2%) qui permet l'éluion des composés acides. Cet éluât est alors évaporé à sec et repris dans de l'acétate d'éthyle.

Ce protocole a été appliqué aux sédiments mais aussi aux matrices biologiques. La Figure II-31 présente les rendements obtenus sur des échantillons de moules supplémentés (niveau moyen 500 ng.g⁻¹). Les rendements sont compris entre 23 % et 104 %. Les valeurs les plus faibles sont obtenues pour les composés acides (kétoprofène à 29 % et le naproxène à 23 %, l'étape limitante étant la phase de purification sur les cartouches PSA (Figure II-30).

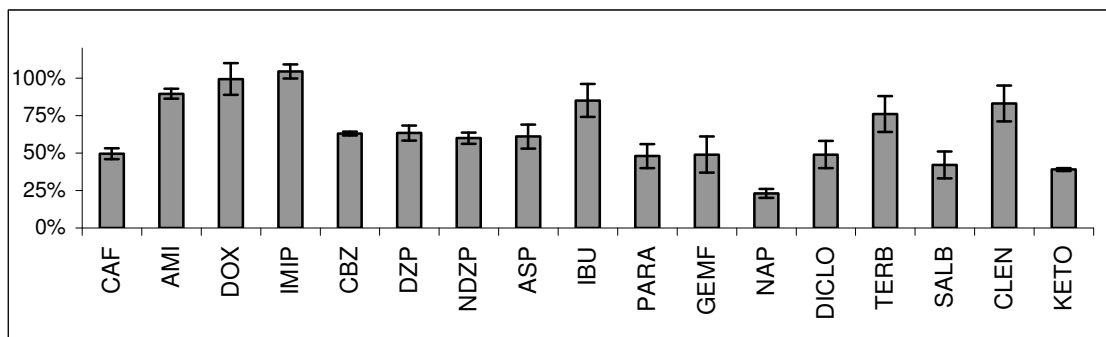


Figure II-31 : Rendements d'extraction (MCX + PSA) sur des échantillons supplémentés de moules (500 ng.g⁻¹, n=3).

IV-Etude de la bioaccumulation dans les organismes aquatiques.

IV-1 Etude en laboratoire

Dans le cadre du programme ECOTDYN (Ecotoxicologie et Ecodynamique des continents), le projet DECIME (Dynamique et effets biologiques des contaminants organiques dans le contexte d'intertidalité d'un organisme sentinelle, *Mytilus edulis*). Pour ce projet, 4 classes de contaminants (HAP, PCB, agents non-ioniques et composés pharmaceutiques) ont été sélectionnées. Pour les composés pharmaceutiques l'étude en laboratoire a été effectuée avec la carbamazépine, un des composés les moins hydrophiles parmi ceux étudiés au cours de la thèse. Ce travail de recherche se propose d'analyser les interrelations croisées entre l'exposition aux contaminants chimiques et les effets physiologiques de l'intertidalité. Ces relations sont étudiées en terme de bioaccumulation, et d'expression d'une série de biomarqueurs d'exposition et d'effet.

Six conditions expérimentales simultanées sont comparées :

- ❖ Moules témoins (non-exposées aux contaminants) totalement immergées
- ❖ Moules témoins –DMSO (sans contaminant) totalement immergées
- ❖ Moules témoins (non-exposées aux contaminants) subissant l'alternance immersion –émersion

- ❖ Moules témoins –DMSO (sans contaminant) subissant l’alternance immersion –émersion
- ❖ Moules exposées aux contaminants totalement immergées
- ❖ Moules exposées aux contaminants subissant l’alternance immersion - émersion

Le DMSO utilisé comme agent-vecteur des contaminants peut avoir un effet sur les dosages toxicologiques, ce qui peut fausser les résultats. Des bacs témoins DMSO ont donc été mis en place. La Figure II-32 présente le plan expérimental mis en place.

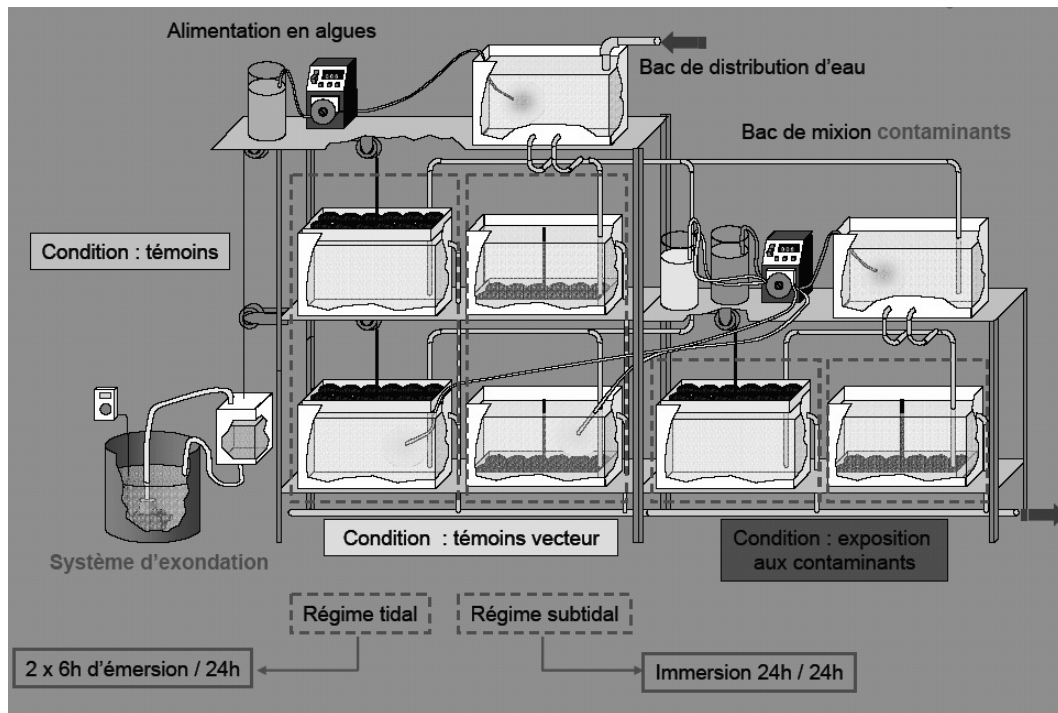


Figure II-32 : Dispositif expérimental d'exposition des moules.

Les animaux sont contaminés par voie dissoute à une concentration de $30 \mu\text{g.l}^{-1}$ en condition semi-statique (2 contaminations par jour).

Les moules sont introduites dans les bacs pour une période de 7 jours de stabulation avant une période d'exposition de 14 jours. Les moules sont prélevées lors de la contamination puis après 1, 3, 7 et 14 jours d'exposition. L'eau est suivie en parallèle. La concentration en carbamazépine dans l'eau de l'ensemble des bacs a été quantifiée, pour assurer la stabilité de la contamination dans les bacs d'exposition et l'absence de composé dans les bacs témoin. Les moules sont prélevées par pool par bac, disséquées (récupération de l'ensemble des tissus) et immédiatement congelées. Les échantillons sont ensuite lyophilisés et broyés avant l'extraction des substances pharmaceutiques, comme décrit précédemment.

IV-2 Mesures dans le milieu naturel

Une étude préliminaire a été entreprise pour estimer les teneurs en composés pharmaceutiques sur des organismes aquatiques prélevés dans le milieu naturel. Une vingtaine d'échantillons de soles et de flet, prélevés dans le cadre de différents programmes de recherche sur la Baie de Seine ont été sélectionnés. 3 organes ont été étudiés : le foie, la bile et le muscle. Tous les échantillons ont été préalablement disséqués, congelés, lyophilisés et broyés avant l'étape d'extraction.

V-Utilisation des POCIS

Parmi les nouveaux outils développés pour l'échantillonnage passif, les POCIS (Polar Organic Compounds Integrative Sampler) sont encore peu employés et l'on manque encore d'informations sur leur comportement, leur limites dans le suivi de la contamination des écosystèmes aquatiques, comme cela a été présenté dans le chapitre I. Ce chapitre présente les principes d'utilisation de cet outil, les premiers essais en laboratoire et les premières applications environnementales développées dans le cadre de la thèse.

V-1 Généralités

V-1-1 : Principes

Dans l'échantillonnage passif dans l'eau, les analytes d'intérêt diffusent à travers une membrane du milieu extérieur vers un milieu collecteur (phase), de manière constante jusqu'à une condition d'équilibre, non atteinte à l'échelle du temps d'échantillonnage (de l'ordre de 2 mois) (Alvarez *et al.*, 2004a ; Alvarez *et al.*, 2004b).

L'intérêt de cette linéarité est qu'elle permet de calculer la concentration moyenne dans le milieu sur la période d'exposition à partir de la quantité d'analytes présents dans la POCIS.

Pour recalculer la concentration dans le milieu à partir de la concentration dans la POCIS, il est nécessaire de connaître le taux d'échantillonnage (R_s) pour chaque substance. Le taux d'échantillonnage correspond au volume d'eau épuré d'analyte par unité de temps (Alvarez, 1999). Afin d'obtenir des valeurs de référence pour ce facteur R_s , spécifique pour chaque composé, des expérimentations en laboratoire doivent être menées, pour simuler les conditions environnementales et travailler en conditions de concentration d'exposition connues. Le R_s est calculé par l'équation (1). Quand le R_s est connu, il permet d'obtenir la concentration moyenne dans le milieu sur la période d'exposition par la relation (2).

$$(1) \quad R_s = \frac{Q_0 - Q_t}{d} \times V \qquad (2) \quad C_w = \frac{C_s \times M_s}{R_s \times d}$$

Q_0 , la quantité d'analyte présent au début de l'exposition,
 Q_t est la quantité d'analyte présent à la fin de l'exposition,
 V est le volume d'exposition de la POCIS
 d est la durée de l'exposition
 C_s est la concentration en analyte dans la phase adsorbante
 M_s est la masse de phase
 R_s est le taux d'échantillonnage spécifique de l'analyte

Figure II-33 : Equations de calcul utilisées pour les POCIS.

Le R_s est donc un facteur clef dans l'utilisation quantitative de cet outil. Les études actuelles essaient de déterminer quelle peut être la validité de ce facteur évalué en laboratoire dans les conditions environnementales. En effet, la température, la salinité, la teneur en matière organique et en matière en

suspension, sont autant de paramètres qui peuvent influencer sur les capacités d'adsorption et de rétention de l'échantillonneur.

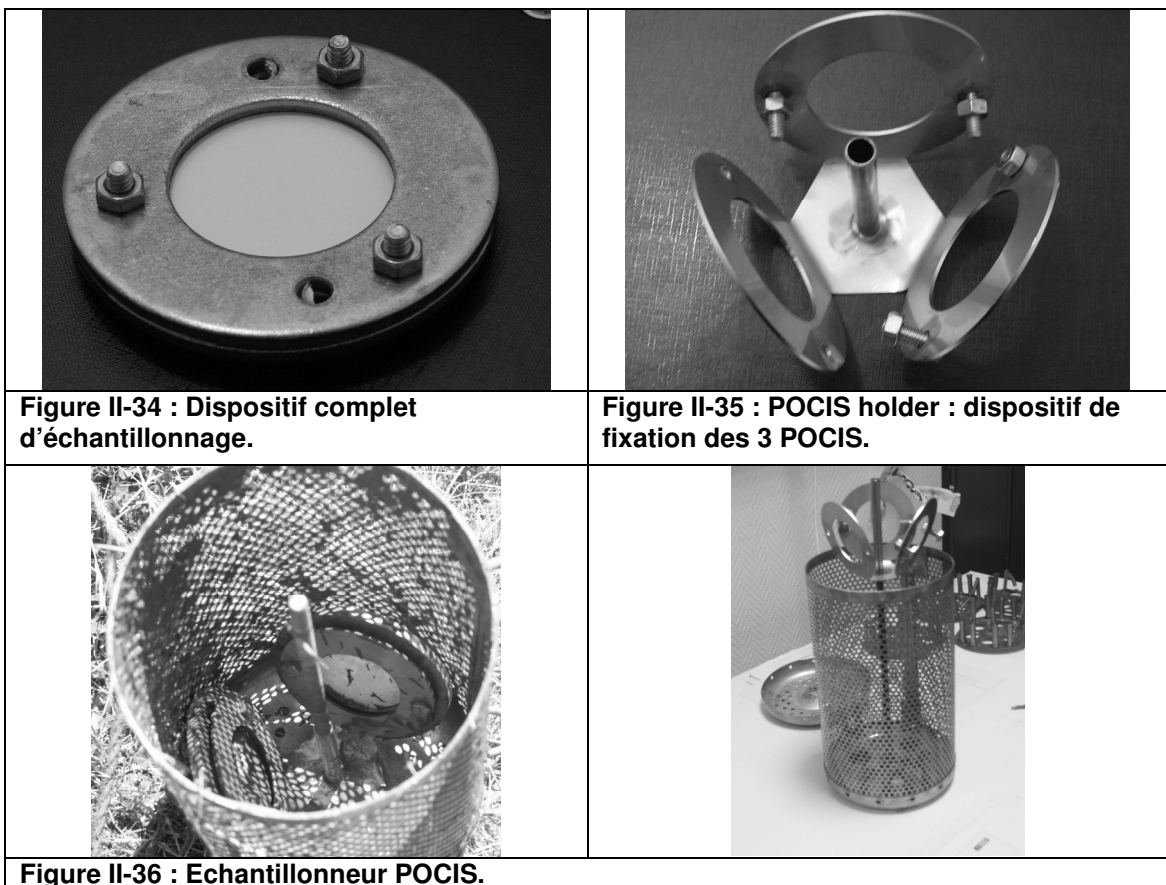
V-1-2 : Présentation des POCIS

La POCIS est constituée d'environ 100 mg d'une phase polymérique. Il existe deux types de phase, selon le type de composés d'intérêt. Pour l'étude des composés pharmaceutiques, c'est une phase Oasis HLB® qui est utilisée, un copolymère macroporeux constitué de deux monomères : le divinylbenzène lipophile et le N-vinylpyrrolidone hydrophile. Cette phase est contenue entre deux membranes de polyéthylsulfone dont le diamètre des pores (0,1 µm) permet le passage des analytes mais retient les colloïdes et les matières en suspension (Figure I- 6).

V-1-3 : Dispositif environnemental

Les POCIS sont fournis par Exposmeter (Suède), société dépositaire pour l'Europe du brevet déposé par l'USGS (United States Geological Survey). Les POCIS sont fournies serties et prêtes à l'emploi (Figure II-34).

Pour les installations sur le terrain, un dispositif fourni par le revendeur permettant d'exposer simultanément 3 échantillonneurs (Figure II-35) est fourni par le revendeur. Un système de protection des échantillonneurs est aussi disponible, qui limite le dépôt de macro-débris sur le dispositif et permet de fixer l'ensemble sur un support et d'ajouter des poids pour le lester et ainsi assurer son exposition permanente (Figure II-36).



V-1-4 : Protocole d'extraction des POCIS

Quand les POCIS sont déployées dans le milieu naturel, la première étape consiste en un rinçage de la POCIS à l'eau osmosée afin d'éliminer les dépôts de particules et le biofilm fixés sur l'échantillonneur.

Le système est ensuite dissocié : la phase est récupérée dans un bécher, les parois de la membrane sont rincées à l'eau osmosée. La phase est transférée sur une micro-colonne de verre obstruée par du coton de verre préalablement nettoyé (multiples rinçages au dichlorométhane dans un bain à ultrasons). Le système d'extraction (micro-colonne/coton) est taré avant le dépôt de la phase afin de pouvoir recalculer la masse exacte de phase récupérée de l'échantillonneur.

Après séchage pendant une heure sous vide, l'élution est effectuée par 18 ml du mélange d'acétate d'éthyle : acétone (50:50; v : v).

Quand les membranes sont utilisées, elles sont extraites par trois bains successifs de 20 ml de méthanol dans un bain à ultrasons (3 x 10 min). Ces extraits sont ensuite évaporés sous flux d'azote avant d'être repris dans 100 à 500 µl d'acétate d'éthyle.

La quantité de phase par POCIS est pesée après extraction des composés, après lyophilisation du système micro-colonne de verre/coton/phase, permettant ainsi de défalquer la masse initiale du système de collecte. La mesure gravimétrique permet de s'affranchir de la variabilité avérée de la quantité de phase dans les échantillonneurs en exprimant les taux d'échantillonnage en concentration (litre.jour⁻¹.g⁻¹ de phase).

L'analyse des extraits se fait par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, selon les méthodes préalablement explicitées.

L'étalonnage interne tel qu'il a été présenté pour les analyses d'eau n'est pas applicable pour ce protocole. En effet, ils ne peuvent suivre l'intégralité du protocole analytique. Néanmoins, les étalons deutérés sont introduits gravimétriquement après le dépôt de la phase dans la micro-colonne permettant de suivre les étapes de séchage et d'élution. La fiabilité de l'étape d'élution a été vérifiée par le dopage de 100 mg de phase avec un mélange de composés (solution aqueuse à 100 µg.g⁻¹, dopage par 0,1 mg, soit 1 µg de composés). Cette validation est présentée dans la Figure II-37. Les rendements sont supérieurs à 75 % pour la majorité des composés avec des écarts-types inférieurs à 15 % pour l'ensemble des composés. Les valeurs les plus faibles, inférieures à 75 %, sont rencontrées pour la terbutaline (TERB, 56 %), le salbutamol (SALB, 62 %) et le paracétamol (PARA, 66 %) qui montrent des problèmes analytiques lors de l'analyse par GC-MS après dérivation.

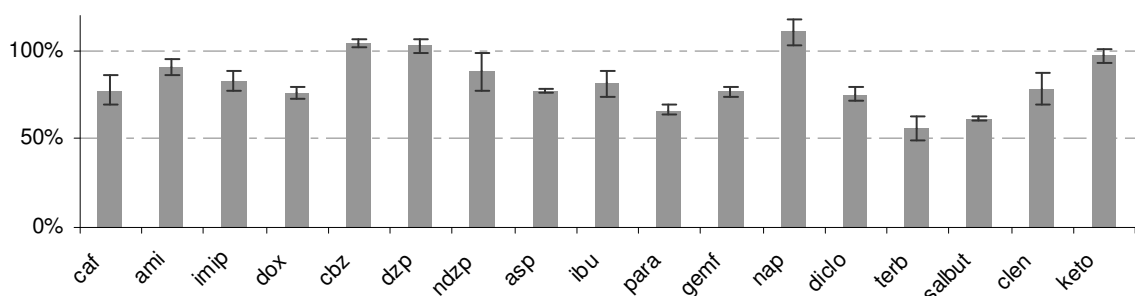


Figure II-37 : Validation du protocole d'extraction de la phase des POCIS (n=3).

Des blancs expérimentaux ont été réalisés sur la phase et n'ont montré aucune trace significative de composés ou d'interférents venant perturber la quantification des analytes.

V-2 Protocole expérimental en laboratoire

Comme explicité précédemment, plusieurs études en laboratoire ont été menées afin d'une part d'estimer le taux d'échantillonnage de la POCIS pour chacun des analytes d'intérêt et d'autre part de documenter la variabilité de ce taux d'échantillonnage en fonction des conditions physico-chimiques environnementales.

Pour le calcul du taux d'échantillonnage, les POCIS sont exposées individuellement dans des béchers de 2 l contenant de l'eau supplémentée en substances pharmaceutiques. Cette eau est renouvelée tous les jours et agitée par un système de barreau magnétique. Différentes conditions expérimentales ont été testées et sont résumées dans le Tableau II- 5.

| n° exp. | Nb POCIS | Concentration | Température | Salinité | Durée d'exposition |
|---------|----------|------------------------|-------------|----------|--------------------|
| 1 | 1 | 5 µg.l ⁻¹ | 15 °C | 0 PSU | 7,14 et 21 jours |
| 1 | 1 | 5 µg.l ⁻¹ | 27 °C | 0 PSU | 7,14 et 21 jours |
| 2 | 3 | 0,5 µg.l ⁻¹ | 21 °C | 0 PSU | 7 jours |
| 2 | 3 | 5 µg.l ⁻¹ | 21 °C | 0 PSU | 7 jours |
| 2 | 3 | 5 µg.l ⁻¹ | 21 °C | 35 PSU | 7 jours |
| 3 | 3 | 10 µg.l ⁻¹ | 21 °C | 0 PSU | 2 jours |

Tableau II- 5 : Conditions expérimentales testées pour les POCIS.

Pour les expériences 1 et 2 (effets temps, température et salinité) seule la phase et l'eau en fin d'exposition ont été analysées.

Pour l'expérience 3, l'eau a été analysée en triplicat à t = 0h, t = 1h, t = 48h sur chacun des 3 béchers. Les phases et les membranes ont été quantifiées à la fin de l'exposition et un 4^{ème} bécher ne contenant que l'eau supplémentée a servi de contrôle de la dégradation des composés sur toute la période de l'exposition.

V-3 Expérimentations environnementales

Après le développement en laboratoire, ces échantillonneurs passifs ont été expérimentés dans le milieu naturel. Dans un premier temps, dans le cadre du projet SWIFT, visant à développer et à valider de nouveaux outils de mesures des contaminants dans les écosystèmes aquatiques (swift-wfd.com) dans le cadre de la directive cadre sur l'eau, une campagne de validation a été mise en place sur la Meuse. Puis dans le cadre du programme Seine Aval, les POCIS ont été installées pour effectuer une comparaison avec les mesures effectuées par le laboratoire dans un milieu connu et suivi depuis plusieurs années : l'Estuaire de Seine.

V-3-1 : Expérimentation sur la Meuse

Les expérimentations se sont déroulées à deux niveaux. D'une part une première expérience a été menée en milieu contrôlé par l'utilisation d'un système expérimental de 300 litres alimenté en continu par les eaux de la Meuse et dopés par apport en continu de divers composés organiques (HAP, pesticides...) dont les substances pharmaceutiques. Différents types d'échantillonneurs passifs ont été exposés : POCIS (Université de Bordeaux 1), mais aussi d'autres systèmes développés par les différents partenaires du programme (Portsmouth samplers, MESCO, ... (Vrana *et al.*, 2005)). Les échantillonneurs passifs et l'eau sont quantifiés en parallèle afin d'évaluer la validité des outils.

D'autre part, des POCIS ont été déployées dans la Meuse pendant 5 jours. En parallèle, la mesure de la concentration dans l'eau a été faite en début et en fin d'exposition, pour comparer les deux types de résultats obtenus.

a) Plan expérimental de l'exposition contrôlée

Le montage expérimental est présenté dans la Figure II-38. L'eau de la Meuse est pompée et stockée dans un premier bac (1), puis apportée en flux continu par une pompe péristaltique (2) vers le bac d'exposition (3). Le mélange de composés pharmaceutiques est amené au système par une seconde pompe péristaltique (4). Les divers échantillonneurs passifs sont fixés sur un arbre (Figure II-39) monté sur un axe rotatif (5), permettant l'agitation en continu du système.

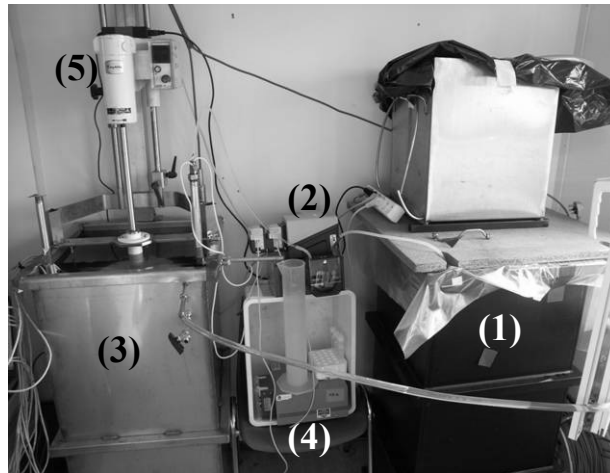


Figure II-38 : Montage expérimental en milieu contrôlé.



Figure II-39 : Déploiement des échantillonneurs en milieu contrôlé.

L'objectif est d'atteindre une concentration stable dans le système. Après un premier dopage du bac expérimental permettant d'amener la concentration à 500 ng.l⁻¹, l'apport par les pompes permet de stabiliser la concentration, de manière à compenser les pertes dues aux prélèvements et au recyclage de l'eau par le « trop-plein » du système.

La première exposition vise à atteindre une concentration dans le tanker de 500 ng.l⁻¹ pour chacun des composés. Puis à mi-exposition (57 h), une deuxième solution est mise en place, pour atteindre un niveau de 1000 ng.l⁻¹. La solution

méthanolique utilisée est remplacée tous les deux jours, afin d'éviter toute dégradation de la solution.

En ce qui concerne les mesures effectuées, un suivi de la contamination de l'eau a été mené tout au long de l'expérimentation :

- ✓ T0 : l'eau de la Meuse est introduite dans le tanker (avant dopage)
- ✓ T+3 h : prélèvement 3 h après le dopage initial du bac puis à T+9 h, T+33 h et T+57 h.
- ✓ A 57 h, le système est dopé pour atteindre un niveau de 1000 ng.l^{-1}
- ✓ T+60h prélèvement 3 h après le dopage du bac et la mise en place des pompes péristaltiques et de même à T+81 h et à T+105 h.

Concernant les POCIS, 3 échantillonneurs ont été disposés dans le tanker et restent dans le système de T 0 h à T 105 h. Ces POCIS sont extraites en suivant (phase) et les éluats obtenus sont stockés à $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pour être ramenés au laboratoire et analysés.

b) Exposition dans la Meuse

Au niveau de la Meuse, un prélèvement est fait le 22/04/05 (début de l'exposition) et un deuxième le 27/04/05 (fin de l'exposition). Pour chacun, 3 l d'eau sont prélevés et filtrés en suivant (triplicats de 1 l) selon le protocole d'extraction déjà explicité.

En parallèle, 3 POCIS sont immergées, sur le côté du bateau de la station RIZA (Institute for Inland Water Management and Waste Water Treatment) associées aux échantillonneurs déjà mis en place (Figure II-40). Le débit est suivi en continu par la station de mesure de RIZA et la cage contenant les échantillonneurs passifs est nettoyée tous les jours pour éliminer le fort dépôt de matière et les macro-déchets qui obstruent la grille de la cage.



Figure II-40 : Dispositif expérimental en milieu naturel.

V-3-2 : Exposition sur la Seine

La campagne a été réalisée sur l'estuaire de la Seine en juin 2005 au niveau du barrage de Poses (Figure II-41). 6 POCIS sont installées dans le flux de la Seine : 3 sont prélevées au bout de 3 jours d'exposition et 3 au bout de 34 jours. En parallèle, des prélèvements d'eau sont effectués sur les 3 premiers jours. Les extractions d'eau et de POCIS (phase) sont effectuées dans les heures suivant le prélèvement. Les éluats sont conservés à 4^o C, avant le transport au laboratoire et l'analyse. Le débit de la Seine est stable sur l'ensemble de la période d'exposition (34 jours), (300 m³.s⁻¹, données DIREN).



Figure II-41 : Barrage de Poses, estuaire de Seine.

CHAPITRE 3 : SYNTHÈSE

I-Techniques développées pour l'étude des substances pharmaceutiques

Plusieurs développements analytiques, présentés dans le chapitre « Matériel et Méthodes » ont été réalisés pour mener à bien cette étude. En effet, les techniques préexistantes concernaient principalement le dosage des eaux de surface ou des effluents de station d'épuration. Ces protocoles sont souvent focalisés sur une classe thérapeutique, ce qui rend difficile leur utilisation pour du « monitoring » environnemental : la multiplication des techniques d'extraction augmentant le temps et le coût d'analyse, diminue d'autant le nombre d'échantillons pouvant être traités. L'objectif de ces optimisations s'est donc focalisé sur le développement de procédés multi-contaminants et utilisables sur différentes matrices. Pour l'application aux matrices solides, le protocole a dû être modifié et adapté, par ajout d'étapes précédant l'extraction en phase solide.

I-1 Analyse des substances pharmaceutiques

Techniques analytiques pour le dosage des substances pharmaceutiques

Le choix de la technique analytique s'est porté sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Cette technique robuste, fiable et sensible a été appliquée à différents types de matrices, plus ou moins complexes. La dérivation, nécessaire pour l'analyse des substances acides a été validée. Sa robustesse a été prouvée sur la majorité des composés. Seuls 2 composés, le salbutamol et le clenbutérol, présentent parfois des difficultés d'analyses, attribuées à un problème de dérivation.

Développement de l'extraction en phase solide (Publications 1 et 2)

Dans un premier temps, les composés pharmaceutiques ont été extraits selon deux protocoles différents, séparant les composés acides des composés neutres. L'optimisation a été faite au niveau du choix de la cartouche, du pH d'extraction et des solvants d'élution (Figure III- 1). Le protocole ainsi obtenu est reproductible et robuste, permettant l'application aux matrices environnementales. La bonne reproductibilité (RSDs < 15 %) a été vérifiée à la fois sur les eaux dopées et sur les premiers échantillons naturels, ce qui a permis rapidement de supprimer l'analyse en triplicat des échantillons, et ainsi d'augmenter le nombre d'échantillons traités lors des campagnes environnementales.

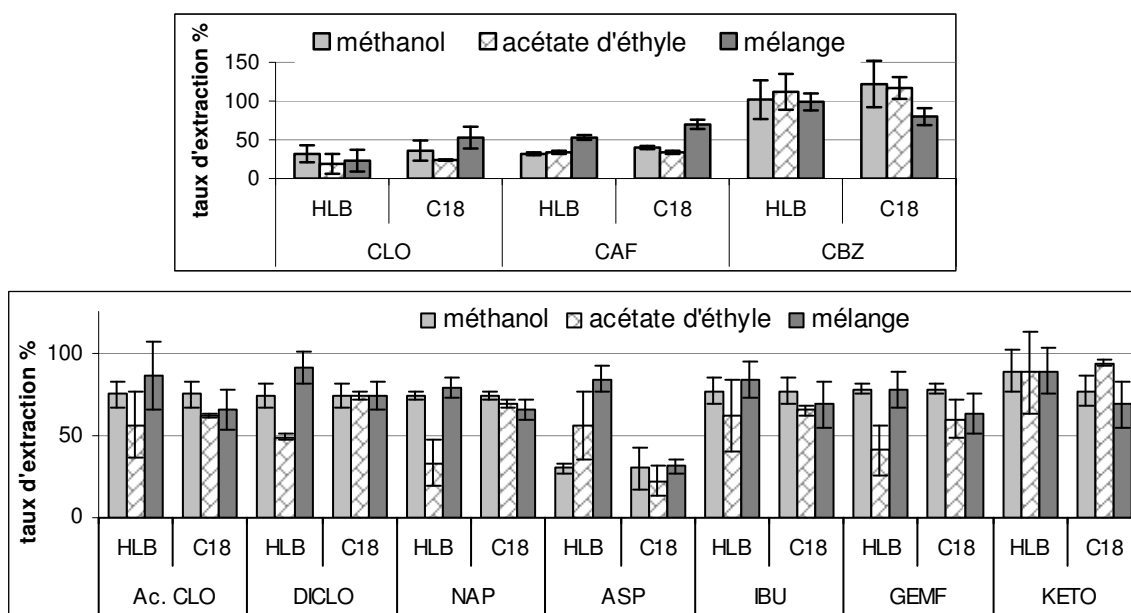


Figure III- 1: Rendements d'extraction (en fonction du pH et du solvant d'extraction) (n=3).

Un second protocole, utilisant un nouveau type de cartouches polymériques (Oasis MCX, Cation Exchange, Waters) a permis d'extraire l'ensemble des composés d'intérêts en une seule étape d'extraction, sans que les rendements d'extraction soient fortement influencés. Au contraire, certains composés, non extractibles avec les cartouches préalablement utilisées (C18 et HLB), le sont par l'utilisation des cartouches MCX, comme la doxépine et l'imipramine. Le nouveau protocole a été validé sur des eaux supplémentées puis sur des échantillons naturels extraits par les différentes méthodes. Il a de plus été étendu à de nouveaux composés.

Le Tableau III- 1 présente les rendements obtenus par les différentes méthodes d'extraction. D'autres composés ont été testés : certains œstrogènes (œstrone, œstradiol, éthinyloœstradiol et œstriol) sont très bien extraits par ce protocole. Les rendements obtenus sur des eaux dopées sont respectivement de $97 \pm 3 \%$, $91 \pm 1 \%$, $93 \pm 2 \%$ et $91 \pm 2 \%$, ce qui permet d'envisager une utilisation étendue. Une seule extraction permet, après tous les développements, d'extraire 17 composés pharmaceutiques différents, ce qui a permis d'augmenter le nombre d'échantillons traités.

| Composés | Extraction HLB (n = 5) | Extraction C18 (n = 5) | Extraction MCX (n = 6) |
|----------|------------------------|------------------------|------------------------|
| DICLO | 91 ± 10 | - | 105 ± 5 |
| KETO | 89 ± 14 | - | 106 ± 6 |
| NAP | 79 ± 12 | - | 90 ± 3 |
| ASP | 84 ± 18 | - | 71 ± 12 |
| GEMF | 78 ± 11 | - | 81 ± 1 |
| IBU | 84 ± 11 | - | 80 ± 3 |
| CAF | - | 70 ± 6 | 68 ± 11 |
| DOX | - | 2 ± 0 | 98 ± 9 |
| CBZ | - | 99 ± 11 | 120 ± 6 |
| IMIP | - | 1 ± 1 | 95 ± 5 |

| Les composés suivants n'ont pas été analysés par l'extraction séparée (C18 + HLB) | | | |
|---|---|---|---------|
| AMI | - | - | 95 ± 9 |
| PARA | - | - | 76 ± 4 |
| SALB | - | - | 62 ± 14 |
| CLEN | - | - | 90 ± 17 |
| TERB | - | - | 54 ± 12 |
| DZP | - | - | 104 ± 2 |
| NDZP | - | - | 101 ± 4 |

Tableau III- 1 : Rendements d'extraction des différents protocoles développés.

Le Tableau III- 2 présente les limites de détection obtenues par ce protocole combiné, suffisamment faibles pour permettre une quantification correcte pour l'ensemble des sites d'intérêts. Ces limites varient selon la nature des échantillons (eau de captage, eau de surface, effluents), notamment en fonction de la teneur en matières organiques qui va perturber la détection par spectrométrie de masse en augmentant le bruit de fond et en créant des pics interférents.

| Composés : Classe thérapeutique et abréviations utilisées | | Eau profonde (1 l extrait) | Eau de surface (1 l extrait) | Effluent (0,5 l extrait) |
|---|-------|--|------------------------------|--------------------------|
| <u>Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)</u> | | Limites de détection (ng.l ⁻¹) | | |
| Aspirine | ASP | 0,2 | 2,1 | 7,8 |
| Diclofénac | DICLO | 0,9 | 0,7 | 4,5 |
| Ibuprofène | IBU | 0,0 | 0,1 | 2,4 |
| Kétoprofène | KETO | 0,3 | 0,7 | 5,8 |
| Naproxène | NAP | 0,3 | 1,0 | 3,1 |
| Paracétamol | PARA | 5,3 | 8,5 | 17,5 |
| <u>Antidépresseurs</u> | | | | |
| Amitryptiline | AMI | 0,7 | 2,2 | 3,4 |
| Doxépine | DOX | 0,7 | 2,1 | 8,3 |
| Imipramine | IMIP | 0,7 | 1,2 | 6,9 |
| Diazépam | DZP | 0,4 | 1,4 | 6,9 |
| Carbamazépine | CBZ | 0,8 | 1,4 | 11,6 |
| Nordiazépam | NDZP | 0,4 | 1,4 | 6,9 |
| <u>Bronchodilatateurs</u> | | | | |
| Terbutaline | TERB | 0,6 | 0,3 | 3,5 |
| Salbutamol | SALB | 0,6 | 0,5 | 3,9 |
| Clenbutérol | CLENB | 0,6 | 0,3 | 2,0 |
| <u>Stimulant</u> | | | | |
| Caféine | CAF | 1,5 | 2,5 | 14,3 |
| <u>Hypolipémiant</u> | | | | |
| Gemfibrozil | GEMF | 0,1 | 0,3 | 1,6 |

Tableau III- 2 : Limites de détection obtenues sur les matrices aqueuses.

I-2 Application aux matrices solides (Publication 3)

Afin de pouvoir extraire les composés pharmaceutiques des matrices solides, une étape d'extraction assistée sous champs micro-onde a été ajoutée. L'évaporation se fait sous vide et sous chauffage (RapidVap®). L'utilisation de ce système permet une bonne évaporation du solvant et surtout le traitement de 24 échantillons simultanément (contre 1 seul pour l'utilisation d'un Rotavap®). De plus, même si l'évaporation sous flux d'azote permet l'évaporation de plusieurs échantillons, elle n'est pas adaptée à celle des mélanges complexes de solvant à haut point d'ébullition. Le mélange d'extraction, composé à 30 % d'eau acidifiée permet d'obtenir après évaporation un extrait aqueux, directement utilisable pour l'extraction en phase solide.

Pour les matrices particulières, les rendements sont compris entre 47 % et 115 % (sauf pour la terbutaline et le salbutamol, 11 % et 13 %), ce qui rend ce protocole applicable aux contraintes environnementales. Une étape de purification complémentaire a été mise en place, permettant l'analyse de matrices complexes, aussi bien des matrices biologiques (poissons, moules...) que des sédiments, voir des boues d'épuration. Ce protocole a été appliqué à différentes études environnementales (Estuaire de Seine) et à l'étude de la bioaccumulation de la carbamazépine dans les moules exposées en laboratoire (programme DECIME). Des limites de détection sont difficilement calculables, étant donnée la présence aléatoire d'interférents importants (plusieurs minutes consécutives lors de l'analyse GC-MS). Chaque échantillon est donc spécifique ; selon la nature du sédiment et les composés, les limites de détection ont été évaluées entre 0,2 ng.g⁻¹ et 20 ng.g⁻¹. L'utilisation de la GC-MS-MS, en cours de développement devrait apporter une solution satisfaisant pour abaisser ces limites, en limitant le phénomène d'interférence par le jeu de la sélectivité.

II-Présence des composés pharmaceutiques

Ce travail de thèse consistait dans un premier temps à identifier qualitativement et quantitativement la présence de substances pharmaceutiques dans divers milieux aquatiques français. Le chapitre suivant présente les résultats obtenus sur ce point. Les résultats bruts de l'ensemble des campagnes sont présentés en annexes, par sites et par campagne de prélèvements.

II-1 Contamination des estuaires atlantiques étudiés

Le Tableau III- 3 présente les gammes de concentrations des quatre estuaires étudiés en phase dissoute. La Gironde est l'estuaire le moins impacté. Bien qu'il y ait deux villes importantes sur la Garonne, Bordeaux et Toulouse, le débit important du fleuve limite sans doute l'impact des stations d'épuration qui peuvent s'y déverser. Le même phénomène est visible sur la Loire pour laquelle les concentrations restent faibles, sauf en un point, situé à proximité d'un effluent de station d'épuration.

L'Adour est un petit estuaire sur lequel se trouvent des villes dont la population fluctue de manière importante en fonction des saisons (Pau, Bayonne et Dax). Les concentrations qui y sont mesurées sont globalement peu élevées.

L'estuaire de Seine est de loin le plus impacté avec des concentrations de plusieurs centaines de ng.l^{-1} selon les composés.

Ces études permettent de mettre en évidence l'estuaire de Seine en tant que site pollué par les substances pharmaceutiques.

| | GIRONDE | LOIRE | ADOUR | SEINE |
|---------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| Aspirine | < 2 - 4 | < 2 - 27 | 8 - 28 | < 2 - 196 |
| Caféine | < 1 - 31 | < 1 - 73 | < 1 - 16 | 40 - 860 |
| Diclofénac | < 2 - 4 | < 2 - 6 | 8 - 23 | 8 - 380 |
| Gemfibrozil | < 2 - 4 | < 2 - 5 | < 2 - 9 | 3 - 126 |
| Ibuprofène | < 2 - 3 | < 2 - 9 | 14 - 37 | 5 - 610 |
| Kétoprofène | < 2 - 24 | < 2 - 9 | < 2 - 3 | 3 - 78 |
| Naproxène | < 2 - 7 | < 2 - 8 | 1 - 6 | 3 - 185 |
| Carbamazépine | < 1 - 13 | < 1 - 228 | < 1 - 8 | 3 - 164 |

Tableau III- 3 : Gamme de concentrations mesurées sur les différents estuaires.

II-2 Cas du bassin versant de l'Hérault (Publication 4)

Cette étude ponctuelle avait pour but de confirmer l'hypothèse d'une contamination des rivières et des eaux de captage par des effluents de stations d'épuration. L'impact d'une station (S 15) a été suivi à la fois dans la Lergue, milieu de rejet de la station et dans l'Hérault, dont la Lergue est le principal affluent.

II-2-1 : Contamination de la Lergue

L'apport de la station d'épuration (station W2) est clairement identifiable. Néanmoins, la dilution du rejet dans la rivière est très rapide. Quelques kilomètres après le rejet, l'apport de la station n'est plus visible, comme le montre la Figure III-2.

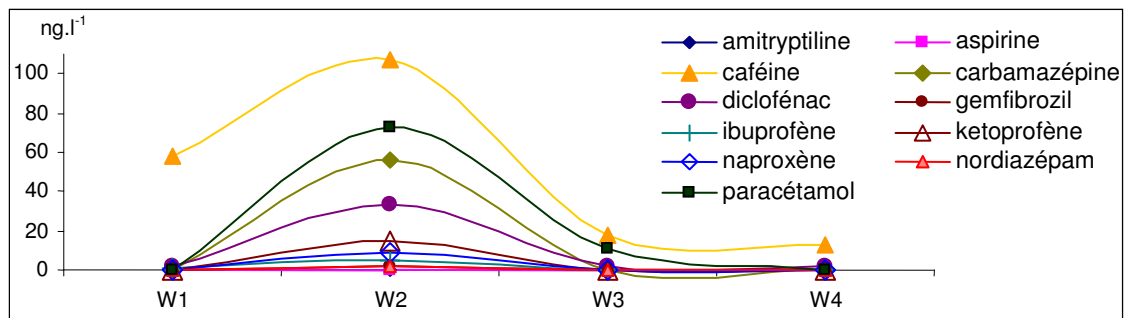


Figure III- 2: Présence des composés pharmaceutiques dans la Lergue. W1 : point amont de la station, W2 : point d'introduction de la station, W3 et W4, points en aval du rejet.

Dans cette étude, les éléments majeurs ont été suivis en parallèle des substances pharmaceutiques. Il est à noter que dans cette région, le bore, souvent utilisé pour le suivi des effluents de stations n'est pas approprié. En effet, dans cette région, le bore naturel est mesuré à des teneurs trop élevées pour que l'on puisse discriminer les apports anthropiques de bore. La Figure III- 3 permet de mettre en évidence dans ce cas l'utilité des dosages des éléments majeurs dans leur ensemble : le chlore est ici un excellent traceur de la station d'épuration.

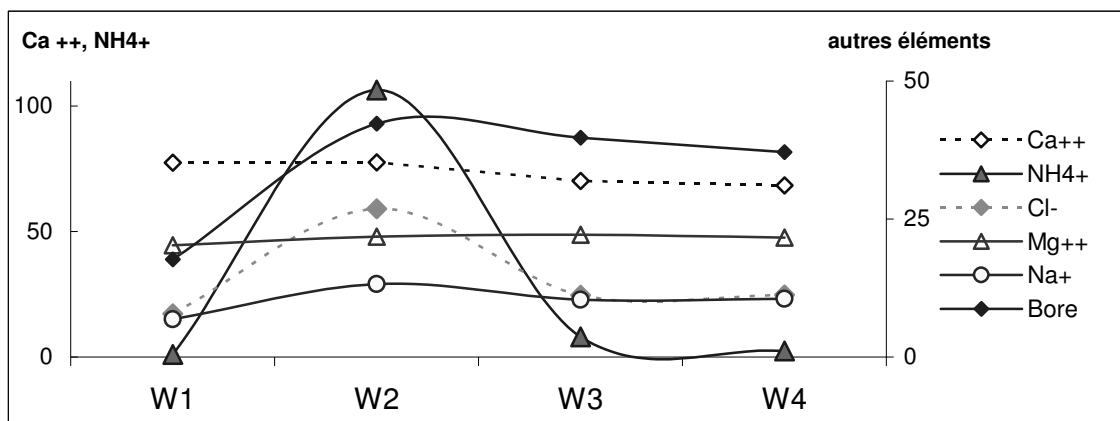


Figure III- 3: Suivi des éléments majeurs dans la Lergue. W1 : point amont de la station, W2 : point d'introduction de la station, W3 et W4, points en aval du rejet. (Résultats exprimés en mg.l⁻¹, sauf nitrate, µg.l⁻¹).

II-2-2 : Contamination de l'Hérault

Si l'on regarde la présence de composés pharmaceutiques à la confluence de la Lergue et de l'Hérault, on note que la contamination de la Lergue est inférieure à celle de l'Hérault (Figure III- 4). L'affluent n'influe pas sur la contamination du fleuve, contaminé au préalable par des apports amont, hormis pour le diclofénac pour lequel la teneur est quasiment similaire entre l'Hérault (2,5 ng.l⁻¹) et la Lergue (1,3 ng.l⁻¹).

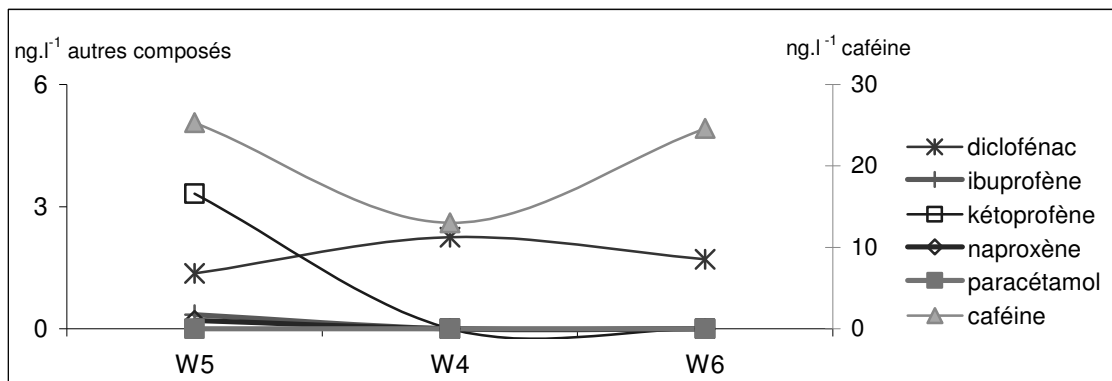


Figure III- 4: Suivi des substances pharmaceutiques dans l'Hérault. W5, amont confluence ; W4 : confluence Lergue et Hérault ; W6 : aval confluence.

II-2-3 : Contamination des eaux de captage

Sur les 6 points de captage analysés, seuls 2 se sont révélés contaminés par des substances pharmaceutiques : C15 (Pouget) et C17 (Brignac) (Figure III- 5). Dans ces deux nappes, 3 composés sont retrouvés à des concentrations élevées : la caféine (4,1 ng.l⁻¹ pour C15 ; 22,9 ng.l⁻¹ pour C17), la carbamazépine (43,2 ng.l⁻¹ pour C15 ; 13,9 ng.l⁻¹ pour C17) et le paracétamol (9,6 ng.l⁻¹ pour C15 ; 100 ng.l⁻¹ pour C17).

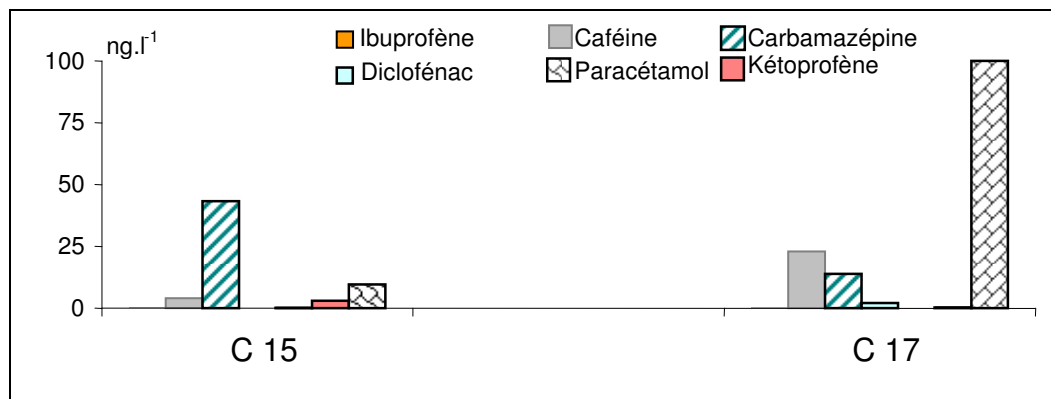


Figure III- 5: Suivi des substances pharmaceutiques dans les eaux de captage.

La présence importante de ces composés montre la pollution de ces 2 captages par des eaux de station d'épuration. Le paracétamol et la caféine étant des composés facilement dégradés dans les stations d'épuration et dans l'environnement, on peut supposer que le point d'introduction de l'effluent est proche du captage et que c'est plus un phénomène de fuite qu'une contamination du captage par infiltration du rejet. Ces prélèvements ont été effectués avant l'étape de chloration. On sait que cette étape permet la dégradation du paracétamol, mais est peu efficace sur la carbamazépine et le kétoprofène, aussi

présents dans les échantillons (Metcalf *et al.*, 2003 ; Pinkston et Sedlak, 2004). De plus, il n'a pas été observé de risque sanitaire pour la consommation d'eau de boisson contenant ces composés. Les premières études, déterminant une dose journalière acceptable de composés via l'eau de boisson, concluent à une innocuité pour le consommateur (Schwabb *et al.*, 2005). Il s'agit à ce niveau plus d'un problème d'image par rapport aux consommateurs que d'un réel risque d'exposition.

De manière générale pour cette campagne sur le bassin versant de l'Hérault, dans tous ces échantillons, il est à noter la forte teneur mesurée en paracétamol. Ce profil de contamination diffère de ceux retrouvés en Seine, où le paracétamol a été rarement détecté, même dans les effluents des stations d'épuration.

II-3 Introduction d'un effluent de station d'épuration dans le milieu naturel : cas de la Jalle d'Eysines (Publication 5)

Le cas de la Jalle d'Eysines a été étudié pour plusieurs raisons. D'une part la station d'épuration d'Eysines a été identifiée comme source de contamination importante de polluants urbains, de par sa sur-utilisation et l'inadéquation de ses traitements. Dans le cadre de la mise en place de la Directive cadre sur l'eau, la Jalle d'Eysines est un des principaux points noirs de la Région Aquitaine (http://dce.eau-adour-garonne.fr/m_pages.asp?page=139). Ce petit cours d'eau est de plus très utilisé pour l'irrigation de la zone maraîchère environnante.

D'autre part, la facilité d'accès du site pour un suivi rapproché de la dilution de l'effluent, de l'amont de l'émissaire jusqu'à la confluence avec la Garonne a permis un suivi régulier et précis de cette zone d'étude, au cours de 4 campagnes saisonnières.

Cette étude a mis en évidence, en plus de la réelle contamination de l'effluent par les substances pharmaceutiques le devenir de ces composés après leur introduction, en corrélant aux analyses classiques la mesure du bore apporté par l'effluent. Cela a permis de mesurer le phénomène de dilution du rejet dans le cours d'eau et donc d'isoler la part réelle de la dégradation dans la diminution de la teneur en composé des eaux de surface.

II-3-1 : Niveaux de contamination de la phase dissoute

La Figure III- 6 présente les résultats obtenus pour 4 composés aux propriétés différentes. Pour la campagne hivernale (février 2005), on note une absence de dégradation de l'ensemble des composés : les concentrations mesurées sont très proches des concentrations calculées en utilisant la concentration en bore comme facteur de dilution de l'effluent. L'augmentation du débit de la rivière limitant de plus le temps de résidence des eaux polluées, l'eau contaminée par l'émissaire est introduite sans abattement de cette pollution dans la Garonne au km 10.

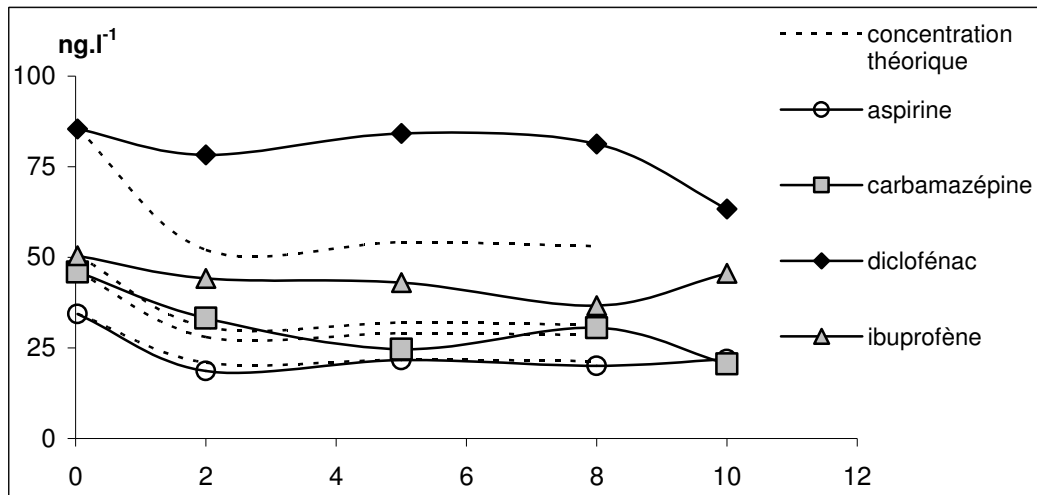


Figure III- 6: Suivi des substances pharmaceutiques dans la Jalle d'Eysines, février 2005.

A l'opposé, pour la même campagne d'étude réalisée en condition estivale (juillet 2004), le comportement des composés varie considérablement (Figure III-7). La carbamazépine et le diclofénac mesurés suivent les concentrations « prédites », c'est-à-dire que la diminution de concentration dans la rivière est uniquement le fait de la dilution. A l'inverse, les concentrations de l'ibuprofène et de l'aspirine mesurées dévient considérablement des concentrations calculées : des phénomènes de dégradation entrent en jeu, entraînant la disparition de toute contamination par l'aspirine moins de 2 kilomètres après le rejet et celle de l'ibuprofène au point de confluence (km 10).

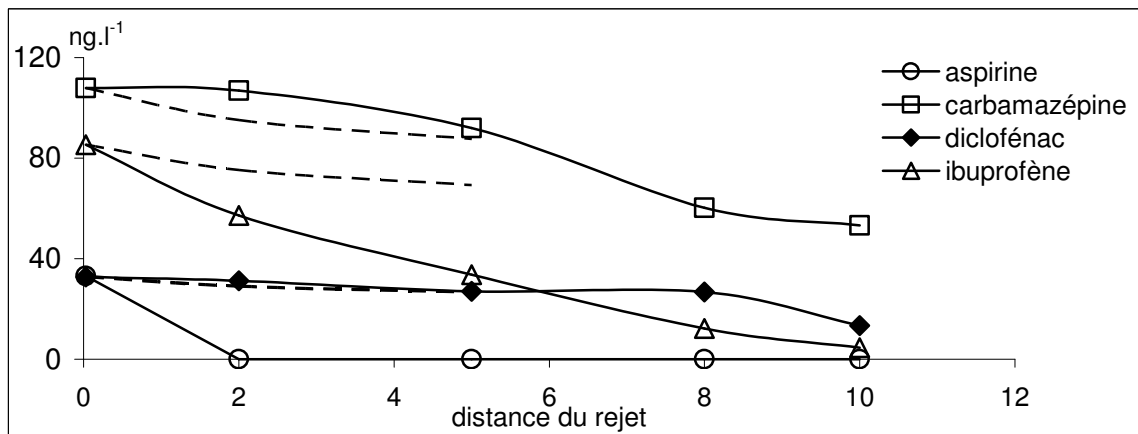


Figure III- 7: Suivi des substances pharmaceutiques dans la Jalle d'Eysines, juillet 2004.

II-3-2 : Niveaux de contamination de la phase particulaire

La teneur particulaire en substances pharmaceutiques a été mesurée sur l'ensemble des prélèvements effectués sur la Jalle d'Eysines, pendant les différentes campagnes saisonnières. Ses résultats quantitatifs, parmi les premiers actuellement publiés montrent une réelle contamination de la phase particulaire (Figure III- 8), avec des concentrations en moyenne de plusieurs centaines de ng.g⁻¹, allant jusqu'à 1600 ng.g⁻¹ pour le gemfibrozil (juillet 2003). Ces concentrations décroissent progressivement tout au long de la rivière, pour atteindre des niveaux inférieurs à 10 ng.g⁻¹ à la confluence avec la Garonne. En plus des phénomènes de dégradation, déjà observés sur la phase dissoute, un phénomène de dilution

intervient. En effet, l'entrée d'eau de la Garonne, qui entre dans la rivière à marée montante, apporte une quantité de particules importantes, jusqu'à 45 mg.l^{-1} .

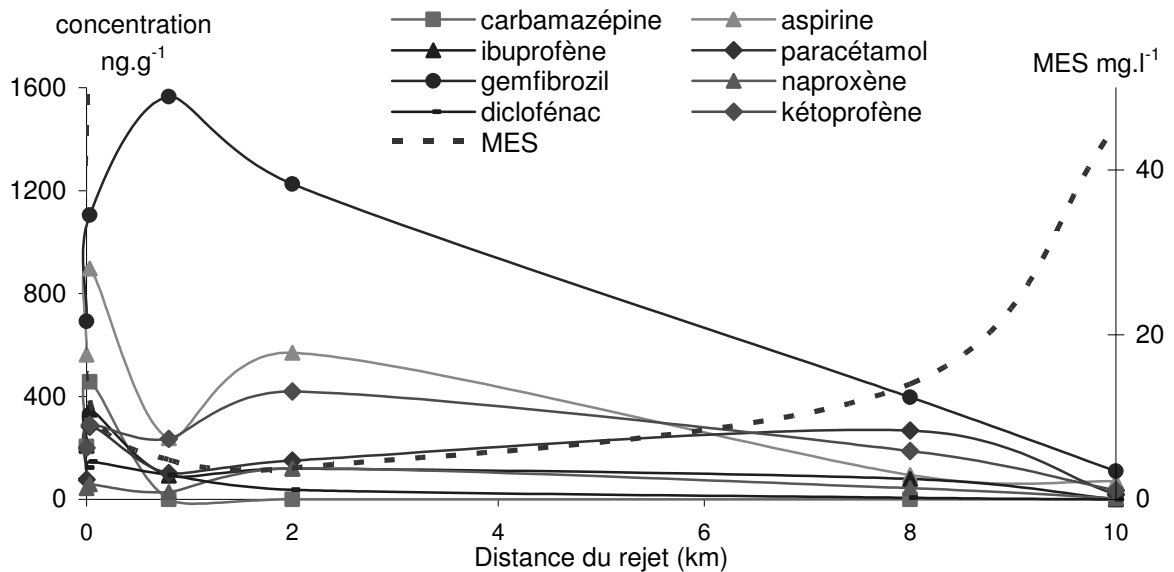


Figure III- 8: Concentrations mesurées dans la Jalle d'Eysines, juillet 2003, exprimées en ng.g^{-1} .

Les concentrations mesurées en septembre 2003 et en février 2004, si elles sont moins élevées (entre 13 et 1330 ng.g^{-1} (aspirine, kétoprofène) en septembre et entre 0 et 380 ng.g^{-1} (kétoprofène) en février) montrent les mêmes tendances. Parmi les composés les plus fréquemment et abondamment retrouvés, on note le kétoprofène, le diclofénac, l'aspirine et la caféine et exceptionnellement en juillet, le gemfibrozil.

Si le kétoprofène le diclofénac et le gemfibrozil comptent parmi les composés pharmaceutiques les moins polaires (log Kow respectivement de 3,12, 4,51 et 4,77) ce qui peut justifier leur présence dans les particules, il n'en n'est pas de même pour la caféine et l'aspirine. En effet avec des log Kow de respectivement 0 et 1,19, ces deux composés, fortement polaires, ne devraient pas être retrouvés dans les phases solides. D'autres résultats antérieurs ont déjà montré ce phénomène, en notant la présence de paracétamol (log Kow 0,46) dans des boues de station de dépollution (Khan et Ongerth, 2002). L'intervention d'autres phénomènes, comme des interactions électrostatiques (Tolls, 2001) semblent entrer en jeu, même si l'on manque encore de recul et de données sur ce point.

Les phénomènes de répartition entre la phase dissoute et la phase particulaire sont encore difficiles à élucider. Si on observe les teneurs respectives dans les deux phases tout au long de la Jalle d'Eysines, il s'avère que le comportement est très variable selon les composés.

La Figure III- 9 présente cette répartition sur 4 composés : le diclofénac, l'ibuprofène, le naproxène et la carbamazépine. La discrimination des phénomènes de dégradation et de transferts entre les deux phases n'est pas facile à mettre en évidence. Pour le diclofénac, les concentrations dans la phase dissoute restent constantes tandis que la concentration dans les particules décroît rapidement. Pour l'ibuprofène, les deux concentrations diminuent dans les deux phases. Pour le naproxène, la concentration particulaire, bien que faible, reste relativement constante dans les échantillons. La carbamazépine, non soumise aux phénomènes de dégradation, voit sa concentration décroître très rapidement dans les particules

tandis qu'elle reste stable dans la phase dissoute. Dans ce cas, le transfert de la phase dissoute vers la phase particulaire semble être mis en évidence.

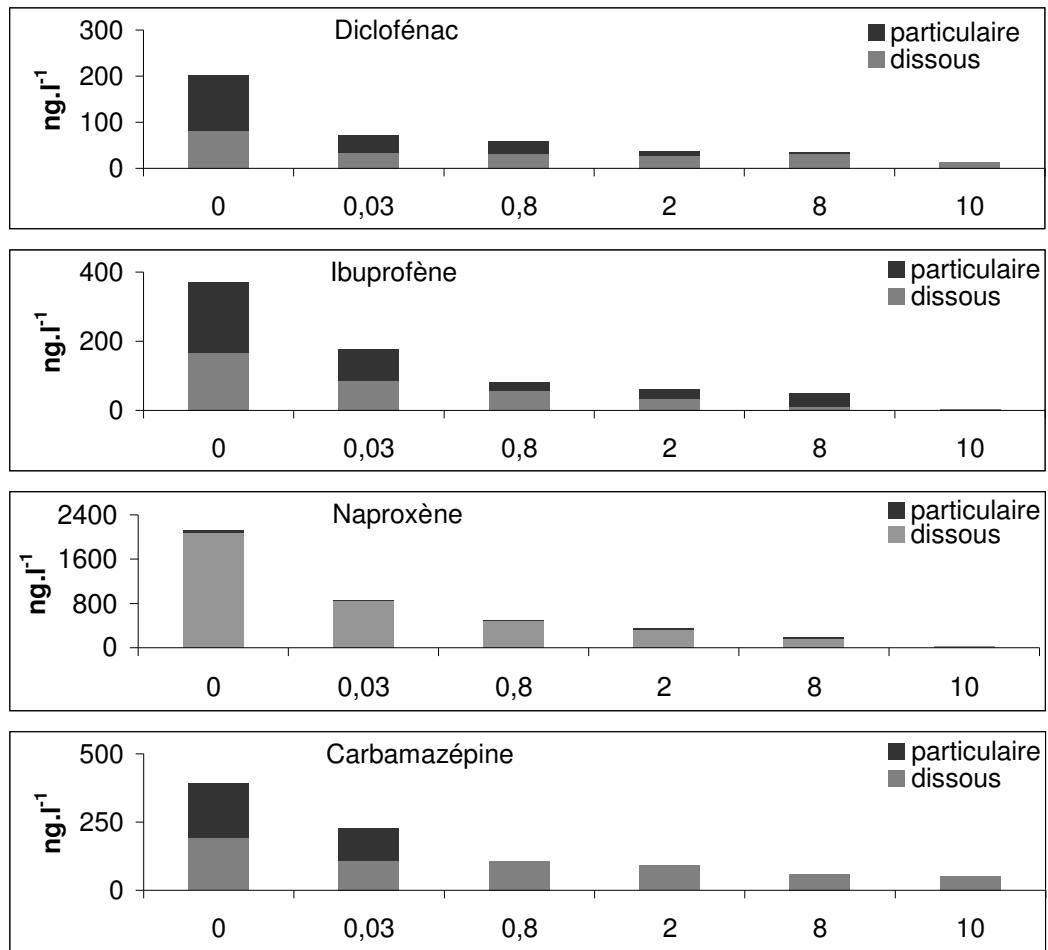


Figure III- 9: Répartition entre les deux phases dans la Jalles d'Eysines, concentrations exprimées en ng.l⁻¹, campagne de juillet 2003.

Les phénomènes qui se déroulent entre ces deux phases sont autant plus difficiles à appréhender que la phase particulaire émise par les stations d'épuration a des caractéristiques physico-chimiques très particulières, avec une teneur très élevée en carbone organique (entre 15 et 18 mg.l⁻¹ selon les campagnes) et la présence d'une phase colloïdale plus ou moins importante qui peut modifier fortement les phénomènes d'interaction.

II-4 Calanque de Cortiou

L'étude de la Calanque a été effectuée dans le cadre d'un programme de recherche visant à évaluer l'impact de la métropole marseillaise sur la côte méditerranéenne. Cette première campagne visait à mesurer la présence éventuelle de composés pharmaceutiques dans la zone de rejet de l'émissaire de la station d'épuration de Marseille et à identifier la zone d'influence de ce rejet.

II-4-1 : Niveaux de contamination de la phase dissoute

Les concentrations mesurées dans la calanque de Cortiou sont globalement très élevées, avec cependant une gamme de variation très importante selon les composés.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (aspirine, diclofénac, naproxène, ibuprofène et kétoprofène), le paracétamol et la caféine sont présents à de très fortes concentrations, de l'ordre du $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Figure III- 10). Pour le paracétamol, ces concentrations vont jusqu'à $250 \mu\text{g.l}^{-1}$.

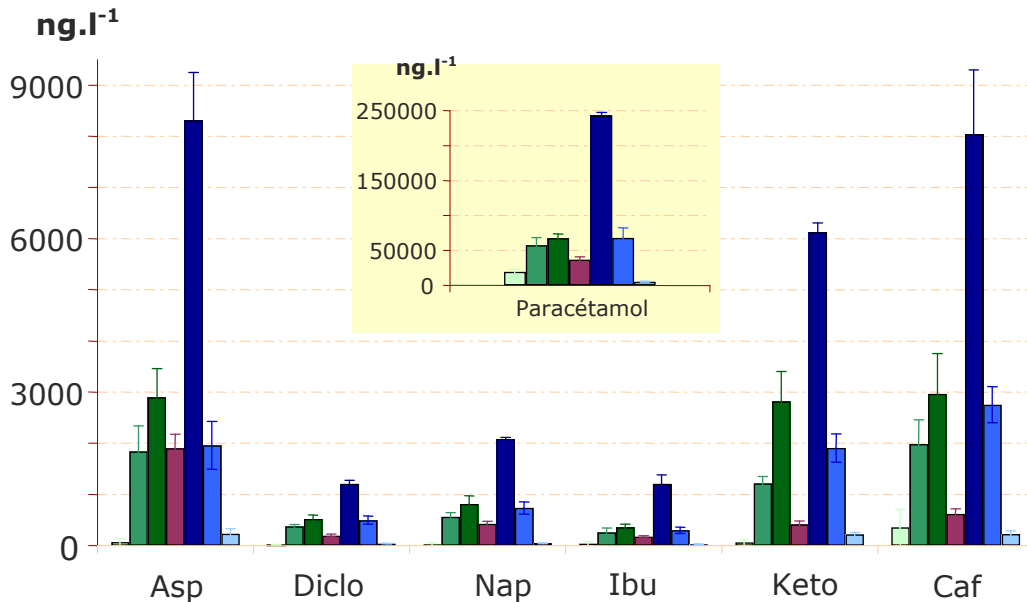


Figure III- 10 : Concentrations en anti-inflammatoires dans la calanque de Cortiou (n=3), campagne octobre 2004.

Pour les antidépresseurs (amitryptiline, diazépam, nordiazépam, carbamazépine) et l'hypolipémiant, le gemfibrozil, les concentrations sont plus faibles, de l'ordre de la dizaine de ng par litre, mais ces niveaux sont plus élevés que ceux présentés dans les différentes publications de la littérature, même pour des rejets de stations d'épuration, hormis pour la carbamazépine, parfois mesurée jusqu'à $6 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Ternes, 1998) (Figure III- 11).

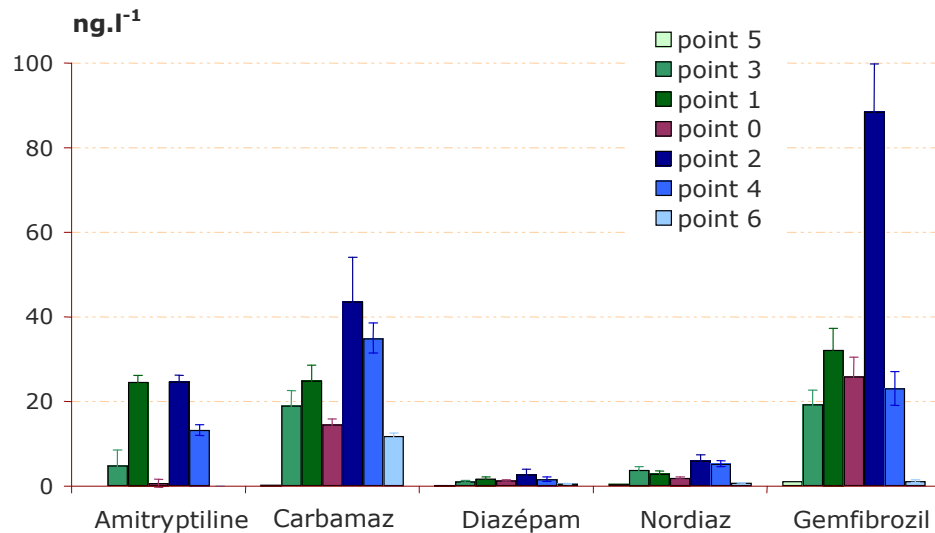


Figure III- 11: Concentrations en antidépresseurs et hypolipémiant dans la calanque de Cortiou, campagne octobre 2004.

Ces niveaux de concentrations sont représentatifs de la consommation de chaque composé : la caféine provient majoritairement de la consommation de boissons ; les anti-inflammatoires et autres antipyrétiques sont des composés fortement utilisés, sans prescription médicale et avec des prises journalières comprises entre 100 et 6000 mg. Par opposition, les antidépresseurs et les hypolipémiant sont des composés moins consommés quantitativement, car d'usage moins répandu, avec prescription médicale et avec des prises beaucoup moins importantes (de l'ordre de 10 à 1000 mg par jour).

La contamination de la Calanque de Cortiou ne semble pas affectée par la dégradation des composés dans la station d'épuration. Les composés les plus dégradables dans les stations (aspirine, ibuprofène, caféine) sont aussi présents que les composés beaucoup plus persistants (diclofénac, kétoprofène...). Le paracétamol par exemple est un composé très sensible aux traitements des stations d'épuration, montrant un abattement généralement supérieur à 95 % en présence d'un traitement secondaire biologique (Joss *et al.*, 2005).

L'absence de ce type de traitement sur la station d'épuration de Marseille ainsi que sa capacité de traitement très importante explique les fortes teneurs mesurées.

Ces valeurs mesurées sont parmi les plus élevées jamais mesurées hors des effluents de station d'épuration. La zone de Cortiou est fortement impactée par ce rejet très important à la fois en volume et en charge contaminante. Cette station traite actuellement 85 500 000 m³ et cette valeur ne va cesser de croître avec le développement de la population. Actuellement en rénovation, il est à souhaiter que les nouvelles installations puissent permettre la limitation des rejets de polluants et ainsi la réhabilitation de la qualité de l'eau de la Calanque.

II-4-2 : Contamination de la phase particulaire (publication 3)

La concentration dans la phase particulaire a été mesurée sur l'ensemble des points de prélèvement. La concentration des particules en composés pharmaceutiques, de l'ordre plusieurs centaines de ng.g⁻¹ (Figure III- 12), semble relativement élevée, même s'il n'existe pas actuellement beaucoup de données sur ce type d'échantillons permettant la comparaison.

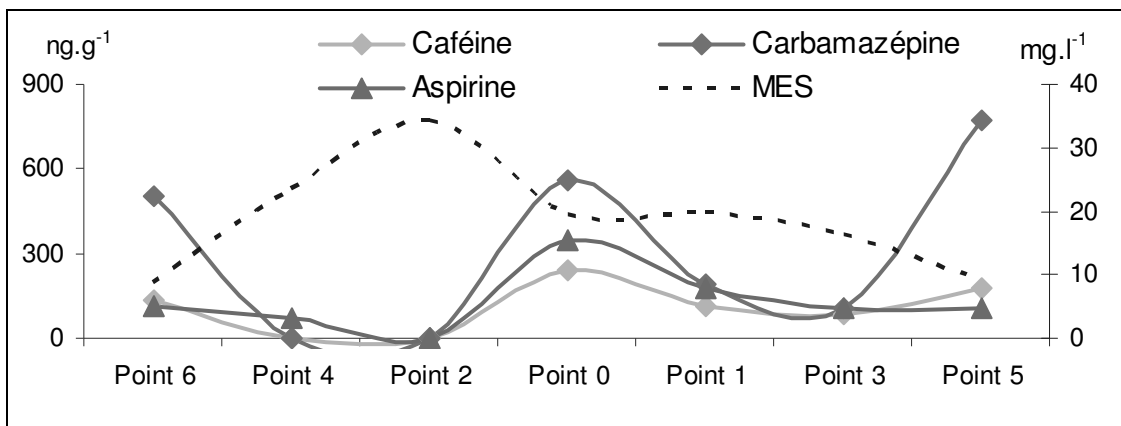


Figure III- 12: Concentrations exprimées en ng.g^{-1} de particules, Calanque de Cortiou, campagne d'octobre 2004.

Néanmoins, cette même concentration ramenée en ng par litre d'eau devient quasiment négligeable, étant donné de la faible teneur en particules des eaux de la Calanque, de l'ordre de quelques ng par litre (Figure III- 13).

Dans le cas de la calanque de Cortiou, la phase particulaire ne joue pas un rôle prépondérant dans le niveau global de contamination. Néanmoins, elle peut jouer un rôle dans la dissémination de la pollution et dans la contamination des organismes aquatiques.

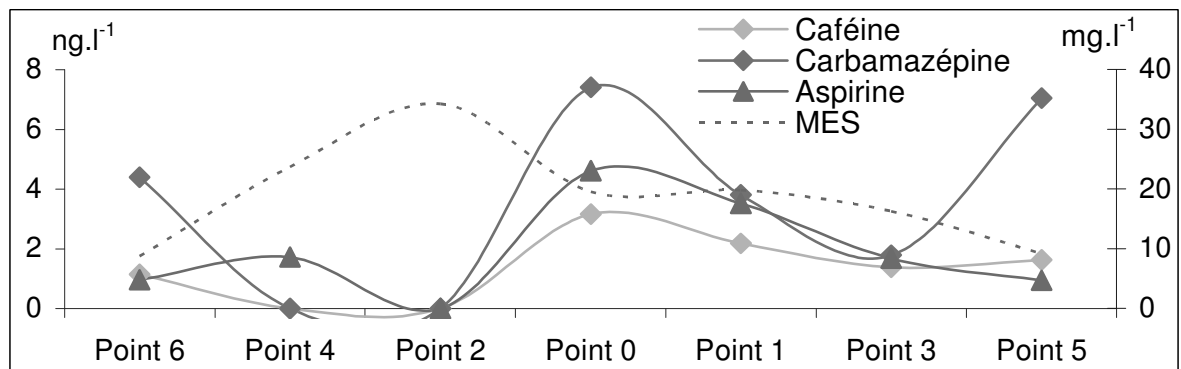


Figure III- 13: Concentrations dans les particules exprimées en ng.l^{-1} , Calanque de Cortiou, campagne d'octobre 2004.

II-4-3 : Phase sédimentaire

La complexité de cette matrice, possédant une très forte teneur en matière organique (émise par la station d'épuration), rend difficile l'analyse, avec l'apparition de nombreux interférents et une augmentation de la limite de détection. Tandis que les limites de détection pour des particules (Estuaire de Seine) sont comprises entre 1 et 9 ng.g^{-1} (1 g extrait) elles peuvent s'élever jusqu'à 30 ng.g^{-1} approximativement pour des composés comme l'ibuprofène. La présence d'interférents importants (pics de plusieurs minutes lors de l'analyse GC-MS) ne permet pas pour certains composés (doxépine, imipramine...) de déterminer leur présence dans les échantillons.

Le Tableau III- 4 présente les concentrations mesurées en différents points de la Calanque de Cortiou. Seuls quelques composés ont été détectés dans les

sédiments : la caféine, l'aspirine et la carbamazépine, composés aussi présents dans la phase particulaire. La carbamazépine, composé très persistant dans l'environnement, ainsi que la caféine, l'aspirine et le kétoprofène présents à de fortes teneurs dans l'effluent sont les composés majoritairement retrouvés. Malgré sa présence dans l'effluent, le paracétamol n'est pas retrouvé dans les sédiments. Les phénomènes de biodégradation dans le milieu naturel et les difficultés de dosage de ce composé dans les matrices complexes, peuvent expliquer ce phénomène.

| | SED 1 | SED 2 | SED 3 | SED 4 | SED 5 | SED 6 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Caféine | 186,6 | 14,6 | 18,9 | 2,4 | 103,1 | 8,6 |
| Amitryptiline | 4,9 | 2,3 | 0,4 | 1,1 | <ld | <ld |
| Doxépine | <ld | <ld | <ld | <ld | <ld | <ld |
| Imipramine | <ld | <ld | <ld | <ld | <ld | <ld |
| Carbamazépine | 24,3 | 23 | 10,5 | 9,6 | 14,2 | 4,9 |
| Diazépam | <ld | <ld | <ld | <ld | <ld | <ld |
| Nordiazépam | 45 | 159 | 53,3 | 121,9 | 19,4 | 38,3 |
| Aspirine | <ld | <ld | 62,3 | <ld | <ld | <ld |
| Ibuprofène | <ld | <ld | <ld | <ld | <ld | <ld |
| Paracétamol | 0,9 | 0,4 | 2,4 | 0,8 | <ld | <ld |
| Gemfibrozil | <ld | <ld | 0,3 | 5,5 | <ld | <ld |
| Naproxène | 0,8 | <ld | 1,9 | <ld | <ld | <ld |
| Diclofénac | 0,4 | <ld | <ld | <ld | <ld | <ld |
| Terbutaline | 2,1 | 1 | 2,1 | <ld | <ld | <ld |
| Salbutamol | <ld | <ld | 1,2 | <ld | <ld | <ld |
| Clenbutérol | 1,3 | <ld | <ld | <ld | <ld | <ld |
| Kétoprofène | 8,1 | 18,8 | 6 | <ld | <ld | <ld |

Tableau III- 4 : Concentrations exprimées en ng.g^{-1} de sédiment (Poids sec)

II-4-4 : Impact du rejet sur la zone

En ce qui concerne l'aire d'impact de ce rejet, la zone d'étude s'est limitée à une aire proche de l'émissaire, dans le panache de dilution. La présence des îles à proximité de l'émissaire en fait une zone protégée, peu soumise aux vents et aux forts courants, qui pourraient entraîner une dilution plus rapide de l'effluent. Les courants locaux créent deux panaches (Points 1, 3, 5 et points 2, 3, 6) qui s'homogénéisent assez rapidement. L'impact du rejet se fait de plus ressentir au niveau des sédiments et des particules émises par l'effluent (résultats développés dans le paragraphe IV) qui peuvent entraîner une plus grande dissémination de la pollution dans la Calanque.

Dans des investigations futures, il serait intéressant d'élargir la zone d'étude pour établir la limite d'influence de cette contamination anthropique majeure.

III-Spécificité de l'estuaire de Seine (Publication 6)

Diverses études ont été mises en œuvre, focalisées sur l'estuaire de Seine, compte-tenu de son niveau élevé de contamination. Pendant 4 ans, cet estuaire a été étudié autour de certains axes :

- ❖ Identification des principales substances présentes
- ❖ Détermination de niveaux moyens de contamination
- ❖ Identification et quantification des principales sources
- ❖ Etude du devenir de ces substances :
 - Phénomènes de dégradation dans l'estuaire
 - Présence dans la phase particulaire
- ❖ Impact sur la Baie de Seine

Pour ce faire, plusieurs campagnes ont été mises en œuvre, pour assurer le suivi des eaux de surface, mais aussi celui des effluents de stations d'épuration.

Dans un premier temps, les analyses ont été effectuées en triplicat. Les premiers résultats sur ces échantillons naturels confirmant la faible variabilité de l'analyse (RSDs inférieurs à 15 %) a permis de réduire les échantillonnages à 1 échantillon par point et ainsi d'augmenter le nombre de stations étudiées.

III-1 Niveaux moyens de contamination

Les niveaux de concentrations mesurés sont très variables, à la fois selon les composés (composés persistants/dégradables), les stations de prélèvement (variations amont/aval), les saisons de prélèvements (été/hiver), les conditions hydrologiques (crue/étiage). L'ensemble des mesures effectués sont présentées dans l'annexe 4. Le

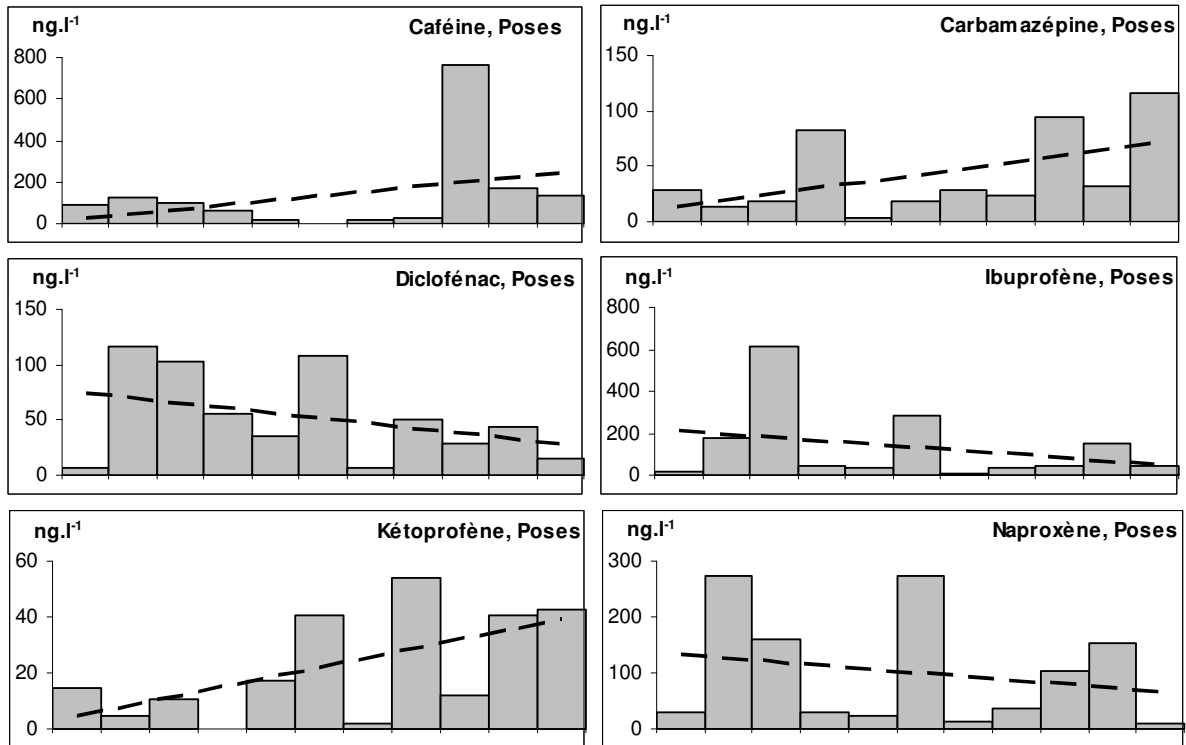
Tableau III- 5 montre l'ampleur de cette variabilité.

Les composés facilement dégradés notamment, comme la caféine ou l'ibuprofène sont ceux qui vont à la fois montrer les plus fortes concentrations (respectivement 762 ng.l⁻¹ et 611 ng.l⁻¹) et les plus fortes moyennes (138 ng.l⁻¹ et 151 ng.l⁻¹). L'aspirine, quant à elle, est parfois retrouvée à de fortes concentrations (332 ng.l⁻¹), mais c'est aussi le composé le moins fréquemment retrouvé (absent de 4 échantillons sur 11).

| | POSES | | CAUDEBEC | | HONFLEUR | |
|---------------|--------------|----------|-----------------|----------|-----------------|----------|
| Aspirine | 65 | [nd-332] | 26 | [nd-112] | 14 | [nd-94] |
| Caféine | 138 | [nd-762] | 76 | [3-160] | 15 | [nd-62] |
| Carbamazépine | 34 | [3-95] | 28 | [7-63] | 16 | [nd-41] |
| Diclofénac | 55 | [7-116] | 55 | [5-173] | 39 | [nd-128] |
| Gemfibrozil | 31 | [5-86] | 29 | [3-84] | 18 | [nd-46] |
| Ibuprofène | 151 | [6-611] | 68 | [nd-220] | 18 | [nd-73] |
| Kétoprofène | 20 | [nd-54] | 12 | [nd-27] | 24 | [nd-73] |
| Naproxène | 110 | [12-275] | 63 | [nd-183] | 15 | [nd-42] |

Tableau III- 5 : Gamme de concentrations mesurées dans l'estuaire de Seine. Echantillonnage de mars 2002 à février 2006. Moyenne [valeur minimale-valeur maximale], exprimées en ng.l⁻¹. Mesures sur 11 campagnes.

La Figure III- 14 présente pour quelques composés, l'ampleur de la variabilité sur l'ensemble des mesures effectuées. Les valeurs mesurées sont très variables, selon les mois et les composés. Il est difficile d'identifier une tendance générale à l'augmentation ou à la diminution de la concentration en substances pharmaceutiques dans l'estuaire. Si de fortes amplitudes de variation entre les différentes campagnes sont observées, les niveaux moyens de contamination de l'estuaire n'a pas clairement évolué au cours des 4 années de l'étude.



Les quantités de substances pharmaceutiques présentes dans l'estuaire peuvent sembler faibles, exprimées en $\mu\text{g.l}^{-1}$ voir en ng.l^{-1} . Néanmoins, si ces valeurs sont transposées en « équivalent comprimé », en tenant compte des doses moyenne par comprimé (Tableau III- 6), ce sont des quantités très importantes de composés qui sont introduites dans l'estuaire chaque jour.

| | Qté moyenne | Qté min. | Qté max. |
|---------------|-------------|----------|----------|
| ASP (1g) | 2 307 | 0 | 11762 |
| CBZ (200 mg) | 6 105 | 5 84 | 16 816 |
| DICLO (50 mg) | 39 154 | 5 030 | 81 900 |
| GEMF (450 mg) | 498 | 76 | 1368 |
| IBU (200 mg) | 24 932 | 1031 | 108 149 |
| KETO (200 mg) | 3 466 | 0 | 9 527 |
| NAP (500 mg) | 1 941 | 214 | 4 864 |

Tableau III- 6 : Estimation des quantités de comprimés passant le barrage de Poses par jour, en considérant les doses moyennes par comprimé et un débit moyen de $410 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$.

En ce qui concerne les rejets de station d'épuration, 3 d'entre eux ont été suivis pendant plusieurs campagnes, permettant de mettre en évidence les principales tendances (Tableau III- 7). Le kétoprofène et la carbamazépine ($2,5 \mu\text{g.l}^{-1}$) sont les composés retrouvés aux plus fortes concentrations : ($3,9 \mu\text{g.l}^{-1}$). En terme de concentration moyenne, le diclofénac est lui aussi fortement présent (jusqu'à 470 ng.l^{-1}) dans les rejets de station d'épuration.

| | STEP ELBEUF | STEP ROUEN | STEP TANC. |
|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Aspirine | 21 [nd-41] | 12 [nd-24] | 55 [nd-204] |
| Caféine | 54 [nd-115] | 59 [16-130] | 221 [3-815] |
| Carbamazépine | 367 [nd-858] | 324 [145-742] | 813 [113-2519] |
| Diclofénac | 96 [14-282] | 470 [25-863] | 464 [26-1014] |
| Gemfibrozil | 121 [6-525] | 69 [9-164] | 62 [nd-135] |
| Ibuprofène | 100 [nd-342] | 48 [2-132] | 44 [7-95] |
| Kétoprofène | 217 [21-1136] | 71 [15-157] | 988 [nd-3903] |
| Naproxène | 140 [nd-267] | 146 [18-584] | 160 [14-620] |

Tableau III- 7 : Gamme de concentrations mesurées dans l'estuaire de Seine. Echantillonnage de mars 2002 à Février 2006. Moyenne [valeur minimale-valeur maximale], exprimées en ng.l^{-1} , sur 11 campagnes de prélèvements.

Dans les stations aussi, la variabilité est importante. Plusieurs phénomènes concourent à ce résultat.

D'une part les apports à la station vont varier en fonction de la consommation des substances en amont. Certains composés vont être plus consommés en période hivernale (anti-pyrétiques, anti-inflammatoires...). D'autres, soumis à prescription médicale, ont une consommation plus constante (antidépresseurs, hypolipémiants...) (Castiglioni *et al.*, 2004 ; Castiglioni *et al.*, 2006).

D'autre part, les conditions climatiques vont influencer sur le volume d'effluents entrants dans la station. Quand ce volume augmente, le temps de rétention dans la station, et donc l'efficacité de celle-ci, vont diminuer, augmentant la quantité de composés non dégradée. Mais d'un autre côté, l'effluent non traité peut être dilué par les eaux de ruissellement (pas ou peu contaminées par des substances pharmaceutiques), ce qui peut contrebalancer la déficience de dégradation. L'utilisation de mesures parallèles, comme celle de la teneur en bore (utilisée dans le suivi de la station d'épuration d'Eysines) ou de la teneur en chlore (campagne dans le bassin versant de l'Hérault) permet de s'affranchir des facteurs de dilution et peut ainsi permettre de déconvoluer les différents phénomènes.

Ces résultats de suivi sur le long terme de différents effluents représentent un apport important à la recherche sur le devenir de ces nouveaux contaminants émergents. Diverses études se sont focalisées sur ce point, en mesurant l'efficacité de différents modes de traitement (Programme POSEIDON). Cette étude corrobore celles déjà publiées (Tauxe-Wuersch, 2005), mettant en évidence les lacunes des systèmes unitaires (pas de séparation entre eaux de ruissellement et eaux usées domestiques). Les données de consommation sont un important facteur à prendre en compte, en plus du degré de dégradation des composés dans la station. La non-accessibilité de ces données est actuellement un frein important à la modélisation du devenir de ces contaminants dans les écosystèmes.

III-2 Dégradation dans l'écosystème estuarien

Selon les composés, la dégradation va être plus ou moins marquée dans l'écosystème estuarien. La carbamazépine par exemple ne montre aucune dégradation. Le naproxène, l'ibuprofène et surtout la caféine, sont eux fortement dégradés tout au long de l'estuaire. Le diclofénac et le kétoprofène sont eux aussi connus pour se dégrader dans le milieu naturel, mais les faibles niveaux mesurés lors de cette campagne (Figure III- 15) dès la partie amont masquent le phénomène.

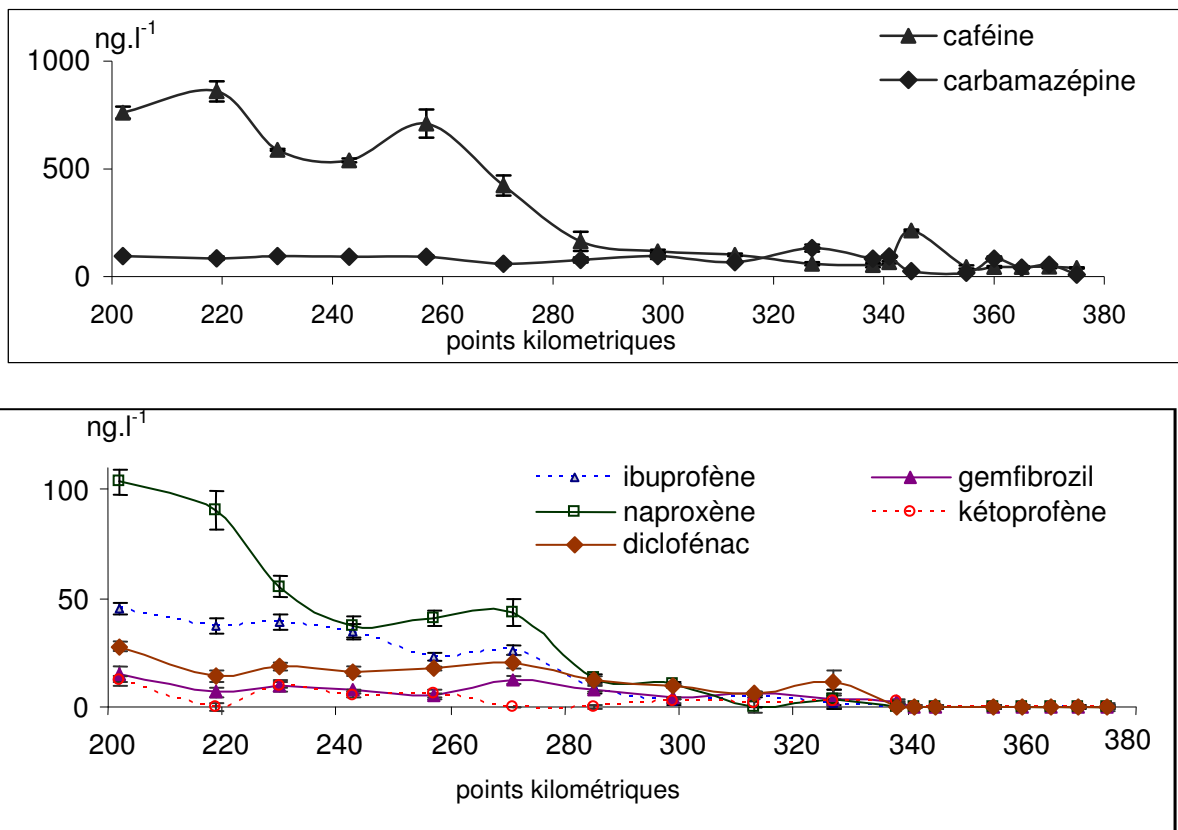
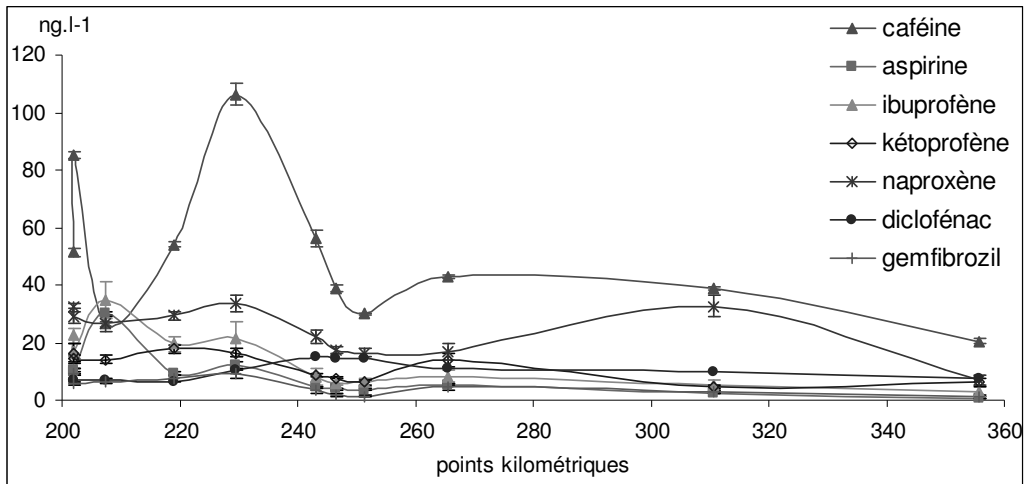


Figure III- 15: Suivi des substances pharmaceutiques tout au long de l'estuaire, du pK 202 (barrage de Poses) à la Baie de Seine. Concentrations exprimées en ng.l⁻¹, 22 points de prélèvements, triplicats, campagne d'octobre 2003.

Selon les conditions climatiques, ces phénomènes vont être plus ou moins marqués. Ainsi, sur la campagne effectuée en mars 2002 (Figure III- 16), on voit que les concentrations restent beaucoup plus stables tout au long de l'estuaire. Cette faible dégradation est probablement due au fort débit de la Seine pendant cette période de crue (1000 m³.s⁻¹). En effet, en période de crue, non seulement les concentrations sont faibles dès l'amont (pK 202 à Poses) à cause de la dilution des apports, mais de plus, les temps de résidence des masses d'eau dans l'estuaire sont beaucoup plus courts, limitant les possibilités de dégradation avant l'expulsion dans la Baie de Seine. De plus, en conditions hivernales, le plus faible ensoleillement va réduire les phénomènes de photodégradation et les températures de l'eau, plus basses, vont affecter la biodégradation.



Figure

III- 16: Suivi des substances pharmaceutiques dans l'estuaire de Seine, conditions hivernales, mars 2002.

III-3 Caractérisation des apports

III-3-1 : Identification des sources principales :

Pour caractériser les principales sources de composés pharmaceutiques dans l'environnement, 2 campagnes ont été mises en œuvre. Les teneurs en substances pharmaceutiques ont été mesurées dans 9 affluents de l'estuaire de Seine. Ces concentrations, exprimées en ng.l^{-1} , sont comprises entre quelques ng.l^{-1} et plusieurs centaines de ng.l^{-1} selon les composés et les affluents (Figure III-17).

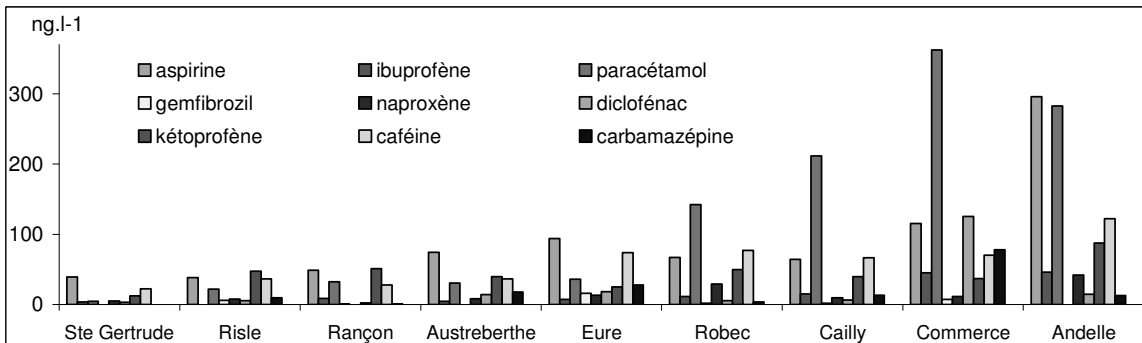


Figure III- 17: Suivi des substances pharmaceutiques dans les affluents de l'estuaire de Seine, avril 2005 (concentrations exprimées en ng.l^{-1}).

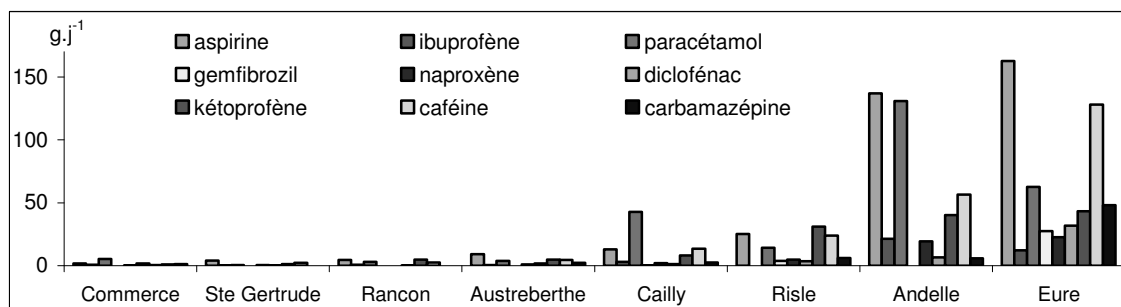


Figure III- 18: Suivi des substances pharmaceutiques dans les affluents de l'estuaire de Seine, avril 2005 (apports exprimés en g.jour^{-1}).

Les affluents les plus contaminés sont l'Andelle, le Commerce et le Cailly. Néanmoins, en rapportant ces concentrations aux débits les apports majoritaires à l'estuaire proviennent de l'Eure et de l'Andelle (Figure III- 18), avec des apports supérieurs à plusieurs dizaines de grammes de composés par jour (pour l'aspirine, 140 g par l'Andelle et 165 g par l'Eure).

Si on compare ces apports à ceux de l'amont (Poses) et à ceux des 3 stations d'épuration suivies (Tancarville, Elbeuf et Rouen), ils s'avèrent relativement faibles : la partie amont de l'estuaire reste la source majoritaire de composés à l'estuaire.

On peut toutefois noter des différences selon les types de substances pharmaceutiques, comme le montre la Figure III- 19.

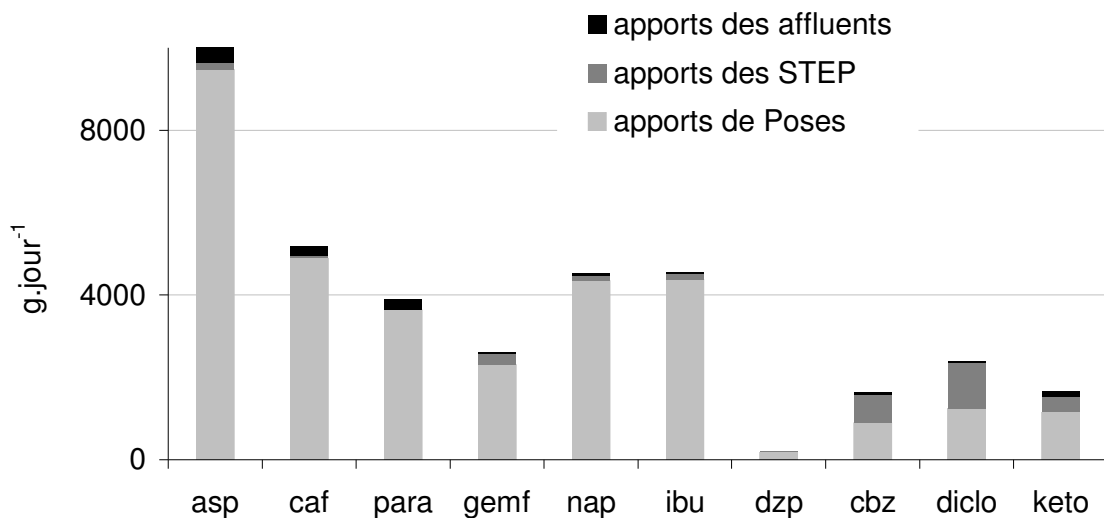


Figure III- 19: Répartition des apports selon les contributeurs : Poses amont, affluents et stations d'épuration, campagne d'avril 2005. Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2.

Les composés fortement dégradables (aspirine, caféine et paracétamol) sont ceux dont les apports sont les plus importants (jusqu'à 10 kg par jour). Pour ces composés, les apports de l'amont sont très majoritaires (supérieurs à 95 %). L'apport des stations d'épuration est quasiment négligeable et celui des affluents est faible, mais ces apports restent significatifs. Pour ces composés, les phénomènes de dégradation interviennent à la fois dans les stations d'épuration et dans le milieu naturel. Les apports des affluents sont certes faibles mais non négligeables. Dans les affluents, on trouve des rejets directs (populations non connectées à un réseau de traitement des eaux) et des stations sans traitement biologique. Or on sait que des composés comme le paracétamol sont très sensibles à la dégradation lors du traitement biologique (Joss *et al.*, 2005). La présence de stations d'épuration peu performantes peut justifier la présence de ces composés, parmi les plus consommés.

Pour les composés plus persistants (gemfibrozil, naproxène, ibuprofène, diazépam), si l'apport amont reste majoritaire, l'apport des stations d'épuration représente environ 3 à 5 % de la charge globale. Ces composés, partiellement dégradés dans les stations d'épuration et dans le milieu naturel, vont être rejetés dans l'environnement à des concentrations plus faibles que ceux précédemment cités (compte tenu de leur niveau de consommation). L'efficacité des traitements

étant plus faible pour ces composés, leur présence dans les rejets est plus importante que pour les composés fortement dégradables.

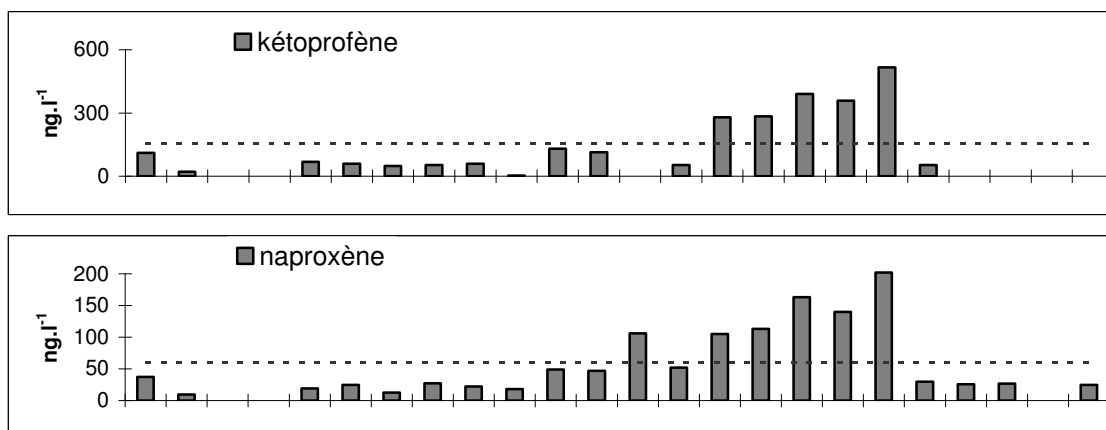
Pour les composés les plus persistants (diclofénac, kétoprofène et carbamazépine), les apports des stations d'épuration sont beaucoup plus conséquents. Pour un apport global de l'ordre de 2 kg, près de la moitié provient des stations d'épuration. La présence dans les affluents est quasiment négligeable, compte tenu des plus faibles consommations. La persistance dans les stations d'épuration de ces composés relie directement les concentrations trouvées dans le milieu à la population de consommateurs. La station de Rouen par exemple, draine une population de consommateur de carbamazépine beaucoup plus importante que les affluents, ce qui justifie la prédominance de la source « station d'épuration » pour expliquer la quantité de composés dans le milieu.

La deuxième campagne, effectuée en février 2006, malgré des concentrations beaucoup plus faibles (approximativement d'un facteur 5), donne des résultats du même ordre.

III-3-2 : Variabilité des apports

Que ce soit dans les effluents de station d'épuration ou dans les prélèvements d'eau de surface, il a été démontré une grande variabilité dans les concentrations mesurées. Il est malgré tout difficile d'appréhender l'échelle de ces variations. Une étude, sur une courte échelle de temps a été entreprise à Poses pendant deux jours. En parallèle, un suivi de la station d'épuration de Rouen a été effectué pendant 24 h avec un échantillonnage heure par heure, afin de suivre la variabilité de l'effluent.

En ce qui concerne les effluents, les phénomènes sont différents selon les composés (Figure III- 20). Des composés comme le diazépam ou la carbamazépine sont relativement stables dans tous les échantillons : on observe une faible variabilité selon les heures de prélèvements. Au contraire, pour les anti-inflammatoires non stéroïdiens (ici présentés le kétoprofène et le naproxène) la variabilité est très importante entre les différents échantillons (variabilité entre 10 et 202 ng.l⁻¹ pour le naproxène, entre 12 et 520 ng.l⁻¹ pour le kétoprofène). Cette variabilité peut être imputée à différents phénomènes, notamment, et probablement essentiellement, la variabilité des effluents bruts entrant dans la station, pour lesquels il n'a malheureusement pas été possible de procéder à la même analyse.



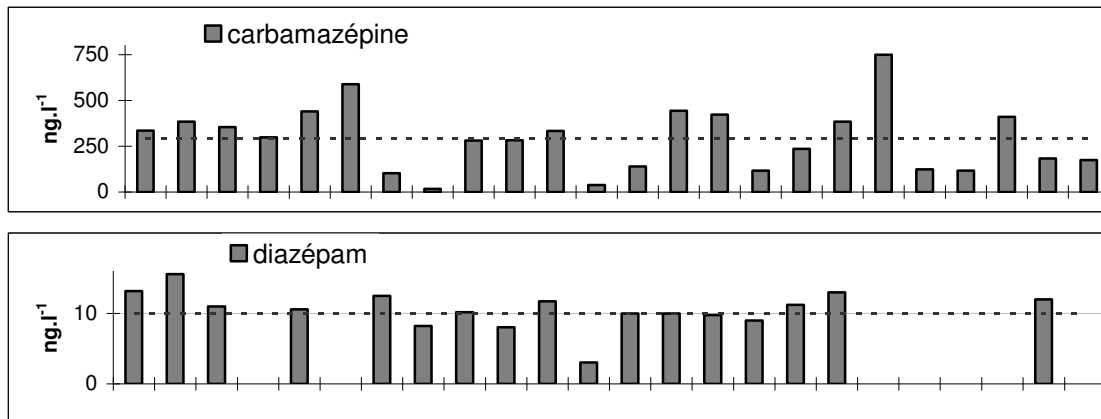


Figure III- 20: Concentrations en composés pharmaceutiques dans l'effluent de la station d'épuration de Rouen, suivi de 24 h.

En ce qui concerne la variabilité des apports amont, caractérisée au niveau du barrage de Poses, une importante variabilité a aussi été mise en évidence.

Si l'on considère les résultats exprimés en ng.l^{-1} , la concentration de la carbamazépine varie entre $3,3 \text{ ng.l}^{-1}$ et 95 ng.l^{-1} . Ces amplitudes semblent plus ou moins corrélées aux débits de la Seine, mettant en avant les phénomènes de dilution dûs aux apports par les eaux de pluies et de ruissellement à la rivière dans sa partie amont.

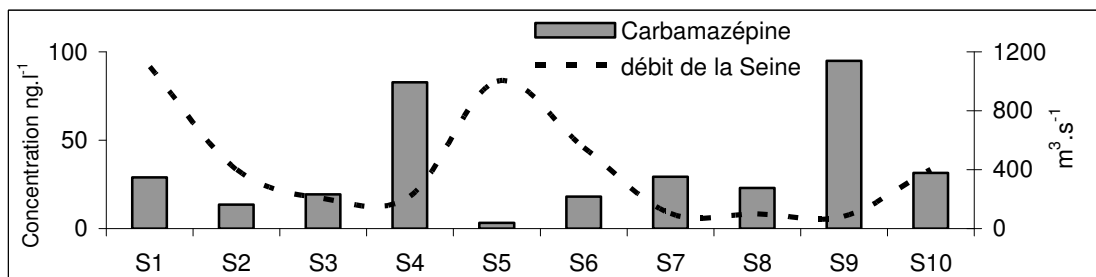


Figure III- 21: Variabilité de la carbamazépine mesurée à Poses, exprimée en ng.l^{-1} . Prélèvements effectués entre mars 2002 et février 2006.

Néanmoins, en corrigeant le facteur dilution et en exprimant les apports en quantités journalières (g.jour^{-1}), on note que l'amplitude des variations n'est pas réduite (entre 198 et 2754 g.jour^{-1}) par ce calcul (Figure III- 22). D'autres phénomènes sont à prendre en compte.

L'augmentation du débit de la Seine, s'il entraîne la dilution des divers apports, va diminuer le temps de résidence des composés (comme explicité précédemment dans le paragraphe III-2) et donc leur dégradation, augmentant ainsi les apports à Poses.

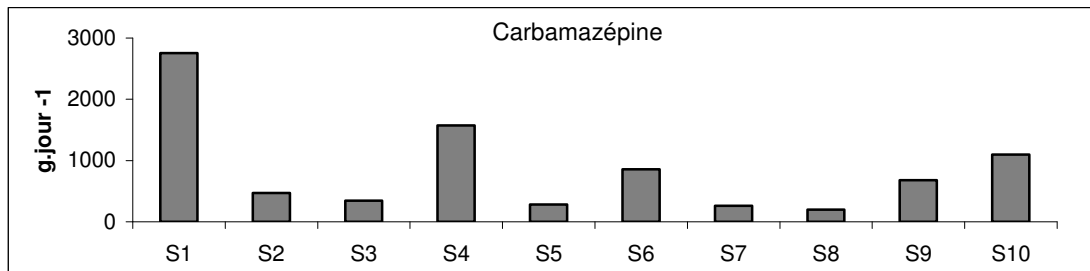


Figure III- 22: Variabilité de la carbamazépine mesurée à Poses, exprimée en g.j⁻¹. Prélèvements effectués entre mars 2002 et février 2006.

En étudiant l'évolution de la contamination à l'échelle de quelques heures (4 prélèvements en 52 h), en condition de débit constant, la variabilité diminue (au maximum un facteur 3 pour l'aspirine), montrant le rôle du débit. Néanmoins, pour certains composés cette variabilité n'est pas totalement supprimée, mettant en évidence le rôle des apports. La principale source d'apport à l'estuaire est à priori la station d'épuration d'Achères, d'une capacité de plus de 6 millions équivalents-habitants et qui émet plus de 2 080 000 m³ d'effluent par jour. La variabilité de cet effluent pouvant être comparée à celle de l'effluent de Rouen, elle peut apporter une explication supplémentaire aux variations de concentrations en substances pharmaceutiques mesurées au barrage de Poses.

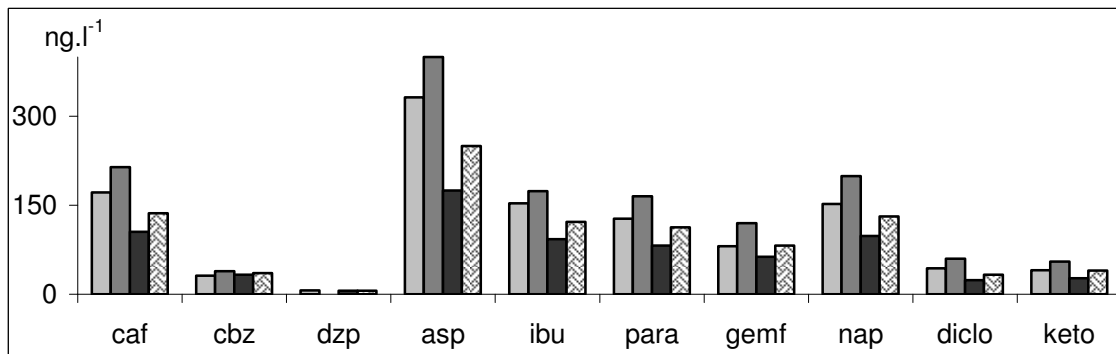


Figure III- 23: Variabilité des substances pharmaceutiques mesurées à Poses, suivi pendant 52h, 4 prélèvements. Pour les abréviations, voir Tableau III- 2.

Ces résultats mettent en évidence l'intérêt du développement d'un nouvel outil d'échantillonnage, les POCIS (Polar Organic Compounds Integrative Sampler), décrit dans le paragraphe VI, qui devrait permettre d'avoir une mesure intégrée sur du moyen/long terme, plus globale et donc moyennée, des niveaux de contamination.

III-4 Composés pharmaceutiques dans le milieu marin

Le milieu marin en tant que milieu extrêmement sensible aux perturbations anthropiques a été étudié dans certaines conditions. La Baie de Seine subit un apport de charge contaminante par l'estuaire de Seine, lui-même pollué en substances pharmaceutiques par l'amont et les stations d'épuration localisées sur ces berges.

La Figure III- 24 présente le suivi de la zone de mélange des eaux. Cet échantillonnage, en point fixe sur un cycle de marée, montre bien l'origine estuarienne de la contamination. Les teneurs suivent la salinité, montrant que la présence de ces composés en milieu marin est due à l'apport d'eau douce.

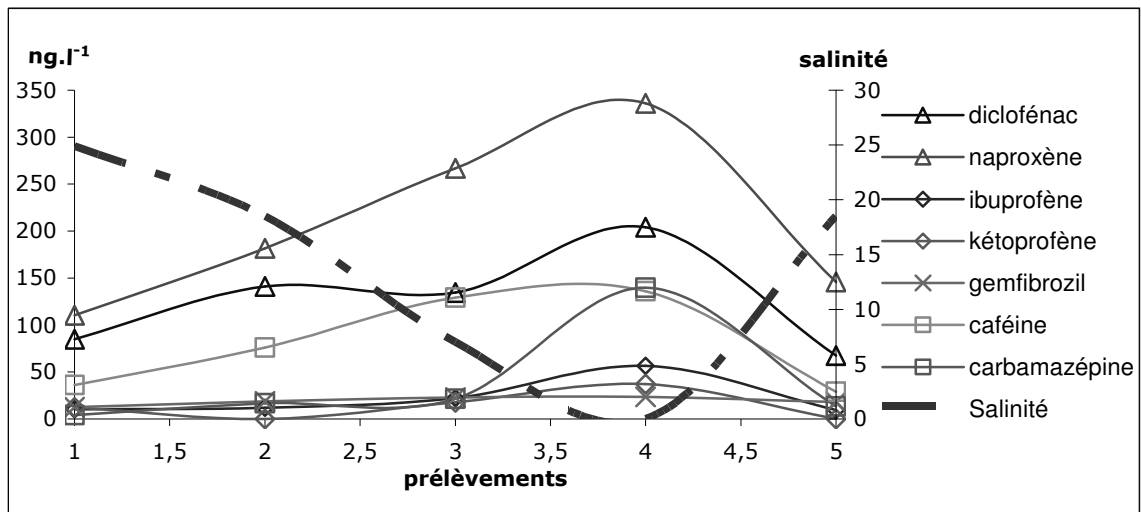


Figure III- 24: Evolution de la concentration en substance pharmaceutiques au cours d'un cycle de marée, point fixe, pont de Tancarville, campagne de mai 2004.

C'est donc la contamination effective des masses d'eau estuariennes qui va définir le niveau d'exposition de l'embouchure et de la Baie de Seine. Mais le phénomène de dilution important survenant dès les premiers kilomètres (Figure III- 25) rend la contamination de la Baie de Seine par les substances pharmaceutiques quasiment négligeable.

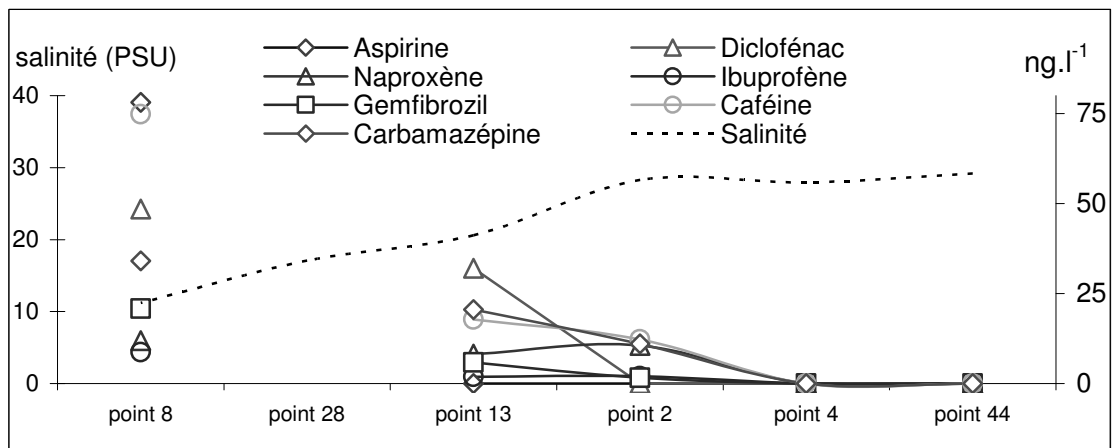


Figure III- 25 : Présence des composés pharmaceutiques dans la Baie de Seine (Campagne Réseau National d'observation, décembre 2004).

IV-Partition solide / liquide. (Publication 3)

Le rôle de la phase particulaire, considéré comme négligeable compte tenu de la polarité des composés, a rarement été étudié. Les outils analytiques développés au cours de ces études ont permis un accès à ce compartiment, aussi bien pour les eaux d'effluents (suivi de la station d'Eysines, suivi de la Calanque de Cortiou) que pour les eaux superficielles (Estuaire de Seine). Le suivi de la contamination de la phase particulaire a été précédemment décrit dans le cas des effluents de station d'épuration, ce chapitre présente les résultats spécifiquement obtenus sur l'estuaire de Seine.

IV-1-1 : Estuaire de Seine

En Estuaire de Seine, la présence de substances pharmaceutiques n'a pu être étudiée pour l'ensemble des missions. En effet compte tenu de la faible teneur en matière en suspension des eaux, surtout dans la partie aval de l'estuaire et la faible concentration en substances pharmaceutiques, le manque de matrice a été un frein à la généralisation de cette mesure. Néanmoins, les mesures effectuées montrent une très faible présence de composés dans cette phase, comme leur forte polarité le laissait présager. Certains composés, comme le diclofénac et le kétoprofène sont certes présents dans la phase particulaire, mais restent majoritairement dans le compartiment dissous. La Figure III- 26 présente les résultats obtenus en estuaire de Seine, sur une campagne comportant un échantillonnage de 22 points entre Poses et la Baie de Seine.

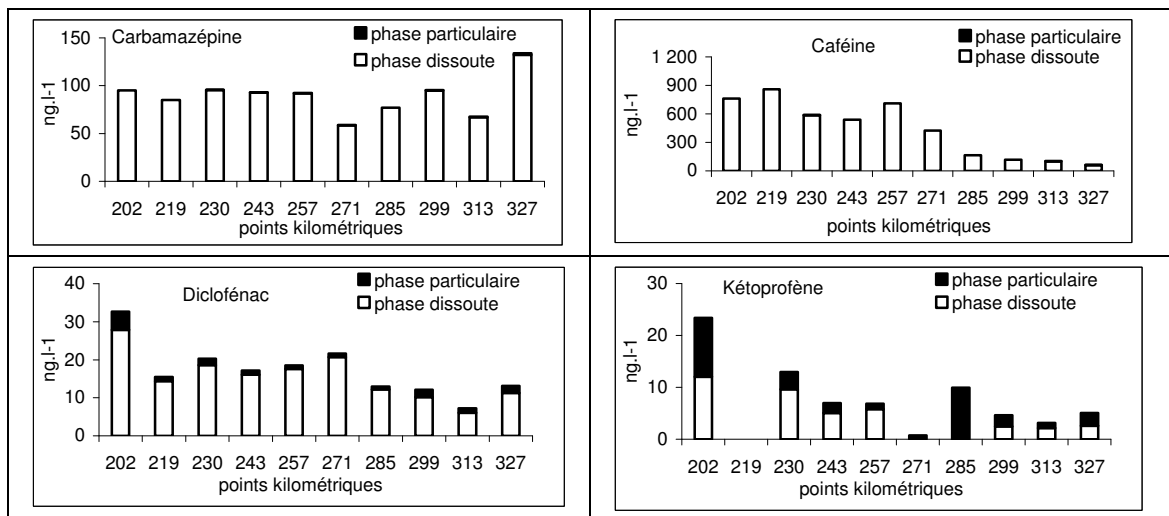


Figure III- 26 : Répartition entre phase dissoute et phase particulaire : estuaire de Seine.

Les concentrations de kétoprofène dans la phase particulaire sont particulièrement élevées (Figure III- 27) et demandent à être confirmées par des campagnes supplémentaires pour lesquelles l'attention sera focalisée sur l'obtention de quantité suffisante de particules. En effet, les teneurs très importantes (supérieures à $1 \mu\text{g.g}^{-1}$ au niveau de Poses) ainsi que les fortes fluctuations tout au long de l'estuaire sont difficilement explicables.

Le niveau de contamination des particules émises par la station permettrait d'élucider le rôle des effluents dans ces fluctuations.

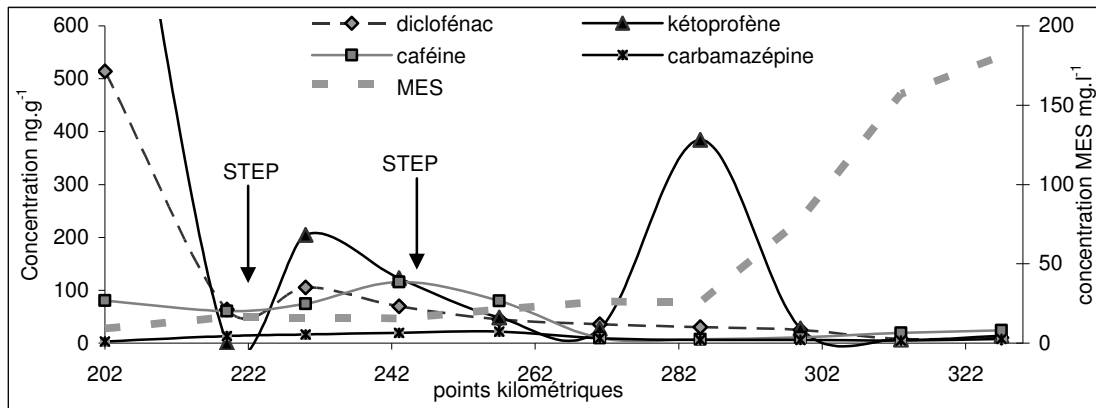


Figure III- 27 : Concentrations des composés pharmaceutiques dans la phase particulaire en estuaire de Seine, exprimées en ng.g⁻¹, poids sec.

Les apports des stations d'épuration entraînent une légère augmentation des teneurs dans l'estuaire qui disparaît rapidement compte tenu des faibles niveaux de concentrations dans la phase particulaire des eaux de surface.

V-Devenir des composés dans les organismes aquatiques

V-1 Résultats en laboratoire

L'accumulation des substances pharmaceutiques a été mesurée sur une espèce sentinelle, la moule *Mytilus edulis*, en prenant la carbamazépine comme composé modèle. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure III- 28. On note une accumulation de ce composé au cours de l'exposition, beaucoup plus marquée pour les moules immergées sur toute la durée de l'exposition (14 jours). Pour ces moules, le niveau en fin d'exposition atteint 9 µg.g⁻¹, contre 5 µg.g⁻¹ pour les organismes qui alternent les cycles d'immersion et d'émersion. Ces données d'accumulation figurent parmi les premières obtenues sur des organismes bivalves en ce qui concerne les substances pharmaceutiques. Auparavant, une étude avait montré l'accumulation de diclofénac dans des truites (Schwaiger *et al.*, 2004) exposées à des concentrations dans la phase dissoute de 1 à 500 µg.l⁻¹. Les concentrations mesurées dans les différents organes montraient une accumulation préférentielle dans le foie (jusqu'à 6000 ng.g⁻¹ pour une exposition à 500 µg.l⁻¹). Les résultats montrent une différence entre les moules exposées en permanence (immergées) et celles subissant l'alternance tidale. Les moules immergées accumulent quasiment deux fois plus de carbamazépine que celles subissant l'alternance, pour un niveau d'exposition équivalent (30-40 µg.l⁻¹).

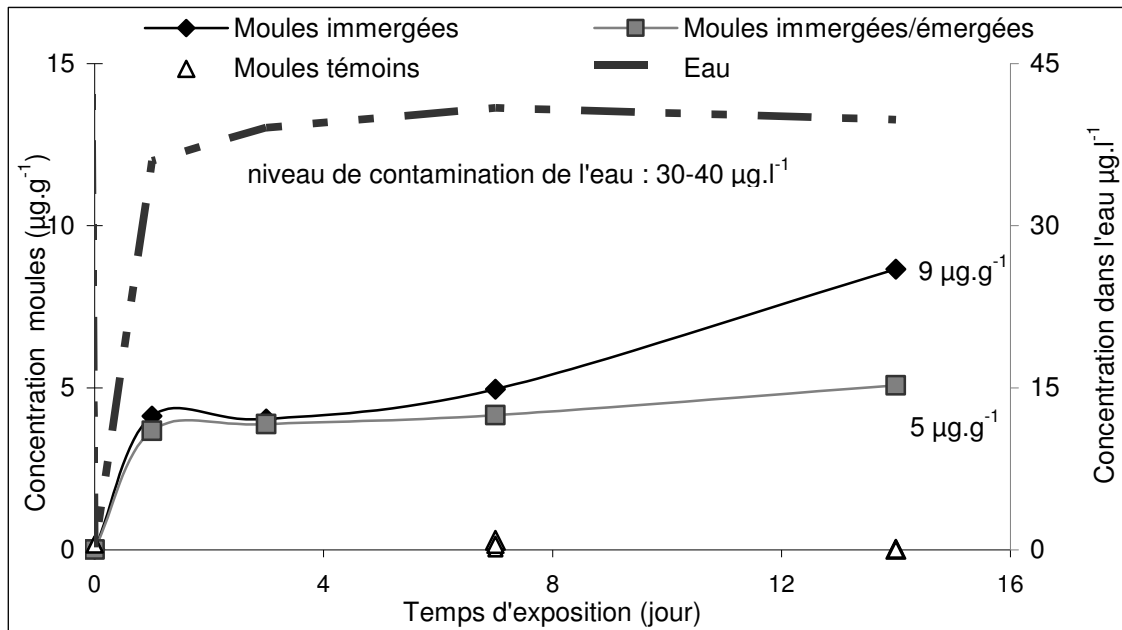


Figure III- 28 : Accumulation de la carbamazépine chez la moule *Mytilus edulis*, exposition en laboratoire.

V-2 Présence dans le milieu naturel

Sur les différents échantillons analysés, il n'a pas été possible d'identifier la présence de composés pharmaceutiques, aussi bien dans le foie que dans la bile ou les muscles. Les prises d'essai utilisées pour ces mesures se sont avérées faibles (moins de $100 \mu\text{l}$ pour la bile, 50 à 100mg pour les organes), ne permettant pas de dépasser les limites de détection (de l'ordre du ng). De plus, les poissons échantillonnés sont des poissons de la Baie de Seine, qui s'avère elle-même faiblement contaminée. La mobilité des poissons dans le milieu marin leur permet de ne pas être exposés sur du long terme à de fortes concentrations. Il serait intéressant d'analyser des espèces de rivière ou estuariennes, qui seront plus assujetties aux conditions de contamination du milieu contaminé qu'est l'Estuaire de Seine.

VI-Les POCIS, Echantillonneurs intégratifs, publication 7

VI-1 Résultats en laboratoire

VI-1-1 : Etude du comportement sur 48h

Afin de valider les mesures effectuées pour les différentes expérimentations, une étude de la stabilité des composés a été entreprise. L'objectif est de vérifier la stabilité des composés pendant la durée de l'exposition. Sur ce suivi pendant 48h de l'évolution de la concentration des analytes dans l'eau, différents résultats peuvent être mis en évidence.

On peut noter l'existence de phénomènes de dégradation des composés durant le temps d'exposition (Figure III- 29), comme l'indiquent les pertes obtenues dans le béccher témoin (en l'absence d'échantillonneur). Cette perte variable et non négligeable pour certains composés nous a incité à modifier l'équation de calcul du taux d'échantillonnage R_s (Equation 1). En remplaçant dans le calcul la perte dans l'eau pendant l'exposition (Q_0-Q_t) par la quantité présente dans la POCIS en fin d'exposition (Q_s), on s'affranchit des pertes dues à la dégradation (Equation 1').

$$(1) R_s = \frac{Q_0 - Q_t}{d} \times V \Rightarrow R_s = \frac{Q_s}{d} \times V (1')$$

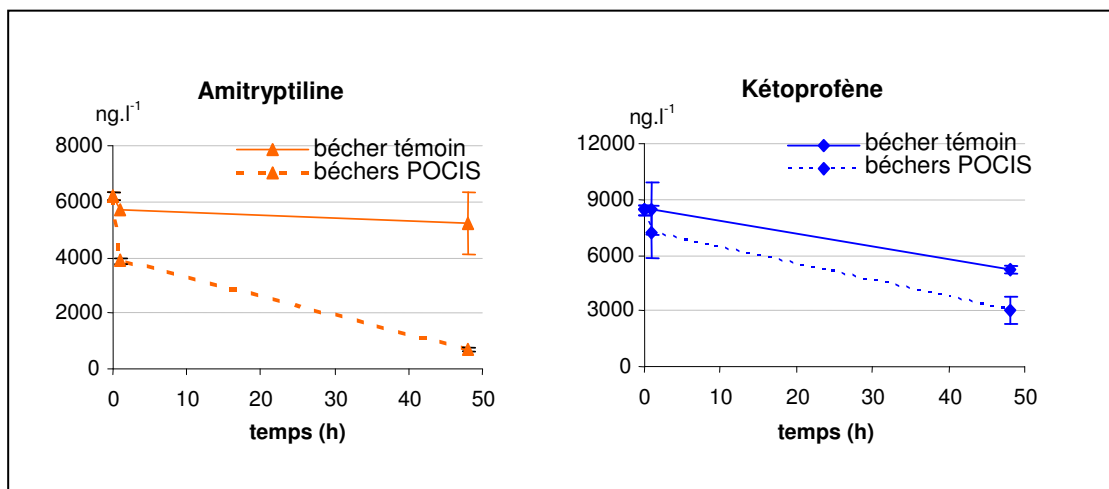


Figure III- 29 : Cinétique de dégradation des composés pharmaceutiques.

Si l'on s'intéresse à la cinétique de disparition des composés de l'eau, on s'aperçoit de plus que dans les bécchers contenant les POCIS, il y a une importante diminution de la concentration durant la première heure, puis une diminution plus lente de la teneur dans l'eau tout au long de l'expérimentation. Le rôle de la membrane est dans ce cas mis en évidence : il y a une première adsorption des composés sur la membrane, très rapide, puis un transfert des analytes de la membrane vers la phase réceptrice (Alvarez, 1999). Ce transfert est plus ou moins rapide et total selon les composés d'intérêt. Dans ses développements sur les pesticides (Alvarez, 1999), Alvarez a montré qu'au bout de 28 jours d'exposition, 25 % du diazinon restait dans la membrane, contre 5 % pour l'atrazine. Ce même phénomène est rencontré pour les substances pharmaceutiques. La Figure III- 30

présente la répartition des analytes entre la phase et la membrane après 48 h d'exposition. La majorité des composés sont déjà stockés dans la phase et ce phénomène va s'accroître au cours du temps. Cette répartition rapide justifie de négliger l'analyse des membranes, simplification d'autant plus utile lors des applications en milieu naturel (dépôt de biofilm sur les membranes qui complexifie l'analyse).

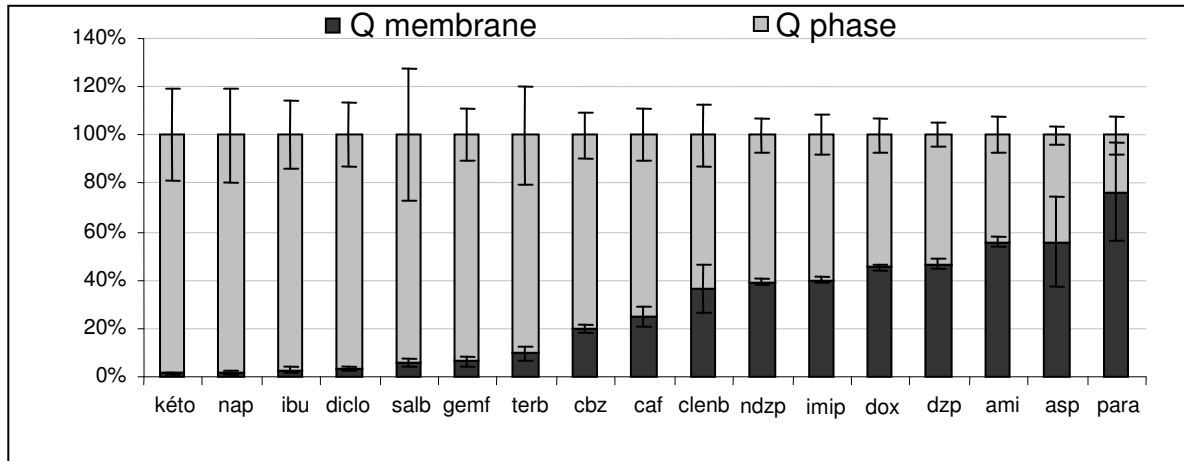


Figure III- 30 : Répartition phase / membrane en 48h d'exposition (n=3). Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2.

VI-1-2 : Effet de la concentration :

Il est important de savoir si la concentration du milieu en analytes influe sur le taux d'échantillonnage. En effet, un tel phénomène ne permettrait pas l'utilisation quantitative des POCIS.

Cette vérification a été effectuée sur 2 niveaux de concentration : $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ et $5 \mu\text{g.l}^{-1}$, pour une durée d'exposition de 7 jours.

Les résultats obtenus, présentés dans la Figure III- 31, montrent que la concentration dans le milieu d'exposition n'a aucune influence sur le taux d'adsorption ce qui permet d'envisager d'utiliser le Rs calculé en laboratoire pour calculer une concentration réelle dans le milieu naturel.

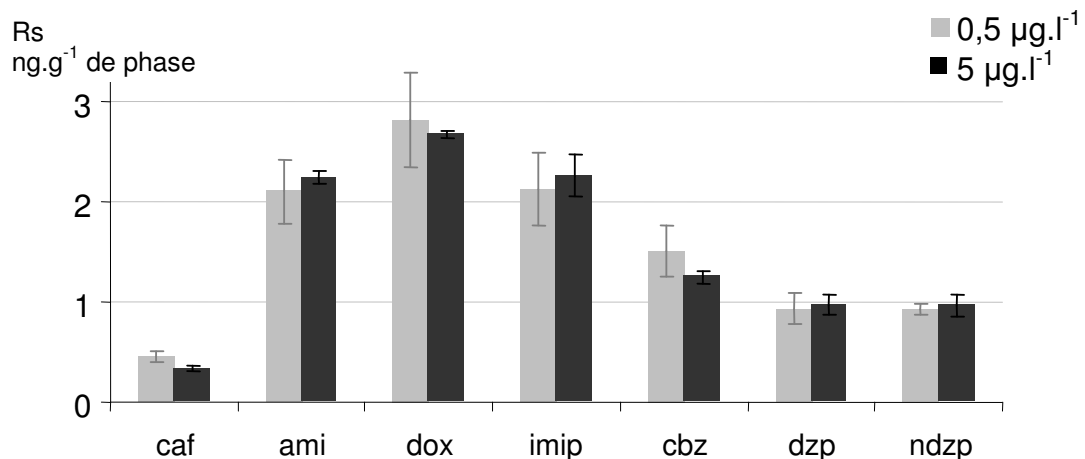


Figure III- 31 : Effet de la concentration sur le taux d'échantillonnage (n=3). Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2.

VI-1-3 : Effet de la température

On peut voir que l'augmentation de la température de l'eau sur une semaine d'exposition entraîne une augmentation du taux d'échantillonnage pour tous les composés mais de manière plus ou moins marquée (Figure III- 32), le maximum étant observé pour le kétoprofène avec une variation du simple au double pour 6°C d'augmentation. Néanmoins, en considérant les conditions en milieu naturel, il est important de préciser que sur des périodes d'exposition de 1 à 2 semaines, une telle amplitude de variation est rarement observée, rendant ce paramètre moins important.

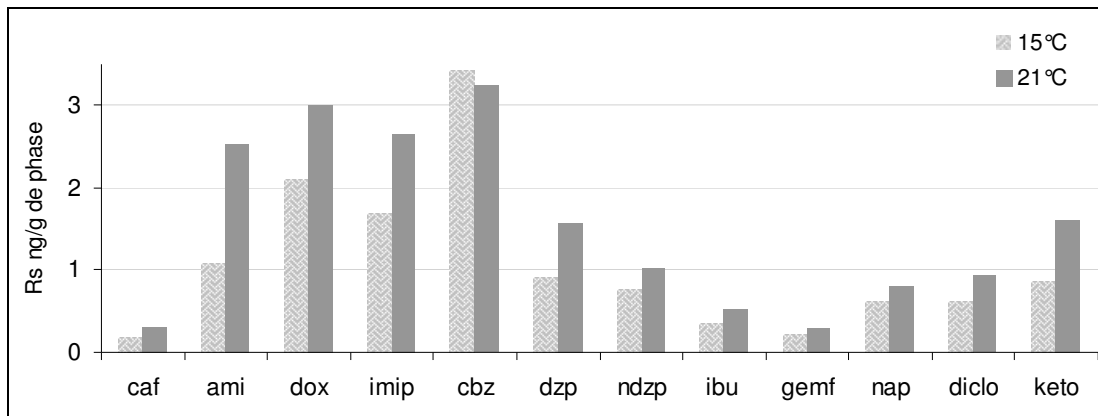


Figure III- 32 : Effet de la température sur le taux d'échantillonnage. Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2.

VI-1-4 : Effet de la salinité :

Un des objectifs de ce travail de thèse était de documenter les niveaux de contamination dans différents écosystèmes aquatiques, dont les estuaires et certains milieux marins. C'est pourquoi il a paru intéressant d'estimer l'effet de la salinité sur le taux d'échantillonnage. Deux conditions extrêmes ont donc été comparées : 0 et 35 PSU.

Les résultats obtenus, présentés dans la Figure III- 33, varient selon les composés et la classe chimique. En effet, si pour la majorité des composés, il n'y a pas d'effet de la salinité, certains d'entre eux sont sensibles à ce paramètre. En ce qui concerne le taux d'échantillonnage, la fluoxétine montre une diminution de 40% et les composés de la classe des antidépresseurs tricycliques (amitryptiline, doxépine et imipramine) montrent des diminutions de respectivement de 52 %, 53 % et 64 %.

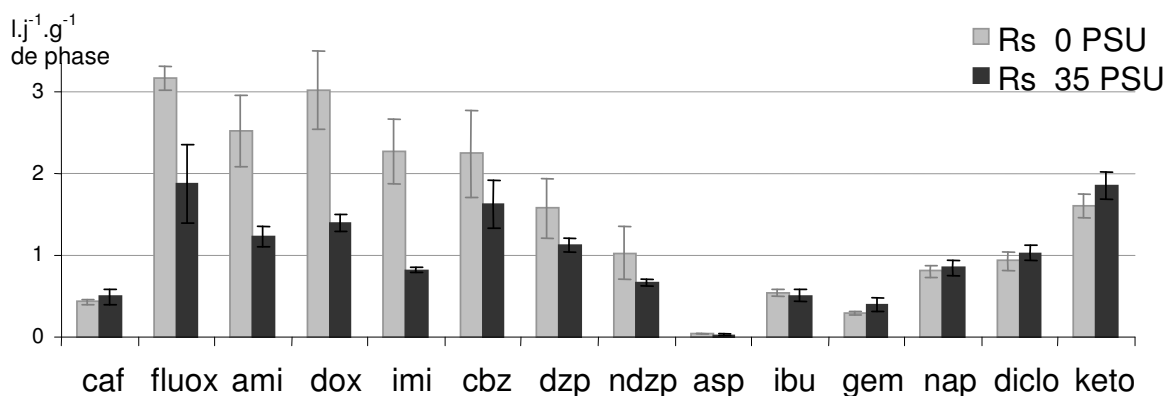


Figure III- 33 : Effet de la salinité sur le taux d'échantillonnage (n=3). Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2.

L'augmentation de la salinité augmente la force ionique de l'eau et diminue l'hydrophilie des composés. Cet effet est d'autant plus marqué pour les composés les moins polaires, les composés neutres, notamment les composés tricycliques : amitryptiline, doxépine, imipramine.

Sur l'ensemble des expérimentations en laboratoire, il est important de noter la bonne reproductibilité obtenue : sur les triplicats, exposés dans des conditions similaires, la variation de la mesure de composé dans la phase n'excède jamais 20% (valeur maximale pour la carbamazépine), comme le montre la Figure III- 34.

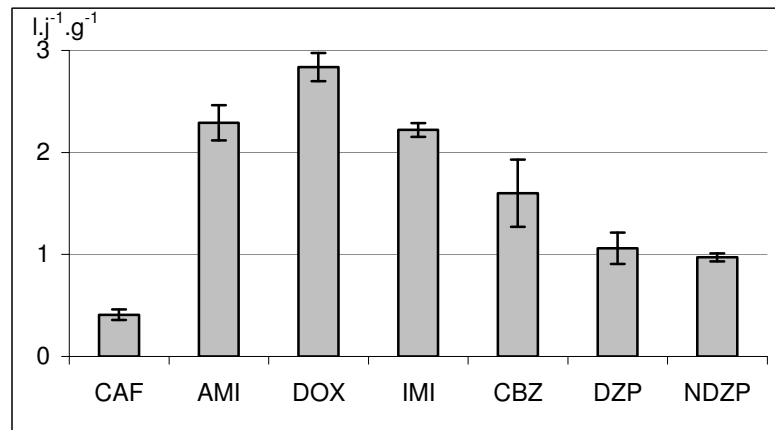


Figure III- 34 : Variabilité du taux d'échantillonnage (21°C, 0 ‰, n=9). Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2.

VI-2 Expérimentations sur la Meuse

VI-2-1 : Résultats en milieu naturel

Les deux mesures classiques ponctuelles (1 l d'eau en triplicat) effectuées ont été faites dans deux conditions différentes. Le premier prélèvement (22/04/05) a été fait au moment de la mise en eau du système expérimental. Le deuxième correspond à la fin de l'expérimentation après une importante montée des eaux de la Meuse. De manière générale, les résultats obtenus sont comparables à ceux trouvés dans d'autres estuaires de même importance. L'importante variation dans le débit de la Meuse peut expliquer les différences des concentrations entre les deux mesures (Tableau III- 8), correspondant à une dilution de la contamination apportée par les différents rejets pour le second prélèvement effectué après une remontée des eaux.

| | 22/04/2005 | 27/04/2005 | | 22/04/2005 | 27/04/2005 |
|---------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| Caféine | 199 ± 27 | 18 ± 4 | Ibuprofène | 37 ± 4 | 13 ± 2 |
| Fluoxétine | <5 | <5 | Paracétamol | <2 | <2 |
| Amitryptiline | <1 | <1 | Gemfibrozil | 2 ± 1 | <1 |
| Doxépine | <1 | <1 | Naproxène | 23 ± 6 | 10 ± 1 |
| Imipramine | <2 | <2 | Diclofénac | 29 ± 7 | 14 ± 3 |
| Carbamazépine | 196 ± 33 | 40 ± 3 | Terbutaline | <2 | <2 |
| Diazépam | nd | 8 ± 3 | Salbutamol | <2 | <2 |
| Nordiazépam | 3 ± 1 | 2 ± 1 | Clenbutérol | 5 ± 1 | 2 ± 1 |
| Aspirine | 30 ± 6 | 11 ± 0,2 | Kétoprofène | 10 ± 2 | 4 ± 1 |

Tableau III- 8 : Concentrations exprimées en ng.l⁻¹ dans la Meuse sur les deux mesures, avril 2005. (moyenne de triplicats).

L'importante variabilité obtenue sur les POCIS (Tableau III- 9), supérieure à celle calculée en milieu contrôlé peut être expliquée par le dépôt particulaire et les divers développements (biofilm) observés sur les membranes. La brusque montée des eaux et l'importante remise en suspension qui en a résulté ont accru ces phénomènes, malgré le nettoyage quotidien de la cage d'exposition des POCIS. En effet, des macro-déchets (branchages, poches plastiques...) ont du être fréquemment retirés du système expérimental. Néanmoins, la quasi-totalité des composés recherchés (à l'exception de la fluoxétine et de la terbutaline) ont été détectés. Certains composés, non détectés par l'analyse de l'eau (l'amitryptiline, la doxépine, l'imipramine, le diazépam, le paracétamol et le salbutamol) sont ainsi mis en évidence dans la Meuse par l'utilisation de l'échantillonneur intégratif. On peut noter ainsi une des caractéristiques très intéressante de ce nouvel outil, à savoir sa capacité à permettre l'identification et la quantification de composés présents à des concentrations inférieures à la limite de détection obtenues par les échantillons d'eau de 1 l. L'échantillonneur permet en effet de concentrer les analytes présents dans plusieurs litres (caféine, ibuprofène...), voir dans plusieurs dizaines de litres (carbamazépine, amitryptiline...).

| | Moyenne (ng.g⁻¹) | Ecart-type (ng.g⁻¹) | Ecart-type (%) |
|---------------|------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| Caféine | 9982 | 2544 | 25% |
| Fluoxétine | nd | - | - |
| Amitryptiline | 96 | 40 | 41% |
| Doxépine | 199 | 95 | 48% |
| Imipramine | 331 | 169 | 51% |
| Carbamazépine | 1064 | 96 | 9% |
| Diazépam | 505 | 184 | 36% |
| Nordiazépam | 20 | 14 | 74% |
| Aspirine | 309 | 146 | 47% |
| Ibuprofène | 932 | 107 | 11% |
| Paracétamol | 2 923 | 885 | 30% |
| Gemfibrozil | 293 | 187 | 64% |
| Naproxène | 387 | 60 | 15% |
| Diclofénac | 928 | 51 | 6% |
| Terbutaline | nd | - | - |
| Salbutamol | 101 | 56 | 56% |
| Clenbutérol | 1 775 | 931 | 52% |
| Kétoprofène | 593 | 254 | 43% |

Tableau III- 9 : Concentrations dans les POCIS exposées dans la Meuse exprimées en ng.g⁻¹ de phase après 5 jours d'exposition (Moyenne de triplicats)

Si on applique à ces mesures les taux d'échantillonnage calculés en laboratoire, en utilisant les conditions expérimentales les plus proches (eau douce, 20 °C) on obtient par le calcul une estimation de la concentration de composés dans la Meuse (Tableau III- 10).

Dans tous les cas où les composés ont pu être mesurés par les deux techniques, le système d'échantillonnage donne une valeur largement surestimée de la concentration réelle dans le milieu. Ce phénomène est probablement dû à une mauvaise simulation en laboratoire des conditions environnementales naturelles. D'importants facteurs comme le débit, la teneur en particules, le développement de biofilm, ne sont pas correctement simulés en laboratoire, entraînant des biais dans le calcul des taux d'échantillonnage mesurés en laboratoire. Dans le cas présent, on peut présumer que les mesures en laboratoire ont sous-estimé le taux d'échantillonnage, notamment via l'effet du débit. Le

dispositif expérimental utilisé en laboratoire (agitation par barreau magnétique) ne permet pas de simuler un débit de plusieurs centaines de $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Il n'existe à l'heure actuelle aucune étude spécifique sur ce point permettant d'étayer cette hypothèse.

| | [C] $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ de phase | R_s ($\text{l} \cdot \text{j}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) | Volume (l) | [C] théo. ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$) | [C] mesurée ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$) | Rapport théo/mesure |
|---------------|---|---|---------------|--|---|------------------------|
| Caféine | 9982 | 0,39 | 1,9 | 5145 | 109 | 4720 % |
| Fluoxétine | nd | | 0,0 | - | <2 | - |
| Amitriptyline | 96 | 2,24 | 11,2 | 9 | <1 | - |
| Doxépine | 199 | 2,68 | 13,4 | 15 | <1 | - |
| Imipramine | 331 | 2,02 | 10,1 | 33 | <1 | - |
| Carbamaz. | 1064 | 1,99 | 10,0 | 107 | 118 | 91 % |
| Diazépam | 505 | 1,40 | 7,0 | 72 | 8 | 903 % |
| Nordiazépam | 20 | 1,38 | 6,9 | 3 | 2 | 142 % |
| Aspirine | 309 | 0,04 | 0,2 | 1546 | 20,5 | 7539 % |
| Ibuprofène | 932 | 0,48 | 2,4 | 388 | 25 | 1553 % |
| Paracétamol | 2 923 | 0,12 | 0,6 | 4871 | <2 | - |
| Gemfibrozil | 293 | 0,27 | 1,4 | 217 | <1 | - |
| Naproxène | 387 | 0,72 | 3,6 | 108 | 16,5 | 652 % |
| Diclofénac | 928 | 0,83 | 4,2 | 223 | 21,5 | 1038 % |
| Terbutaline | nd | 0,83 | 4,2 | - | <2 | - |
| Salbutamol | 101 | 0,44 | 2,2 | 46 | <2 | - |
| Clenbutérol | 175 | 0,40 | 2,0 | 87 | 3,5 | 2499 % |
| Kétoprofène | 593 | 1,43 | 7,2 | 83 | 7 | 1182 % |

Tableau III- 10 : Calcul de la concentration dans l'eau à partir de celle mesurée dans les POCIS : Concentrations exprimées en $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ dans la Meuse sur les deux mesures (Moyenne de triplicats).

VI-2-2 : Résultats de l'exposition contrôlée

Si l'on observe les résultats obtenus au niveau du tanker d'exposition ils apparaissent très différents de ceux obtenus en milieu naturel. En effet, en effectuant le même calcul que précédemment, à savoir en extrapolant de la concentration des composés dans la phase des POCIS la concentration dans l'eau et en comparant ce résultat aux mesures effectuées, on remarque (Tableau III- 11) que l'écart entre valeurs calculées et valeurs théoriques est moins prononcé. Ce résultat est tout à fait cohérent avec l'hypothèse énoncée précédemment, concernant le rôle de la turbulence et du débit sur le taux d'échantillonnage. En effet, l'influence du débit est moins importante dans ce milieu confiné, agité lentement par le système de rotation de l'arbre porteur des échantillonneurs. On se trouve donc dans une configuration plus proche de celle dans laquelle les R_s ont été déterminés.

Les résultats les plus différents correspondent aux plus petites molécules (aspirine, caféine et paracétamol) pour lesquelles les R_s de laboratoire sont

toujours autant sous-estimés. Pour ces molécules, d'autres phénomènes non encore élucidés peuvent intervenir. Le comportement de ces composés est assez particulier. Ce sont des composés rapidement dégradables (Joss *et al.*, 2005), qui présentent des taux d'échantillonnage très faibles. Il est possible d'envisager qu'il y ait eu une dégradation des composés dans la phase, ce qui a pu entraîner la sous-estimation du taux d'échantillonnage. Une étude plus approfondie du comportement de ce type de petites molécules devra être menée.

| | [C] ng.g ⁻¹ de phase | Rs (l.j ⁻¹ .g ⁻¹) | Volume (l) | [C] théo. (ng.l ⁻¹) | [C] mesurée (ng.l ⁻¹) | Rapport théo/ mesure |
|---------------|------------------------------------|---|---------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Caféine | 4860 | 0,39 | 1,7 | 2863 | 633 | 452 % |
| Amitriptyline | 1059 | 2,24 | 9,8 | 108 | 454 | 24 % |
| Doxépine | 1687 | 2,68 | 11,7 | 144 | 633 | 23 % |
| imipramine | 1628 | 2,02 | 8,8 | 185 | 508 | 36 % |
| Carbamaz. | 2773 | 1,99 | 8,7 | 318 | 736 | 43 % |
| Diazépam | 1989 | 1,40 | 6,1 | 325 | 828 | 39 % |
| Aspirine | 311 | 0,04 | 0,2 | 1775 | 130 | 1368 % |
| Ibuprofène | 1104 | 0,48 | 2,1 | 526 | 1063 | 49 % |
| Paracétamol | 1255 | 0,12 | 0,5 | 2391 | 121 | 1969 % |
| Gemfibrozil | 1075 | 0,27 | 1,2 | 910 | 760 | 120 % |
| Naproxène | 1046 | 0,72 | 3,2 | 332 | 738 | 45 % |
| Diclofénac | 880 | 0,83 | 3,6 | 242 | 987 | 25 % |
| Terbutaline | 502 | 0,83 | 3,6 | 138 | 209 | 66 % |
| Salbutamol | 758 | 0,44 | 1,9 | 394 | 254 | 155 % |
| Clenbutérol | 811 | 0,40 | 1,8 | 463 | 242 | 191 % |
| Kétoprofène | 1126 | 1,43 | 6,3 | 180 | 578 | 31 % |

Tableau III- 11 : Evaluation de la concentration dans l'eau par extrapolation de la concentration dans les POCIS : Application en milieu contrôlé.

VI-3 Expérimentation sur la Seine :

Dans la même optique que pour la Meuse, une campagne expérimentale a été organisée sur la Seine. L'avantage de l'étude de ce système est l'important recul que le laboratoire possède sur l'état de la contamination par les substances pharmaceutiques. Plusieurs années d'études dans le cadre du programme Seine Aval permettent de connaître le niveau moyen de la contamination, la variabilité du système....

La Figure III- 35 présente la mesure en ng.g-1 de phase des substances pharmaceutiques dans les POCIS déployées pendant 3 jours. Ces résultats montrent dans un premier temps la bonne reproductibilité entre les 3 échantillonneurs, avec une variabilité inférieure à 20 %.

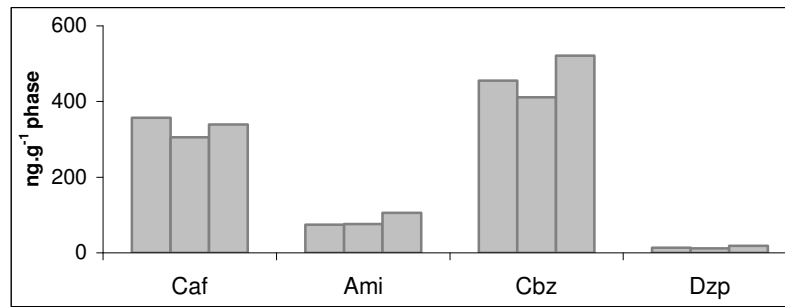


Figure III- 35 : Accumulation dans les POCIS après 3 jours d'exposition. Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2.

Si on compare les concentrations calculées à partir des extractions d'eau et celles calculées à partir des POCIS (Figure III- 36), on arrive à plusieurs conclusions.

Tout d'abord, comme pour l'étude sur la Meuse (et sur le même composé, l'amitryptiline) l'utilisation des échantillonneurs passifs permet de détecter des composés non quantifiés ni même détectés par le protocole classique par échantillonnage ponctuel.

De plus, pour les composés détectés dans les deux cas, les deux approches donnent des résultats comparables. Pour l'exposition sur 3 jours, les POCIS semblent permettre une bonne quantification : les concentrations mesurées (triplicat) pour la carbamazépine sont de $35 \pm 3 \text{ ng.l}^{-1}$ contre $41 \pm 5 \text{ ng.l}^{-1}$ pour la concentration moyenne calculées par les POCIS (triplicat).

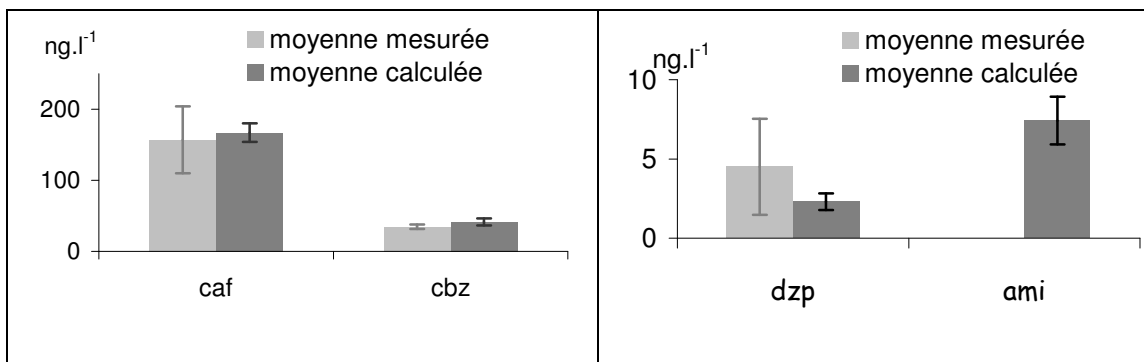


Figure III- 36 : Comparaison des concentrations mesurées et calculées après 3 jours d'exposition (n=3). Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2.

Si l'on considère les résultats obtenus sur les POCIS déployées pendant 34 jours, l'utilisation des POCIS trouve ses limites. En comparant l'accumulation des analytes entre 3 et 34 jours (Figure III- 37), on ne retrouve pas la proportionnalité attendue, correspondant à 11 fois plus de composés puisqu'on expose les POCIS 11 fois plus longtemps. Si l'on utilise les développements effectués par Alvarez (Alvarez, 1999), après 34 jours d'exposition on devrait encore se situer dans la zone d'accumulation linéaire : le pallier n'est atteint qu'après environs 56 jours. Seul le diazépam donne un résultat cohérent avec cette hypothèse (facteur d'accumulation de 9,7).

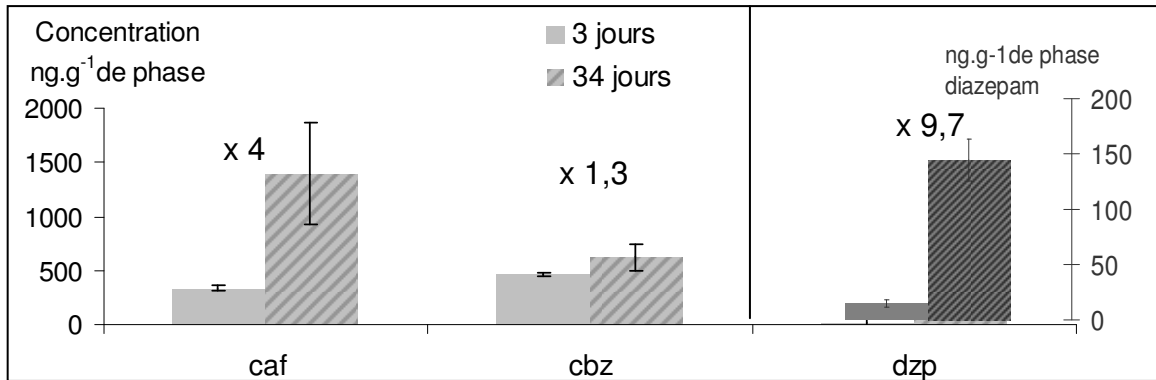


Figure III- 37 : Comparaison des concentrations dans les POCIS à 3 et 34 jours d'exposition : facteurs d'accumulation. Pour les abréviations, se référer au Tableau III- 2.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces différences. En ce qui concerne la caféine, il est connu que ce composé est très facilement dégradé dans le milieu naturel (Joss et al., 2005). On peut penser qu'en 34 jours, dans des conditions estivales, ce composé peut subir une dégradation (photodégradation, biodégradation...) dans la phase, ce qui justifierait le facteur d'accumulation de 4 (334 ng.g⁻¹ en 3 jours et 1394 ng.g⁻¹ en 34 jours) au lieu du facteur 11 attendu.

En ce qui concerne la carbamazépine, sa persistance dans le milieu et sa résistance aux traitements de station d'épuration les plus drastiques (Joss *et al.*, 2005) ne concordent pas avec l'hypothèse de la dégradation. L'explication peut être recherchée dans l'effet du dépôt de biofilm sur les membranes, qui peut limiter les capacités d'adsorption de la phase et donc diminuer le taux d'échantillonnage, d'autant plus sur ce composé, comptant parmi les moins polaires.

Dans tous les cas, on obtient une excellente reproductibilité entre les 3 POCIS exposées dans le même dispositif sur la même durée. La valeur la plus élevée est obtenue pour le diazépam (variabilité de 20 %).

Ces travaux sur les « Polar Organic Compounds Integrative Sampler » sont parmi les premiers réalisés sur les substances pharmaceutiques. D'autres études antérieures ont utilisé ces outils dans un but qualitatif global, montrant l'identification de nouveaux produits jusqu'ici jamais détectés par les techniques d'échantillonnage ponctuel, (Alvarez *et al.*, 2004a ; Alvarez *et al.*, 2005 ; Jones-Lepp *et al.*, 2004), comme l'ont montré, dans cette étude, les cas de l'amitriptyline, la doxépine, l'imipramine, le diazépam, le paracétamol et le salbutamol. Les travaux précurseurs d'Alvarez (Alvarez, 1999) ont porté sur 3 composés polaires : le diazinon et l'atrazine comme pesticides et l'éthinylœstradiol comme hormone stéroïdienne de synthèse. Il a été montré par cette présente étude que la généralisation de ces premiers résultats n'était pas envisageable.

Pour l'utilisation quantitative des POCIS, les spécificités du milieu sont plus ou moins importantes, mais nécessitent dans tous les cas des calibrations en laboratoire fastidieuses et coûteuses, avant de pouvoir réellement envisager une utilisation des POCIS pour le suivi des milieux, comme souhaité dans le cadre du projet SWIFT.

Le facteur débit / turbulence doit être clairement élucidé, car il semble, à ce stade des recherches, être un des facteurs prépondérants et réhibitoire de l'utilisation de cet outil, néanmoins prometteur. A ce stade, les POCIS peuvent d'ors et déjà être envisagées pour suivre l'évolution d'un milieu si les conditions

environnementales restent stables dans le temps, comme les eaux souterraines, les réseaux d'assainissement.... Leur facilité de déploiement, d'extraction et d'analyse en font un outil de choix pour les organismes de surveillance (Agences de l'Eau, IFREMER,...), qui devraient sous peu développer son utilisation. De plus, la capacité de ces outils à permettre la détection de composés en dessous des seuils de détection des méthodes classiques en fait un outil prometteur dans le suivi des écosystèmes aquatiques en terme de pollution.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le but de cette thèse était de mettre au point différents outils analytiques permettant d'évaluer la présence de composés pharmaceutiques dans différents milieux aquatiques, soumis à différents niveaux de pression anthropique.

La mise au point de protocoles analytiques, basés sur la technique de l'extraction en phase solide, a permis le traitement simultané d'un grand nombre d'échantillons, sur différents types de matrices allant de l'eau de captage, à l'eau de mer et aux effluents de station d'épuration. Ce procédé d'extraction initial a été optimisé pour le traitement de matrices plus complexes, avec l'ajout d'une seconde étape de purification sur cartouche, qui a permis d'étendre son application aux matrices sédimentaires et biologiques.

L'analyse par GC-MS a été développée pour l'étude des substances pharmaceutiques à des niveaux très variables de contamination, allant de quelques ng.l⁻¹ (eau de captage) à plusieurs centaines de µg.l⁻¹ (paracétamol dans la Calanque de Cortiou). L'ensemble des composés ciblés est quantifié par deux analyses successives rapides (2x 45 min), robustes et reproductibles.

Ces protocoles ont été appliqués aux suivis de différents milieux aquatiques permettant d'effectuer une première estimation du niveau global de contamination des milieux aquatiques français, comme les estuaires atlantiques (Seine, Gironde, Adour). Des études plus focalisées ont permis de documenter le comportement de ces substances émergentes de leur point d'introduction à leur dissémination dans le milieu (cas de la Jalle d'Eysines et de la Calanque de Cortiou).

L'étude ciblée sur l'estuaire de la Seine a permis de mettre en évidence les phénomènes de dégradation dans un écosystème complexe, ainsi que d'identifier qualitativement et quantitativement les principales sources d'apport. La présence de composés pharmaceutiques dans la Baie de Seine a été montrée, même si les niveaux de contamination restent très faibles. De grandes fluctuations ont été mises en évidence, à la fois dûes aux composés, aux conditions saisonnières et aux niveaux fluctuants de consommation.

Actuellement, diverses études essaient de modéliser l'introduction et le devenir de ces composés dans l'environnement. Les données environnementales produits dans cette thèse, obtenues sur différents milieux, dans différentes conditions saisonnières sont un important apport à ce type de recherche. Un modèle de l'estuaire de la Seine, développé à l'IFREMER pour l'étude des contaminants métalliques (modèle de transport hydro-sédimentaire SAM-3D, utilisable via l'interface SIMUSA) est en voie d'être appliqué aux substances pharmaceutiques. La validation de différents modèles (SIMUSA, GREAT-ER, <http://www.great-er.org>) nécessite la comparaison des « PEC » (Predicted Environmental Concentration) calculée à des « MEC » (Measured Environmental Concentration). Ces concentrations « prédites », utilisées dans toutes les définitions de normes et législations nécessitent un ajustement permanent afin d'être les plus réalistes possibles.

Le rôle de la phase particulaire est à ce jour encore négligé dans la problématique des substances pharmaceutiques. Néanmoins ce travail de thèse a mis en évidence le rôle que ce compartiment pouvait jouer, notamment dans la dissémination de la charge contaminante. Les niveaux élevés mesurés peuvent ainsi jouer un rôle dans la contamination des organismes aquatiques, exposés à la fois par la voie cutanée et respiratoire (phase dissoute) et par la voie trophique (alimentation).

Les capacités de bioaccumulation de certains composés pharmaceutiques ont été mises en évidence lors des études en laboratoire, montrant des différences

de comportement selon le type d'exposition (conditions immergées ou tidales). Les premiers essais de mesures sur des organismes du milieu naturels ont été effectués sur des espèces pélagiques, qui ne sont pas continuellement exposées à un fort niveau de contamination (poissons prélevés en Baie de Seine). Actuellement des études écotoxicologiques sont en cours pour essayer de corréliser cette accumulation à des effets physiologiques sur les moules exposées (LEMA, Université du Havre, Prof. F. Leboulanger).

Les échantillonneurs intégratifs ont été développés en laboratoire, permettant de documenter le comportement de ces outils dans différentes conditions environnementales de température et de salinité. Les taux d'échantillonnage, essentiels pour l'application quantitative des POCIS ont été obtenus pour 18 composés pharmaceutiques.

L'utilisation quantitative des POCIS a été expérimentée sur la Meuse et la Seine. En conditions environnementales, les mesures ont montré l'influence du manque de maîtrise des conditions physico-chimiques sur le calcul des concentrations, même si les résultats d'exposition à court terme ont donné des résultats satisfaisants. L'utilisation qualitative des POCIS a lui donné des résultats très prometteurs. Sur les premiers essais effectués au cours de ce travail, de nouveaux composés ont pu être mis en évidence. Cette technique d'échantillonnage peu sélective (tout composé polaire) permet d'avoir une vision non orientée des composés présents dans un écosystème aquatique. L'intérêt au cours d'une première caractérisation d'un milieu est de permettre l'appréhension de l'état du système sans a priori (liste de composés...), en utilisant un réel système de screening.

Des études supplémentaires permettraient de compléter les résultats obtenus dans le cadre de ces travaux de thèse :

1) Différentes nouvelles approches analytiques sont en cours de développement. La Micro Extraction en Phase Solide (SPME) est une technique prometteuse qui devrait permettre d'augmenter le nombre d'échantillons traités. En effet, l'absence de préparation d'échantillon diminue considérablement le temps d'analyse. Les premiers essais, utilisant la SPME couplée à un GC-MS montrent d'une part une bonne reproductibilité et ont amené à la validation de la quantification par cette technique. Mais, d'autre part, ils ont aussi montré les limites de cette technique en ce qui concerne les limites de détection (entre $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ et $4 \mu\text{g.l}^{-1}$ selon les composés). De nouveaux essais, en cours de développement et utilisant cette fois la SPME combinée à la GC-MS-MS qui apporte un gain de sélectivité et de sensibilité, pourraient apporter une solution qui rendrait cette nouvelle technique très prometteuse.

2) L'utilisation des POCIS en tant qu'outil d'échantillonnage intégratif est toujours en cours de développement. Il est à présent nécessaire d'affiner les premiers résultats obtenus en laboratoire. En effet, à l'heure actuelle, l'utilisation quantitative de cet outil n'est pas encore validée. Trop de phénomènes sont encore méconnus (effets de la salinité, dégradation dans la phase, notamment) pour permettre une utilisation robuste et fiable de cet outil. L'évolution du taux d'échantillonnage en fonction des différents paramètres doit être mieux documentée afin de pouvoir mieux prendre en compte les spécificités du milieu pour le calcul quantitatif des concentrations en substances pharmaceutiques dans le milieu naturel. Une des futures utilisations de cet outil concerne l'approche dite « TIE » pour Toxicity Identification Evaluation. Cette approche, basée sur des

techniques analytiques et des bioessais permet de parvenir à l'identification des agents responsables de la toxicité d'un milieu. Dans l'étude de l'impact des stations d'épuration, elle permet de déconvoluer les différents effets, cumulatifs, synergiques ou antagonistes des nombreux polluants présents. L'échantillonnage complet permis par les POCIS (pour les composés polaires) ou les SPMDs (composés apolaires) pourrait être un bon outil dans cette démarche globale.

3) L'exposition en laboratoire ayant montré les capacités de bioaccumulation de certains composés, l'expérience serait à renouveler à des concentrations plus proches des conditions environnementales réelles. Il serait intéressant de renouveler les mesures dans les organismes aquatiques du milieu naturel en privilégiant un échantillonnage sur des zones plus impactées, comme la Calanque de Cortiou ou la Jalles d'Eysines, sur des espèces résidentes (moules ou dreissènes) ou en utilisant les techniques de « caging ».

4) Cette étude s'est focalisée sur certains composés pharmaceutiques, parmi les plus couramment utilisés. Certains composés pharmaceutiques d'usage moins répandus, comme la fluoxétine, le bromazépam, l'alprazolam et la théophylline ont été envisagés. Néanmoins, des difficultés analytiques (manque de sensibilité de l'analyse GC-MS) ont fait qu'ils n'ont pas été retenus pour les diverses études. Des développements par GC-MS-MS sont actuellement en cours, permettant d'augmenter le nombre de composés étudiés. Il est aussi envisagé de développer l'usage de la LC-MS-MS pour le dosage de nouvelles classes thérapeutiques (antibiotiques, bêta-bloquants, anti-cancéreux...).

5) De plus, les produits de dégradation de ces substances, qu'ils soient créés dans les stations d'épuration des eaux usées, lors du traitement des eaux de boisson ou dans l'environnement, peuvent eux aussi présenter des risques environnementaux non encore pris en compte. Il serait intéressant de documenter l'impact des différents traitements sur leur création et leur présence dans les écosystèmes aquatiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aertgeerts, A. et Angelakis, A. (2003). State of the Art Report: Health Risks in Aquifer Recharge Using Reclaimed Water. Copenhagen. WHO Regional Office for Europe. Series Report No. EUR/03/5041122
<http://www.euro.who.int/document/E78995.pdf>
- Ahnoff, M. (1984). Determination of felodipine in plasma by capillary gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* 2(3-4), 519-526.
- Alpendurada, M.F. (2000). SPME : a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A* 889, 3-14.
- Alvarez, D. (1999). Development of an integrative sampling device for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. PhD thesis. Missouri-Columbia. 160p
- Alvarez, D., Cranor, W.L., Huckins, J., Clark, R.C. et Perkins, S.D. (2004a). Assessment of organic contaminant in integrative samplers from Chesapeake Bay tributaries. *USGS Final Report*, 43 p.
- Alvarez, D., Petty, J.D., Huckins, J.N., Jones-Lepp, T.L., Getting, D.T., Goddard, J.P. et Manahan, S.E. (2004b). Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(7), 1640-1648.
- Alvarez, D., Stackelberg, P.E., Petty, J.D., Huckins, J.N., Furlong, E.T., Zaugg, S.D. et Meyer, M.T. (2005). Comparison of a novel passive sampler to standard water-column sampling for organic contaminants associated with wastewater effluents entering a New Jersey stream. *Chemosphere* 61(5), 610-622.
- Alzieu, C., Sanjuan, J., Michel, P., Borel, M. et Dreno, J.P. (1989). Monitoring and assesement of butyltins in Atlantic coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 20(1), 22-26.
- Alzieu, C. (1998). Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean & Coastal Management* 40(1), 23-36.
- Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G. et Pollio, A. (2002). Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Research* 36(11), 2869-2877.
- Andreozzi, R., Raffaele, M. et Nicklas, P. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50(10), 1319-1330.
- Bedner, M. et MacCrehan, W.A. (2006). Transformation of Acetaminophen by Chlorination Produces the Toxicants 1,4-Benzoquinone and N-Acetyl-p-benzoquinone Imine. *Environmental Science and Technology* 40(2), 516-522.
- Bennett, E.R. et Metcalfe, C.D. (1996). Semipermeable membrane devices (SPMDs) for monitoring organic contaminants in the Otonabee River, ontario. *Chemosphere* 33(3), 363-375.
- Binet, S., Pfohl-Leszkowicz, A., Brandt, H., Lafontaine, M. et Castegnaro, M. (2002). Bitumen fumes: review of work on the potential risk to workers and the

- present knowledge on its origin. *The Science of The Total Environment* 300(1-3), 37-49.
- Bissuel, Y. et Marie-Cardine, M. (1991). L'utilisation de la carbamazépine en psychiatrie. *Médecine et Hygiène* 49(1891), 1735-1736.
- Blumenthal, U.J., Mara, D.D., Peasey, A., Ruiz-Palacios, G. et Stott, R. (2001). Reducing the health risks of using wastewater in agriculture. *Urban Agriculture Magazine* 3, 26-29.
- Booij, K., Smedes, F. et Van Weerlee, E. (2002). Spiking of performance reference compounds in low density polyéthylène and silicon passive water samplers. *Chemosphere* 46, 1157-1161.
- Booij, K., Hofmans, H., Fischer, C. et Van Weerlee, E. (2003). Temperature dependant uptake rates of non polar organic compounds by semi-permeable membranes devices and low density polyethylene membranes. *Environmental Science and Technology* 37, 361-366.
- Boulanger, G. (2005). Elaboration d'une base de données destinée à sélectionner les résidus de médicaments d'intérêt pour la sécurité sanitaire des eaux de boisson : étude de faisabilité. Mastère «Evaluation et gestion du risque sanitaire lié à l'environnement». Université Paris V – Université Paris XI – Ecole Nationale de Santé Publique. 85 p.
- Bound, J.P. et Voulvoulis, N. (2006). Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. *Water Research* 40(15), 2885-2892.
- Boyd, G.R., Reemtsma, H., Grimm, D.A. et Mitra, S. (2003). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *The Science of The Total Environment* 311(1-3), 135-149.
- Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Hanson, M.L., Sanderson, H., Lam, M.W., Young, C., Mabury, S.A., Sibley, P.K. et Solomon, K.R. (2004). Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquatic Toxicology* 70(1), 23-40.
- Brodersen, J., Juul, J. et Jacobsen, H. (2002). Review of selected waste streams: Sewage sludge, construction and demolition waste, waste oils, waste from coal-fired power plants and biodegradable municipal waste. Copenhagen. Technical report n° 69. European Environment Agency. http://reports.eea.europa.eu/technical_report_2001_69/en/tech_rep_69.pdf
- Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M. et La Point, T.W. (2003a). Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicology Letters* 142(3), 169-183.
- Brooks, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J.J., Glidewell, E.A., Foran, C.M., Slattery, M., La Point, T.W. et Huggett, D.B. (2003b). Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere* 52(1), 135-142.
- Brooks, B.W., Kevin Chambliss, C., Stanley, J.K., Ramirez, A., Banks, K.E., Johnson, R.D. et Lewis, R.J. (2005). Determination of select antidepressant in fish

from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(2), 464-469.

Brossa, L., Marce, R.M., Borrull, F. et Pocurull, E. (2005). Occurrence of twenty-six endocrine disrupting compounds in environmental water sample from Catalonia, Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(2), 261-267.

Budzinski, H., Letellier, M., Thompson, S., LeMenach, K. et Garrigues, P. (2000). Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 367(2), 165-171.

Budzinski, H., Devier, M.H., Labadie, P. et Togola, A. (2006). Analysis of hormonal steroids in fish plasma and bile by coupling solid-phase extraction to GC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386(5), 1429-1439.

Burnison, B.K., Hartmann, A., Lister, A., Servos, M.R., Ternes, T. et Van Der Kraak, G. (2003). A toxicity identification evaluation approach to studying estrogenic substances in Hog manure and agricultural runoff. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(10), 2243-2250.

Buser, H.-R. et Müller, M.D. (1998). Occurrence of the pharmaceutical drug clofibric acid and the herbicide Mecoprop in various Swiss lakes and the North Sea. *Environmental Science and Technology* 32, 188-192.

Buser, H.R., Poiger, T. et Müller, M.D. (1998). Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters : rapid photodegradation in a Lake. *Environmental Science and Technology* 32(22), 3449-3456.

Buser, H.R., Poiger, T. et Müller, M.D. (1999). Occurrence and environmental behaviour of chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environmental Science and Technology* 33, 2529-2535.

Bussi, M.: Inégalités de santé en France. *Dans Festival International de Géographie : Géographie de la santé.* (2000). http://fig-st-die.education.fr/actes/actes_2000/bussi/article.htm

Cahill, J.D., Furlong, E.T., Burkhardt, M.R., Kolpin, D. et Anderson, L.G. (2004). Determination of pharmaceutical compounds in surface and ground water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1041(1-2), 171-180.

Cajaraville, M., P., Canciolbon, Ibabe, A. et Orbea, A. (2003). Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Microscopy Research and Technique* 61(2), 191-202.

Carpinteiro, J., Quintana, J.B., Martinez, E., Rodriguez, I., Carro, A.M., Lorenzo, R.A. et Cela, R. (2004a). Application of strategic sample composition to the screening of anti-inflammatory drugs in water samples using solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta* 524(1-2), 63-71.

Carpinteiro, J., Quintana, J.B., Rodriguez, I., Carro, A.M., Lorenzo, R.A. et Cela, R. (2004b). Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation

for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1056(1-2), 179-185.

Castiglioni, S., Fanelli, R., Calamari, D., Bagnati, R. et Zuccato, E. (2004). Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environment by comparing predicted and measured concentrations in River Po, Italy. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39(1), 25-32.

Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R. et Zuccato, E. (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1092(2), 206-215.

Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D. et Zuccato, E. (2006). Removal of Pharmaceuticals in Sewage Treatment Plants in Italy. *Environmental Science and Technology* 40(1), 357-363.

Christensen, F.M. (1998). Pharmaceuticals in the Environment : a Human Risk? . *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 28(3), 212-221.

Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59(3), 309-315.

Cleuvers, M. (2005). Initial risk assessment for three [beta]-blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* 59(2), 199-205.

Corpet, D.E. (2000). Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques. *Revue Médicale Vétérinaire* 151(2), 99-104.

Damasceno, L., Ventura, R., Ortuno, J. et Segura, J. (2000). Derivatization procedures for the detection of β 2-agonists by gas chromatography-mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry* 35, 1285-1294.

Damasceno, L., Ventura, R., Cardoso, J., et Segura, J. (2002). Diagnostic evidence for the presence of B-agonists using two consecutive derivatization procedures and gas chromatography-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography B* 780, 61-71.

Daughton, C.G. et Jones-Lepp, T.L. (ed) (2001): Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues. *Symposium Series 791*, Daughton and Jones-Lepp ACS/Oxford University Press, Washington, D.C.

Debernard, S., Rossignol, F. et Couillaud, F. (1994). The HMG-CoA Reductase Inhibitor Fluvastatin Inhibits Insect Juvenile Hormone Biosynthesis. *General and Comparative Endocrinology* 95(1), 92-98.

Deng, A., Himmelsbach, M., Zhu, Q.Z., Frey, S., Sengl, M., Buchberger, W., Niessner, R. et Knopp, D. (2003). Residue Analysis of the Pharmaceutical Diclofenac in Different Water Types Using ELISA and GC-MS. *Environmental Science and Technology* 37(15), 3422-3429.

- Díaz-Cruz, M.S., López de Alda, M.J., López, R. et Barceló, D. (2003). Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry* 38(9), 917-923.
- Dietrich, D.R. et Prietz, A. (1999). Fish embryotoxicity and teratogenicity of pharmaceuticals, detergents and pesticides regularly detected in sewage treatment plant effluents and surface waters. *Toxicologist* 48(1-S), 151.
- Dietrich, D.R., Webb, S.F. et Petry, T. (2002). Hot spot pollutants : pharmaceuticals in the environment. *Toxicology Letters* 131, 1-3.
- Drewes, J.E., Heberer, T. et Reddersen, K. (2002). Fate of pharmaceuticals during indirect potable reuse. *Water Science and Technology* 46(3), 73-80.
- Dunn, P., Galvin, S. et Hettenbach K. (2004). The development of an environmentally benign synthesis of sildenafil citrate (Viagra™) and its assessment by green chemistry metrics. *Green Chemistry* 6, 43-48.
- Ecosse, D. (2001). Techniques alternatives en vue de subvenir à la pénurie d'eau dans le monde. Mémoire D.E.S.S. «Qualité et Gestion de l'Eau». Faculté Sciences, Amiens. 62 p.
- Emmanuel, E., Perrodin, Y., Keck, G., Blanchard, J.-M. et Vermande, P. (2005). Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *Journal of Hazardous Materials* 117(1), 1-11.
- Eskilsson, C.S. et Erland, B. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* 902(1), 227-250.
- Fang, H., Liu, M. et Zeng, Z. (2006). Solid-phase microextraction coupled with capillary electrophoresis to determine ephedrine derivatives in water and urine using a sol-gel derived butyl methacrylate/silicone fiber. *Talanta* 68(3), 979-986.
- Farré, M., Ferrer, I., Ginebreda, A., Figueras, M., Olivella, L., Tirapu, L., Vilanova, M. et Damia, B. (2001). Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography A* 938, 187-197.
- Ferrari, B., Paxeus, N., Giudice, R.L., Pollio A. et Garric J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55(3), 359-370.
- Flaherty, C.M. et Dodson, S.I. (2005). Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* 61(2), 200-207.
- Fong, P. (1998). Zebra Mussel Spawning Is Induced in Low Concentrations of Putative Serotonin Reuptake Inhibitors. *Biological Bulletin* 194(2), 143-149.
- Fong, P., Huminski, P.T. et D'Urso, L.M. (1998). Induction and potentiation of parturition in fingernail clams (*Sphaerium striatum*) by selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). *Journal of Experimental Zoology* 280 (3), 260-264.

- Foran, C.M., Weston, J., Slattery, M., Brooks, B.W. et Duane, B.H. (2004). Reproductive assessment of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Environmental Science and Technology* 46(4), 511-517.
- Golet, E.M., Alder, A.C., Hartmann, A., Ternes T.A. et Giger W. (2001). Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by SPE and LC with fluorescence detection. *Analytical chemistry* 75(15), 3632-3638.
- Golet, E.M., Alder, A.C. et Giger, W. (2002a). Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environmental Science and Technology* 36(17), 3645-3651.
- Golet, E.M., Strehler, A., Alder, A.C. et Giger W. (2002b). Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge treated soil using ASE followed by SPE. *Analytical chemistry* 74(21), 5455-5462.
- Gomes, R.L., Deacon, H.E., Lai, K.M., Birkett, J.W., Scrimshaw, M.D. et Lester, J.N. (2004). An assessment of the bioaccumulation of estrone in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 105-108.
- Gräslund, S. et Bengtsson (2001). Chemical and biological products used in south-east Asian shrimp farming, and their potential impact on the environment- a review. *The Science of the Total Environment* 280, 93-131.
- Gros, M., Petrovic, M. et Barcelo, D. (2006). Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70(4), 678-690.
- Grzegorz, N.-J. et Guido, P. (2006). Toxicity of Selected Pharmaceuticals to the Anostracan Crustacean *Thamnocephalus platyurus* - Comparison of Sublethal and Lethal Effect Levels with the 1h Rapidtookit and the 24h Thamnotokit Microbiotests. *Environmental Science and Pollution Research* 13(1), 22-27.
- Guan, F., Seno, H., Ishii, A., Watanabe, K., Kumazawa, T., Hattori, H. et Osamu, X. (1999). Solid-Phase Microextraction and GC-ECD of Benzophenones for Detection of Benzodiazepines in Urine. *Journal of Analytical Toxicology* 23(1), 54-61.
- Hall, B.J. et Brodbelt, J.S. (1997). Determination of barbiturates by SPME and ion trap GC-MS. *Journal of Chromatography A* 777, 275-282.
- Hallare, A.V., Kohler, H.-R. et Triebkorn, R. (2004). Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere* 56(7), 659-666.
- Halling-Sorensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhoff, H.C. et Jorgensen, S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment : a review. *Chemosphere* 36, 357-393.
- Hari, A.C., Paruchuri, R.A., Sabatini, D.A. et Kibbey, T.C.G. (2005). Effects of pH and Cationic and Nonionic Surfactants on the Adsorption of Pharmaceuticals to a Natural Aquifer Material. *Environmental Science and Technology* 39(8), 2592-2598.

- Harnagea-Theophilus, E., Gadd, S.L., Knight-Trent, A.H., DeGeorge, G.L. et Miller, M.R. (1999). Acetaminophen-induced proliferation of breast cancer cells involves estrogen receptors. *Toxicology Applied Pharmacology* 155(3), 273–279.
- Hartmann, A., Alder, A.C., Koller, T. et Widmer, R.M. (1998). Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of *umuC* genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(3), 377-382.
- He, Y. et Lee, H.K. (1997). Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe. *Analytical Chemistry* 69(22), 4634-4640.
- Heberer, T., Dünnebier, U., Reilich, C. et Stan, H.-J. (1997). Detection of drugs and drug metabolites in ground water samples of a drinking water treatment plant. *Fresenius Environmental Bulletin* 6, 438–443.
- Heberer, T. (2002a). Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment : a review of the recent research data. *Toxicology Letters* 131, 5-17.
- Heberer, T. (2002b). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology* 266, 175-189.
- Heberer, T. et Feldmann, D. (2005). Contribution of effluents from hospitals and private households to the total loads of diclofenac and carbamazepine in municipal sewage effluents--modeling versus measurements. *Journal of Hazardous Materials* 122(3), 211-218.
- Hektoen, H., Berge, J.A., Hormazabal, V. et Yndestad M. (1995). Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133, 175-184.
- Henschel, K.P., Wenzel, A., Diedrich M. et Fliedner A. (1997). Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 25, 220-225.
- Hernando, M.D., Petrovic, M., Fernandez-Alba, A.R. et Barcelo, D. (2004). Analysis by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for [beta]-blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples. *Journal of Chromatography A* 1046(1-2), 133-140.
- Hirai, T., Matsumoto, S. et Kishi, I. (1997). Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 692(2), 375-388.
- Hirsch, R., Ternes, T.A., Heberer, K. et Kratz, KL (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total environment* 225, 109-118.
- Hoivik, D.J., Qualls, C.W., Jr., Mirabile, R.C., Cariello, N.F., Kimbrough, C.L., Colton, H.M., Anderson, S.P., Santostefano, M.J., Morgan, R.J.O., Dahl, R.R., Brown, A.R., Zhao, Z., Mudd, P.N., Jr., Oliver, W.B., Jr., Brown, H.R. et Miller, R.T. (2004). Fibrates induce hepatic peroxisome and mitochondrial proliferation without overt evidence of cellular proliferation and oxidative stress in cynomolgus monkeys. *Carcinogenesis* 25(9), 1757-1769.

- Huber, M.M., Canonica, S., Park, G.Y. et von Gunten, U. (2003). Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation and Advanced Oxidation Processes. *Environmental Science and Technology* 37(5), 1016-1024.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtiera, L. et Rubino, M. (2005). Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Science of The Total Environment* 348(1-3), 93-101.
- Janex, M.L., Bruchet, A., Lévi, Y. et Ternes, T. (2002). Composés pharmaceutiques : présence dans l'environnement et devenir en traitement d'eau potable. 5^{èmes} Journées Information Eaux, Poitiers, France. Communication orale, 18-20 sept. 2002.
- Johnston, J.J., Savarie, P.J., Primus, T.M., Eisemann, J.D., Hurley, J.C. et Kohler, D.J. (2002). Risk assessment of an acetaminophen baiting program for chemical control of brown tree snakes on Guam: evaluation of baits, snake residues, and potential primary and secondary hazards. *Environmental Science and Technology* 36(17), 3827-3833.
- Jones-Lepp, T.L., Alvarez, D., Petty, J.D. et Huckins, J. (2004). Polar organic chemical integrative sampling and liquid chromatography -electrospray/ ion trap mass spectrometry for assessing selected prescription and illicit drugs in treated sewage effluents. *Environmental Science and Technology* 47, 427-739.
- Jones, O.A.H., Voulvoulis, N. et Lester J.N. (2004). Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment. *Critical Reviews in Toxicology* 34(4), 335-350.
- Joss, A., Keller, E., Alder, A.C., Gobel, A., McArdell, C.S., Ternes T. et Siegrist H. (2005). Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research* 39(14), 3139-3152.
- Juergen, P. (2000). Sorption of hydrophobic organic compounds on nonpolar SPME fibers and dissolved humic organic matter - Part III: Application of the solubility parameter concept to interpret sorption on solid phase microextraction (SPME) fiber coatings. *Journal of Microcolumn Separations* 12(12), 603-612.
- Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Nakamura, Y. et Ishimitsu, S. (2000). Multiresidue Analysis of Pesticides in Fresh Fruits and Vegetables by Supercritical Fluid Extraction and HPLC. *Journal of Health Science* 46(5), 336-342.
- Karakaya, A., Yucesoy, B., Turhan, A., Erdem, O., Burgaz, S. et Karakaya, A.E. (1999). Investigation of some immunological functions in a group of asphalt workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology* 135(1), 43-47.
- Khan, S.J. et Ongerth, J.E. (2002). Estimation of pharmaceuticals residues in primary and secondary sewage sludge based on quantities of use and fugacity modelling. *Water Science and Technology* 46(3), 105-113.
- Khan, S.J. et Ongerth, J.E. (2004). Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations. *Chemosphere* 54(3), 355-367.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. et Buxton, H.T. (2002). Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic

- Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36(6), 1202-1211.
- Kolpin, D.W., Skopec, M., Meyer, M.T., Furlong, E.T. et Zaugg, S.D. (2004). Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Science of The Total Environment* 328(1-3), 119-130.
- Koutsouba, V., Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D. et Hiskia, A. (2003). Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* 51(2), 69-75.
- Kovalczuk, T., Jech, M., Poustka, J. et Hajslova, J. (2006). Ultra-Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS): A novel challenge in multiresidue pesticides analysis in food. *Analytica Chimica Acta* 577(1), 8-17.
- Kreuzinger, N., Clara, M., Strenn, B. et Vogel, B. (2004). Investigation on the behaviour of selected pharmaceuticals in the groundwater after infiltration of treated wastewater. *Water Science and Technology* 50(2), 221-228.
- Kumazawa, L., Sato, T. et Suzuki, O. (1997). Detection of tricyclic antidepressants in whole blood by headspace solid phase microextraction and capillary gas chromatography. *Journal of Chromatographic science* 35(7), 302-308.
- Kumazawa, T., Hiroshi, S., Watanabe-Suzuki, K., Hattori, H., Ishii, A., Sato, K. et Suzuki, O. (2000). Determination of phenothiazines in human body fluids by solid-phase microextraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 35(9), 1091-1099.
- Kümmerer, K., Steger-Hartmann T. et Meyer M. (1997). Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research* 31(11), 2705-2710.
- Kümmerer, K.(ed) (2001a): Introduction : pharmaceuticals in the environment. *Pharmaceuticals in the environment : source, fate, effects and risk*, Springer-Verlag, Germany. 528 p.
- Kümmerer, K. (2001b). Drugs in the environment : emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospital in relation to other sources - a review. *Chemosphere* 45, 957-969.
- Labadie, P. et Budzinski, H. (2005). Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381(6), 1199-1205.
- Lai, K.M., Scrimshaw, M.D. et Lester, J.N. (2002). Biotransformation and bioaccumulation of steroids estrogens by *Chlorella vulgaris*. *Applied Environmental Microbiology*. 68, 859-864.
- Lam, M.W., Tantuco, K. et Mabury, S.A. (2003). PhotoFate: A New Approach in Accounting for the Contribution of Indirect Photolysis of Pesticides and Pharmaceuticals in Surface Waters. *Environmental Science and Technology* 37(5), 899-907.

- Lam, M.W., Young, C.J., Brain, R.A., Johnson, D.J., Hanson, M.A., Wilson, C.J., Richards, S.M., Solomon, K.R. et Mabury, S.A. (2004). Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(6), 1431-1440.
- Lam, M.W. et Mabury, S.A. (2005). Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 67(2), 177-188.
- Lam, M.W., Young, C.J. et Mabury, S.A. (2005). Aqueous Photochemical Reaction Kinetics and Transformations of Fluoxetine. *Environmental Science and Technology* 39(2), 513-522.
- Lamas, P.J., Salgado-Petinal, C., Garcia-Jares, C., Llompert, M., Cela, R. et Gomez, M. (2004). Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of selective serotonin reuptake inhibitors in environmental water. *Journal of Chromatography A* 1046(1-2), 241-247.
- Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.E. et Förlin, L. (1999). Ethinyloestradiol - An undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology* 45, 91-97.
- Laville, N., Ait-Aissa, S., Gomez, E., Casellas, C. et Porcher J. M. (2004). Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196(1-2), 41-55.
- Letellier, M., Budzinski, H., Charrier, L., Capes, S. et Dorthe, A.M. (1999). Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 364(3), 228-237.
- Levasseur, F.A., Caillé, G., Elie, R., Vézina, M. et Larivière, L. (1985). Electron-capture gas chromatographic determination of loprozalam in plasma and a pharmacokinetic application. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 6(4), 381-387.
- Lin, A.Y.-C. et Reinhard, M. (2005). Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(6), 1303-1309.
- Löffler, D. et Ternes, T.A. (2003). Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using LC-MSMS. *Journal of Chromatography A* 1021, 133-144.
- Löffler, D., Rombke, J., Meller, M. et Ternes, T.A. (2005). Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/Sediment Systems. *Environmental Science and Technology* 39(14), 5209-5218.
- Loraine, G.A. et Pettigrove, M.E. (2006). Seasonal Variations in Concentrations of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water and Reclaimed Wastewater in Southern California. *Environmental Science and Technology* 40(3) 687-695.
- Ma, M., Kang, S., Zhao, Q., Chen B. et Yao S. (2006). Liquid-phase microextraction combined with HPLC for the determination of local anaesthetics in human urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* 40(1), 128-135.

- Mallet, C.R., Lu, Z., Mazzeo, J. et Neue U. (2002). Analysis of a basic drug by on-line solid phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a mixed mode sorbent. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 16, 805-813.
- Masuda, Y. (2005). Behavior and toxic effects of PCBs and PCDFs in Yusho patients for 35 years. *Journal of Dermatological Science* 1(1), S11-S20.
- McDowell, D.C., Huber, M.M., Wagner, M., vonGunten, U. et Ternes, T.A. (2005). Ozonation of Carbamazepine in Drinking Water: Identification and Kinetic Study of Major Oxidation Products. *Environmental Science and Technology* 39(20), 8014-8022.
- Metcalf, C., Miao, X.S., Koenig, B.G. et Struger, J. (2003). Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower great lakes, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(12), 2881-2889.
- Mezcua, M., Aguera, A., Lliberia, J.L., Cortes, M.A., Bago, B. et Fernandez-Alba, A.R. (2006). Application of ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of priority pesticides in groundwater. *Journal of Chromatography A* 1109(2), 222-227.
- Miao, X.S., Yang, J.J. et Metcalfe, C.D. (2005). Carbamazepine and Its Metabolites in Wastewater and in Biosolids in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environmental Science and Technology* 39(19), 7469-7475.
- Mill, T. (1999). Predicting photoreaction rate in surface waters. *Chemosphere* 38(6), 1379-1390.
- Mimeault, C., Woodhouse, A.J., Miao, X.-S., Metcalfe, C.D., Moon, T.W. et Trudeau, V.L. (2005). The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology* 73(1), 44-54.
- Mitani, K., Fujioka, M. et Kataoka, H. (2005). Fully automated analysis of estrogens in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1081(2), 218-224.
- Möder, M., Popp, P., Eisert, R. et Pawliszyn, J. (1999). Determination of polar pesticides in soil by solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 363(7), 680-685.
- Moore, A. et Waring, C. (2001). The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquatic toxicology* 52, 1-12.
- Neal, C., Fox, K., Harrow, M. et Neal M. (1998). Boron in the major UK rivers entering the North Sea. *The Science of the Total environment* 210, 41-52.
- Nentwig, G., Oetken, M. et Oehlmann, J. (2004) Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates- the example of carbamazepine and clofibrac acid. *Dans Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risks*. Kümmerer ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 528 p.

- Nickerson, J.G., Dugan, S.G., Drouin, G. et Moon, T.W. (2001). A putative bêta2-adrenoceptor from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular characterization and pharmacology. *European Journal of Biochemistry* 268(24), 6465-6472.
- Niessen, W.M.A. (1998). Analysis of antibiotics by liquid chromatography- mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 812, 53-75.
- Nilsson, T., Montanarella, L., Baglio, D., Tilio, R., Bidoglio, G. et Facchetti, S. (1998). Analysis of volatile organic compounds in environmental water samples and soil gas by solid-phase microextraction. *Environmental Science and Technology* 69(3), 217-226.
- Nunes, B., Carvalho, F. et Guilhermino, L. (2006). Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere* 62, 581-594.
- Öllers, S., Singer, H., Fässler, P. et Müller, S. (2001). Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *Journal of Chromatography A* 911, 225-234.
- Packer, J.L., Werner, J.J., Latch, D.E., McNeill, K. et Arnold, W.A. (2003). Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibrac acid, and ibuprofen. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 65(4), 342-351.
- Pascoe, D., Karntanut, W. et Muller, C.T. (2003). Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere* 51(6), 521-528.
- Pedersen, J.A., Yeager, M.A. et Suffet, I.H. (2003). Xenobiotic Organic Compounds in Runoff from Fields Irrigated with Treated Wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(5), 1360-1372.
- Pedersen, J.A., Soliman, M. et Suffet, I.H. (2005). Human Pharmaceuticals, Hormones, and Personal Care Product Ingredients in Runoff from Agricultural Fields Irrigated with Treated Wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(5), 1625-1632.
- Pedro Landín, M.L.M.L.R.C. (2001). Determination of tri- through heptachlorobiphenyls in water samples by SPME-GC-MS-MS: Comparison of PDMS and PDMS-DVB coatings. *Journal of Microcolumn Separations* 13(7), 275-284.
- Petty, J.D., Huckins, J.N., Martin, D.B. et Adornato, T.G. (1995). Use of semipermeable membrane devices (SPMDs) to determine bioavailable organochlorine pesticide residues in streams receiving irrigation drainwater. *Chemosphere* 30(10), 1891-1903.
- Petty, J.D., Huckins, J.N., Alvarez, D., Brumbaugh, W.G., Cranor W.L., Gale R.W., Rastall A.C., Jones-Lepp T.L., Leiker T.J., Rostad C.E. et Furlong E.T. (2004). A holistic passive integrative sampling approach for assessing the presence and potential impact of waterborne environmental contaminants. *Chemosphere* 54, 695-705.

- Pfeifer, T., Tuerk, J., Bester, K. et Spiteller, M. (2002). Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 16, 663-669.
- Pinkston, K.E. et Sedlak, D.L. (2004). Transformation of Aromatic Ether- and Amine-Containing Pharmaceuticals during Chlorine Disinfection. *Environmental Science and Technology* 38(14), 4019-4025.
- Poiger, T., Buser, H.R. et Müller, M.D. (2001). Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: pathway, field measurements, and mathematical modeling. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(2), 256-263.
- Potter, D. et Pawliszyn, J. (1992). Detection of substituted benzenes in water at the pg/ml level using solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 625(2), 247-255.
- Prest, H.F., Huckins, J.N., Petty, J.D., Herve, S., Paasivirta, J. et Heinonen, P. (1995a). A survey of recent results in passive sampling of water and air by semipermeable membrane devices. *Marine Pollution Bulletin* 31(4-12), 306-312.
- Prest, H.F. et Jacobson, L.A. (1995). Passive sampling of water and coastal air via semipermeable membrane devices. *Chemosphere* 30(7), 1351-1361.
- Prest, H.F., Richardson B.J., Jacobson L.A., Vedder J. et Martin M. (1995b). Monitoring organochlorines with semipermeable membrane devices (SPMDs) and Mussels (*Mytilus edulis*) in Corio Bay, Victoria, Australia. *Marine Pollution Bulletin* 30(8), 543-554.
- Prunet, P., Gonnard, J.-F. et Paboeuf, G. (1993). GABA-ergic control of prolactin release in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitaries *in vitro*. *Fish Physiology and Biochemistry* 11(1), 131-137.
- Qu, B., Li, Q.-T., Wong, K.P., Tan, T.M.C. et Halliwell B. (2001). Mechanism of clofibrate hepatotoxicity: mitochondrial damage and oxidative stress in hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 31(5), 659-669.
- Quintana, J.B., Rodil, R. et Reemtsma, T. (2004). Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid-chromatography-electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects. *Journal of Chromatography A* 1061(1), 19-26.
- Quintana, J.B., Weiss, S. et Reemtsma, T. (2005). Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research* 39(12), 2654-2664.
- Rabiet, M., Brissaud, F., Seidel, J.-L., Pistre, S. et Elbaz-Poulichet, F. (2005). Deciphering the presence of wastewater in a medium-sized Mediterranean catchment using a multitracer approach. *Applied Geochemistry* 20(8), 1587-1596.
- Reddersen, K., Heberer, T. et Dunnbier, U. (2002). Identification and significance of phenazone drugs and their metabolites in ground- and drinking water. *Chemosphere* 49(6), 539-544.

- Renner, R. (2002). Drug mixtures prove harmful. *Environmental Science and Technology* 37, 1713-1719.
- Roadcap, B.A., Musson, D.G., Rogers, J.D. et Zhao, J.J. (2003). Sensitive method for the quantitative determination of gemfibrozil in dog plasma by liquid-liquid cartridge extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 791(1-2), 161-170.
- Rodriguez (2004). Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for the analysis of anti-inflammatory drugs in water samples. *Journal of Chromatography A* 1024, 1-8.
- Ross, G. (2004). The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59(3), 275-291.
- Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.-J. et Blankenhorn, I. (2001). Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography A* 938, 199-210.
- Sacher, F., Raue, B. et Brauch, H.-J. (2005). Analysis of iodinated X-ray contrast agents in water samples by ion chromatography and inductively-coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1085(1), 117-123.
- Sakamoto, M.K., Mima, S., Kihara, T., Matsuo, T., Yasuda, Y. et Tanimura, T. (1993). Developmental toxicity of caffeine in the larvae of *Xenopus laevis*. *Teratology* 47, 189-201.
- Salgado-Petinal, C., Lamas, J.P., Garcia-Jares, C., Llompart, M. et Cela, R. (2005). Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382(6), 1351-1359.
- Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E. et Callejon, M. (2005). Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Analytica Chimica Acta* 550(1-2), 116-122.
- Sausen, P.J., Teets, V.D., Voss, K.S., Miller, R.T. et Cattley, R.C. (1995). Gemfibrozil-induced peroxisome proliferation and hepatomegaly in male F344 rats. *Cancer Letters* 97, 263-268.
- Schulman, L.J., Sargent, E.V., Naumann, B.D., Faria, E.C., Dolan, D.G. et Wargo, J.P. (2002). A Human Health Risk Assessment of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment. *Human and Ecological Risk Assessment* 8(4), 657-680.
- Schwabb, B.W., Hayes, E.P., Fiori, J.M., Mastrocco, F.J., Roden, M., Cragin D., D., M.R., D'Aco V. J. et Anderson P. D. (2005). Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 42(3), 296-312.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H. et Negele, R.D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 68(2), 141-150.

- Sedlak, D.L., Gray, J.L. et Pinkston, K.E. (2000). Understanding microcontaminants in recycled water. *Environmental Science and Technology* 34, 508A-515A.
- Sedlak, D.L. et Pinkston, K.E. (2001). Factors affecting the concentrations of pharmaceuticals released to the aquatic environment. *Water Research Update* 120, 56-64.
- Shao, Z.J. (2001). Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Advanced Drug Delivery Reviews* 50, 229-243.
- Shou, W.Z., Jiang, X. et Naidong, W. (2004). Development and validation of a high-sensitivity liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method with chemical derivatization for the determination of ethinyl estradiol in human plasma. *Biomedical Chromatography* 18(7), 414-421.
- Stackelberg, P.E., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Henderson, A.K. et Reissman, D.B. (2004). Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of The Total Environment* 329(1-3), 99-113.
- Stamatelatou, K., Frouda, C., Fountoulakis, M.S., Drillia, P., Kornaros M. et Lyberatos G. (2003). Pharmaceuticals and health care products in wastewater effluent : the example of carbamazepine. *Water Science and Technology : Water Supply* 3(4), 131-137.
- Stashenko, E.E. et Martinez, J.R. (2004). Derivatization and solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry* 23(8), 553-561.
- Steger-Hartmann, T., Kümmerer, K. et Schecker, J. (1996). Trace analysis of the antineoplasics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two-step solid phase extraction and GC-MS. *Journal of Chromatography A* 726, 179-184.
- Stolker, A.A.M., Niesing, W., Hogendoorn, E., Versteegh, J.M., Fuchs, R. et Brinkman, U.T. (2004). Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(4), 955-963.
- Stumpf, M., Ternes, T.A., Haberer, K., Seel, P. et Baumann, W. (1996). Determination of pharmaceuticals in sewage plants and river water. *Vom Wasser* 86, 291-303.
- Stumpf, M., Ternes, T.A., Wilken, R.D., Rodrigues, S.V. et Baumann, W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science of the Total environment* 225, 135-141.
- Sun, Y., Takaba, K., Kido, H., Nakashima, M.N. et Nakashima, K. (2003). Simultaneous determination of arylpropionic acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and human plasma by HPLC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30(5), 1611-1619.
- Tauber, R. (2003). Quantitative analysis of pharmaceuticals in drinking water from ten Canadian cities. Ontario, Canada. Enviro-test Laboratories, Xenos Division.

- Tauxe-Wuersch, A. (2005). Wastewaters : occurrence of pharmaceutical substances and genotoxicity. PhD thesis. Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne. 263 p.
- Tauxe-Wuersch, A., De Alencastro, L.F., Grandjean, D. et Tarradellas, J. (2005). Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research* 39(9), 1761-1772.
- Ternes, T.A. (1998). Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. *Water Research* 32(11), 3245-3260.
- Ternes, T.A., Hirsch, R., Mueller, J. et Haberer, K. (1998a). Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and beta-2 sympatomimetics in aqueous matrices using GC-MS and LC-MS-MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 362, 329-340.
- Ternes, T.A., Stumpf, M., Schuppert, B. et Haberer, K. (1998b). Simultaneous determination of antiseptics and acidic drugs in sewage and river water. *Vom Wasser* 90, 295-309.
- Ternes, T.A. et Hirsch, R. (2000). Occurrence and behavior of X-ray contrast media in sewage facilities and the aquatic environment. *Environmental Science and Technology* 34, 2741-2748.
- Ternes, T.A.: Pharmaceuticals as new emerging environmental contaminant : a survey. *Dans 2nd international conference on pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals in water.*(2001a). National Groundwater Association
- Ternes, T.A. (2001b) Pharmaceuticals and metabolites as contaminants of the aquatic environment. *Dans Pharmaceuticals and personal care products in the environment.* Daughton and Jones-Lepp ed., ACS symposium series 791. p 39-54.
- Ternes, T.A., Bonerz, M. et Schmidt, T. (2001). Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by LC-ESI-tandem MS. *Journal of Chromatography A* 938, 175-185.
- Ternes, T.A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H.J., Haist-Gulde, B., Preuss, G., Wilme, U. et Zulei-Seibert, N. (2002). Removal of Pharmaceuticals during Drinking Water Treatment. *Environmental Science and Technology* 36(17), 3855-3863.
- Ternes, T.A., Janex, M.L., Knacker, T., Kreuzinger, N. et Siegrist, H. (2004). Detailed report of POSEIDON project. <http://www.eu-poseidon.com>
- Theodoridis Theodoridis, G, Koster, J. et de Jong, J. (2000). SPME for the analysis of biological samples. *Journal of Chromatography B* 745, 49-82.
- Thiele-Bruhn, S. (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166(2), 145-167.
- Thomas, K.V. et Hilton, M.J. (2004). The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 49(5-6), 436-444.

- Tixier, C., Singer, H.P., Oellers, S. et Muller, S.R. (2003). Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters. *Environmental Science and Technology* 37(6), 1061-1068.
- Tolls, J. (2001). Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. *Environmental Science and Technology* 35(17), 3397-3406.
- Tranchant, J.(ed) (1995): Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Masson,Paris. 700p.
- Tyler , C.R., Jobling, S. et Sumpter, J.P. (1998). Endocrine Disruption in Wildlife: A Critical Review of the Evidence. *Critical Reviews in Toxicology* 28(4), 319-361.
- Ulrich, S. (2000). SPME in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A* 902, 167-194.
- US Environmental Protection Agency (2001). Water Recycling and Reuse: The Environmental Benefits. US EPA Region 9.
<http://www.epa.gov/region09/water/recycling/brochure.pdf>
- Van Bocxlaer, J.F., Clauwaert, K.M., Lambert, W.E., Deforce, D.L., Van den Eeckhout, E.G. et De Leenheer, A.P. (2000). Liquid chromatography - mass spectrometry in forensic toxicology. *Mass Spectrometry Reviews* 19(4), 165-214.
- Van der Ven, K., Van Dongen, W., Maes, B.U.W., Esmans, E.L., Blust, R. et De Coen, W.M. (2004). Determination of diazepam in aquatic samples by capillary liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 57(8), 967-973.
- Vanderford, B.J., Pearson, R.A., Rexing, D.J. et Snyder, S.A. (2003). Analysis of Endocrine Disruptors, Pharmaceuticals, and Personal Care Products in Water Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 75(22), 6265-6274.
- Velagaleti, R. (1997). Behaviour of pharmaceutical drugs (human and animal health) in the environment. *Drug Information Journal* 31, 715-722.
- Velagaleti, R., Burns, K.P., Gill, M. et Prothro, J. (2002). Impact of Current good manufacturing of practices and emission regulations and guidances on the discharge of pharmaceutical chemicals into the environment from manufacturing, use and disposal. *Environmental Health Perspectives* 110(3), 213-220.
- Volmer, D.A. et Hui, J.P.M. (1998). Study of erythromycin A decomposition products in aqueous solution by solid-phase microextraction/liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12(3), 123-129.
- Vrana, B., Allan, I.J., Greenwood, R., Mills, G.A., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J. et Morrison, G. (2005). Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trends in Analytical Chemistry* 24(10), 845-868.
- Webb, S. (2001) A Data-based Perspective on the environmental Risk Assessment of Human Pharmaceuticals I - Collation of Available Ecotoxicity. *Dans Pharmaceutical in the Environment: Sources, fate, effects and risks*. Kümmerer ed., Springer, Berlin Heidelberg NewYork. p 175–201.

- Weigel, S. (2003). Occurrence, distribution and fate of pharmaceuticals and further polar contaminants in the marine environment. PhD Thesis. University of Hamburg. 136 p.
- Williams, R.J., Johnson, A.C., Smith, J. et Kanda, R. (2003). Steroids estrogens profiles along river stretches arising from sewage treatments works. *Environmental Science and Technology* 37, 1744-1750.
- Ying, G.G., Kookona, R.S. et Ru, Y.J. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International* 28(6), 545-551.
- Zou, J., Neumann, N.F., Holland, J.W., Belosevic, M., Cunningham, C., Secombes, C.J. et Rowley, A.F. (1999). Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation. *Biochemical Journal* 340(1), 153-159.
- Zuccato (2000). Presence of therapeutic drugs in the environment. *The Lancet* 355, 1789-1790.
- Zuehlke, S., Duennbier, U. et Heberer, T. (2004). Determination of Polar Drug Residues in Sewage and Surface Water Applying Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 76(22), 6548-6554.
- Zurhelle, G., Petz, M., Müller-Seitz, E. et Siewert, E. (2000). Metabolites of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline and their distribution in egg white, egg yolk and hen plasma. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48, 6392-6396.
- Zwiener, C. et Frimmel, F. (2004a). LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment - a critical review. Part 1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(4), 851-861.
- Zwiener, C. et Frimmel, F. (2004b). LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment - a critical review. Part 2. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(4), 862-874.

ANNEXES

Cette partie contient le descriptif des campagnes et l'ensemble données physico-chimiques obtenues lors des campagnes de mesure.

Les données sur les concentrations mesurées en substances pharmaceutiques (données brutes) sur l'ensemble des campagnes décrites dans ces annexes sont disponibles sur demande au LPTC (H. BUDZINSKI, h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr).

ANNEXE 1 : Etudes de la Jalles d'Eysines

Analyse du bore par ICP-MS

- ❖ Prélèvement de l'échantillon dans un flacon en polypropylène.
- ❖ Filtration à 0,7 µm.
- ❖ Ajout d'acide nitrique 70 % (concentration finale 1 %) et conservation à 4°C (Analyse dans les 6 mois suivants le prélèvement).
- ❖ Analyse par ICP-MS (HP 4500, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) :
 - Nébuliseur « cross flow »
 - Puissance Rf 1250 W
 - Débit du gaz plasmagène 15 l.min⁻¹
 - Débit du gaz nébuliseur : 0,98 l.min⁻¹
 - Débit du gaz auxiliaire : 0,8 l.min⁻¹
 - Débit d'échantillon : 1 ml.min⁻¹

Les valeurs obtenues ont été corrigées par rapport au rhodium (utilisé comme étalon interne à la concentration de 25 µg.l⁻¹) et par rapport aux blancs de manipulation.

Etudes de la Jalles d'Eysines

Campagne de juillet 2003

Pas de réplicat

| Phase dissoute | point 1 | point 2 | point 3 | point 4 | point 5 | point 7 | point 8 |
|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| MES (mg.l ⁻¹) | 5 | 52,9 | 12 | 4,8 | 3,8 | 14 | 45,3 |
| COP(µg.l ⁻¹) | 640 | 16300 | 3050 | 1560 | 1080 | 4000 | 3850 |
| COD (mg.l ⁻¹) | 4,05 | 16 | 8 | - | 8,65 | - | 8,15 |
| Bore (µg.l ⁻¹) | 74,14 | 289 | 144 | 127 | 117 | 404 | 335 |
| Conductivité (µS) | 327 | 1281 | 646 | 523 | 530 | 596 | 951 |
| Temp. eau (°C) | 19,5 | 26 | 25 | 21 | 23,7 | 22,8 | 24,8 |

Campagne de septembre 2003**Analyse en triplicat**

| Phase dissoute ng.l ⁻¹ | point 1 | point 2 | point 3 | point 4 | point 5 | point 6 | point 7 |
|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| COP (µg.l ⁻¹) | 95,4 | 1648,2 | 2210,5 | 327,2 | 376,7 | 620,5 | 313,9 |
| COD (mg.l ⁻¹) | 4,1 | 15,5 | 7,7 | 7,0 | 6,2 | 6,1 | 4,9 |
| Bore (µg.l ⁻¹) | 100,5 ± 1,5 | 510,7 ± 7,0 | 205,7 ± 5,0 | 215,0 ± 8,0 | 192,5 ± 6,5 | 189,9 ± 7,9 | 688,4 ± 33,0 |

Campagne de février 2004**Analyse en triplicat**

| | point 1 | point 2 | point 3 | point 4 | point 5 | point 6 | point 7 |
|----------------------------|------------|--------------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| MES (mg.l ⁻¹) | 9,0 | 56,1 | 14,5 | 15,2 | 11,4 | 10,5 | 20,6 |
| COP (µg.l ⁻¹) | 108 | 113 | 76 | 91 | 93 | 79 | 97 |
| COD (mg.l ⁻¹) | 9,15 | 17,75 | 9,6 | 8,9 | 8,8 | 8,7 | 9,1 |
| Bore (µg.l ⁻¹) | 55,0 ± 3,9 | 462,7 ± 32,0 | 92,5 ± 3,2 | 56,3 ± 2,8 | 58,6 ± 2,0 | 57,5 ± 1,8 | 116 ± 7,4 |

ANNEXE 2 : Mesures dans la Calanque de Cortiou

Campagne octobre 2005**Données physico-chimiques**

| | T° eau (°C) | pH | O2 dissous (mg.l ⁻¹) | salinité (PSU) | Conductivité (mS.cm ⁻¹) |
|-----------|----------------|------|-------------------------------------|----------------|--|
| station 0 | 12,6 | 8,4 | 9,81 | 14,7 | 24,7 |
| station 1 | 14,9 | 8,32 | 7,89 | 23,2 | 37,2 |
| station 2 | 16,9 | 8,17 | 12,23 | 30,6 | 47,8 |
| station 3 | 16,9 | 8,4 | 19,97 | 35,6 | 54,3 |
| station 4 | 16,9 | 8,37 | 24,2 | 33,4 | 51,5 |
| station 5 | 16,9 | 8,37 | 11,7 | 36,6 | 56 |
| station 6 | 16,8 | 8,47 | 8,24 | 36,7 | 55,7 |

Mesures des concentrations dans la phase dissoute, exprimées en ng.l⁻¹
Analyse en triplicat

Mesures des concentrations dans la Calanque de Cortiou dans la phase particulaire
exprimées en ng.g⁻¹.
Pas de réplicat

Concentrations dans la Calanque de Cortiou dans la phase sédimentaire exprimées
en ng.g⁻¹.
Pas de réplicat

ANNEXE 3 : Etude du bassin versant de l'Hérault

| N° carte | Nom STEP | Bassin | Capacité | Charges (entrée) m ³ /j | Population |
|----------|------------|---------|----------|------------------------------------|------------|
| S3 | St Thibéry | Hérault | 4000 | 319 | 2232 |
| S15 | Lodève | Lergue | 13300 | 1835 | 7101 |

| N° carte | Commune ouvrage | Volume annuel capté (10 ³ m ³) | Origine de l'eau |
|----------|-------------------|---|------------------|
| C4a | St Thibéry 1 | 265.8 | Nappe |
| C4b | St Thibéry 2 | 65.5 | Nappe |
| C5 | Servian | 264.1 | Nappe |
| C6 | Nezignan l'Eveque | 181 | Nappe |
| C13 | Plaissan | 306.2 | Nappe |
| C15 | Le Pouget | 142.3 | Nappe |
| C17 | Brignac | 32.3 | Nappe |

| Prélèvements | Localisation | pH | T° eau | O2 mg/l | Cond. µS |
|--------------|----------------------|------|--------|---------|----------|
| C 4-A | St TIBERY | 7,07 | 16,6 | 2 | 935 |
| C 4-B | St TIBERY | 7,88 | 11,9 | 7 | 385 |
| STEP S3 | St TIBERY | 7,69 | 15 | 5 | 994 |
| C 17 | BRIGNAC | 7,40 | 15,7 | 5 | 851 |
| C 13 | PAULHAN | 7,29 | 16,5 | 10 | 798 |
| C 5 | SERVIAN | 7,10 | 16 | 5 | 1194 |
| P 22 | La THONGUE | 8,07 | 13,6 | 8 | 938 |
| C 6 | NEZIGNAN | 7,05 | 15,5 | 7 | 747 |
| C 15 | POUGET | 7,40 | 12 | 7 | 968 |
| L 1 | Lergue amont STEP | 8,55 | 11,3 | 8 | 504 |
| STEP S15 | LODEVE | 7,69 | 13,2 | 7 | 675 |
| L 2 | Lergue aval STEP | 8,14 | 12 | 9 | 555 |
| P14 A | Lergue amont Salagou | 8,53 | 11,4 | 9 | 350 |
| P 14 B | Lergue amont Hérault | 8,50 | 11,4 | 9 | 359 |
| H 1 | Hérault aval Lergue | 8,14 | 12,9 | 9 | 272 |
| H 2 | Hérault amont Lergue | 8,09 | 12,4 | 9 | 245 |

Analyses réalisées en parallèle des substances pharmaceutiques :

Terres rares : La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu

Eléments traces: Li, B, Al, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Ba, Pb, U

Eléments majeurs : CO₃²⁻, HCO₃⁻, Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, NH₄⁺

ANNEXE 4 : Etudes de l'estuaire de Seine, campagnes saisonnières

Les mesures effectuées sur les eaux de surface et les effluents de stations d'épuration sont présentées par campagne de prélèvements.

Mars 2002 : 11 points eau de surface, 1 STP

Mai 2002 : 9 points eau de surface, 1 affluent, 4 STP

Juillet 2002 : 9 points eau de surface, 3 STP

Septembre 2002 : 8 points eau de surface, 1 affluent, 4 STP

Novembre 2002: 6 points eau de surface, 3 STP

Mars 2003 :

3 points eau de surface, 3 STP, 2 affluents,
zone d'influence de la STP de Tancarville.

Juillet 2003 :

3 points eau de surface, 3 STP

Septembre 2003 :

3 points eau de surface, 3 STP

Octobre 2003

Phase dissoute/phase particulière
16 points de surface

ANNEXE 5 : Études qualitatives en Estuaire de Seine

Campagne 2005

5 stations dans l'estuaire de Seine
9 stations dans les principaux affluents de la Seine
3 Mesures dans les stations d'épuration

Suivi de 24 h de la station de Rouen

Concentration dans la phase dissoute
Pas de réplikat

Campagne février 2006

6 stations dans l'estuaire de Seine
9 stations de mesures dans les principaux affluents de la Seine
Mesures dans les 3 stations d'épuration :

ANNEXE 6 : Mesures en Baie de Seine

RNO 1, Campagne juin 2003

| | Température de l'eau | Salinité | O2 (mg.l ⁻¹) | Profondeur max. |
|----------|----------------------|----------|--------------------------|-----------------|
| Point 8 | 18,3 | 4,0 | 4,6 | 10 |
| Point 28 | 17,6 | 14,0 | 5,5 | 12 |
| Point 13 | 17,0 | 23,8 | 7,3 | 10 |
| Point 2 | 15,0 | 29,0 | - | 9 |
| Point 44 | 14,2 | 32,3 | 10,2 | 15 |
| Point 4 | 15,6 | 32,2 | 10,1 | 22 |
| Point 25 | 15,7 | 31,8 | 10,5 | 30 |

Concentrations mesurées dans la phase dissoute (ng.l⁻¹) sur 3 niveaux de profondeur

RNO 2, Campagne novembre 2004

| Points | Heure | Température (°C) | Salinité (PSU) | O2 (mg.l ⁻¹) | Profondeur (m) |
|--------|-------|------------------|----------------|--------------------------|----------------|
| 8 | 09:50 | 9,99 | 11,85 | 7,33 | 7 |
| | 09:53 | 9,95 | 10,42 | 7,22 | |
| | 10:01 | 9,95 | 11,23 | 7,41 | |
| 28 | 10:15 | 10,2 | 17,12 | 8,07 | 11,6 |
| 13 | 10:40 | 10,25 | 20,6 | 8,6 | 9,5 |
| | 10:44 | 10,3 | 20,65 | 8,61 | |
| | 10:45 | 10,22 | 20,53 | 8,6 | |
| 2 | 11:00 | 10,98 | 28,3 | 8,92 | 9,8 |
| 44 | 11:17 | 10,25 | 27,92 | 9,59 | 16 |
| | 11:22 | 10,47 | 28,01 | 9,3 | |
| 4 | 11:30 | 10,73 | 29,08 | 9,27 | 22,5 |
| | 11:38 | 10,7 | 29,28 | 9,3 | |
| | 11:39 | 10,68 | 29,12 | 9,28 | |
| 25 | 11:53 | 10,52 | 29,31 | 9,52 | 30,4 |
| | 11:58 | 10,5 | 29,3 | 9,53 | |
| | 11:59 | 10,51 | 29,29 | 9,52 | |
| 5 | 12:15 | 11,99 | 32,03 | 8,98 | 36,8 |
| | 12:19 | 12 | 32,02 | 8,98 | |
| | 12:22 | 12 | 32,03 | 8,97 | |

Concentrations dans la phase dissoute (ng.l⁻¹) sur 2 niveaux de profondeur

ANNEXE 6, suite : Etude de la baie de Seine :
Point fixe (Pont de Tancarville)

SAZOOTOX 1, Campagne mai 2004

5 Points de prélèvements (surface et fond) sur un cycle de marée

SAZOOTOX 2, campagne Juin 2004

7 Points de prélèvements (surface et fond) sur un cycle de marée

ANNEXE 7 : Etudes de l'estuaire de la Gironde

Campagne février 2002

5 points de prélèvements, effectués au pK 90, pK 70, pK 55, pK 30, pK15

Campagne juin 2003

10 points de prélèvements effectués tout au long de l'estuaire (partie aval Bordeaux)

Campagne février 2005

9 points de prélèvements effectués tout au long de l'estuaire+ Garonne

ANNEXE 8 : Etudes de l'estuaire de l'Adour

Campagne septembre 2002

4 points de prélèvements eau de surface effectués tout au long de l'estuaire (partie aval Bayonne) + 4 STP

Campagne novembre 2005

9 points de prélèvements effectués tout au long de l'estuaire+ partie rivière

| (ng.l ⁻¹) | Port de Lanne | Peyrehorade | Urt | Bayonne | Embouchure Bayonne |
|------------------------|---------------|-------------|------|---------|--------------------|
| MES mg.l ⁻¹ | 51,0 | 47,5 | 70,5 | 61,6 | 33,6 |
| COP µg.l ⁻¹ | 2250 | 950 | 1270 | 2050 | 690 |
| COD mg.l ⁻¹ | 7,0 | 7,1 | 10,2 | 1,3 | 1,2 |

| (ng.l ⁻¹) | Saint Mont | Saint Sever | Pontonx sur Adour | Saubusse |
|------------------------|------------|-------------|-------------------|----------|
| MES mg.l ⁻¹ | 2,1 | 3,0 | 19,2 | 15,2 |
| COP µg.l ⁻¹ | 135 | 195 | 3000 | 1230 |
| COD mg.l ⁻¹ | 8,1 | 2,2 | 1,7 | 7,9 |

ANNEXE 9 : Conditions d'analyses en GC-MS

Appareillage : Chromatographe 6890 couplé à un spectromètre de masse 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA).

Mode d'injection : mode splitless non pulsé.

Volume d'injection : 1 µl.

Solvant d'injection : acétate d'éthyle.

Mode d'analyse : sélection d'ion (temps d'accumulation 70 ms, 1,67 cycle / seconde).

Mode d'ionisation : impact électronique, énergie d'ionisation 70 eV.

Colonne chromatographique : HP 5MS (longueur : 30 m ; 0,25 mm diamètre interne, 0,25 µm épaisseur de film).

Gaz vecteur : Hélium (Linde gas) qualité 6.0 (99,9990%).

Débit de gaz vecteur : 1.3 ml.min⁻¹ (constant).

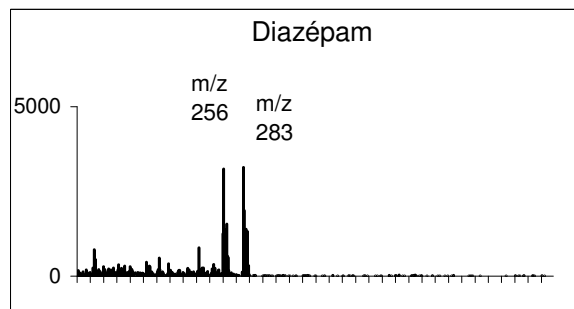
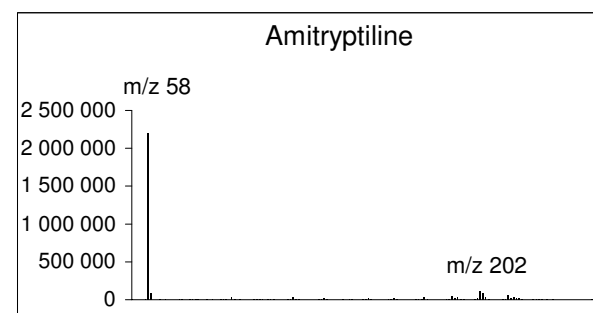
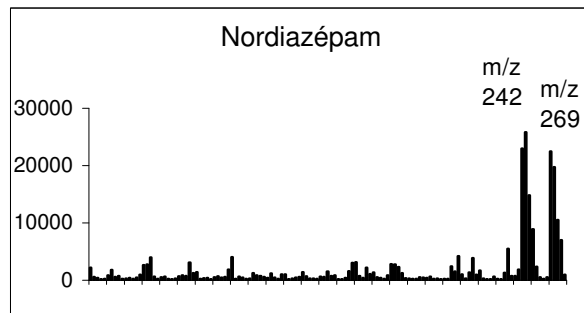
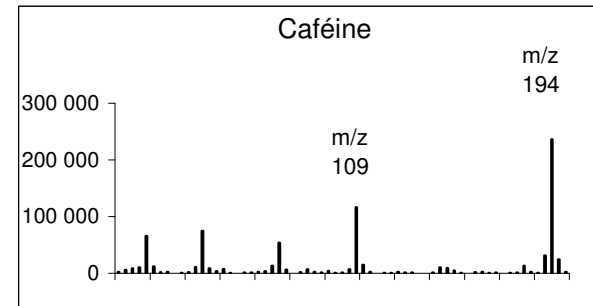
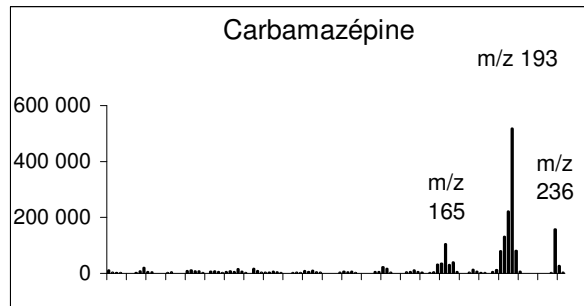
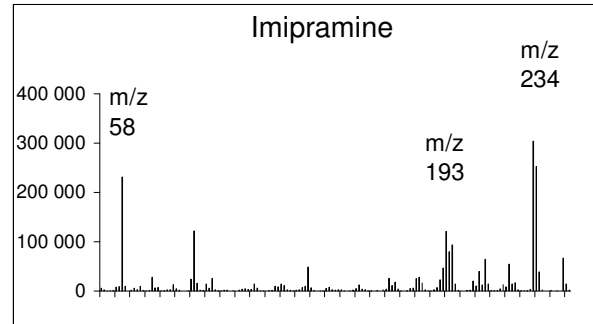
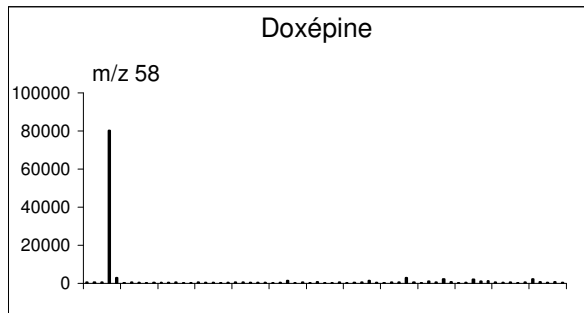
Gradient de température : 70 °C (2 min.), montée à 250 °C (rampe de 10 °C par min.), isotherme de 5 min.

Températures : Ligne de transfert 280 °C ; source 230 °C ; quadrupole 150 °C.

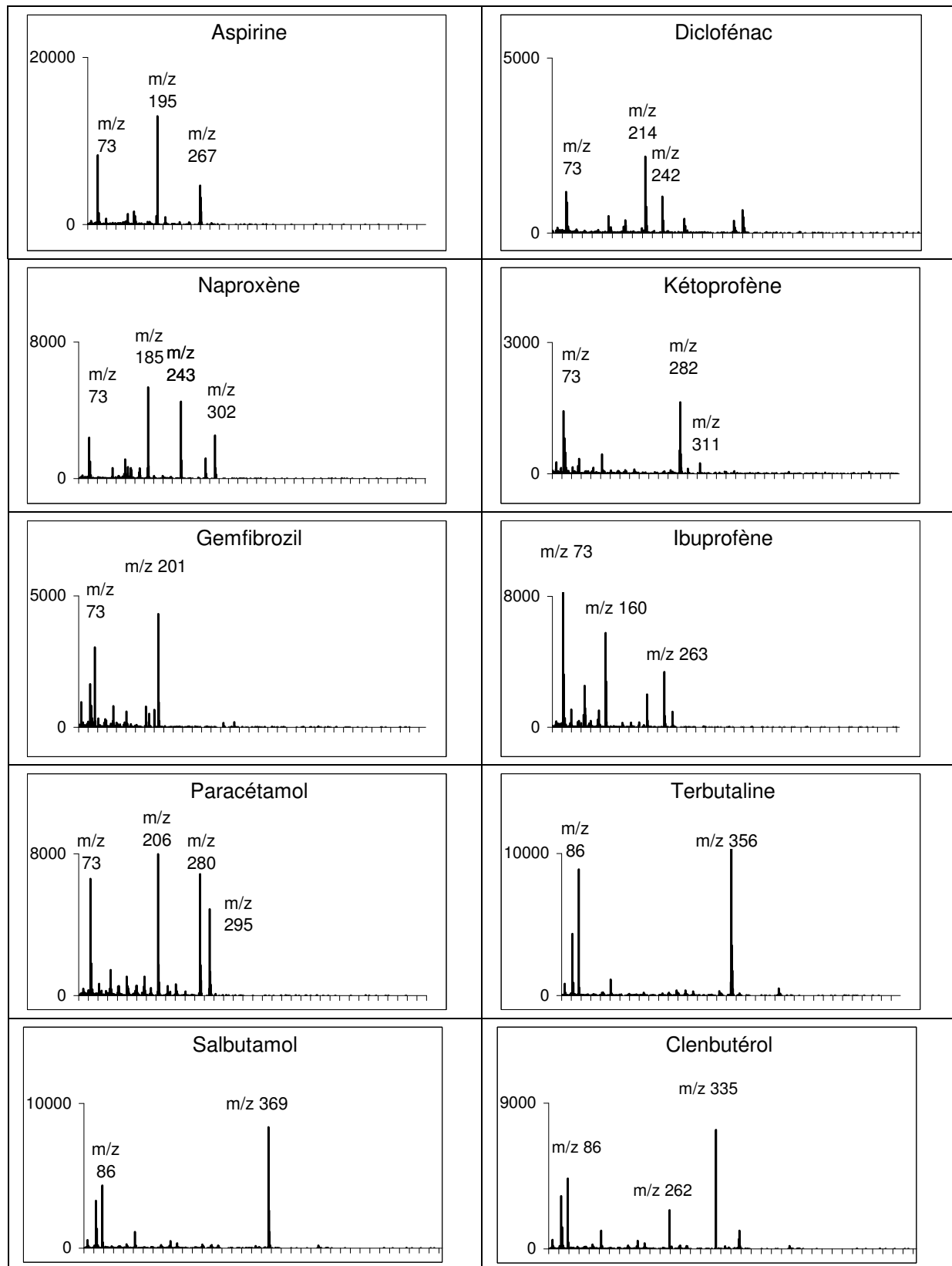
Multiplicateur d'électron 1976 eV.

ANNEXE 10 : Spectres de masse obtenus par impact électronique (GC-MS)

Spectres des composés neutres

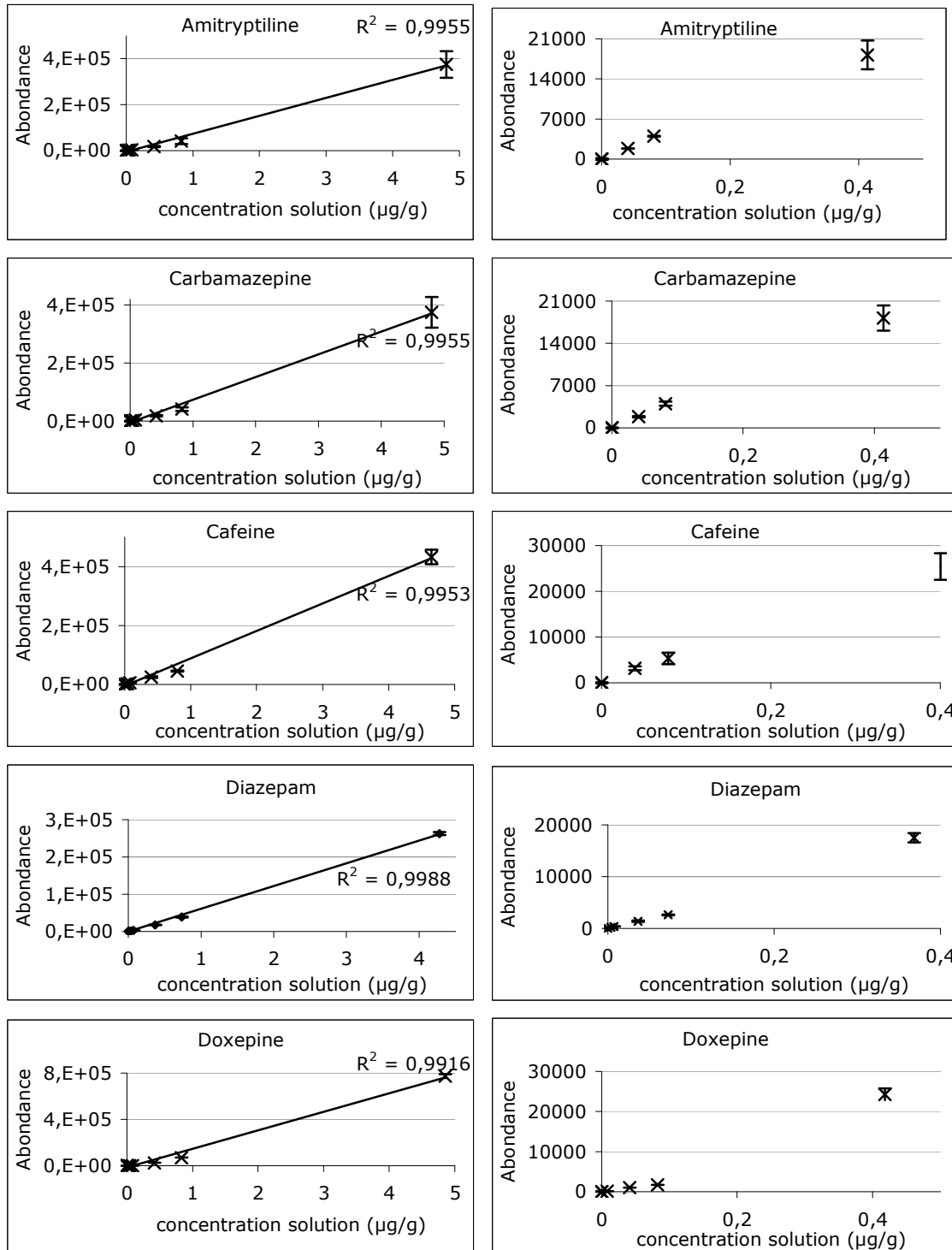


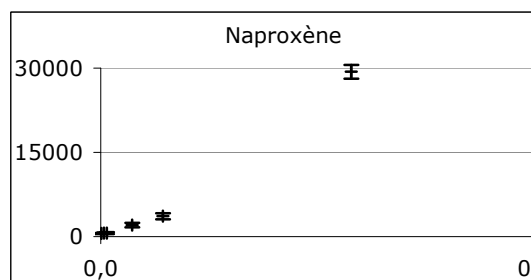
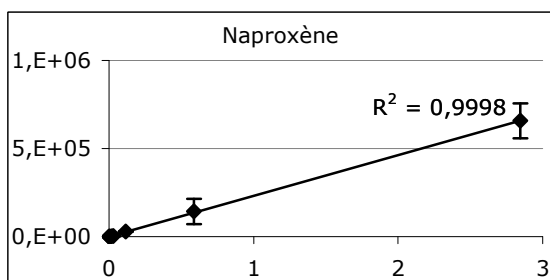
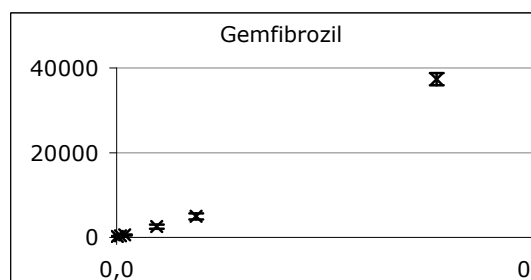
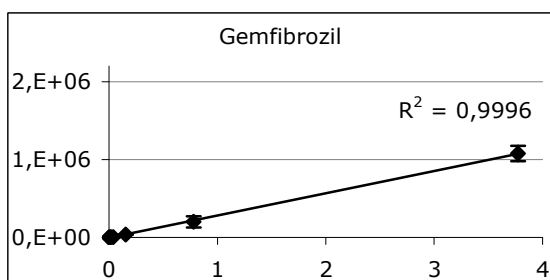
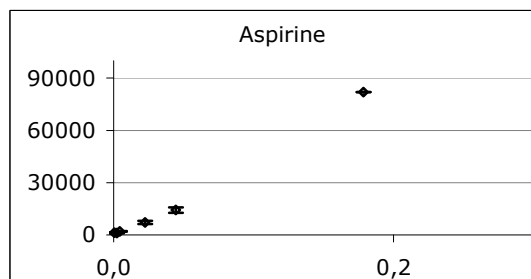
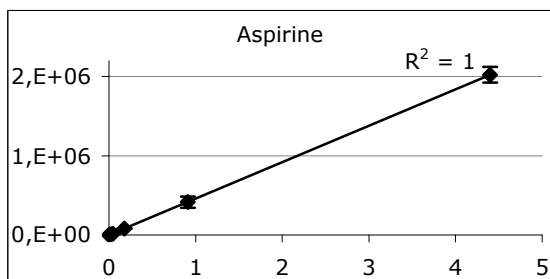
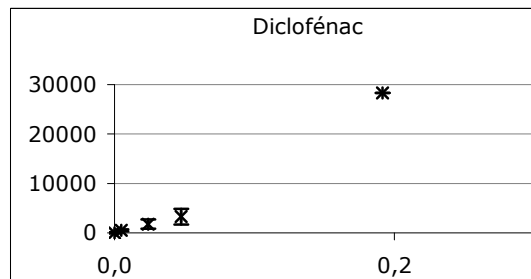
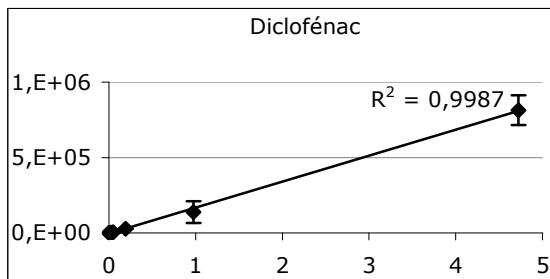
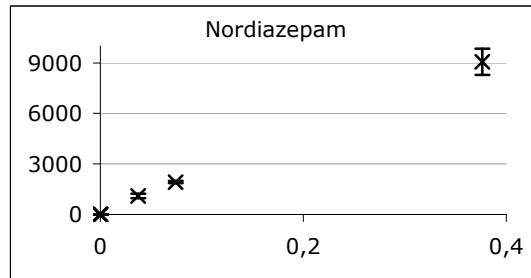
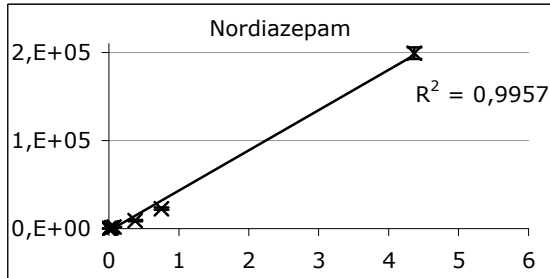
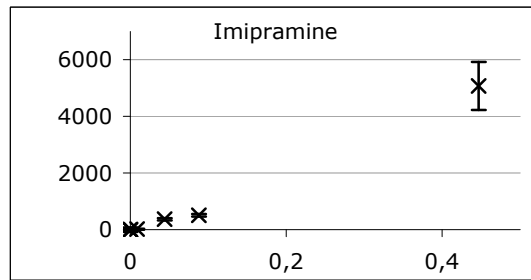
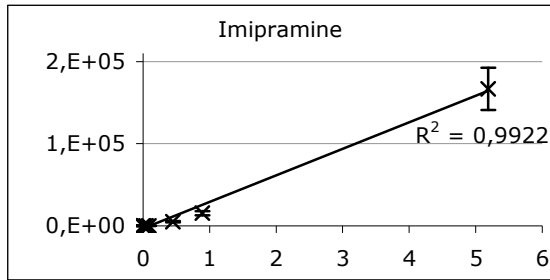
Spectres de masse obtenus par impact électronique (GC-MS)

Spectres des composés acides, après dérivation

ANNEXE 11 : Gammes de linéarité (GC-MS)

Pour chaque molécule, deux graphes sont présentés, le premier montre l'ensemble de la gamme, le deuxième présente un zoom des plus faibles concentrations. Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.





PUBLICATIONS

PUBLICATION 1
Analytical and Bioanalytical Chemistry (Acceptée)

Analytical development for the analysis of pharmaceuticals in water samples using SPE and GC/MS.

Anne Togola and H el ene Budzinski
LPTC, UMR 5472 CNRS, University of Bordeaux 1, 351 crs de la Lib eration,
33405 TALENCE, FRANCE

KEYWORDS:

Pharmaceuticals, wastewater, surface water, SPE, GC-MS

ABSTRACT:

An analytical procedure for the determination of pharmaceutical compounds (aspirin, caffeine, carbamazepine, diclofenac, ketoprofen, naproxen, ibuprofen, clofibrate, clofibric acid and gemfibrozil) in various aqueous samples (wastewater and surface water) by solid-phase extraction (SPE) and gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) has been developed. After filtration, samples were extracted and concentrated using C18 or HLB[®] cartridges depending on the compound chemical classes. Purification processes and sample storage conditions have been optimized. For most of the pharmaceuticals monitored, recoveries were in the range of 53 to 99%, and the variability was below 15% for the complete procedure. The developed method was successfully applied to the monitoring of pharmaceutical contamination in the Seine estuary.

INTRODUCTION

Nowadays, about 3 000 different compounds are used in human and veterinary medicine and cover a large range of different chemical structures [1]. The number of prescribed substances, especially for antibiotics and antidepressants is very high, and high use of non- prescription drugs such as anti-inflammatory and antihistaminic drugs must also be taken into account. Accordingly, many different products have been found in natural media, belonging to different therapeutical classes such as analgesics, antipyretics, lipid-lowering agents, antidepressants, broncholitics, human and veterinary antibiotics, synthetic steroidal hormones, etc...

When pharmaceuticals are consumed, in most cases, up to 80 per cent or more of the drug can pass through the body without being transformed [1]. When they are biotransformed, they break down into metabolites, which can be more bioactive than the drug itself. Due to the incomplete elimination in wastewater treatment plants, some residues of pharmaceutical substances and of their metabolites are found in wastewaters and in surface water of various countries: in Germany [2, 3], in Italy [4], in Greece [5], but also in Italy [6], in Spain [7], in Switzerland [8, 9, 10], in Sweden [11], in the USA [12]...

All pharmaceuticals are bioactive – they have been synthesized for specific intended effects on living beings. This way, these compounds could also have important toxic effects on aquatic organisms. In order to estimate environmental risks, there is a need for data documenting the effective contamination of the aquatic environment by these molecules.

Different existing analytical methods are used to detect these substances in human organisms and complex biological samples such as blood [13], plasma [14] and urine [15]. These methods generally use liquid liquid extraction (LLE) or solid phase extraction. Concerning environmental studies, solid phase extraction is extensively used to measure levels of pharmaceuticals in aqueous matrices. For the analytical part, High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) with spectroscopic detectors [14, 16] is rapid, reproducible [17], but not very sensitive (range of $\mu\text{g.l}^{-1}$) and most often specific for one compound or several ones with similar chemical structures. New spectrometric detectors, such as MS-MS with LC [18, 19, 20] or GC [21] are more sensitive and allow to reduce pharmaceutical limits of detection below ng.l^{-1} range. However, interfering compounds and matrix interferences [22] can reduce applicability for complex water samples such as influent or effluent wastewater. On the other hand, these new apparatus are expensive and can be complex to develop.

The application of GC-MS can overcome those problems and reduce analysis cost. GC-MS allows rapid analysis and is easier to develop and to manage [3, 23, 24, 25].

The main aim of this study was to develop an analytical methodology using SPE followed by GC-MS analysis that could be used to screen indifferently waste waters and surface waters in order to identify and quantify substances of several different chemical or therapeutical classes in a multiresidue type approach. Solid phase extraction is the most widespread method for the extraction of large volumes of water. Each parameter influencing efficiency of the extraction step such as the pH of the sample, the nature of cartridges phases, and the nature of elution solvents have been optimized before applying the optimized protocol to environmental samples in order to document the contamination of the biggest French Atlantic estuary: the Seine estuary. In order to know the behaviour of all pharmaceutical classes, one or few molecules of the main classes mentioned above have been retained for this study: carbamazepine as an anti-epileptic drug; ibuprofen, ketoprofen and naproxen as Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs

(NSAIDs); gemfibrozil and clofibric acid as lipid-lowering agents with clofibrate as main metabolite of clofibric acid; aspirin as an analgesic and caffeine.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and material:

All studied pharmaceutical compounds, pyrene and 1-hydroxypyrene, used for recovery determination (internal standards) were of analytical grade (purity > 98%) and purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Figure 1 shows the molecular structure of the different pharmaceuticals investigated in this study. Individual solutions and mixtures of drugs were prepared in both methanol (used for spiked water samples) and ethyl acetate (used for analytical developments and direct analysis by GC/MS).

Solid phase extraction was carried out using two types of cartridges: C18 Bondelut® 200 mg purchased from Interchim (Montluçon, France) and OASIS HLB® 60 mg purchased from Waters (Saint Quentin en Yvelines, France).

N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) used as derivatization agent was supplied by Acros Organics (Noisy le Grand, France). Whatman GFF glass fibre filters (pore size 0.7µm) were purchased from VWR International (Strasbourg, France). Chlorhydric acid (37%, reagent grade) and HPLC reagent grade methanol, ethyl acetate and acetone were purchased from ICS (Belin-Beliet, France). Ultrapure water used for spiked samples and as solvent for SPE extraction was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). Potassium hydroxide (purity > 86%) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Pharmaceutical analysis

Natural waters and wastewaters were sampled in amber glass bottles, filtered through heated (450 °C, 6h) GFF glass fibre filters. For natural waters, 2 l are filtered then 1 l is taken for the analysis of neutral pharmaceuticals and 1 l is taken for acidic pharmaceuticals. For wastewater treatment plant (WWTP) effluents, 500 ml is used for each extraction. pH adjustment was done just before extraction processes at pH 2 with HCl (3.5 M) for acidic compounds and at pH 9 with KOH (1 M) for the neutral ones using pH-526 WTW® pH-meter (VWR International, Strasbourg, France). All the glassware was carefully cleaned by washing with detergent, then rinsing with pure water and finally by heating at 450 °C overnight.

SPE cartridges were conditioned subsequently with 3 ml of an ethyl acetate/acetone mixture (50:50; v/v), 3 ml of methanol and 3 ml of milliQ-water adjusted at pH 2 for acidic compounds extraction and at pH 9 for the others. Water samples were loaded under vacuum at a flow rate of 12 to 15 ml.min⁻¹. After sample loading, cartridges were washed with a mixture of methanol/water (40:60; v/v) and dried under vacuum for 1h. After elution with 9 ml of ethyl acetate/acetone (50:50; v/v), the collected extracts were evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream and redissolved in 50 to 100 µl of ethyl acetate. Pyrene was added to the final extracts for neutral compounds and 1-hydroxypyrene was added to the final extracts for acidic compounds before the derivatization step, consisting in adding 30 µl of MSTFA before incubation of 35 min at 65 °C.

All additions of matrix, standards, solvents or reagents were gravimetrically controlled. Blanks were performed for each batch experiment in order to prevent any contamination. No compounds have been found in blank samples.

GC-MS analyses were carried out using an HP 6890 gas chromatograph from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). The capillary column was an HP5/MS (30m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness; phase: 5% diphenyl, 95% dimethylsiloxane) from Bios

Analytique (L'Union, France). Samples were injected (2 μ l) into the GC in splitless mode at 250 $^{\circ}$ C using an HP 6890 series injector. The carrier gas was ultrapure helium (99.99990%, Linde Gas, Bassens, France) set at constant flow mode (1.3 ml.min⁻¹). For GC separation, the temperature program started at 70 $^{\circ}$ C (held for 2 min.), set at 10 $^{\circ}$ C per min. to 250 $^{\circ}$ C and was held isothermally for 5 min. The gas chromatograph is coupled to an HP 5973N mass selective detector (LMSD, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), operated in electronic impact (EI) mode at 70 eV using single ion monitoring mode (see Table 1) at 0.92 scan.s⁻¹. The electron multiplier voltage (EMV) sensitivity was set to 1976 V. The transfer line, source and quadrupole temperatures were 280, 230 and 150 $^{\circ}$ C, respectively.

Sampling of surface water and WWTP effluents

From March 2002 to November 2002, surface water and WWTP effluent samples were collected every two months at six stations located in the Seine river Estuary: Poses, Caudebec and Honfleur for surface water, with kilometric points downstream of Paris (kp) respectively of 200, 313 and 355; Elbeuf wastewater treatment plant effluent (WWTP) (kp 220; 110,000 population equivalents), Rouen WWTP effluent (kp 245; 450,000 population equivalents) and Tancarville WWTP effluent (kp 330; 1,800 population equivalents). All three WWTPs included secondary biological treatment.

RESULTS AND DISCUSSION

Validation of GC-MS analysis:

Mass spectrometry conditions:

Acidic compounds (aspirin, ibuprofen, diclofenac, naproxen, gemfibrozil and clofibric acid) should be derivatized before GC-MS injection, by adding 30 μ l of MSTFA before an incubation of 35 min at 65 $^{\circ}$ C. The mass spectrum of each compound was characterized in full scan mode and selected ion monitoring mode was used for all quantitative measurements. Retention times, m/z ratio and limits of detection used for quantitative purposes are given in Table 1.

Linearity and limits of detection

Linearity was tested with standard mixtures in ethyl acetate at different levels of concentration between 2 and 5000 ng.g⁻¹ of injected solution (1 μ g.l⁻¹). Depending on the compound, correlation coefficients between 0.9916 (for doxepine) and 1 (for aspirin) have been obtained with relative standard deviation (RSDs) ranging from 6% to 13% for 6 consecutive injections.

Analytical limits of detection (Table 1), expressed in injected pg, were obtained for a signal-to-noise ratio of 3. If we extrapolate these values considering the analytical protocol (1l of water extracted and final extract reconcentration to 50 μ l), we can postulate that these values make possible the use of GC-MS to study the occurrence of pharmaceuticals in natural environment, considering environmental concentrations already published, for it give pharmaceutical concentrations in the range of ng.l⁻¹ [26, 27, 28] to μ g.l⁻¹ [10, 29, 30].

Quantification

Two calibration solutions were prepared by mixing the internal standards used for quantification (pyrene for neutral compounds and 1-hydroxy-pyrene for acidic ones) and the pharmaceuticals of interest. The different solutions were gravimetrically controlled during the preparation. These calibration solutions were injected in order to calculate response factors with respect to their internal standards (see Table 1). These response factors were then applied to other independent solutions in order to validate the quantitative approach. 6 replicates have been implemented to obtain the results shown in

figure 2. The recoveries range from 87% for ketoprofen to 110% for ibuprofen with RSDs between 5 and 13%, allowing the use of these two compounds as internal standards to quantify the ten studied pharmaceuticals.

Optimisation of the extraction parameters

The solid phase extraction step was optimized studying several parameters independently. The extraction procedure was tested in each case by spiking 1 l of milli-Q water with a mixture of standards in methanol ($1 \mu\text{g.l}^{-1}$ for each drug, gravimetrically controlled). Each condition has been tested in triplicate, allowing calculating RSDs for repeatability.

PH water influence

Water samples were adjusted at 3 different pH values: pH 2, pH 7 and pH 9 prior to the extraction step using HCl (3.5 M) and KOH (1 M). C18 sorbent has been chosen in this case as the most widely used type of cartridges with methanol elution [31]. Results of extraction obtained for the three pH conditions are presented on Figure 3. For the acidic compounds, there is a better extraction at pH2 (between 30% and 78%) than at pH 7 or 9. Similar yields are obtained for clofibrate at pH 7 and pH 9 (respectively $43 \pm 7\%$ and $36 \pm 2\%$) and for the three conditions for caffeine ($33 \pm 3\%$, $40 \pm 10\%$ and $40 \pm 2\%$). For carbamazepine the extraction rate is very low at pH 2 and aberrant (266%) at pH 7 but correct at pH 9 ($83 \pm 11\%$).

This first experiment has allowed to identify two groups of compounds. For further experiments, both classes have been studied separately. The first one corresponds to neutral compounds: clofibrate, caffeine and carbamazepine extracted at pH 9. The second one contains clofibric acid, aspirin, ketoprofen, ibuprofen, gemfibrozil and diclofenac extracted at pH 2.

Choice of sorbent and solvent:

In comparison with reversed silica based bonded octadecyl adsorbent (C18) widely used for pharmaceutical extraction, a polymeric phase has been evaluated: Oasis HLB sorbent, a macroporous copolymer made with a balanced ratio of two monomers, the lipophilic divinyl-benzene and the hydrophilic N-vinylpyrrolidone.

For the same experiment, 3 solvents have been tested depending on their elution strength: methanol, ethyl acetate and a mixture of acetone/ethylacetate (50/50, v/v) with the same elution volume of 9 ml. The optimal conditions concerning pH water adjustment have been used, with separate extraction processes for neutral and acid pharmaceutical groups.

Results presented in Figure 4 show yields of extraction obtained for both kinds of cartridges (C18 and HLB) in the three elution conditions (methanol, ethyl acetate and acetone/ethyl acetate mixtures).

For acidic compounds (Figure 4a), the best yield is obtained with Oasis HLB cartridges and elution with a mixture of acetone/ethyl acetate (50/50, v/v). Recoveries ranged from $78 \pm 11\%$ (for gemfibrozil) to $91 \pm 10\%$ (for diclofenac). The most significant variation is obtained for aspirin: $84 \pm 10\%$ for HLB extraction and mixture elution while recovery is around $30 \pm 10\%$ for other conditions.

For neutral compounds, results are more or less similar depending on the different extraction conditions. For clofibrate and caffeine, C18 sorbent gives better results than HLB, with solvent mixture elution (for caffeine, $53 \pm 3\%$ with HLB and $70 \pm 6\%$ for C18). For carbamazepine, better results have been obtained with acetone and methanol alone comparing with solvent mixture but with interference phenomena (recoveries up to 115%). Yields of extraction obtained with solvent mixture are of $99 \pm 11\%$ with HLB and

80 ± 11% for C18. Nevertheless, in order to have the same solid phase extraction step for all neutral compounds, C18 cartridges have been chosen.

Final extraction processes use HLB cartridges for acidic pharmaceuticals (adjustment at pH 2 of water samples) and C18 cartridges for neutral ones (adjustment at pH 9 of water samples). For both cartridges, elution step is done with 9 ml of acetone/ethyl acetate (50/50, v/v) mixture.

Sample clean-up

In order to decrease the limits of detection and to insure a better reliability of the determination, a clean up step of natural samples was optimized. For the optimization only acidic compounds (extracted on HLB cartridges, pH 2) have been used. Four mixtures of rinsing have been tested: 20/80, 40/60, 60/40 and 80/20 of methanol/water (v/v) after sample deposition step and before drying of the cartridges. Results are shown on Figure 5.

The use of 3 ml of a mixture methanol/water (40/60; v/v) decreased significantly the noise and allowed to lower the limits of detection without significant losses of compounds, except for clofibrate (yield of extraction 8%). Global recoveries concerning all step of solid phase extraction range from 53% to 94% with RSDs (n=3) from 0 to 12% for all pharmaceuticals.

Storage parameters:

In order to evaluate the stability of pharmaceuticals in water samples between sampling, extraction and analysis steps, different experiments have been carried out.

A first experiment consisted in evaluating the loss caused by the storage of the final organic extract in acetone/ethyl acetate (50/50; v/v); the chromatographic analysis step has been separated from the rest of the protocol: sampling, filtration and extraction steps. A mixture of pharmaceutical standards was prepared in the final extract solvent: ethyl acetate/acetone (50:50 v/v). The solution was characterized the day of preparation (D0, see Figure 6). Other samples were kept at 4°C and analysed after 3 and 7 days of storage (Figure 6). Compounds are stable in the solvent for several days (up to 7) after extraction, without significant loss or variability, allowing the storage at 4°C of extracts before GC-MS analysis for 7 days.

A second experiment was performed in order to evaluate the stability of the pharmaceuticals in natural water samples during storage. Natural water was spiked (around 1 µg.l⁻¹, gravimetrically checked) without any filtration and stored in 4 different conditions: at 4°C and at ambient temperature (20°C) and in both cases, with and without addition of methanol (5% in volume) used to slow down the compound bacterial degradation [32]. Samples were characterized just after sampling, 3 and 8 days after sampling.

A similar experiment was applied to natural water from the Seine estuary, sampled at the dam of Poses (Eure, France) and to an effluent from a wastewater treatment plant (Tancarville, Seine Maritime, France). After sampling, raw waters were treated in three different ways: 5% of methanol, 5% of formalin (in volume) and without anything. All samples were stored at 4°C until filtration and extraction. In this case, samples were characterized the first day and 8 days after the preparation.

In the three cases, results (Figure 7) show that there are no significant losses between samples analysed the first day and after eight days of storage at ambient temperature, with all kinds of conservative agents. On the contrary, the addition of methanol or formalin does not improve the stability but increases the variability of the measurement.

Therefore, it has been chosen to store the water at 4 °C just after sampling. The water is filtered as soon as possible and the extraction is done no more than 3 days after sampling. Considering the conservation study, this can ensure pharmaceutical compound conservation and analysis validity.

Application to natural samples

In order to study the contamination of the Seine estuary and validate the optimized protocol in the case of natural and WWTP waters, a sampling has been made on different points of the Seine estuary between march 2002 and march 2003 (see map on figure 8). The sensitivity of the analytical protocol is enough to detect most of the studied compounds. A good similarity can be observed between theoretical limits of detection (presented on Table 1 and calculated from analytical limits of detection and yields of extraction) and measured ones on natural samples (see Table 2). The limits of detection are widely below observed concentrations and vary according to water sample properties: wastewater samples are more complex and contain higher organic matter content than surface water samples which increases interference phenomena and background noise; this increases more or less by two the detection limits. Nevertheless, limits of detection obtained by this multiresidue extraction combined with purification step stand comparison with those obtained for GC-MS-MS or LC-MS-MS analyses [31, 33] or using compounds specific extraction procedure [2, 8].

The purification step allows to obtain good limits of detection but also proper identification of compounds in analysed samples. Figure 9 shows the analogy between a spectrum obtained with standard compound analysis and a spectrum extracted from the chromatogram of a natural water sample of the STEP of Tancarville for the trimethylsilyl derivative of naproxen. Compounds can be identified without ambiguity, allowing for environmental monitoring.

In most samples of this study, the levels of pharmaceuticals are in the range of 2 ng.l⁻¹ to 600 ng.l⁻¹ for surface water, depending on seasons, compounds and sample location. The upper part of the estuary (Poses, kp 200) is the most contaminated area, probably due to the main influence of the most important WWTP of the Seine (Acheres, in charge of the treatment of Paris waste waters, more than 6 million population equivalents). For the downstream part, pharmaceutical concentrations are lower, showing degradation phenomena occurring in surface water [8, 34]. Concerning WWTP effluents, levels are in the range of 4 to 3,260 ng.l⁻¹, depending on seasons, compounds and WWTP capacity and treatment efficiency. These continuous inputs to the surface water maintain a global contamination of the aquatic system in spite of degradation phenomena.

For the two kinds of samples, the most persistent compounds (carbamazepine and diclofenac with removals generally described below 70% [35]) are always detected, more frequently than more labile compounds (aspirin) which are sometimes below the limits of detection. The occurrence of Non Steroidal Anti-inflammatory Drugs, used as non-prescribed drugs is measured at very high concentration levels. Clofibrate and clofibric acid often detected in other countries [10, 36, 37] have not been detected in this study, which is related to their prohibition for sale in France since 1990. For this first study, all samples have been done in triplicate. Reproducibility for natural samples is below 15% for most of the compounds. This low variability allows for the following campaigns the use of a single water sample for each point, allowing to increase the number of analysed points and thus a better environmental monitoring of the Seine estuary.

CONCLUSIONS

The SPE technique is an innovating and efficient method to extract pharmaceutical substances from different matrices. An analytical procedure has been developed allowing to analyse environmental water sample, efficient on surface waters, as well as on wastewaters, for a large range of pharmaceutical concentrations. This method has shown to be rapid and easy to identify and quantify many pharmaceutical substances permitting to estimate the potential contamination of aquatic environments. This way, many water analyses can be managed at the same time, by automation processes that facilitate environmental monitoring on a large scale, for example on the watershed level for the Seine Estuary.

It was found that the developed procedure applied to the Seine River has allowed the identification of a new kind of contamination of this highly anthropised estuary. It is to our knowledge the first report of pharmaceutical concentrations for this area.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank the "Région Aquitaine", the Seine Aval and the "GIS ECOBAG" programs for research funding. They want also to acknowledge the ORQUE (Environmental Quality Research Observatory) program and the NFS (National Funding for Science) for providing a PhD grant (A. Togola).

BIBLIOGRAPHY

1. Halling-Sorensen B, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhof HC and Jorgensen SE (1998) *Chemosphere* 36: 357-393
2. Sacher F, Lange FT, Brauch H-J and Blankenhorn I (2001) *J Chrom A* 938: 199-210
3. Ternes TA, Hirsch R, Mueller J and Haberer K (1998) *Fresenius J Anal Chem* 362: 329-340
4. Zuccato E, Castiglioni S and Fanelli R (2005) *J Hard Mater* 122: 205-209
5. Koutsouba V, Heberer T, Fuhrmann B, Schmidt-Baumler K, Tsipi D and Hiskia A (2003) *Chemosphere*. 51: 69-75
6. Castiglioni S, Fanelli R, Calamari D, Bagnati R and Zuccato E (2004) *Regul Toxicol Pharm* 39: 25-32
7. Farré M, Ferrer I, Ginebreda A, Figueras M, Olivella L, Tirapu I, Vilanova M and Damia B (2001) *J Chrom A* 938: 187-197
8. Buser HR, Poiger T and Müller MD (1998) *Environ Sci Tech* 32: 3449-3456
9. Golet EM, Alder AC and Giger W (2002) *Environ Sci Tech* 36: 3645-3651
10. Tauxe-Wuersch A, De Alencastro LF, Grandjean D and Tarradellas J (2005) *Water Res* 39: 1761-1772
11. Andreatti R, Raffaele M and Nicklas P (2003) *Chemosphere* 50: 1319-1330
12. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB and Buxton HT (2002) *Environ Sci Technol* 36: 1202-1211
13. Kumazawa L, Sato T and Suzuki O (1997) *Journal of Chromatogr Sci* 35: 302-308
14. Sun Y, Takaba K, Kido H, Nakashima MN and Nakashima K (2003) *J Pharmaceut Biomed* 30: 1611-1619
15. Theodoridis G, Koster H and de Jong (2000) *J Chrom B* 745: 49-82
16. Santos JL, Aparicio I, Alonso E and Callejon M (2005) *Anal Chim Acta* 550: 116-122
17. Ulrich S (2000) *J Chrom A* 902: 167-194
18. Fagerquist CK and Lightfield AR (2003) *Rapid Commun Mass Sp* 17: 660-671
19. Löffler D and Ternes TA (2003) *J Chrom A* 1021: 133-144
20. Hilton MJ and Thomas KV (2003) *J Chrom A* 1015: 129-141
21. Ternes TA, Stüber J, Haerrmann N, McDowell D, Ried A, Kampmann M and Teiser B (2003) *Water Res* 37: 1976-1982

22. Metcalfe CD, Miao XS, Koenig BG and Struger J (2003) *Environ Toxicol Chem* 22: 2881-2889
23. Moeder M, Schrader S, Winkler M and Popp P (2000) *J Chrom A* 873: 95-106
24. Deng A, Himmelsbach M, Zhu QZ, Frey S, Sengl M, Buchberger W, Niessner R and Knopp D (2003) *Environ Sci Technol* 37: 3422-3429
25. El Haj BM, Al Ainri AM, Hassan MH, Bin Khadem RK and Marzouq MS (1999) *Forensic Sci Int* 105: 141-153
26. Heberer T (2002) *Toxicol Lett* 131: 5-17
27. Ternes TA (1998) *Water Res* 32: 3245-3260
28. Ternes TA, Meisenheimer M, McDowell D, Sacher F, Brauch HJ, Haist-Gulde B, Preuss G, Wilme U and Zulei-Seibert N (2002) *Environ Sci Technol* 36: 3855-3863
29. Ternes TA and Hirsch R (2000) *Environ Sci Technol.* 34: 2741-2748.
30. Tixier C, Singer HP, Ollers S and Muller SR (2003) *Environ Sci Technol.* 37(6): 1061-1068.
31. Ternes TA (2001) *Trends Anal Chem.* 20: 419-434
32. Desbrow C, Routledge E, Brighty G, Sumpter JP and Waldock MJ (1998) *Environ Sci Technol* 32: 1549-1558
33. Verenitch SS, Lowe CJ and Mazumder A (2006) *J Chrom A* 1116 193-203
34. Lam MW, Young CJ, Brain RA, Johnson DJ, Hanson MA, Wilson CJ, Richards SM, Solomon KR and Mabury SA (2004) *Environ Toxicol Chem* 23: 1431-1440
35. Joss A, Keller E, Alder AC, Gobel A, McArdell CS, Ternes T and Siegrist H (2005) *Water Res* 39: 3139-3152
36. Buser HR, Müller M and Theobald N (1998) *Environ Sci Technol* 32: 188-192
37. Metcalfe CD Koenig BG, Bennie DT, Servos M, Ternes TA and Hirsch R (2003) *Environ Toxicol Chem* 22: 2872-2880

Figure captions

Figure 1: Molecular structures of compounds of interest.

Figure 2: Recoveries of quantification of pharmaceutical compounds by GC-MS analysis.

Figure 3: Yields of extraction for different pH conditions (C18 cartridges, elution solvent methanol). For abbreviation of names of compounds, see Table 1.

Figure 4: Yields of extraction for different types of solvent and two kinds of sorbent.

(a) acidic compound group

(b) neutral compound group

For abbreviations of names of compounds, see table 1.

Figure 5: Recoveries of purification step in function of percentage of methanol in solvent.

Figure 6: Effects of the conservation of samples as eluate at 4 °C.

Figure 7: Recoveries in different conditions of storage.

(a) on natural spiked water

(b) on surface water

(c) on wastewater

Figure 8: Map of the Seine estuary. Black points correspond to sampling of surface waters in the estuary and asterisks to WWTP effluents. pK is for kilometric point and gives the exact location of the sampling.

Figure 9: Comparison between spectrum obtained from the standard compound (a) and from natural sample (b) (STEP of Elbeuf, September 2002).

Table captions

Table 1: GC-MS parameters (retention times, molecular weight and monitored masses for pharmaceuticals investigated).

Pyrene and 1-hydroxypyrene are the internal standards.

Table 2: Occurrence of selected pharmaceuticals in surface water and WWTP effluent in the Seine estuary (n=3).

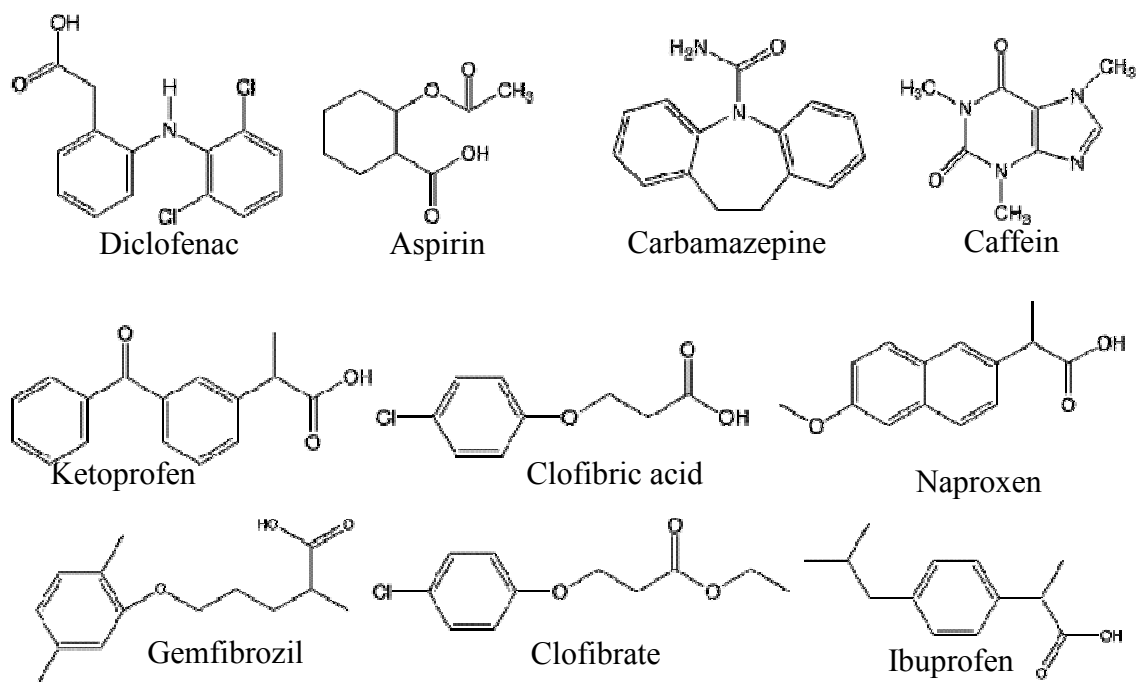


Figure 1: Molecular structures of compounds of interest.

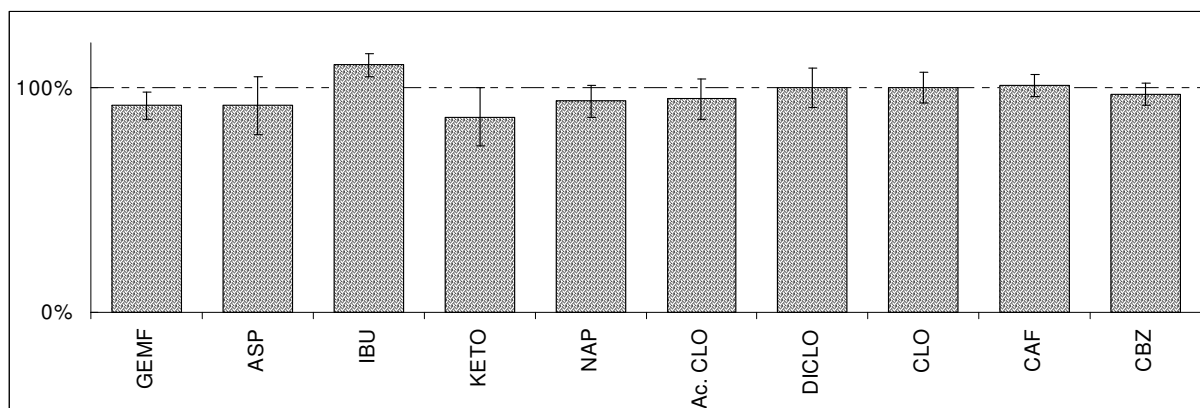


Figure 2: Recoveries of quantification of pharmaceutical compounds by GC-MS analysis.

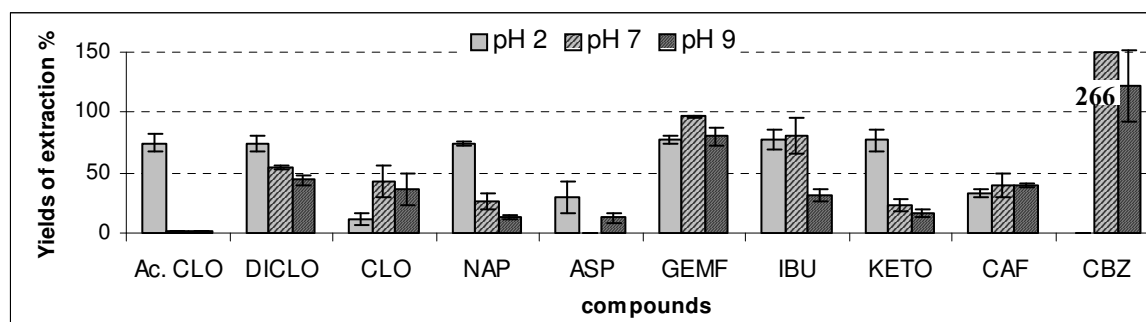


Figure 3: Yields of extraction for different pH conditions (C18 cartridges, elution solvent methanol). For abbreviation of names of compounds, see Table 1.

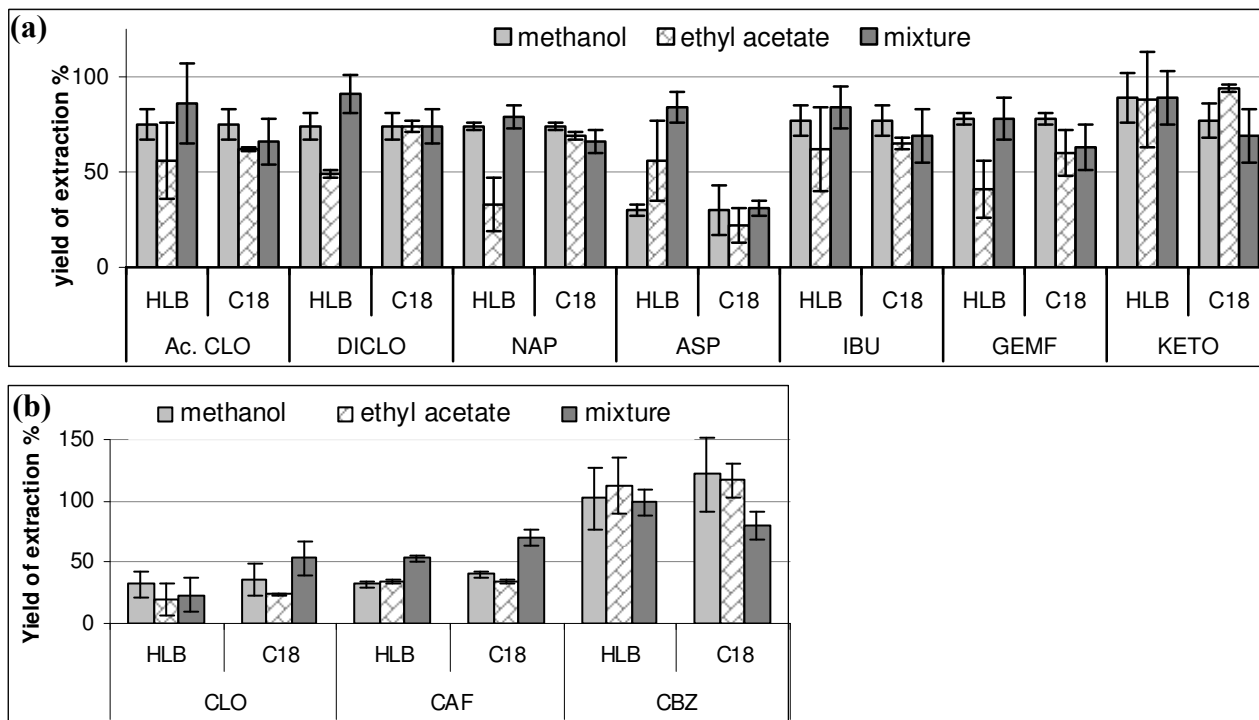


Figure 4: Yields of extraction for different types of solvent and two kinds of sorbent.

(a) acidic compound group

(b) neutral compound group

For abbreviations of names of compounds, see table 1.

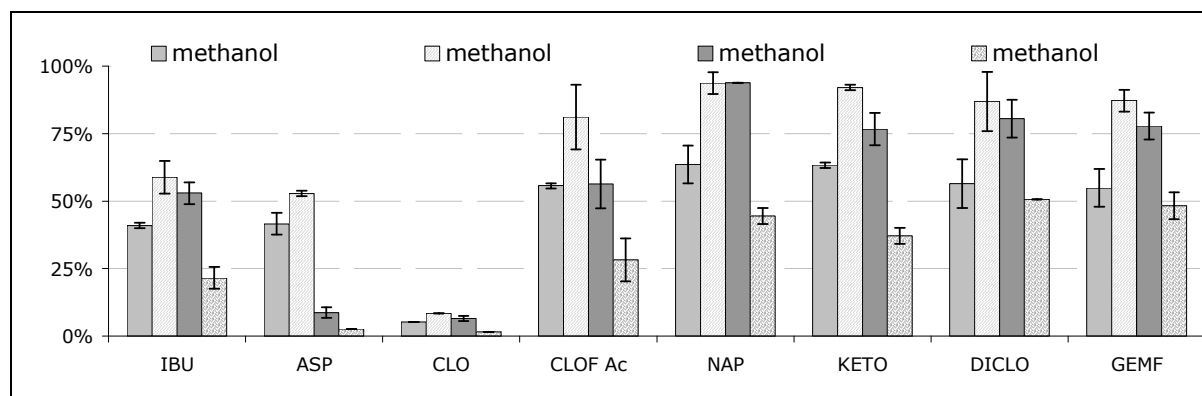


Figure 5: Recoveries of purification step in function of percentage of methanol in solvent.

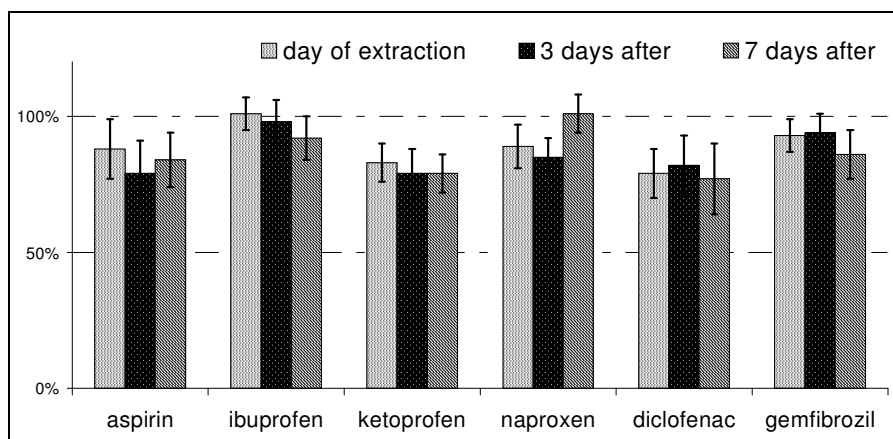


Figure 6: Effects of the conservation of samples as eluate at 4°C.

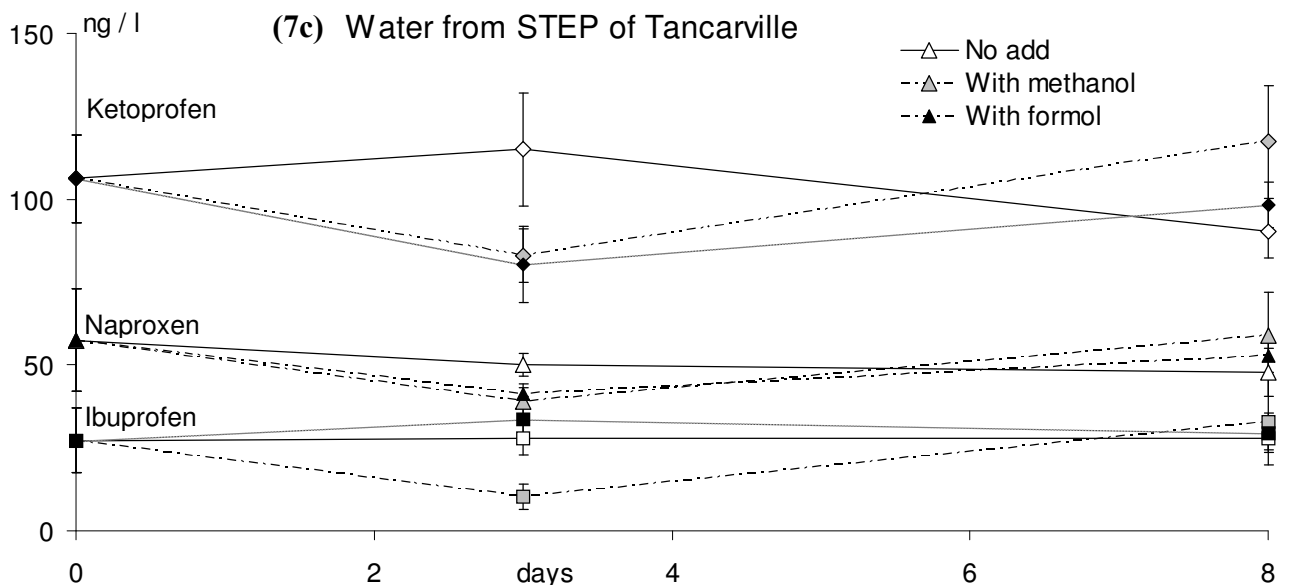
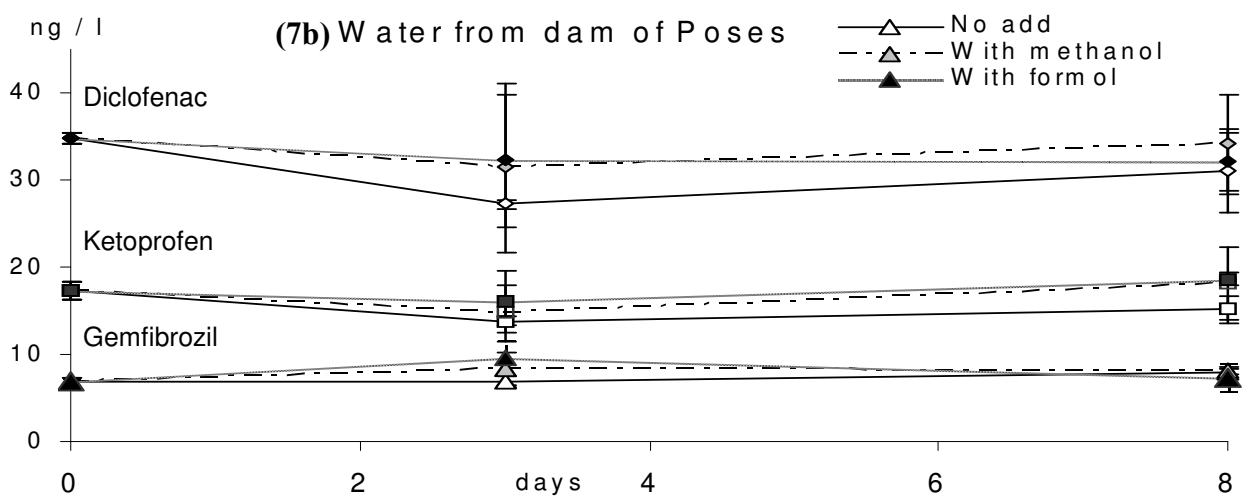
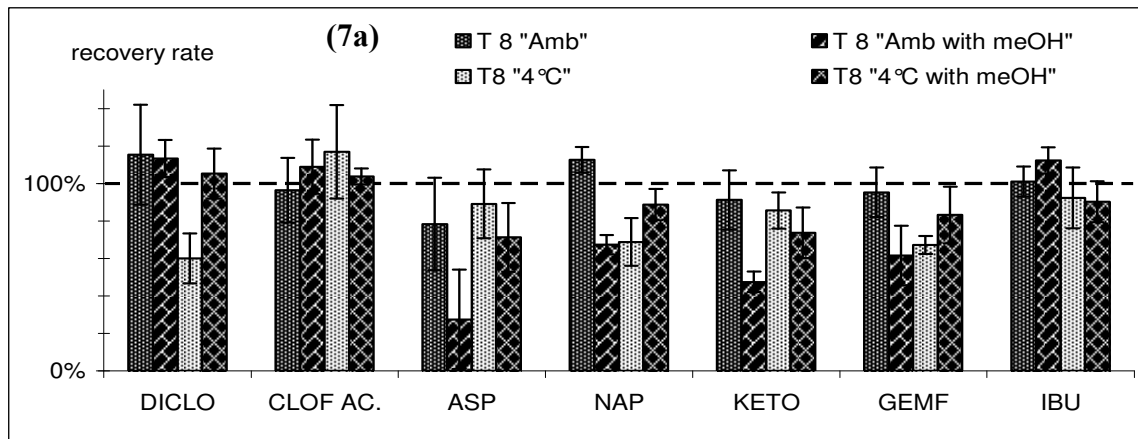


Figure 7: Recoveries in different conditions of storage.
 (a) on natural spiked water
 (b) on surface water
 (c) on wastewater

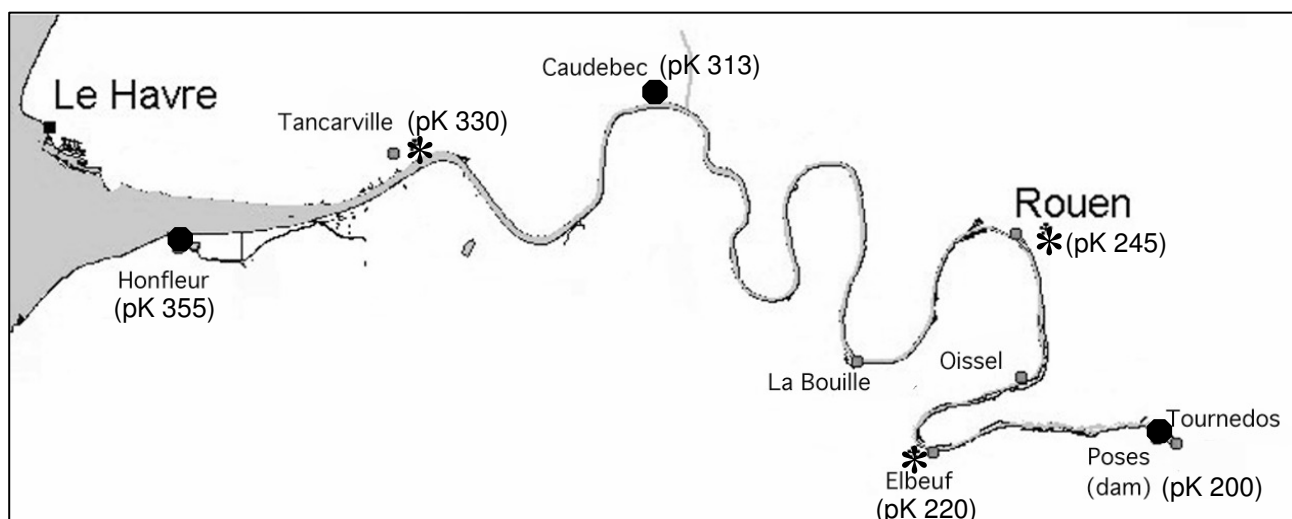


Figure 8: Map of the Seine estuary. Black points correspond to sampling of surface waters in the estuary and asterisks to WWTP effluents. pK is for kilometric point and gives the exact location of the sampling.

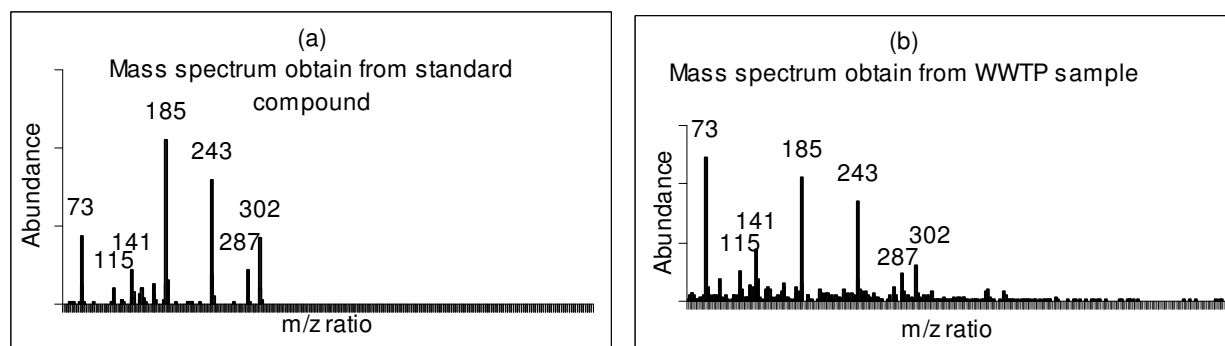


Figure 9: Comparison between spectrum obtained from the standard compound (a) and from natural sample (b) (STEP of Elbeuf, September 2002).

**Table 1: GC-MS parameters (retention times, molecular weight and monitored masses for pharmaceuticals investigated).
Pyrene and 1-hydroxypyrene are the internal standards.**

| Compounds | Abbreviation | Molecular weight (g/mol) | Retention time (min.) | m/z for SIM | Analytical LOD (pg injected) | Extrapolated detection limit (ng.l ⁻¹ of water) |
|------------------------|--------------|--------------------------|-----------------------|-------------|------------------------------|--|
| Carbamazepine | CBZ | 236 | 18.60 | 193 | 40 | 2.5 |
| Caffein | CAF | 194 | 15.30 | 194 | 10 | 0.7 |
| Clofibrate | CLO | 242 | 12.20 | 128 | 16 | 1.5 |
| <u>Pyrene</u> | | 202 | 20.6 | 202 | | |
| Clofibric acid | AC CLO | 214 | 11.95 | 128 | 17 | 1.0 |
| Aspirin | ASP | 180 | 11.50 | 195 | 10 | 0.6 |
| Ibuprofen | IBU | 206 | 12.60 | 160 | 7 | 0.4 |
| Gemfibrozil | GEMF | 250 | 16.40 | 201 | 15 | 0.9 |
| Ketoprofen | KETO | 254 | 18.80 | 282 | 16 | 0.9 |
| Naproxen | NAP | 230 | 17.30 | 185 | 14 | 0.9 |
| Diclofenac | DICLO | 295 | 20.30 | 214 | 10 | 0.5 |
| <u>1-Hydroxypyrene</u> | | 218 | 21.30 | 290 | | |

Table 2: Occurrence of selected pharmaceuticals in surface water and WWTP effluent in the Seine estuary (n=3).

| Sampling station (pK) | Sampling month | Concentration (ng.l ⁻¹) | | | | | | | |
|--|----------------|-------------------------------------|---------------|-------------|---------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| | | ASP | DICLO | GEMF | IBU | KETO | NAP | CBZ | CAF |
| Surface waters (LOQ) in ng.l ⁻¹ | | 1.6 | 2.2 | 2.2 | 2.0 | 2.4 | 2.6 | 0.8 | 1.3 |
| Poses (kp 200) | March | 9.8 ± 1.3 | 7.1 ± 0.2 | 5.9 ± 0.7 | 17.0 ± 2.5 | 14.7 ± 1.2 | 29.2 ± 2.8 | 29.0 ± 1.1 | 85.8 ± 6.4 |
| | May | <1.6 | 115.6 ± 22.8 | 34.8 ± 11.5 | 175.8 ± 59.2 | 4.4 ± 0.4 | 274.6 ± 64.7 | 13.6 ± 1.1 | 126.1 ± 26.2 |
| | July | 85.8 ± 20.2 | 103.2 ± 19.9 | 85.8 ± 20.2 | 610.6 ± 148.2 | 10.6 ± 0.9 | 161.3 ± 31.5 | 19.3 ± 1.5 | 103.2 ± 19.9 |
| | September | 3.4 ± 0.3 | 55.1 ± 6.4 | 21.5 ± 2.5 | 45.1 ± 4.4 | <2.4 | 30.4 ± 1.8 | 82.7 ± 13.2 | 64.3 ± 15.8 |
| | November | 6.2 ± 2.8 | 34.8 ± 0.6 | 6.8 ± 0.5 | 32.0 ± 6.1 | 17.3 ± 1.0 | 22.0 ± 1.1 | 3.3 ± 1.3 | 14.0 ± 3.8 |
| Caudebec (kp 313) | March | 2.5 ± 0.3 | 9.6 ± 0.9 | 2.7 ± 0.5 | 5.2 ± 1.8 | 4.7 ± 0.6 | 32.5 ± 3.8 | 26.8 ± 2.4 | 65.9 ± 2.2 |
| | May | 27.1 ± 3.0 | 172.5 ± 32.0 | 84.3 ± 2.8 | 111.7 ± 4.8 | <2.4 | 175.0 ± 19.6 | 27.1 ± 3.0 | 137.8 ± 32.7 |
| | July | 5.1 ± 1.2 | 38.8 ± 1.6 | 39.7 ± 16.8 | 122.9 ± 4.0 | 13.2 ± 3.3 | 42.1 ± 7.7 | 13.9 ± 2.6 | 4.0 ± 0.1 |
| | September | 3.4 ± 0.5 | 25.6 ± 4.7 | 12.3 ± 1.5 | 4.7 ± 0.7 | <2.4 | <2.6 | 62.7 ± 1.7 | 123 ± 2.3 |
| | November | 6.4 ± 0.7 | 39.1 ± 4.5 | 7.6 ± 0.6 | 38.7 ± 5.5 | 11.9 ± 0.8 | 16.7 ± 0.7 | 6.7 ± 0.2 | 159.8 ± 27.1 |
| Honfleur (kp 355) | March | <1.6 | 7.7 ± 1.3 | <2.2 | 3.0 ± 1.0 | 6.2 ± 1.3 | 7.2 ± 1.7 | 6.1 ± 0.8 | 41.1 ± 2.5 |
| | May | 14.4 ± 5.8 | 63.4 ± 13.4 | 43.2 ± 4.8 | 21.6 ± 4.1 | 33.2 ± 1.7 | 30.2 ± 3.5 | - | - |
| | July | 6.1 ± 3.9 | 16.7 ± 6.7 | 16.7 ± 6.8 | 10.7 ± 2.1 | 13.4 ± 2.4 | 4.1 ± 0.2 | 12.4 ± 1.5 | 3.5 ± 0.3 |
| | September | <1.6 | 26.4 ± 1.9 | 7.3 ± 0.4 | <2.0 | <2.4 | <2.6 | 41.2 ± 4.2 | 26.8 ± 8.8 |
| | November | <1.6 | 15.1 ± 1.0 | <2.2 | 3.0 ± 0.3 | 8.1 ± 0.6 | 2.6 ± 0.5 | 1.8 ± 0.6 | 14.9 ± 2.9 |
| Wastewaters (LOQ) in ng.l ⁻¹ | | 2.6 | 4.0 | 3.3 | 5.8 | 3.9 | 4.2 | 1.6 | 2.3 |
| Elbeuf WWTP (kp 220) | May | 12.0 ± 6.5 | 281.9 ± 118.5 | 77.6 ± 36.1 | 61.3 ± 26.5 | 1136.5 ± 497.1 | 2666.8 ± 87.3 | - | - |
| | July | 56.2 ± 12.7 | 30.5 ± 6.7 | 24.5 ± 2.9 | 73.3 ± 3.8 | 120.9 ± 13.3 | 417.5 ± 25.3 | 30.9 ± 7.8 | 246.2 ± 23.5 |
| | September | <2.6 | 35.8 ± 3.8 | 15.7 ± 9.8 | 6.7 ± 2.3 | 37.2 ± 9.0 | <4.2 | 858.2 ± 89.8 | 38.2 ± 3.2 |
| | November | <2.6 | 59.8 ± 5.0 | 6.4 ± 4.8 | <5.8 | 33.6 ± 2.2 | 13.6 ± 1.2 | 319.1 ± 203.3 | 59.1 ± 8.1 |
| Rouen WWTP (kp 245) | March | 211.5 ± 4.9 | 125.7 ± 6.1 | 108.8 ± 1.9 | 197.6 ± 10.1 | 364.8 ± 11.2 | 302.1 ± 2.8 | 249.2 ± 4.3 | 3257.2 ± 270.2 |
| | May | 8.1 ± 2.1 | 555.5 ± 33.4 | 28.8 ± 2.5 | 5.4 ± 1.5 | 157.0 ± 30.1 | 66.4 ± 2.3 | 320.0 ± 211.4 | 119.8 ± 29.5 |
| | July | 23.6 ± 11.1 | 498.7 ± 26.4 | 23.1 ± 3.1 | 102.5 ± 22.9 | 130.2 ± 8.8 | 64.8 ± 3.7 | 145.3 ± 7.8 | 19.4 ± 1.2 |
| | September | <2.6 | 271.6 ± 55.2 | 9.4 ± 2.4 | 2.4 ± 0.2 | 15.2 ± 1.8 | 17.8 ± 4.1 | 742.4 ± 51.1 | 16.7 ± 1.9 |
| | November | 15.3 ± 2.3 | 609.1 ± 36.7 | 39.1 ± 1.1 | 12.0 ± 1.2 | 80.9 ± 5.1 | 53.4 ± 0.4 | 250.3 ± 99.1 | 15.9 ± 3.1 |
| Tancarville WWTP (kp 330) | May | 4.1 ± 2.5 | 918.6 ± 73.3 | 62.3 ± 15.5 | 20.1 ± 2.0 | 733.1 ± 160.4 | 133.2 ± 39.5 | 667.3 ± 94.1 | 815.2 ± 131.6 |
| | July | 4.9 ± 2.1 | 181.4 ± 26.6 | 7.6 ± 2.1 | 95.0 ± 15.0 | 172.7 ± 25.8 | 54.2 ± 14.2 | 112.9 ± 12.2 | 2.6 ± 0.3 |
| | September | <2.6 | 26.3 ± 9.7 | <3.3 | 7.2 ± 1.7 | <3.9 | 13.6 ± 2.4 | 2519.3 ± 147.6 | 126.3 ± 13.5 |
| | November | 8.6 ± 2.0 | 587.4 ± 91.5 | 4.3 ± 2.4 | 27.2 ± 9.7 | 106.2 ± 13.2 | 57.5 ± 15.5 | 399.8 ± 92.9 | 43.4 ± 20.0 |

Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples

Anne Togola and H  l  ne Budzinski
LPTC, UMR 5472 CNRS, University of Bordeaux 1, 351 crs de la Lib  ration,

33405 TALENCE, FRANCE * corresponding author

h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

KEYWORDS: Gas chromatography mass spectrometry (GC–MS); Pharmaceuticals; Multi-residue analysis ; Urban wastewaters; Marine waters; Drinking waters; Surface waters; Solid phase extraction (SPE)

ABSTRACT

Pharmaceutical compounds are nowadays an emerging group of organic pollutants in aquatic systems. Several methodologies have already been published to measure these pollutants in the environment, showing the difficulties to take into account the various compounds belonging to numerous therapeutical and chemical groups. In order to develop environmental monitoring, there is a need for a less costly and time-consuming multi-component procedure.

The work presented here deals with the development of an extraction procedure that makes it possible to measure at trace level (ng.l^{-1}) many pharmaceuticals belonging to very different chemical classes: anti-inflammatory drugs, antidepressants, hypolipidic drugs...

The reliability and sensitivity have been tested on 18 different compounds (7 neutral compounds and 11 acidic drugs) extracted simultaneously and analyzed by GC-MS. This optimized procedure has been applied in two very different areas: first, the Cortiou rocky inlet, in the Mediterranean Sea (South coast of France), highly impacted by the Marseilles wastewater treatment plant effluent and secondly the H  rault watershed by studying drinking water, surface water and wastewater. In both cases, the level of pharmaceuticals was totally unknown. Those applications have demonstrated the multi-residue but also multi-matrix characteristics of the developed method.

INTRODUCTION:

Pharmaceuticals are a part of emerging pollutants, a topical issue which gains in importance nowadays. These synthetic compounds have been created to be biologically active and to bring therapeutic benefits to users. Unfortunately, as a result of their use, these last few years these compounds have been found in aquatic systems, in sewage treatment plant effluents [1, 2] as well as in surface waters [3] even sometimes for some products, in drinking waters [4].

This more and more common presence has prompted researchers to identify the effects that these compounds could have on non-target species [5, 6] and to develop chronic exposure risk assessment on aquatic organisms [7] as well as on human beings [8,9].

As a first step we need to have an assessment of aquatic environment contamination and to obtain data concerning organism exposure levels [10].

The quantification of pharmaceuticals in human biological matrix such as blood, plasma or urine [11] has been developed for a long time. But similar developments concerning pharmaceuticals in natural waters are still under investigation for two reasons: these compounds are present at low levels and as very complex mixtures of dozens of different molecules. Only one study has been reported which can simultaneously extract different therapeutic groups in one extraction [12], particularly focused on antibiotics and steroids and using HPLC-MS-MS analyses.

The difficulties in measuring this kind of compounds are numerous. Indeed pharmaceuticals are chosen for therapeutic effectiveness and belong to numerous different chemical classes. If solid phase extraction is more and more used as an extraction technique for measurement for water samples, getting a large spectrum of structural and chemical properties is relatively difficult, especially when considering the requirement to work at trace levels and the large number of different chemical classes.

Some studies have already presented very efficient analytical procedures designed for specific pharmaceutical classes [13]. Some other procedures have allowed to measure pharmaceuticals at trace levels but with very tedious extraction procedures [14] and large extraction volumes, reducing the number [8] of analyzed samples which makes the environmental screening difficult to achieve [15]. Furthermore, environmental applications require robust and sensitive procedures, permitting to measure pharmaceuticals at trace levels, more particularly in drinking waters and the largest possible number of compounds to increase the knowledge about this type of multi-compound contamination.

The work presented here deals with the development of an extraction procedure that makes it possible to measure at trace level (ng.l^{-1}) many pharmaceuticals belonging to very different chemical classes: anti-inflammatory drugs, antidepressants, hypolipidic drugs... The reliability and sensitivity have been tested on 18 different compounds (7 neutral compounds and 11 acidic drugs) extracted simultaneously and analyzed with GC-MS. The choice of two environmental areas with different water properties and potential contamination has been made to validate this multi-residue and multi-matrix procedure. First, the Hérault watershed was studied including wastewaters as well as surface waters and spring waters dedicated to human consumption, with low pharmaceutical levels. On the other hand, seawaters, highly contaminated by the Marseilles wastewater treatment plant effluent [16] and with a high organic matter content, have been monitored in the Cortiou rocky inlet, in the Mediterranean Sea (Marseilles area, South coast of France).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Pharmaceutical products (presented in Table 1) as well as pyrene and 1-hydroxypyrene, used as recovery determination standards were purchased from Sigma

Aldrich (St Quentin Fallavier, France; purity > 98%). Deuterated products (diazepam d5, amitriptyline d6 and nordiazepam d5) were purchased from Euriso-Top (St Aubin, France, purity > 98 %). Acetone, ethyl acetate and methanol (HPLC reagent grade, Scharlau) were purchased from ICS (Belin-Beliet, France). Hydrochloric acid 37% (reagent grade) and phosphoric acid 85% (reagent grade) were obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Ultrapure water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). 60 mg Oasis MCX cartridges were purchased from Waters (St Quentin en Yvelines, France).

MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, purity > 97% from Acros Organics (Noisy-le-Grand, France)) was used as the derivatizing reagent for GC-MS analyses. Whatman GFF glass fibre filters (pore size 0.7µm) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France) and Atlantic Labo (Eysines, France).

Solid phase extraction

Raw water was filtered on GFF filters to separate dissolved phase and particles. For natural waters, 1 l was filtered; for Wastewater Treatment Plant Effluent (WWTP effluent), 500 ml were used for each extraction. pH adjustment was made just before extraction processes at pH 2 with HCl (3.5 M) and internal standards (25 µl to 50 µl of a methanolic mixture containing 1 µg.g⁻¹ of each standard) were added to the samples.

SPE cartridges were conditioned subsequently with 3 ml of ethyl acetate and 3 ml of milliQ-water at adjusted pH 2. Water was percolated under vacuum at a flow rate of 12 to 15 ml.min⁻¹. Cartridges were dried under vacuum for 1 h. After elution with three successive solvents, respectively 3 ml of ethyl acetate, 3 ml of ethyl acetate/acetone (50/50; v/v) and 3 ml of ethyl acetate/acetone/ammonium hydroxide (48/48/2; v/v/v), the samples were completely evaporated under nitrogen and transferred into GC injection vials in 50 to 100 µl of ethyl acetate. For recovery control, pyrene was added to the final extracts for neutral compounds before GC-MS analysis and 1-hydroxypyrene was added to the final extracts for acidic compounds before the derivatization step, consisting in adding 30 µl of MSTFA before incubation at 65 °C.

All additions of matrix, standards, solvents or reagents were gravimetrically controlled. Blanks were performed for each batch experiment in order to prevent any contamination. No compounds have been found in blank samples.

GC-MS analysis

GC-MS analyses were carried out using an HP 6890 gas chromatograph from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). The capillary column was an HP5/MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness; phase : 5% diphenyl, 95% dimethylsiloxane) from Bios Analytique (L'Union, France). Samples were injected (1 µl) into the GC in splitless mode at 250°C using an HP 6890 series injector. The carrier gas was ultrapure helium (99.99990%, Linde Gas, Bassens, France) set at constant flow mode (1.3 ml/min). For GC separation, the temperature program started at 70°C (held for 2 min.), set at 10°C per min. to 250°C and then was held isothermally at 250°C for 5 min. The gas chromatograph was coupled to an HP 5973N mass selective detector (LMSD, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), operated under electronic impact (EI) mode at 70 eV using scan mode (from 50 to 600 amu, 2.69 scan.s⁻¹) and single ion monitoring mode at 1.67 scan.s⁻¹ (dwell time 70 ms). The transfer line, source and quadrupole temperatures were 280, 230 and 150°C, respectively.

Analytical development

Elution on MCX cartridges has been tested with three successive elutions, respectively 3 ml of ethyl acetate, 3 ml of ethyl acetate/acetone (50/50; v/v) and 3 ml of ethyl acetate/acetone/ammonium hydroxide (48/48/2; v/v/v). This experiment has been

compared with optimized C18 and Oasis HLB extraction procedures (elution with 9 ml of ethyl acetate/acetone (50/50; v/v)) already developed and validated [17].

To allow the quantification of the different compounds, the use of several internal standards has also been investigated. The accuracy of the quantification method and the recovery of internal standard extraction have been evaluated with direct injections of solutions in ethyl acetate and on spiked samples.

Each compound has been first characterized individually in scan mode in order to identify the main ions (m/z ratio) constituting the mass spectrum and to choose the ions for the quantification methods (Table 1). After preparing individual mother standard solutions in methanol ($10 \mu\text{g.g}^{-1}$) stored at 4°C , diluted mixtures have been prepared in ethyl acetate ($1 \mu\text{g.g}^{-1}$ for each compound). For acidic compounds, detection has also been investigated after the derivatization step with *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA). For this purpose, the solution has been kept for 35 minutes in an oven at 65°C after adding $30 \mu\text{l}$ of MSTFA.

Environmental analysis

A sampling campaign was conducted in April 2004 in the Hérault watershed. This area has been chosen in order to compare with other works concerning the potential contamination of the waters of this area by anthropic effluents characterized for some of them by the occurrence of gadolinium, a pharmaceutical residue of Magnetic Resonance Imaging (MRI) analysis [18]. Three kinds of water have been sampled: 3 sewage treatment plant wastewater samples, 6 surface water samples and 6 tap water samples. All sampling stations are presented in Figure 1. Spring water samples have been collected just before the chlorination process. The limits of detection of water have been calculated on the three kinds of water.

The Cortiou rocky inlet is located near Marseilles (France), in the Mediterranean Sea. The effluent of the Marseilles city wastewater treatment plant (1,300,000 population equivalents) which undergoes no biological treatment pollutes this area. Several samples have been collected in the effluent plume (Figure 2) to investigate the influence area of the effluent.

Water samples have been collected in amber glass bottles, previously detergent washed, acid rinsed and heated at 450°C for 6 hours. The samples were filtered on GFF fiber filters immediately after collection and pharmaceutical extraction was done during the day of sampling.

RESULTS AND DISCUSSION

GC-MS analysis

GC-MS tests have been done in SCAN mode in order to choose the quantification ions. The compounds have been separated into two groups: neutral and acidic compounds. The neutral compound group (caffeine, carbamazepine, amitriptyline, imipramine, doxepine, nordiazepam and diazepam) is directly injected. Compounds with one or more acidic functional groups require a derivatization step in order to improve chromatographic performances.

Among the tested derivatizing products and derivatization conditions [19], it has been chosen to use $30 \mu\text{l}$ of MSTFA per sample and to keep the samples for 35 minutes at 65°C before injection, considering the abundance of ions, the repeatability and robustness of this procedure.

Therefore, each sample has first been analysed by GC-MS before the derivatization step, then reinjected after derivatization using a second GC-MS method. Both chromatographic methods are similar; diazepam that presents the same main fragment and responses using both methods is used to compare the two injections.

Ions (m/z ratios) chosen for quantification, molecular weights and linearity coefficients (between 2 pg and 5 ng injected) obtained for GC-MS analyses are presented in Table 1, with the chemical structures of studied pharmaceuticals.

Quantification

All available deuterated standards have been used for quantification. Paracetamol d4 and diazepam d5 have been tested for acidic compound quantification and diazepam d5, amitryptilin d6, nordiazepam d5 and caffeine C13 for the neutral group. Pyrene and 1-hydroxypyrene have been used for quantification of deuterated compounds ("syringe" standards).

Concerning acidic compounds, the rates of quantification for standard solutions obtained using diazepam d5 are between 74% and 115% with RSDs between 0% and 20% (Figure 3).

Some quantification problems on some compounds, as well as high RSDs going up to 20% for salbutamol, are mainly due to derivatization problems. Indeed for clenbuterol, salbutamol, and terbutaline different derivatives are formed [20] but not in reproducible conditions.

In the case of neutral compounds, reproducible optimum quantification results have been obtained (see Figure 3). Different deuterated compounds have been selected depending on best recoveries, that is nordiazepam d5 for nordiazepam quantification ($100 \pm 5\%$), diazepam d5 for diazepam, carbamazepine and caffeine (respectively $100 \pm 4\%$, $99 \pm 4\%$ and $75 \pm 3\%$), and amitryptiline d6 for amitryptiline, imipramine and doxepine (respectively $88 \pm 4\%$, $93 \pm 3\%$ and $87 \pm 2\%$).

Pyrene (for neutral compounds) and 1-hydroxypyrene (for acidic ones) are used as syringe standards in order to quantify internal standards (diazepam d5, amitryptiline d6 and nordiazepam d5) and calculate recoveries (Figure 4). The results that have been obtained (between $86 \pm 5\%$ and $110 \pm 5\%$) make it possible to use pyrene and 1-hydroxypyrene as standards for controls of pharmaceutical extraction rates.

Solid phase extraction

Recoveries for MCX extraction procedures

Combined extraction using MCX cartridges have given high recovery values, presented in Table 2. The obtained values ranged between $54 \pm 12\%$ (for terbutaline) and $120 \pm 6\%$ (carbamazepine), with an average of 88 %.

Comparison with C18 extraction

The previous procedure used until then [17] permitted only to extract separately the acidic and neutral groups, by using two kinds of cartridges (C18 for the neutral group and HLB for the acidic one). The new methodology is also more interesting from a practical point of view. Furthermore, neutral compound recovery rates have been widely enhanced, more particularly as regards doxepine and imipramine that were not extracted at all with the previous procedure using C18 cartridges. Table 2 shows recovery rates depending on solvents and sorbents. Figure 5 shows compared results between two similar wastewater samples coming from a WWTP effluent analyzed by the two methods: the procedure using C18 and HLB cartridges and the combined procedure with MCX cartridges. Results show a good similarity between both measured concentrations, that allows the use of the new procedure, easier to manage, more efficient for some compounds and less costly and time consuming than the previous one.

Internal standard selection

Caffeine C¹³ and paracetamol d⁴ have not been selected as internal standards: even if the quantification results are correct, the successive steps, especially the evaporation one, lead to significant and not reproducible losses (Figure 6). For diazepam

d⁵, amitryptiline d⁶, nordiazepam d⁵, recoveries are the same as those of non-labeled compounds.

Repeatability and reproducibility

Repeatability and reproducibility have been tested in order to assess the extraction procedure reliability. Repeatability measured on 6 independent replicates, fluctuates between 3% (for aspirin) and 26% (for clenbuterol). Reproducibility fluctuates between 2 and 11% on triplicates for neutral compounds and between 1 and 17% for the acidic group, with higher value for clenbuterol (17%).

In both cases, the compounds for which the protocol is the less reliable are paracetamol, clenbuterol, terbutaline and salbutamol. This weakness is partly due to the GC-MS step, due to difficulties during the derivatization step as explained previously, especially highlighted in natural samples, due to the occurrence of numerous interfering compounds that disturb derivatization.

This procedure is robust and repeatable, also applicable to environmental samples and allows single determination for each studied sample, which is important considering environmental monitoring at large scale.

Environmental implementation

The different kinds of water studied present various organic matter contents and matrix complexity. The limits of detection are very different depending on the origin and kind of water. They vary between 0.1 and 1.5 ng.l⁻¹ for tap water, between 0.1 and 2.5 ng.l⁻¹ for surface water and between 3.2 and 28 ng.l⁻¹ for wastewater, with variability depending on compounds, presented in Table 3. These low detection levels permitted to quantify pharmaceuticals in the two studied environments.

The minimal and maximal measured values in the case of the Hérault watershed are presented in Table 4 showing the sensitivity of the developed procedure. Compared with other studies these values are below detection limits generally obtained using GC-MS analyses [21] or even LC-MS-MS [22]. Currently, LC-MS-MS and GC-MS-MS analyses give lower detection limits (below 1 ng.l⁻¹) [23] but need more methods optimization and are more complex to implement. Especially for LC-MS-MS analyses, some difficulties linked to interfering compounds can occur, such as matrix interferences and signal suppression [24].

Comparing with other studies which try to develop multi-residue analytical protocols [12], this optimized procedure has been applied to several kinds of waters showing its multi-matrix property. Using an easy to use GC-MS analyzer allows less costly and easier environmental monitoring than HPLC-MS-MS or GC-MS-MS analysis.

Concerning the Hérault watershed, results have shown a real contamination of the WWTP effluents but also of the surface waters and tap waters (Table 4). Close connection between WWTP and the tap water collecting station can explain this occurrence [25], already demonstrated in other publications [26, 27]. The use of a single extraction procedure for all samples, sensitive and robust whatever the typed sample, irrespective of concentration levels and water sample physico-chemical properties is an important advance in environmental monitoring. This can allow to monitor environmental areas, without previous knowledge of contamination levels or other characteristics, as is needed for first environmental screening.

Concerning the Cortiou rocky inlet (Figure 7), the measured values are interesting for several reasons. Marseilles wastewater treatment plant has an important capacity (85,500,000 m³ treated and 1,300,000 population equivalents), without secondary treatment. In France, it is the most important station of this kind, allowing evaluation of WWTP effluent in the worst conditions. This station should be renovated in 2007; the results obtained here allow future comparison studies and monitoring of remediation processes.

Some compounds, rarely found in surface water as well as in wastewater effluents have been measured around 10 ng.l^{-1} , especially for amitriptyline, diazepam and nordiazepam, as antidepressants. The high concentration level of treated wastewaters is explained by the relationship between pharmaceutical consumption and occurrence in effluent. Considering 1,300,000 inhabitants, the number of antidepressant consumers is high, increasing the content of those drugs in effluent and then allowing their detection. For the same reasons, very high amounts of non-prescribed drugs have been measured, such as aspirin ($8 \text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$), caffeine ($8 \text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$), but above all paracetamol ($200 \text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$). The degradation of these three compounds is highly related to biological treatment efficiency in wastewater treatment plants [28, 29]. In the absence of biological treatment in the Marseilles WWTP, high concentrations of those compounds are thus measured in the effluent.

Concerning the plume of dilution of the effluent and its impact on the Cortiou rocky inlet, this preliminary study has focused on the area close to the emissary, more or less 500 meters from the emissary for the remotest stations (stations 5 and 6). Currents influence the plume of dilution and carry effluents towards one side more than towards the other. This very important effluent, introduced into a semi-open aquatic system, poorly submitted to dilution phenomena can present a high environmental risk for aquatic organisms living in the area. Considering the first results presenting the occurrence of antidepressants in fish living in an effluent-dominated stream [30], studies focusing on fish exposure and toxicological impact related to this exposure need to be undertaken.

CONCLUSIONS

This procedure, using MCX solid phase extraction is at the same time quick and semi-automatic, allowing numerous sample processing, reliable, robust and reproducible for drinking water, surface water as well as wastewaters. A protocol allowing to measure 18 different compounds, belonging to 5 therapeutic groups and having important differences in chemical structure has been developed and has been proven to be very interesting for environmental screening.

The obtained results have shown that the developed tool ensures to follow aquatic environment contamination whatever the water physico-chemical characteristics are. The low levels of detection limits obtained for this optimized procedure make it possible to quantify those compounds in little contaminated environments, such as drinking water, seawater or other environments. Results have highlighted the contamination of two sensitive systems, the Cortiou rocky inlet and the Hérault watershed. These results are among the first showing those high concentration levels in sea water and drinking water. Compared with other studies, this procedure is faster and easier to manage, considering the simultaneous extraction of all pharmaceutical compounds studied. This protocol stands comparison with other extraction processes using multiple extraction steps [13, 22, 31] or using complex and costly analysis apparatus [12]. By using this process, impacted areas have been discovered, presenting potentially human health risks, if we consider concentration measured in drinking water or environmental risks considering the Cortiou rocky inlet situation.

Within the limits of current knowledge, risk assessment does not indicate toxic risk, especially concerning human exposure [32, 33]. As regards aquatic organism exposure, research advances need to be more important before a real risk assessment, particularly if we consider long time exposure at environmental concentration levels.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge financial support from the "Région Aquitaine", the Seine Aval and the "GIS ECOBAG" programs for research funding, IFREMER (French Research Institute for Exploitation of the Sea) and Hydrosiences laboratory (UMR 5469, Montpellier) for technical support and sampling campaigns. The authors wish to thank the NFS (National Funding for Science) for providing the PhD grant of A. Togola.

BIBLIOGRAPHY

- [1] M. Farré, I. Ferrer, A. Ginebreda, M. Figueras, Olivella Lourdes, Tirapu Iluis, Vilanova Manel, B. Damia, J. Chrom. A, 938 (2001) 187.
- [2] T. Heberer, J. Hydrol., 266 (2002) 175.
- [3] S. Öllers, H. Singer, P. Fässler, S. Müller, J. Chrom. A, 911 (2001) 225.
- [4] A. Tauxe-Wuersch, L.F. De Alencastro, D. Grandjean, J. Tarradellas, Water Res., 39 (2005) 1761.
- [5] M. Cleuvers, Toxicol. Lett., 142 (2003) 185.
- [6] N. Laville, S. Ait-Aissa, E. Gomez, C. Casellas, Porcher J. M., Toxicology, 196 (2004) 41.
- [7] H. Sanderson, D.J. Johnson, T. Reitsma, R.A. Brain, C.J. Wilson, K.R. Solomon, Regul Toxicol Pharm, 39 (2004) 158.
- [8] O.A.H. Jones, N. Voulvoulis, J.N. Lester, Water Res., 36 (2002) 5013.
- [9] L.J. Schulman, E.V. Sargent, B.D. Naumann, E.C. Faria, D.G. Dolan, J.P. Wargo, Hum. Ecol. Risk Assess., 8 (2002) 657.
- [10] B. Halling-Sorensen, S.N. Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützhof, S.E. Jorgensen, Chemosphere, 36 (1998) 357.
- [11] Snow, J. Chrom. A, 885 (2000) 445.
- [12] S. Castiglioni, R. Bagnati, D. Calamari, R. Fanelli, E. Zuccato, J. Chrom. A, 1092 (2005) 206.
- [13] T.A. Ternes, TrAC 20 (2001) 419.
- [14] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, Environ. Sci. Technol., 36 (2002) 1202.
- [15] S. Weigel, K. Bester, H. Hühnerfuss, J. Chrom. A, 912 (2001) 151.
- [16] L. Sarrazin, C. Diana, T. Schembri, P. Rebouillon, Int. J. Environ. Stud., 61 (2004) 413.
- [17] A. Togola, H. Budzinski, *submitted to Anal. Bioanal. Chem.*, (2006).
- [18] M. Rabiet, F. Brissaud, J.-L. Seidel, S. Pistre, F. Elbaz-Poulichet, Appl. Geochem., 20 (2005) 1587.
- [19] H. Budzinski, M.H. Devier, P. Labadie, A. Togola, Anal. Bioanal. Chem., (2006).
- [20] A. Togola, H. Budzinski, *submitted to Anal. Bioanal. Chem.*, (2006).
- [21] L. Damasceno, R. Ventura, J. Ortuno, J. Segura, J. Mass Spectrom., 35 (2000) 1285.
- [22] T. Kosjek, E. Heath, A. Krbavcic, Environ. Int., 31 (2005) 679.
- [23] T.A. Ternes, M. Bonerz, T. Schmidt, J. Chrom. A, 938 (2001) 175.
- [24] W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, J. Chrom. A, 910 (2001) 69.
- [25] C. Metcalfe, X.S. Miao, B.G. Koenig, J. Struger, Environ. Toxicol. Chem., 22 (2003) 2881.
- [26] M. Rabiet, A. Togola, F. Brissaud, J.L. Seidel, H. Budzinski, F. Elbaz-Poulichet, Environ. Sci. Technol., 40 (2006) 5282.
- [27] B.K. Burnison, A. Hartmann, A. Lister, M.R. Servos, T. Ternes, G. Van Der Kraak, Environ. Toxicol. Chem., 22 (2003) 2243.
- [28] J.A. Pedersen, M. Soliman, I.H. Suffet, J. Agric. Food Chem., 53 (2005) 1625.
- [29] A. Joss, E. Keller, A.C. Alder, A. Gobel, C.S. Mc Ardell, Ternes T., Siegrist H., Water Res., 39 (2005) 3139.
- [30] J.B. Quintana, S. Weiss, T. Reemtsma, Water Res., 39 (2005) 2654.
- [31] B.W. Brooks, C. Kevin Chambliss, J.K. Stanley, A. Ramirez, K.E. Banks, R.D. Johnson, R.J. Lewis, Environ. Toxicol. Chem., 24 (2005) 464.
- [32] T.A. Ternes, M. Bonerz, N. Herrmann, D. Löffler, E. Keller, B.B. Lacida, A.C. Alder, J. Chrom. A, 1067 (2004) 213.
- [33] O.A. Jones, J.N. Lester, N. Voulvoulis, Trends Biotechnol., 23 (2005) 163.
- [34] S. Webb, T.A. Ternes, M. Gibert, K. Olejniczak, Toxicol. Lett., 142 (2003) 157.

Tables captions

Table 1: Studied compounds with various parameters (structure, molecular weight, m/z ratio, internal standards and linearity).

Table 2: Comparison between different solid phase extraction sorbents in the case of spiked water (500 ng.l^{-1} for each compound), (n=6). Abbreviations are given in Table 1.

Table 3: Limits of detection obtained for natural waters (expressed in ng.l^{-1} , for 1 l extracted for tap and surface and saline waters, 500 ml for wastewater effluent).

Table 4: Minimal and maximal values measured in the case of the Hérault watershed samples, expressed in ng.l^{-1} (nd: not detected).

Figure captions

Figure 1: Map of the Herault watershed (a) with sampling sites and zoom on the Lergue river for the study of surface water stations (b).

Figure 2: Map of the rocky Cortiou inlet with sampling stations.

Figure 3: Quantification of pharmaceutical compounds for standard solutions, using internal standards (n=3). Abbreviations are given in Table 1.

Figure 4: Quantification of internal standards by “syringe” standards (n=3). Abbreviations are given in Table 1.

Figure 5: Comparison of both methodologies on natural samples: WWTP effluent. Abbreviations are given in Table 1.

Figure 6: Yields of extraction for deuterated compounds (n=5). Abbreviations are given in Table 1.

Figure 7: Pharmaceutical concentration measured in the Cortiou rocky inlet. Abbreviations are given in Table 1.

Table 1: Studied compounds with various parameters (structure, molecular weight, m/z ratio, internal standards and linearity).

| Compound | Therapeutic group | Chemical structure | MW g.mol ⁻¹ | m/z ratio | Internal standards | R ² |
|---------------------|---|--------------------|------------------------|--|--------------------|----------------|
| Aspirin (ASP) | Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAID) | | 180 | 195 [M _{TMS} -COO-CH ₃] | Diazepam d5 | 0.9958 |
| Ibuprofen (IBU) | | | 206 | 160 [M _{TMS} -COO-TMS] | Diazepam d5 | 0.9953 |
| Ketoprofen (KETO) | | | 254 | 282 [M _{di-TMS} -COO-TMS] | Diazepam d5 | 0.9963 |
| Naproxen (NAP) | | | 230 | 185 [M _{TMS} -COO-TMS] | Diazepam d5 | 0.9934 |
| Paracetamol (PARA) | | | 151 | 206 [M _{TMS} -NH ₂] | Diazepam d5 | 0.9916 |
| Gemfibrozil (GEMF) | Lipid regulator | | 250 | 201 [M _{TMS} -(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₃ -O] | Diazepam d5 | 0.9996 |
| Salbutamol (SALB) | Bronchodilator | | 239 | 369 [M _{tri-TMS} -CH ₂ -NHC(CH ₃) ₃] | Diazepam d5 | 0.9863 |
| Clenbuterol (CLENB) | Bronchodilator | | 276 | 335 [M _{di-TMS} -CH ₂ (CH ₃) ₃] | Diazepam d5 | 0.9908 |
| Terbutalin (TERB) | Bronchodilator | | 225 | 356 [M _{tri-TMS} -CH ₂ -NHC(CH ₃) ₃] | Diazepam d5 | 0.9854 |
| Diclofenac (DICLO) | NSAID | | 295 | 214 [M _{TMS} -COO-TMS-Cl] | Diazepam d5 | 0.9987 |
| Diazepam (DZP) | Antidepressant | | 284 | 256 [M-CH ₂ N] | Diazepam d5 | 0.9989 |

Publications

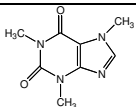
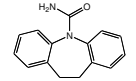
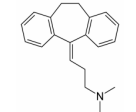
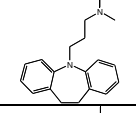
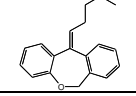
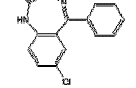
| | | | | | | |
|---------------------|----------------|---|-----|--|------------------|--------|
| Caffeine (CAF) | Stimulant |  | 194 | 194 [M ⁺] | Diazepam d5 | 0.9943 |
| Carbamazepine (CBZ) | Antidepressant |  | 236 | 193 [M-NHCO] | Diazepam d5 | 0.9949 |
| Amitriptyline (AMI) | |  | 277 | 58 fragment [-CH ₂ -N(CH ₃) ₂] | Amitriptyline d6 | 0.9503 |
| Imipramine (IMIP) | |  | 280 | 234, 58 [M-HN(CH ₃) ₂], [-CH ₂ -N(CH ₃) ₂] | Amitriptyline d6 | 0.9558 |
| Doxepine (DOX) | |  | 279 | 58 fragment [-CH ₂ -N(CH ₃) ₂] | Amitriptyline d6 | 0.9677 |
| Nordiazepam (NDZP) | |  | 270 | 242 [M-HCO] | Nordiazepam d5 | 0.9858 |

Table 2: Comparison between different solid phase extraction sorbents in the case of spiked water (500 ng.l⁻¹ for each compound), (n=6). Abbreviations are given in Table 1.

| Compounds | HLB extraction | C18 extraction | MCX extraction |
|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| DICLO | 91±10 | - | 105±5 |
| KETO | 89±14 | - | 106±6 |
| NAP | 79±12 | - | 90±3 |
| ASP | 84±18 | - | 71±12 |
| GEMF | 78±11 | - | 81±1 |
| IBU | 84±11 | - | 80±3 |
| CAF | - | 70±6 | 68±11 |
| DOX | - | 2±0 | 98±9 |
| CBZ | - | 99±11 | 120±6 |
| IMIP | - | 1±1 | 95±5 |
| AMI | - | - | 95±9 |
| PARA | - | - | 76±4 |
| DZP | - | - | 87±3 |
| SALB | - | - | 62±14 |
| CLEN | - | - | 90±17 |
| TERB | - | - | 54±12 |
| DZP | - | - | 104±2 |
| NDZP | - | - | 101±4 |

Table 3: Limits of detection obtained for natural waters (expressed in ng.l-1, for 1 l extracted for tap and surface and saline waters, 500 ml for wastewater effluent).

| | Tap water | Surface water | Marine water | Wastewater effluent |
|---------------|-----------|---------------|--------------|---------------------|
| Amitryptiline | 0.7 | 2.2 | 2.6 | 6.8 |
| Aspirin | 0.2 | 2.1 | 2.1 | 15.0 |
| Caffeine | 1.5 | 2.5 | 2.3 | 28.6 |
| Carbamazepine | 0.8 | 1.4 | 2.2 | 22.3 |
| Clenbuterol | 0.6 | 0.3 | 1.2 | 4.0 |
| Diazepam | 0.4 | 1.4 | 1.9 | 13.8 |
| Nordiazepam | 0.4 | 1.4 | 1.9 | 13.8 |
| Diclofenac | 0.9 | 0.7 | 2.6 | 9.0 |
| Doxepine | 0.7 | 2.1 | 2.4 | 16.6 |
| Gemfibrozil | 0.1 | 0.3 | 1.2 | 3.2 |
| Ibuprofen | 0.1 | 0.1 | 1.7 | 4.8 |
| Imipramine | 0.7 | 1.2 | 1.6 | 12.7 |
| Ketoprofen | 0.3 | 0.7 | 1.8 | 11.6 |
| Naproxen | 0.1 | 1.0 | 2.1 | 6.2 |

Table 4: Minimal and maximal values measured in the case of the Hérault watershed samples, expressed in ng.l-1 (nd: not detected).

| | WWTP effluent (3) | surface water (6) | drinking water (6) |
|---------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Amitryptiline | nd - 6.0 | nd | nd-1.4 |
| Aspirin | 23.5-51.5 | nd | nd |
| Caffeine | 255.1 -2212.7 | 13.0-107.2 | nd-22.9 |
| Carbamazepine | 157.3-293.4 | nd-56.3 | nd-43.2 |
| Clenbuterol | nd-5.9 | nd | nd |
| Diazepam | nd | nd | nd |
| Diclofenac | 210.7-486.4 | 1.36-33.2 | nd-2.5 |
| Doxepine | nd | nd | nd |
| Gemfibrozil | 13.3 -17.2 | nd-2.3 | nd |
| Ibuprofen | 17.7-219.0 | nd-4.5 | nd-0.6 |
| Imipramine | nd | nd | nd |
| Ketoprofen | 21.8-1080.6 | nd-14.5 | nd-3.0 |
| Naproxen | 42.1-289.1 | nd-9.1 | nd-0.2 |
| Nordiazepam | nd-8.3 | nd-2.4 | nd |
| Paracetamol | 108.1-11308.9 | 10.6-72.3 | nd-210.1 |
| Salbutamol | nd | nd | nd |
| Terbutaline | nd-4.1 | nd | nd |

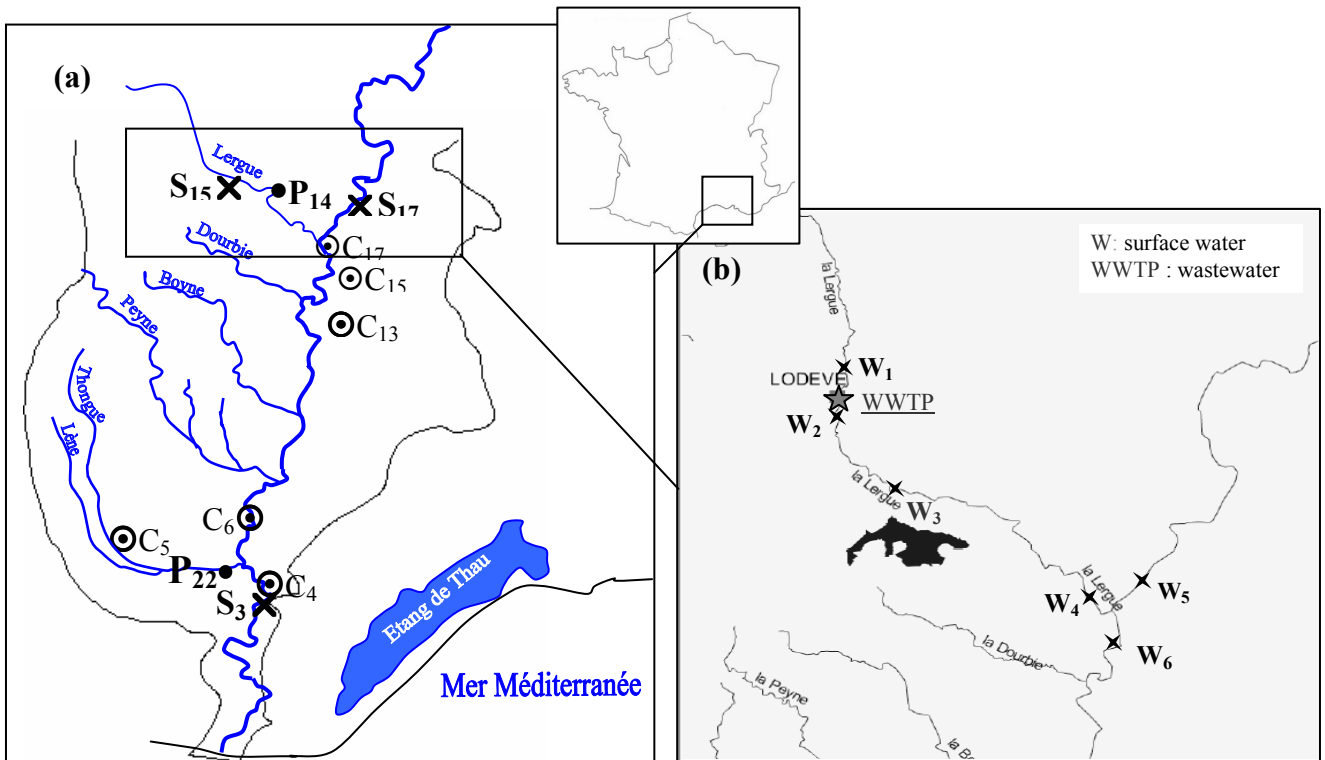


Figure 1: Map of the Hérault watershed (a) with sampling sites and zoom on the Lergue river for the study of surface water stations (b).

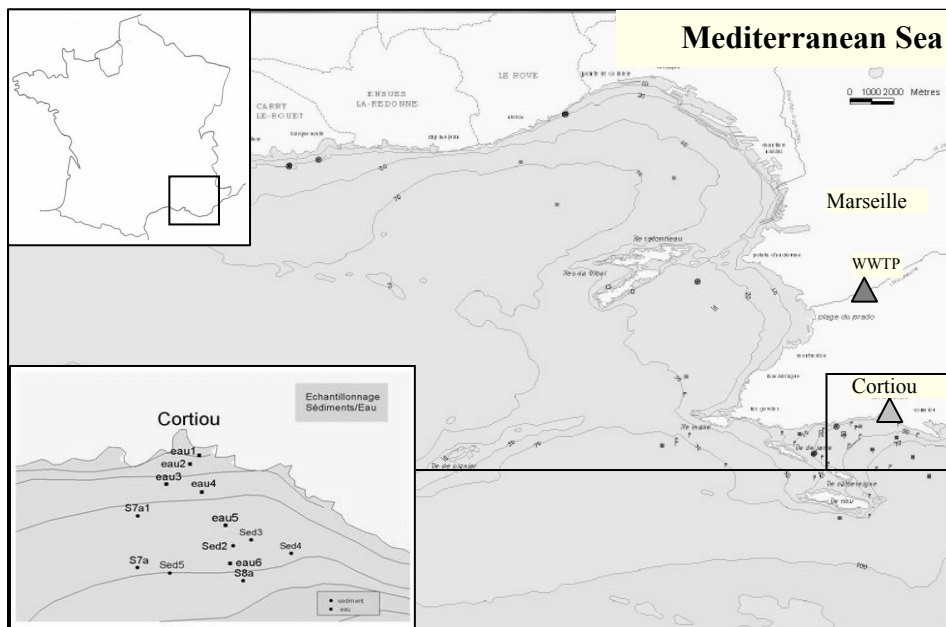


Figure 2: Map of the rocky Cortiou inlet with sampling stations.

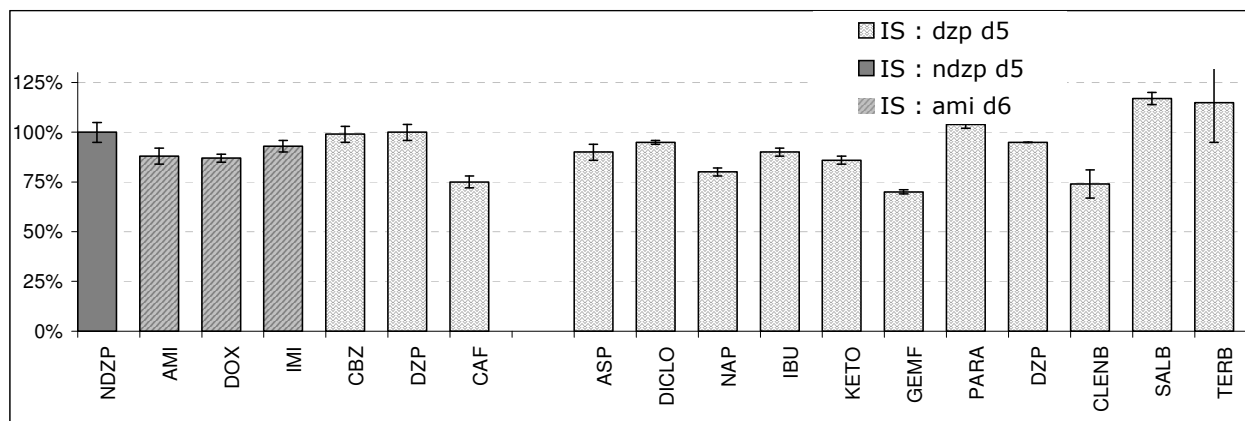


Figure 3: Quantification of pharmaceutical compounds for standard solutions, using internal standards (n=3). Abbreviations are given in Table 1.

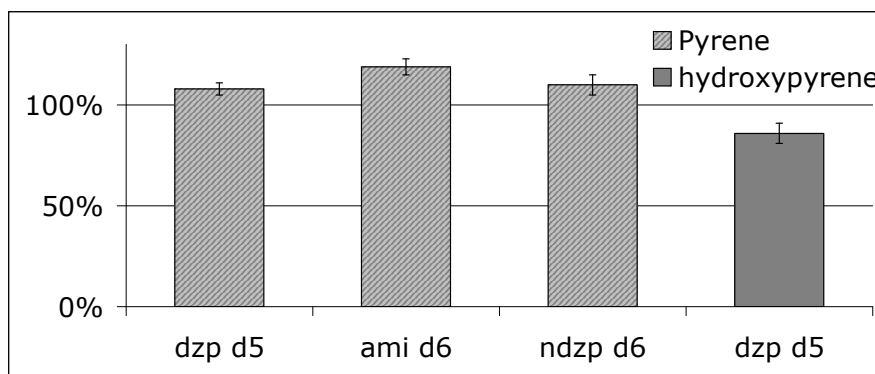


Figure 4: Quantification of internal standards by "syringe" standards (n=3). Abbreviations are given in Table 1.

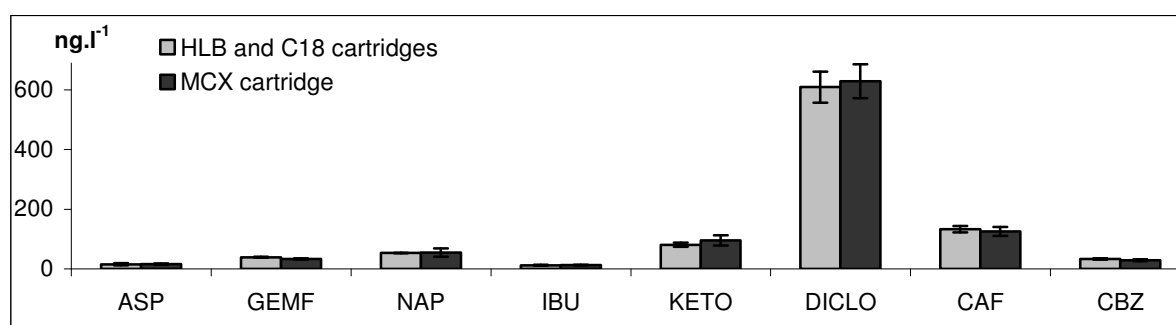


Figure 5: Comparison of both methodologies on natural samples: WWTP effluent. Abbreviations are given in Table 1.

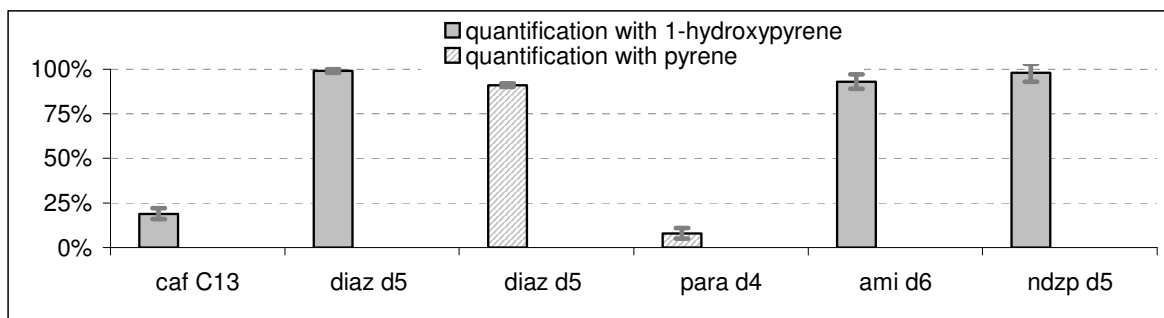


Figure 6: Yields of extraction for deuterated compounds (n=5). Abbreviations are given in Table 1.

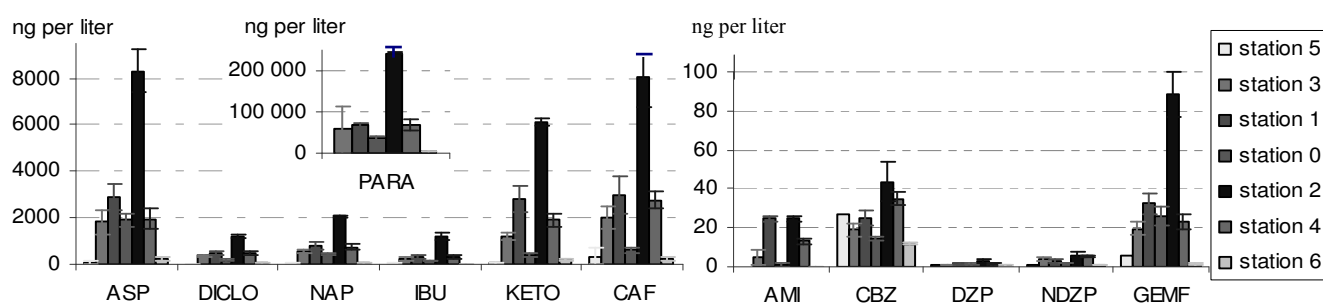


Figure 7: Pharmaceutical concentration measured in the Cortiou rocky inlet. Abbreviations are given in Table 1.

PUBLICATION 3

Analytical developments for the determination of pharmaceuticals in solid matrices: sediments, particles and sludge

Anne Togola and H el ene Budzinski*

University of Bordeaux 1 ; CNRS ; LPTC, UMR 5472, 351 crs de la Lib eration,
33405 Talence, FRANCE

* corresponding author
h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

Keywords: pharmaceuticals, sediment, sludge, particulate phase, SPE, GC-MS

Abstract

A simple extraction process is presented for the study of pharmaceutical compounds in particulate matter, sediment and sludge. Microwave extraction step and a solid phase extraction step have been combined to gas chromatography coupled with mass spectrometry. This procedure has allowed to quantify several pharmaceuticals belonging to different chemical and therapeutic groups, such as anti-inflammatory drugs (ketoprofen, ibuprofen, diclofenac...) antidepressive drugs (carbamazepine, diazepam...). The choice of the organic extraction solvent, the optimization of evaporation and solid phase extraction steps are discussed. Using the optimized conditions, the yields of extraction are comprised between 54 and 106% depending on compounds. The developed method has been applied to samples (particles, sediment) coming from the Cortiou rocky inlet (Marseilles, South of France) impacted by a sewage treatment plant effluent and to a sewage sludge showing the applicability of this procedure to various types of environmental solid samples.

Introduction

For a few years, a growing number of investigations has been reported in numerous countries and has shown clearly the widespread occurrence of human and veterinary pharmaceutical compounds in the environment, especially in the aquatic compartment at ng.l^{-1} to $\mu\text{g.l}^{-1}$ concentrations. More than 60 pharmaceuticals have been found in aquatic systems including analgesics, antibiotics, antiepileptic drugs, β -blockers, β 2-sympathomimetics, and blood-lipid regulators. Due to their potential broad range of biological properties, effects on organisms in the aquatic environment have been investigated (1-5). A limited knowledge is available on the environmental transformation processes, fate, or effects of these compounds. The low concentration of individual substances, coupled with their metabolic characteristics, has been shown to lead to incomplete removal from most municipal wastewater treatment plants (WWTP) (6-9).

Some compounds, such as fluoroquinolone antibiotics, have been recently shown to bind to sewage sludges (10). If the sorption to the solid phase could be a significant removal pathway for drugs, the application of biosolids as fertilizer and soil conditioner may represent an additional entrance way for human pharmaceuticals into the environment (11). There is a need of more data concerning occurrence (qualitative and quantitative) of pharmaceutical products in solid phases.

Most studies have dealt with antibiotic drug sorption on sludge or sediment (12, 13) related to the use of contaminated manure and sludge as fertilizers (10, 14, 15). The occurrence of steroidal drugs has been investigated in suspended particular material from WWTP effluents (16) and a sorption capacity of those compounds to estuarine sediments has been shown (17).

Some laboratory studies have focused on human pharmaceutical behaviour in solid material. A study has shown the poor sorption of diclofenac in the sediment (18). Concerning natural samples Khan and Ongerth (2002) have presented results obtained from sludge quantification. They have found in the secondary treatment sludge some of the most frequently recorded compounds : naproxen ($538 \mu\text{g.kg}^{-1}$), ibuprofen ($243 \mu\text{g.kg}^{-1}$), paracetamol ($49 \mu\text{g.kg}^{-1}$), gemfibrozil ($2700 \mu\text{g.kg}^{-1}$), carbamazepine ($6 \mu\text{g.kg}^{-1}$) and a lot of antibiotics, which shows the interest of the solid compartment for a better understanding of the fate of pharmaceuticals (11).

Concerning the extraction process, methods already published use assisted solvent extraction (19), ultrasonication (20) or liquid-liquid extraction as first extraction step for solid matrices, followed by solid phase extraction step... Concerning analytical development lot of works have used LC-MS-MS analysis for drug detection in sludge and sediment (20, 21). Moreover gas chromatographic methods have not been often developed due to the matrix interferences enhanced by the derivatization step used for acidic drugs and steroids (22).

The aim of this study was to develop a multi-residue method for pharmaceuticals belonging to different chemical groups (acidic drugs and neutral ones) in complex and various solid matrices. The use of solid phase extraction steps, permitting simultaneously extraction and purification procedures has been optimized. Microwave assisted extraction already used for extraction of numerous organic compounds (23, 24) has been selected.

The use of GC-MS analysis already developed for pharmaceuticals in several kinds of water samples (25) has already been chosen for pharmaceutical analyses. After optimization on several matrices (particles, sediment, sludge), the protocol has been applied to natural samples coming from several studied areas: wastewater treatment plant sludge from Rouen (France) and particles and sediment from the Cortiou rocky inlet, impacted by the WWTP of Marseilles (South of France).

Material and methods

Chemicals and solvents

Pharmaceutical products as well as pyrene and 1-hydroxypyrene, used as recovery determination standards were of analytical grade and purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France, purity > 98%). Table 1 presents chemical structures of studied compounds. Deuterated products (amitryptiline d⁶, diazepam d⁵ and nordiazepam d⁵) were purchased from Euriso-Top (St Aubin, France, purity > 98%). Acetone, acetonitrile, ethyl acetate and methanol (HPLC reagent grade, Scharlau) were purchased from ICS (Belin-Beliet, France). Hydrochloric acid 37% (reagent grade) was obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Ultrapure water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). 60 mg Oasis MCX cartridges were purchased from Waters (St Quentin en Yvelines, France) and NH₂ (200 mg) cartridges from Supelco (St Quentin Fallavier, France).

MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, purity > 97% from Acros Organics (Noisy-le-Grand, France)) was used as the derivatizing reagent for GC-MS analysis. Whatman GFF glass fibre filters (pore size 0.7 µm) were purchased from Atlantic Labo (Eysines, France).

Extraction process

For particulate phase or sediment, samples were first lyophilized until entire dryness, spiked with internal standards and then extracted by focused microwave assisted extraction (Microdigest 301, Prolabo, Fontenay sous Bois, France) (30 W, 10 min.) in 30 ml of a mixture acetonitrile/pH 2 deionized water (70/30; v/v). The extracts were filtered on glass fibre cotton and solvent was evaporated under vacuum using a RapidVap, Bioblock, Fontenay-sous-Bois, France) at 80 °C, 500 mbars for 40 min. Aqueous residues were then dissolved in 30 ml of pH 2 deionized water and treated as aqueous samples.

SPE cartridges were conditioned subsequently with 3 ml ethyl acetate and 3 ml of milliQ-water at adjusted pH 2. Water was carried out under vacuum at a flow rate of 12 to 15 ml.min⁻¹. Cartridges were dried under vacuum during 1 h. After elution with three successive elutions, respectively 3 ml of ethyl acetate, 3 ml of ethyl acetate/acetone (50/50; v/v) and 3 ml of ethyl acetate/acetone/ammonium hydroxide (50/50; 2% v/v), samples were completely evaporated under nitrogen stream.

For high organic content samples and sludge, a second extraction step used as an extra purification step was added. Dried extracts were diluted in 2 ml of ethyl acetate/methanol (80/20; v/v), and loaded on NH₂ cartridges, previously conditioned with two successive mixtures: 3 ml of ethyl acetate followed by 3 ml of ethyl acetate/methanol (80/20; v/v). After extract deposition, cartridges were eluted with 9 ml of ethyl acetate/methanol (80/20; v/v). Elution extracts were evaporated under nitrogen until complete dryness.

After extraction steps, samples were transferred into GC injection vials in 50 to 100 µl of ethyl acetate. For recovery control, pyrene was added to the final extracts for neutral compounds before GC-MS analysis and 1-hydroxypyrene was added to the final extracts for acidic compounds before the derivatization step, consisting in adding 30 µl of MSTFA before an incubation at 65°C for 35 minutes.

All additions of matrix, standards, solvents or reagents were gravimetrically controlled. Blanks were performed for each batch experiment in order to prevent from any contamination. No compound has been found in blank samples.

Pharmaceutical analysis

GC-MS analyses were carried out using an HP 6890 gas chromatograph from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). The capillary column was an HP5/MS (30 m

x 0.25 mm x 0.25 μm film thickness; phase: 5% diphenyl, 95% dimethylsiloxane) from Bios Analytique (L'Union, France). Samples were injected (1 μl) into the GC in splitless mode at 250 $^{\circ}\text{C}$ using an HP 6890 series injector. The carrier gas was ultrapure helium (99.99990%, Linde Gas, Bassens, France) set at constant flow mode (1.3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$). For GC separation, the temperature program started at 70 $^{\circ}\text{C}$ (held for 2 min.), set at 10 $^{\circ}\text{C}$ per min. to 250 $^{\circ}\text{C}$ and then was held isothermally for 5 min. The gas chromatograph was coupled to an HP 5973N mass selective detector (LMSD, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), operated under electronic impact (EI) mode at 70 eV (EMV: 1976 V) using scan mode (from 50 to 600 amu, 2.69 $\text{scan}\cdot\text{s}^{-1}$) and single ion monitoring mode at 1.67 $\text{scan}\cdot\text{s}^{-1}$ (dwell time 70 ms). The transfer line, source and quadrupole temperatures were 280, 230 and 150 $^{\circ}\text{C}$, respectively. Table 1 presents selected m/z ratios retained for quantification and linearity performance in the concentration range of interest (10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ to 1000 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$).

Analytical developments

Solid phase extraction step on MCX cartridges has been already developed and validated on water samples (25). Concerning the extraction of solid matrices it has been chosen to use microwave assisted extraction and then the SPE step on MCX cartridges.

Spiked matrices used for developments are sediment, particulate matter and sludge. Sediment has been obtained from the Seine estuary (la Bouille, France, 2002), lyophilised and sieved (2 mm). Raw waters have been sampled on the Gironde Estuary. Water samples were filtered on GFF fibre filters (0.7 μm) and particulate materials were freeze-dried. The choice of the sampling station corresponds to the maximum turbidity zone that allows to obtain an important quantity of particles. Concerning sludge, samples were previously centrifuged (15 $^{\circ}\text{C}$, 4000 RPM, 15 min). Solid phase was also freeze-dried and sieved (2 mm).

All samples have been spiked with pharmaceuticals in methanol at 100 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ for each compound.

The different steps of the protocol have been optimized and validated. Different types of solvent have been tested for microwave extraction combined organic solvents and water: acetonitrile/ pH 2 deionized water (70/30; v/v) and acetone /methanol/pH2 water (15/70/15; v/v/v). The volume of solvent has been fixed at 30 ml per sample, according to previous studies (Budzinski, Letellier et al. 2000).

The evaporation step allows to suppress solvent before solid phase extraction step in order to obtain aqueous extract usable then by SPE cartridges. Evaporation of solvents such as methanol, acetonitrile and acetone, with high boiling point, is difficult and needs the combined use of high temperature and low pressure, using for example rotary evaporators. On the other hand, vacuum evaporation system, Rapidvap[®] combining low pressure with heating, allows the evaporation of 24 samples at the same time, which is very interesting for environmental monitoring. Two parameters have been checked using spiked solvents: compounds preservation during the evaporation step and possible cross-contamination between samples.

The solid phase extraction step has been first validated on MCX cartridges for spiked sediment and particles. For sludge measurements there was a need of an extra purification step, first validated on spiked solvent to estimate extraction recoveries and secondly on spiked sludge to estimate purification efficiency. In parallel, solvent blanks have been performed for each step separately and for the entire protocol to assess the potential sample contamination associated to the protocol.

Environmental fields

The aim of this work was to develop a sensitive, robust, multi-residue and multi-matrixes procedure. After optimization steps, the protocol has been applied to natural samples, already known for the pharmaceutical occurrence in dissolved compartment (26, 27).

Concerning the Cortiou rocky inlet, nearby Marseilles (south of France), in the Mediterranean Sea; this area is polluted by the effluent of Marseilles city wastewater treatment plant (1,300,000 population equivalents) in which no biological treatment has been installed.

Both water and sediment were collected nearby the effluent on several locations in the dilution plume of the effluent to investigate the influence area of the effluent and the occurrence of pharmaceuticals in solid compartments. Water samples were filtered few hours after sampling, and sediment and particulate matter were frozen on the boat.

To test robustness and sensitivity of the process particularly for sludge, samples were collected in the WWTP of Rouen (450,000 population equivalents) and centrifuged (15°C, 4000 RPM, 15 min) to obtain two separated phases. The solid one was freeze-dried before the extraction process.

Results

Protocol validation

Microwave assisted extraction

Two different kinds of solvent have been tested. For the main part of compounds, both processes show no significant differences (Figure 1). For few of them, there is a real better extraction mixture, generally at the advantage of acetonitrile/ pH 2 deionised water (70/30; v/v): for aspirin ($42 \pm 12\%$ versus $25 \pm 9\%$), for paracetamol ($54 \pm 11\%$ versus $28 \pm 1\%$) and for caffeine ($117 \pm 12\%$ versus $70 \pm 13\%$). Only one compound, clenbuterol ($59 \pm 3\%$ versus $14 \pm 6\%$) presents better results with acetone /methanol/pH 2 deionised water (15/70/15; v/v/v). For three compounds, salbutamol, clenbuterol and terbutaline low extraction yields have been obtained with very high RSDs for the two tested mixtures. So the choice of acetonitrile/ pH 2 deionised water (70/30; v/v) has been retained for the further experiments.

Evaporation process

Concerning evaporation process, both extraction and cross-contamination have been evaluated. Evaporation conditions (80°C, 500 mbars and 40 min) have been optimized considering the boiling point and the bumping phenomenon. Figure 2 highlights the validation of evaporation process, with no degradation phenomenon of compounds during this step. Moreover, there is no cross-contamination between samples, with pharmaceutical concentrations in blank below limits of detection.

Solid Phase Extraction step

Complete pharmaceutical extraction has been evaluated on different spiked samples: water, particulate matter and sediment. Figure 3 shows yields of extraction obtained for these three kinds of matrices. For the main compounds, results obtained on solid matrices are comparable with those obtained for aqueous samples. For some compounds, step multiplication decreases yields of extraction (for aspirin, ibuprofen, terbutaline and salbutamol).

For other compounds (terbutaline, paracetamol and doxepine) interferences phenomena have been observed depending on matrices. They were more important for sediment than for particles probably due to its high organic matter content. The same protocol has been applied to sludge sample and has showed high interferences, making

the analysis not possible (Figure 4). For this kind of samples, a second solid phase extraction step has been used as purification step.

NH₂ purification step

First step was validation of purification process on spiked solvent. Correct results have been obtained with this step with recoveries between $41 \pm 3\%$ (for caffeine) and $113 \pm 15\%$ (for doxepine), as shown on Figure 5. Nevertheless, for acidic compounds the yields of extraction were very low and fluctuating depending on compounds (from $3 \pm 0\%$ for naproxen to $97 \pm 6\%$ for terbutaline). Considering these low extraction values this step has not been used for acidic drugs and a more efficient process is still under development.

For neutral drugs, this purification step has been validated on spiked sludge (Figure 6). Except for caffeine ($8 \pm 3\%$), the yield of extraction are between $77 \pm 1\%$ and $108 \pm 2\%$ with very low RSDs (below 8%), with no overestimation due to interferences comparatively with first results. Figure 4 presents comparison for the same sample between with and without purification.

Limits of detection and robustness

Comparing the yield of extraction for internal standards for each samples analysed with this protocol, reproducibility is good with variability below 15% for neutral drugs (quantification using pyrene) and 20% for acidic ones (using 1-hydroxypyrene). The values of detection limits have been calculated for natural samples (ratio S/N= 3) on particulate material range between 1 ng.g^{-1} (paracetamol, naproxen, gemfibrozil) and 9 ng.g^{-1} (imipramine), as presented on Table 2.

Environmental field

The first presented results (Table 3) deal with a sludge from the WWTP of Rouen, already studied for its impact on the Seine estuary contamination (27). Concentrations measured in dissolved phase were very high particularly for persistent compounds (carbamazepine, diclofenac) and high-consumed ones. These compounds, such as caffeine, paracetamol and aspirin, are classically present despite a highly efficient waste water treatments (Joss, Keller et al. 2005). Figure 1 presents the repartition between dissolved and solid phases. Some compounds are distributed in both phases (amitryptiline, nordiazepam, ketoprofen, caffeine and carbamazepine), but for most of compounds, the dissolved phase was the prevailing one. For pharmaceuticals detected in the solid phase, the measured levels are very high, from 26 ng.g^{-1} for ketoprofen to 242 ng.g^{-1} for amitryptiline.

By comparing those measurements with the raredata already published for sludge contamination, same order of value have been found: naproxen (538 ng.g^{-1}), ibuprofen (243 ng.g^{-1}), paracetamol (49 ng.g^{-1}) gemfibrozil ($2,700 \text{ ng.g}^{-1}$) and carbamazepine (6 ng.g^{-1}) (11). Results obtained in the present study are in good agreement with these previous data concerning levels of concentration, considering the variability of the influent, the treatment steps efficiency and the residence time in the WWTP...(28).

Results obtained from the study of the Cortiou rocky inlet are presented in Table 4 and 5. As shown in Table 4, only few compounds have been detected, partially due to the low amount of particles collected because of low suspended matter concentrations in water. Results expressed in ng.g^{-1} of particles (dry weight) presented a relatively high level of contamination for some of the compounds, especially carbamazepine (up to 560 ng.g^{-1}), aspirin (347 ng.g^{-1}) and caffeine (238 ng.g^{-1}).

However, considering the concentrations expressed in ng.l^{-1} the weak suspended material content results in a low contribution of the particulate contamination in

comparison to the dissolved one to the global one. Nevertheless particulate matter contamination can allow the dissemination of drugs in aquatic systems and the storage of compounds in the sediment compartment constituted mainly by particulate matter threw out by the WWTP effluent.

With regard to this compartment, Table 5 shows some results for the area nearby the WWTP effluent, with low pharmaceutical concentrations in solid samples, except for caffeine and carbamazepine. Carbamazepine, as a high persistent compound can end up in the sediment and be preserved for a while. For caffeine, high amount in particles and water can explain their occurrence in spite of their high degradable character.

Conclusions

The efficiency and reproducibility of the method are satisfying for different matrices such as particles, sediment and sludge. The use of microwave assisted extraction process followed by Rapidvap® evaporation is fast and uses low quantities of solvent. Coupled with solid phase extraction, this procedure allows analysis of a large amount of samples, which is a decisive factor for environmental monitoring. GC-MS analyses, as a robust and reproducible tool, has been successfully applied to as small environmental study leading to low limits of detection obtained by this way. For high organic matter content samples, purification has been validated only for neutral compounds. Further experiments are still under investigation for acidic compounds.

An environmental study on impacted area has given first results illustrating the role played by solid compartments on the global environmental contamination. Occurrence of drugs in particles and sediment has been underlined, especially for neutral compounds. Even if the concentration of can be high in the case of the studied area, compared with the dissolved phase, the particulate one seems to account for a small part to the global contamination of the water column (ng.l^{-1}), but it is linked to the low concentration of suspended particulate matter in marine waters.

Nevertheless when considering the concentration in terms of ng.g^{-1} , particulate matter contamination can allow the dissemination of drugs in aquatic systems and could plays a role in biological compartment exposure. All these results are preliminary ones. There is a need for further investigations in order to obtain more information concerning the fate of compounds in sediment and particles and the influence of particles properties (colloidal fraction, organic matter content...).

Acknowledgment

The authors wish to thank the “Région Aquitaine”, the Seine Aval and the “GIS ECOBAG” programs for research funding, IFREMER (French Research Institute for Exploitation of the Sea) for technical support and sampling campaigns. They want also to acknowledge the ORQUE (Environmental Quality Research Observatory) program and the NFS (National Funding for Science) for providing a PhD grant (A. Togola).

References

- (1) Lanzky, P.F, Halling-Sorensen, B. The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. *Chemosphere* **1997**, *35*, 2553-2561.
- (2) Crane, M.; Watts, C.; Boucard, T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* **2006**, *367*, 23-41.
- (3) Brain, R. A.; Johnson, D. J.; Richards, S. M.; Hanson, M. L.; Sanderson, H.; Lam, M. W.; Young, C.; Mabury, S. A.; Sibley, P. K.; Solomon, K. R. Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquatic Toxicol.* **2004**, *70*, 23-40.

- (4) Brooks, B. W.; Foran, C. M.; Richards, S. M.; Weston, J.; Turner, P. K.; Stanley, J. K.; Solomon, K. R.; Slattery, M.; La Point, T. W. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol. Lett.* **2003**, *142*, 169-183.
- (5) Cleuvers, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* **2003**, *142*, 185-194.
- (6) Andreozzi, R.; Raffaele, M.; Nicklas, P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* **2003**, *50*, 1319-1330.
- (7) Joss, A.; Keller, E.; Alder, A. C.; Gobel, A.; Mc Ardell, C. S.; Ternes T.; Siegrist H. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Res.* **2005**, *39*, 3139-3152.
- (8) Kümmerer, K.; Steger-Hartmann T.; Meyer M. Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Res.* **1997**, *31*, 2705-2710.
- (9) Quintana, J. B.; Weiss, S.; Reemtsma, T. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Res.* **2005**, *39*, 2654-2664.
- (10) Golet, E. M.; Xifra, I.; Siegrist, H.; Alder, A. C.; Giger, W. Environmental Exposure Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents from Sewage to Soil. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 3243-3249.
- (11) Khan, S. J.; Ongerth, J. E. Estimation of pharmaceuticals residues in primary and secondary sewage sludge based on quantities of use and fugacity modelling. *Water Sci. Technol.* **2002**, *46*, 105-113.
- (12) Thiele-Bruhn, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. *J. Plant Nutr. Soil Sc.* **2003**, *166*, 145-167.
- (13) Thiele-Bruhn, S.; Seibicke, T.; Schulten, H. R.; Leinweber, P. Sorption of Sulfonamide Pharmaceutical Antibiotics on Whole Soils and Particle-Size Fractions. *J. Environ. Qual.* **2004**, *33*, 1331-1342.
- (14) Golet, S. M. "Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage, river water and soil." PhD Thesis. Swiss Federal Institute of Technology, 2002.
- (15) Kim, S.-C.; Carlson, K. LC-MS² for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices. *TrAC* **2005**, *24*, 635-644.
- (16) Beausse, J. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *TrAC* **2004**, *23*, 753-761.
- (17) Lai, K. M.; Johnson, K. L.; Scrimshaw, M. D.; Lester, J. N. Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 3890-3894.
- (18) Buser, H. R.; Poiger, T.; Müller, M. D. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters : rapid photodegradation in a Lake. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 3449-3456.
- (19) Anjou-Recherche " Rudggedness of analytical methods developped for hormones, antibiotics and pharmaceuticals in sludges," Anjou Recherche, Veolia Water, 2003.
- (20) Löffler, D.; Ternes, T. A. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using LC-MSMS. *J. Chrom. A* **2003**, *1021*, 133-144.
- (21) Diaz-Cruz, M. S.; Lopez de Alda, M. J.; Barcelo, D. Determination of antimicrobials in sludge from infiltration basins at two artificial recharge plants by pressurized liquid extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chrom. A* **2006**, *1130*, 72-82

- (22) Ingerslev, F.; Halling-Sorensen, B. "Evaluation of analytical chemical methods for detection of estrogens in the environment," Danish Environmental Protection Agency, 2003.
- (23) Budzinski, H.; Letellier, M.; Thompson, S.; LeMenach, K.; Garrigues, P. Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresen. J. Anal. Chem.* **2000**, *367*, 165-171.
- (24) Letellier, M.; Budzinski, H.; Charrier, L.; Capes, S.; Dorthe, A. M. Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment. *Fresen. J. Anal. Chem.* **1999**, *364*, 228-237.
- (25) Togola, A.; Budzinski, H. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *submitted to Anal. Chim. Acta* **2006**.
- (26) Togola, A.; Budzinski, H. Présence de résidus de médicaments dans les différents compartiments du milieu aquatique. *Environnement, Risques & Santé* **2006**.
- (27) Togola, A.; Budzinski, H. Analytical development for the analysis of pharmaceuticals in water samples using SPE and GC/MS. *submitted to Anal. Bioanal. Chem.* **2006**.
- (28) Tauxe-Wuersch, A.; De Alencastro, L. F.; Grandjean, D.; Tarradellas, J. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Res.* **2005**, *39*, 1761-1772.

Table captions

Table 1: Studied compounds : structure, molecular weight, m/z ratio and linearity.

Table 2: Limits of detection calculated from particles samples.

Table 3: Pharmaceutical concentrations measured in sludge sample (Rouen, May 2005).

Table 4: Pharmaceutical concentrations measured in particles samples (Cortiou rocky inlet, Marseille, April 2005), expressed in ng.g^{-1} .

Table 5: Pharmaceutical concentrations measured in particles samples (Cortiou rocky inlet, Marseille, April 2005), expressed in pg.l^{-1} .

Table 6: Pharmaceutical concentrations measured in sediment samples (Cortiou rocky inlet, Marseille, April 2005), expressed in ng.g^{-1} .

Figure captions

Figure 1: Yields of extraction for microwave extraction step, two solvent mixtures (n=6).

Figure 2: Recoveries of evaporation step, (n=3).

Figure 3: Yields of whole extraction for three kinds of matrices: dissolved phase, particle and sediment (n=3).

Figure 4: Comparison of sediment analysis with and without purification step, chromatogram obtained using GC-MS analyse (SIM mode).

Figure 5: Recoveries of purification step on spiked solvent (NH_2 cartridges), (n=3).

Figure 6: Recoveries of whole procedure, including purification step (NH_2 cartridges) on spiked sludge, (n=3).

Figure 7: Pharmaceutical distribution between dissolved and solid phase in sludge (WWTP of Rouen, May 2005).

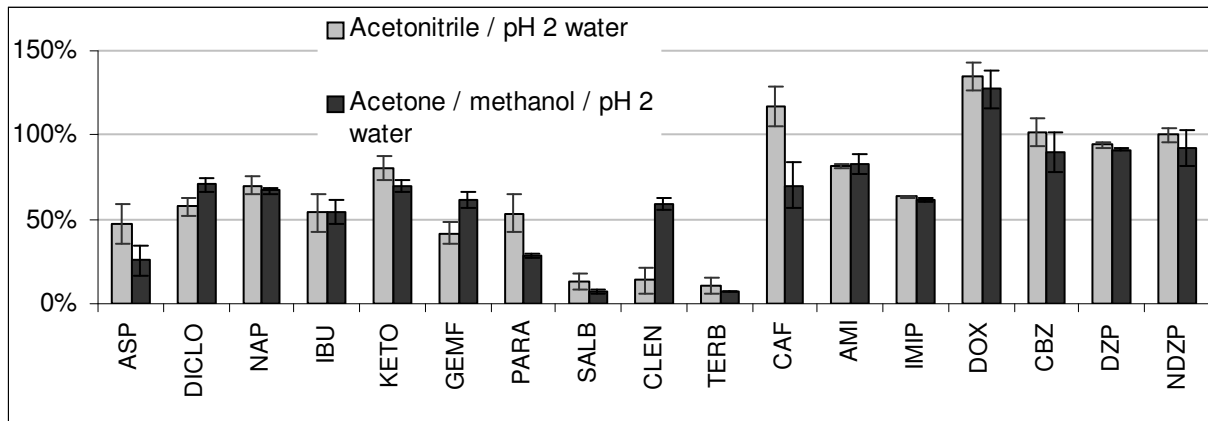


Figure 1: Yields of extraction for microwave extraction step, two solvent mixtures (n=6).

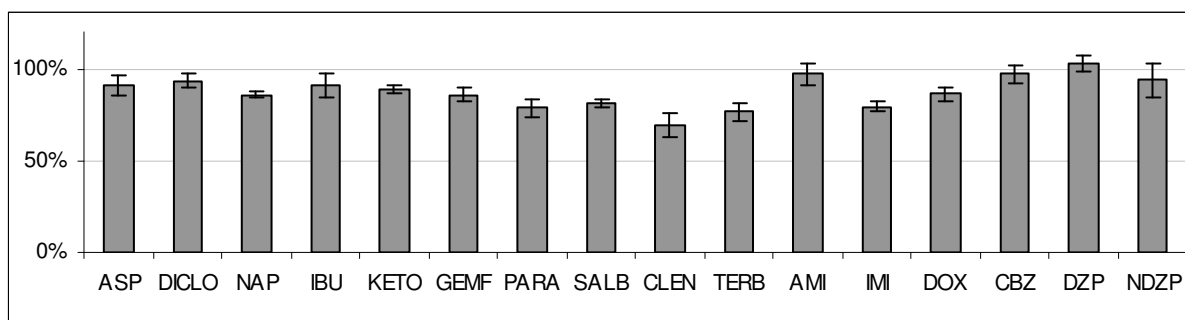


Figure 2: Recoveries of evaporation step, (n=3).

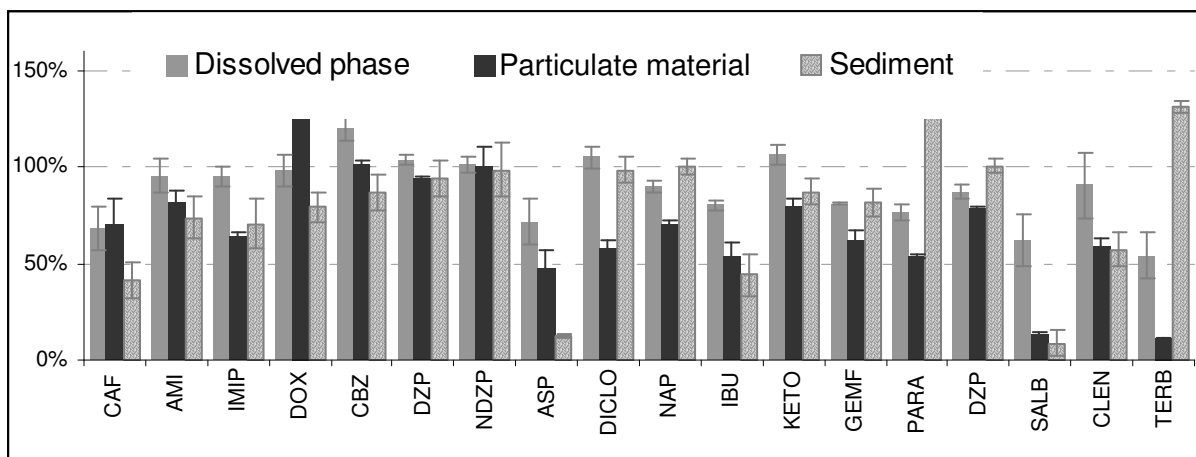


Figure 1: Yields of whole extraction for three kinds of matrices: dissolved phase, particle and sediment (n=3).

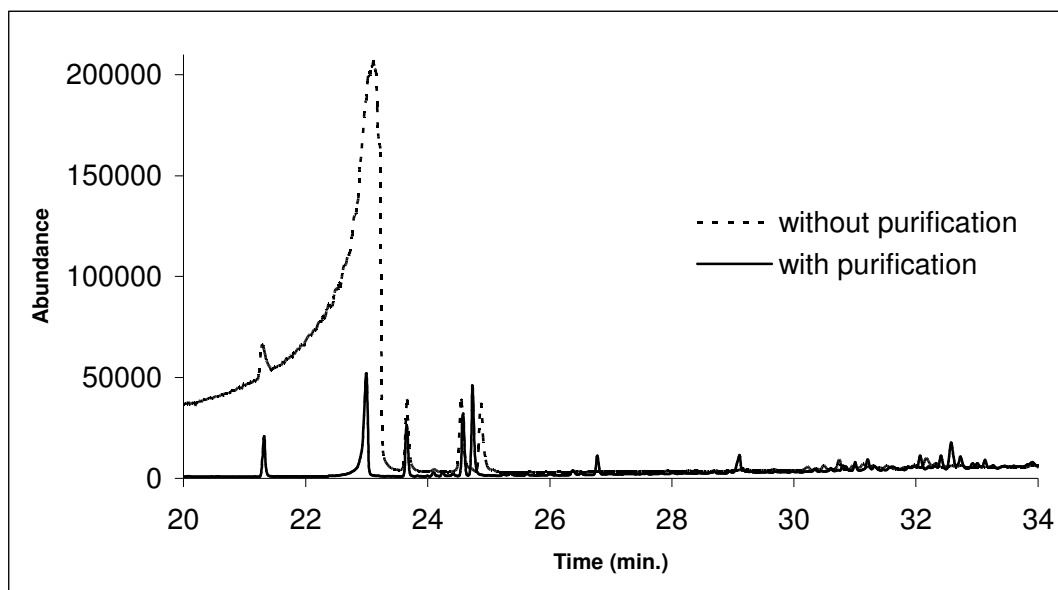


Figure 2: Comparison of sediment analysis with and without purification step, chromatogram obtained using GC-MS analysis (SIM mode).

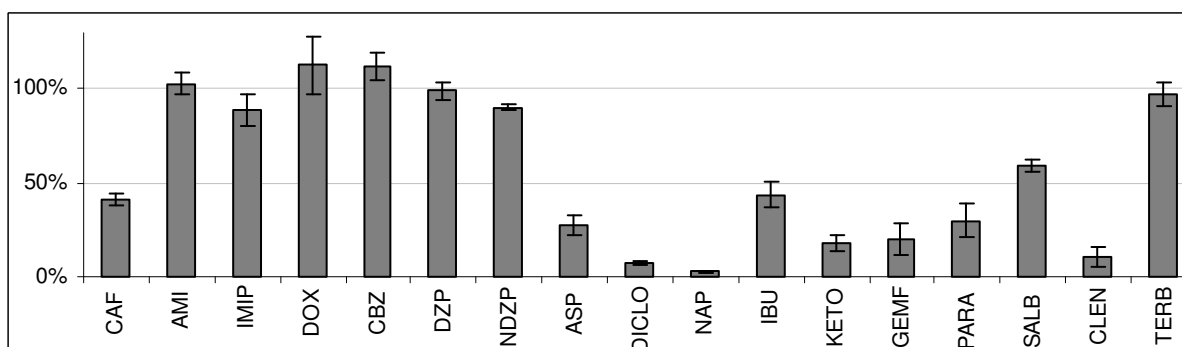


Figure 3: Recoveries of purification step on spiked solvent (NH₂ cartridges), (n=3).

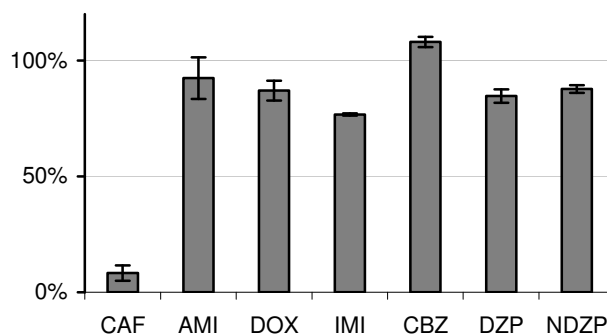


Figure 4: Recoveries of whole procedure, including purification step (NH₂ cartridges) on spiked sludge, (n=3).

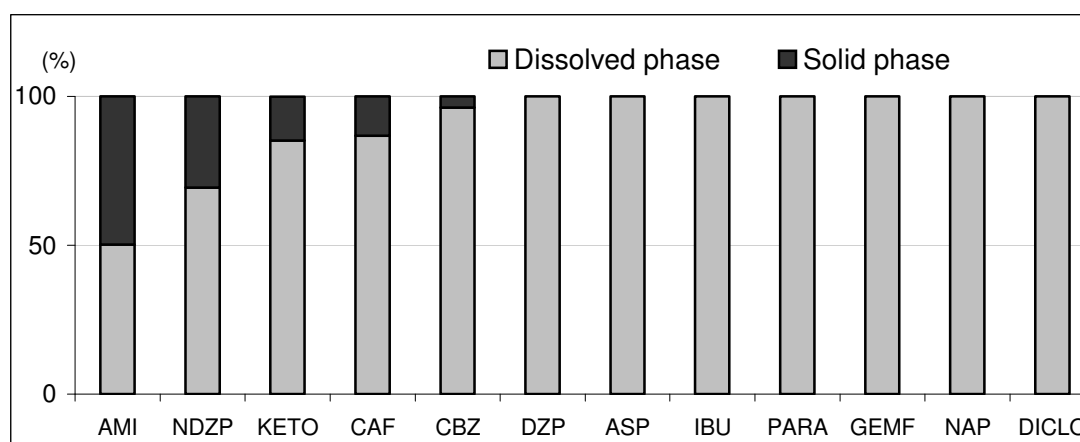


Figure 5: Pharmaceutical distribution between dissolved and solid phase in sludge (WWTP of Rouen, May 2005).

Table 1: Studied compounds : structure, molecular weight, m/z ratio and linearity.

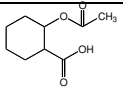
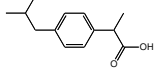
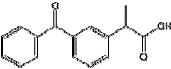
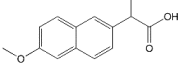
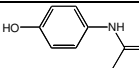
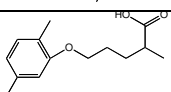
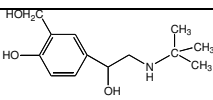
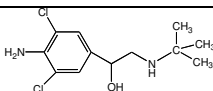
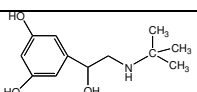
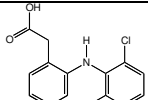
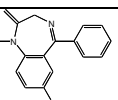
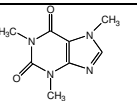
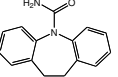
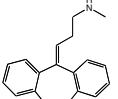
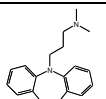
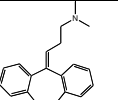
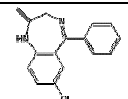
| Compound | Therapeutic group | Chemical structure | MW (g.mol ⁻¹) | m/z | R ² |
|---------------------|--|---|---------------------------|-----|----------------|
| Aspirin (ASP) | Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) |  | 180 | 195 | 0.9958 |
| Ibuprofen (IBU) | |  | 206 | 160 | 0.9953 |
| Ketoprofen (KETO) | |  | 254 | 282 | 0.9963 |
| Naproxen (NAP) | |  | 230 | 185 | 0.9934 |
| Paracetamol (PARA) | |  | 151 | 206 | 0.9916 |
| Gemfibrozil (GEMF) | Lipid regulator |  | 250 | 201 | 0.9996 |
| Salbutamol (SALB) | Bronchodilator |  | 239 | 369 | 0.9863 |
| Clenbuterol (CLENB) | Bronchodilator |  | 276 | 335 | 0.9908 |
| Terbutaline (TERB) | Bronchodilator |  | 225 | 356 | 0.9854 |
| Diclofenac (DICLO) | NSAID |  | 295 | 214 | 0.9987 |
| Diazepam (DZP) | antidepressant |  | 284 | 256 | 0.9989 |
| Caffeine (CAF) | stimulant |  | 194 | 194 | 0.9943 |
| Carbamazepine (CBZ) | Antidepressant |  | 236 | 193 | 0.9949 |
| Amitriptyline (AMI) | Antidepressant |  | 277 | 58 | 0.9503 |
| Imipramine (IMIP) | Antidepressant |  | 280 | 234 | 0.9558 |
| Doxepine (DOX) | Antidepressant |  | 279 | 58 | 0.9677 |
| Nordiazepam (NDZP) | Antidepressant |  | 270 | 242 | 0.9858 |

Table 2: Limits of detection calculated from particles samples.

| Limits of detection (ng per gram of extracted particles) | | | |
|---|---|-------------------|---|
| Caffeine | 4 | Naproxen | 1 |
| Carbamazepine | 5 | Gemfibrozil | 1 |
| Amitryptiline | 4 | Salbutamol | 4 |
| Imipramine | 9 | Clenbuterol | 4 |
| Doxepine | 8 | Terbutaline | 2 |
| Diazepam (neutral) | 7 | Diazepam (acidic) | 5 |
| Nordiazepam | 6 | Paracetamol | 1 |
| Aspirin | 2 | Diclofenac | 2 |
| Ibuprofen | 3 | Ketoprofen | 4 |

Table 3: Pharmaceutical concentrations measured in sludge sample (Rouen, May 2005).

| Compounds | Dissolved phase (ng.l ⁻¹) | Solid phase (ng.l ⁻¹) (SPM = 6,63 g.l ⁻¹) | Sum (ng.l ⁻¹) |
|---------------|--|--|------------------------------|
| Caffeine | 381.8 | 58.2 | 440.0 |
| Amitryptiline | 244.4 | 242.2 | 486.8 |
| Carbamazepine | 5089.6 | 200.3 | 5290.0 |
| Diazepam | 26.4 | 0.0 | 26.4 |
| Nordiazepam | 161.0 | 71.3 | 232.3 |
| Aspirin | 2647.3 | nd | 2647.3 |
| Ibuprofen | 674.1 | nd | 674.1 |
| Paracetamol | 669.4 | nd | 669.4 |
| Gemfibrozil | 278.1 | nd | 278.1 |
| Naproxen | 293.7 | nd | 293.7 |
| Diclofenac | 2325.9 | nd | 2325.9 |
| Ketoprofen | 150.4 | 26.1 | 176.6 |

Table 4: Pharmaceutical concentrations measured in particles samples (Cortiou rocky inlet, Marseille, April 2005), expressed in ng.g-1.

| | Station 6 | Station 5 | Station 4 | Station 3 | Station 2 | Station 1 | Station 0 |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CAF | 132 | 179 | <4 | 84 | <4 | 110 | 238 |
| AMI | <4 | <4 | <4 | <4 | <4 | <4 | <4 |
| DOX | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| IMIP | <9 | <9 | <9 | <9 | <9 | <9 | <9 |
| CBZ | 504 | 771 | <6 | 109 | <6 | 192 | 558 |
| DZP | <7 | <7 | <7 | <7 | <7 | <7 | <7 |
| NDZP | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 |
| ASP | 110 | 103 | 73 | 103 | <6 | 177 | 347 |
| IBU | <3 | <3 | <3 | 3 | <3 | 7 | 4 |
| PARA | 12 | 11 | 11 | 3 | <6 | 20 | 9 |
| GEMF | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <3 |
| NAP | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <3 |
| DICLO | 10 | 22 | <3 | <3 | <3 | <3 | 6 |
| TERB | 8 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 |
| SALB | 11 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 |
| CLEN | 7 | 12 | <3 | <3 | <3 | <3 | 8 |
| KETO | 21 | 11 | <4 | <4 | <4 | 28 | 10 |

Table 5: Pharmaceutical concentrations measured in particles samples (Cortiou rocky inlet, Marseille, April 2005), expressed in pg per liter.

| pg.l ⁻¹ | Station 6 | Station 5 | Station 4 | Station 3 | Station 2 | Station 1 | Station 0 |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CAF | 175 | 213 | <4 | 114 | <4 | 331 | 572 |
| AMI | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 |
| DOX | <11 | <11 | <11 | <11 | <11 | <11 | <11 |
| IMIP | <12 | <12 | <12 | <12 | <12 | <12 | <12 |
| CBZ | 671 | 918 | <8 | 148 | <8 | 576 | 1338 |
| DZP | <9 | <9 | <9 | <9 | <9 | <9 | <9 |
| NDZP | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| ASP | 147 | 123 | 130 | 139 | <4 | 532 | 833 |
| IBU | <4 | <4 | <4 | 4 | <4 | 20 | 8 |
| PARA | 15 | 13 | 20 | 4 | <5 | 59 | 21 |
| GEMF | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 |
| NAP | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 | <3 |
| DICLO | 14 | 27 | <5 | <5 | <5 | <5 | 15 |
| TERB | 10 | <4 | <4 | <4 | <4 | <4 | <4 |
| SALB | 15 | <4 | <4 | <4 | <4 | <4 | <4 |
| CLEN | 10 | 15 | <5 | <5 | <5 | <5 | 19 |
| KETO | 28 | 13 | <7 | <7 | <7 | 28 | 23 |
| SPM (mg.l ⁻¹) | 1.3 | 1.2 | 1.8 | 1.4 | 0.7 | 3.0 | 2.4 |

Table 6: Pharmaceutical concentrations measured in sediment samples (Cortiou rocky inlet, Marseille, April 2005), expressed in ng per gram.

| | SED 1 | SED 2 | SED 3 | SED 4 | SED 5 | SED 6 |
|---------------|------------|------------|-----------|------------|------------|-----------|
| Caffeine | 187 | 15 | 19 | <10 | 103 | 9 |
| Amitryptiline | <13 | <13 | <13 | <13 | <13 | <13 |
| Doxepine | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 |
| Imipramine | <12 | <12 | <12 | <12 | <12 | <12 |
| Carbamazepine | 24 | 23 | <12 | <12 | 14 | <12 |
| Diazepam | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 |
| Nordiazepam | 45 | 159 | 53 | 122 | 20 | 38 |
| Aspirin | <8 | <8 | 62 | <8 | <8 | <8 |
| Ibuprofen | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| Paracetamol | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 |
| Gemfibrozil | <4 | <4 | <4 | 6 | <4 | <4 |
| Naproxen | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| Diclofenac | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 | <8 |
| Terbutaline | <12 | <12 | <12 | <12 | <12 | <12 |
| Salbutamol | <12 | <12 | <12 | <12 | <12 | <12 |
| Clenbuterol | <12 | <12 | <12 | <12 | <12 | <12 |
| Ketoprofen | <13 | 19 | <13 | <13 | <13 | <13 |

PUBLICATION 4
Environnement, Risque et Santé (2006) vol 5 (4)

Présence de résidus de médicaments dans les différents compartiments du milieu aquatique

Anne Togola, Hélène Budzinski,
LPTC-UMR5472 CNRS

Université Bordeaux 1, 351 cours de la Libération, 33405 Talence

Mots clefs : produits pharmaceutiques ; pollution, analyse environnementale
(pharmaceuticals ; water pollution ; environmental analysis)

RESUME

Les substances pharmaceutiques appartiennent à la classe des contaminants émergents, qui sont depuis peu étudiés dans les milieux naturels. Ces composés synthétiques d'usage très répandu, créés pour avoir un effet biologique thérapeutique, consommés en quantités très importantes sont introduits dans le milieu aquatique via les stations d'épuration.

Après la mise au point des différents protocoles d'analytiques (phase dissoute, phase particulaire), un premier bilan de la contamination de différents systèmes aquatiques (Seine, Gironde, Loire, Adour, milieu marin côtier méditerranéen) a été dressé. Différentes techniques analytiques dans le domaine de l'analyse physico-chimique organique environnementale (GC/MS, extraction assistée par micro-ondes, SPE...), ont permis de mettre en évidence une réelle contamination du milieu aquatique par ces composés, quel que soit le système étudié. Les concentrations mesurées vont, selon les composés, les stations et les saisons de quelques dizaines de ng/L à quelques centaines de ng/L pour les eaux de rivière ou les eaux marines. Ces travaux démontrent clairement que le compartiment dissous est le plus contaminé mais également que les phases particulaire et sédimentaire peuvent également jouer un rôle non négligeable dans la distribution de ces composés dans l'environnement aquatique.

ABSTRACT :

Studied since few years in natural environment, pharmaceuticals are defined as emerging contaminants. These widespread synthetic compounds have been thought up to have biological effects. Consumed in large amount they are introduced in aquatic environment by sewage treatment plants.

After analytical developments (dissolved and particulate phases), a first contamination assessment of different aquatic systems (Seine, Gironde, Loire, Adour and mediterranean Sea) has been done. Those procedures (GC/MS, microwave assisted extraction, solid phase extraction...) have permitted to show a real contamination by pharmaceuticals of the aquatic systems. Measured concentrations fluctuate between few nanograms per liter and dozens of micrograms per liter depending on compounds, sampling stations and seasons.

This work has proved that, if dissolved phase is the most contaminated one, particulate phase could have a large part in the pharmaceuticals spread in aquatic systems.

Introduction :

Les substances pharmaceutiques sont des composés synthétiques d'usage très répandu, créés pour avoir un effet biologique thérapeutique. A côté des principaux contaminants chimiques de l'environnement, on trouve des substances telles que des stéroïdes synthétiques (œstradiol, testostérone) utilisés dans de nombreux traitements hormonaux. On trouve également divers médicaments de type anti-dépresseur (diazépam, amitriptyline), analgésique (ibuprofène, paracétamol, diclofénac), antibiotique [1] (néomycine, chloramphénicol, tétracyclines...), hypolipémiant [2] (acide clofibrique, gemfibrozil). Ces différentes molécules actives sont consommées en quantités très importantes dans notre société occidentale, comme le rappelle le tableau 1, indiquant une estimation des consommations en France, Royaume-Uni, Allemagne, Danemark pour certains composés [3]. Ces produits sont rejetés *in fine* dans le milieu aquatique via les stations d'épuration [4] (destruction incomplète). Actuellement peu étudiés, ils peuvent présenter un risque environnemental non négligeable si l'on considère d'une part les quantités potentiellement apportées au milieu aquatique et d'autre part le fait qu'ils ont été fabriqués pour être biologiquement actifs.

Ces composés sont retrouvés dans l'ensemble des compartiments aquatiques de l'environnement, que ce soit dans les rejets de station d'épuration [5, 6], dans les eaux de surface [7], ou encore pour certains composés, dans les eaux de boisson [8]. Cette présence de plus en plus fréquente a amené les chercheurs à s'intéresser d'une part aux effets que ces composés pourraient avoir sur des espèces non cibles [9, 10] ainsi qu'aux risques encourus pour une exposition chronique, que ce soit pour les organismes du milieu aquatique [11] ou pour les hommes [12, 13].

Matériel et méthodes

Produits chimiques et solvants :

Les composés pharmaceutiques étudiés, le pyrène, le 1-OH-pyrène et le produit de silylation (MSTFA : n-méthylsilyltrifluoroacétamide) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Les cartouches SPE Oasis MCX ® proviennent de Waters (Saint Quentin en Yvelines, France). Les composés deutérés proviennent d'Euriso-Top (St Aubin, France), Tous les solvants utilisés sont de qualité Pestinorm ou HPLC-grade, et sont fournis par ICS (Belin-Beliet, France). Les composés sélectionnés pour cette étude sont présentés dans le tableau 2.

Extraction SPE

L'extraction des eaux prélevées se fait en deux étapes. Les échantillons d'eau sont dans un premier temps filtrés sur filtres en fibres de verre (diamètre de pores 0,7 µm) préalablement calcinés (450°C, 10h).

La phase dissoute est acidifiée à pH 2. Les étalons deutérés (diazépam d₅, nordiazépam d₅ et amitriptyline d₆) sont ajoutés avant le passage sur cartouche. Après conditionnement de la cartouche (acétate d'éthyle puis eau osmosée à pH 2), l'échantillon est déposé par aspiration à un débit compris entre 12 et 18 mL par min. Le séchage s'effectue sous vide pendant 1h afin d'éliminer toute trace d'eau sur la cartouche.

L'élution des composés d'intérêt se fait par trois éluions successives (acétate d'éthyle, mélange acétate d'éthyle:acétone (50:50; v:v), puis mélange acétate d'éthyle:acétone:NH₄OH (49:49:2; v:v:v). L'éluat est évaporé à sec et repris dans de l'acétate d'éthyle pour injection.

La phase particulaire est dans un premier temps lyophilisée avant de subir une extraction assistée par micro-ondes (10 min, 15 W) dans 30 mL d'un mélange d'eau à pH 2 et d'acétonitrile (30:70; v:v), après ajout des étalons deutérés. L'extrait est ensuite filtré sur coton de verre, avant évaporation du solvant par utilisation d'un système d'évaporation sous vide par chauffage (Rapidvap ®, 45 min, 80°C, 650 mbars). L'extrait

est ensuite repris dans 50 mL d'eau acidifiée à pH 2 et subit le protocole d'extraction sur phase solide précédemment décrit pour la phase dissoute.

Analyse GC-MS

Les analyses sont effectuées avec un chromatographe en phase gazeuse 6890 Agilent Technologies (injecteur : 270°C; programmation du four de 90°C (2min.) à 250°C (2min.) à 5°C /min) couplé à un détecteur de masse 5973 Agilent Technologies (70 eV ; mode d'analyse en sélection d'ion) en utilisant une colonne capillaire HP5-MS (Agilent Technologies ; 5% phényl-95% méthyl-polysiloxane ; 30 m x 0,25 I.D. mm x 0,25µm d'épaisseur de film).

L'échantillon est injecté une première fois pour l'analyse des composés pharmaceutiques neutres (cf. tableau 2) puis dérivé (30 µl de MSTFA, 65 °C, 35 min.) avant d'être réinjecté pour l'analyse des composés acides.

Avant chaque analyse, un composé étalon est ajouté à l'échantillon pour valider les taux d'extraction et la qualité de l'analyse : le pyrène pour la première injection et le 1-hydroxy-pyrène pour la deuxième. Les ions (rapport m/z) retenus pour chacun des composés pour la quantification par GC-MS sont présentés dans le tableau 2.

Sites d'études :

L'estuaire de la Seine, en tant que zone fortement anthropisée a fait l'objet d'une dizaine de campagnes, réparties entre mars 2002 et juin 2005, concernant à la fois des points de rivière et des stations d'épuration.

Les estuaires de la Gironde, de la Loire et de l'Adour ont aussi fait l'objet de campagnes d'échantillonnage.

La calanque de Cortiou est une zone de la mer Méditerranée dans laquelle se déverse l'effluent de la station d'épuration de Marseille (1,3 Millions équivalents-habitants). Une campagne de prélèvements a été effectuée au niveau du rejet et dans la zone d'influence de celui-ci.

Résultats et discussion :

Le tableau 3 présente les gammes de concentrations des quatre estuaires étudiés.

La Gironde est l'estuaire le moins impacté. Bien qu'il y ait deux villes importantes sur la Garonne, Bordeaux et Toulouse, le débit important du fleuve limite sans doute l'impact des stations d'épuration qui peuvent s'y déverser. Le même phénomène est visible sur la Loire pour laquelle les concentrations restent faibles, sauf en un point, situé à proximité d'un effluent de station d'épuration.

L'Adour est un petit estuaire sur lequel se trouvent des villes dont la population fluctue de manière importante en fonction des saisons (stations balnéaires). Les concentrations qui y sont mesurées sont globalement peu élevées.

L'estuaire de Seine est de loin le plus impacté avec des concentrations de plusieurs centaines de ng/L selon les composés

Sur le suivi pluriannuel de l'estuaire de Seine, divers phénomènes ont pu être mis en évidence. Concernant la répartition longitudinale de la contamination, la majeure partie des apports provient de l'amont de l'estuaire (amont barrage de Poses) avec l'impact très significatif de l'agglomération parisienne (fig.2). Les niveaux de concentration varient selon les composés, leur mode de consommation et leur dégradabilité, que ce soit au niveau des stations d'épuration ou dans le milieu naturel.

La caféine est un composé provenant principalement de la consommation de café. Même si sa dégradabilité est importante (généralement supérieure à 85% [14]), l'importance des quantités apportées fait que ce composé est très présent dans les systèmes fortement anthropisés comme celui de la Seine, avec des concentrations

mesurées jusqu'à 900 ng/L. L'importante dégradabilité dans le milieu entraîne néanmoins une diminution le long de l'estuaire, pour atteindre des concentrations de l'ordre de la dizaine de ng/L en sortie d'estuaire.

La carbamazépine suit un processus différent. Son utilisation comme antidépresseur léger et dans le traitement de l'épilepsie amène une faible consommation. Néanmoins, sa faible dégradabilité, avec des taux d'élimination communément constatés comme inférieurs à 7 % [15], entraîne sa présence dans la Seine, avec des concentrations de l'ordre de 100 ng/L, avec une stabilité tout au long de l'estuaire, due à sa persistance dans le milieu.

Les anti-inflammatoires (naproxène, ibuprofène, kétoprofène, diclofénac...) sont relativement présents dans l'estuaire de la Seine avec des concentrations de l'ordre de la dizaine de ng/L. Consommés en quantités importantes, souvent sans prescription médicale, ils sont plus ou moins bien dégradés (entre 30 et 80%) dans les stations d'épuration [8, 14, 16, 17], selon les modes de traitement.

La figure 3 présente les résultats obtenus dans la Calanque de Cortiou, sur un point de prélèvement situé à environ 300 m du rejet.

Les concentrations mesurées montrent deux niveaux de concentrations : le premier correspond aux anti-inflammatoires non stéroïdiens, à la carbamazépine et la caféine, qui présentent de très forts niveaux de concentrations, compris entre 200 et 8000 ng/L selon les composés. Le paracétamol mesuré montre de très fortes concentrations (jusqu'à 250 µg/L), dues à l'absence de traitement biologique de la station d'épuration de Marseille, principale étape de dégradation du paracétamol [14].

Un deuxième niveau de concentration, compris entre 3 et 10 ng/L, concerne les substances plus exceptionnellement rencontrées dans les milieux naturels, comme le gemfibrozil et les antidépresseurs. Les concentrations sont relativement faibles, mais ces types de composés présentent une toxicité avérée sur les organismes aquatiques [9]. La présence de ces classes thérapeutiques à des concentrations non négligeables montre le fort impact de la station d'épuration dans une zone assez large autour du rejet.

Si on s'intéresse à l'apport particulaire il varie entre 7 et 500 ng/g selon les composés ce qui met en évidence le rôle potentiel de source et de vecteur que peuvent représenter ces particules. Néanmoins, compte tenu de la très faible concentration en matière en suspension des eaux de mer (ici 7 mg/L), la phase particulaire très nettement minoritaire par rapport à la phase dissoute (environ 0,1 ng/L) dans la contamination globale de la colonne d'eau.

Conclusion:

Cette étude est une des premières concernant le niveau de contamination des milieux aquatiques en France [18]. Il est maintenant avéré que les substances pharmaceutiques sont présentes dans les milieux aquatiques anthropisés, sous l'influence des rejets des stations d'épuration. Désormais, de nombreuses études s'attachent à améliorer les systèmes de traitement tant au niveau des rejets urbains que de la potabilisation des eaux.

Concernant le risque humain d'exposition aux substances pharmaceutiques par la consommation des eaux de boissons, il est montré [19] que dans l'état actuel des connaissances, cette exposition à des concentrations inférieures à la dizaine de ng/L ne présente pas de risque. Cette estimation se fait néanmoins en prenant en compte d'une part l'effet individuel des substances, négligeant ainsi un potentiel effet synergique de ces produits, et d'autre part sur la base d'études toxicologiques très limitées (toxicité aigue pour les autorisations de mise sur le marché et quelques études de toxicité chronique). En ce qui concerne l'impact sur les organismes aquatiques, les études sont encore en cours et demanderont de nouvelles recherches pour connaître l'effet à de faibles concentrations mais sur le long terme de ces composés.

Bibliographie:

- [1] Hirsch R., Ternes T.A., Haberer K. and Kratz KL. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment The Science of the Total environment. 1999; 225: 109-118.
- [2] Metcalfe C.D., Koenig B. G., Bennie D. T., Servos M. , Ternes T. A. and Hirsch R. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluent of canadian sewage treatment plants. Environmental Toxicology and Chemistry. 2003; 22 (12): 2872-2880.
- [3] Beausse J. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2004; 23 (10-11): 753-761.
- [4] Halling-Sorensen B., Nielsen S.N, Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lützhof H.C. and Jorgensen S.E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment : a review Chemosphere. 1998; 36: 357-393.
- [5] Farré M., Ferrer I., Ginebreda A. *et al.* Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry : methods and preliminary results including toxicity studies with *vibrio fischeri* Journal of Chromatography A. 2001; 938: 187-197.
- [6] Heberer T. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. Journal of Hydrology. 2002; 266: 175-189.
- [7] Öllers, Singer, Fässler and Müller. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water Journal of Chromatography A. 2001; 911: 225-234.
- [8] Tauxe-Wuersch A., De Alencastro L.F., Grandjean D. and Tarradellas J. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment Water Research. 2005; 39 (9): 1761-1772.
- [9] Cleuvers M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects Toxicology Letters. 2003; 142 (3): 185-194.
- [10] Laville N., Ait-Aissa S., Gomez E., Casellas C. and Porcher J. M. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes Toxicology. 2004; 196 (1-2): 41-55.
- [11] Sanderson H., Johnson D. J., Reitsma T., Brain R. A., Wilson C. J. and Solomon K. R. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2004; 39 (2): 158-183.
- [12] Jones O.A.H., Voulvoulis N. and Lester J.N. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals Water Research. 2002; 36 (20): 5013-5022.
- [13] Schulman L. J., Sargent E. V., Naumann B. D., Faria E. C., Dolan D.G. and Wargo, J. P. A Human Health Risk Assessment of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment Human and Ecological Risk Assessment. 2002; 8 (4): 657-680.
- [14] Joss A., Keller E., Alder A. C. *et al.* Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment Water Research. 2005; 39 (14): 3139-3152.

- [15] Ternes T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*. 1998; 32 (11): 3245-3260.
- [16] Buser H.R, Poiger T. and Müller M.D. Occurrence and environmental behaviour of chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environmental Science and Technology*. 1999; 33: 2529-2535.
- [17] Quintana J.B., Weiss S. and Reemtsma T. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceuticals and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research*. 2005; 39 (12): 2654-2664.
- [18] Ferrari B., Paxeus N., Giudice R. L., Pollio A. and Garric J. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003; 55 (3): 359-370.
- [19] Schwabb B. W., Hayes E. P., Fiori J. M. *et al.* Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2005; 42 (3): 296-312.

Liste des tableaux :

Tableau1 : Consommation en substance pharmaceutiques, données en tonnes par an, selon Beausse [3].

Tableau 2 : substances pharmaceutiques étudiées : Structure chimique, masse molaire (MM) et ion de quantification (m/z) pour l'analyse par GC-MS.

Tableau 3 : Concentrations extrêmes (ng/L) mesurées dans les différents estuaires.

Liste des figures :

Figure 1 : Niveau de contamination de l'estuaire de Seine, octobre 2003 : exemple de 3 composés.

Figure 2 : Niveau de contamination dans la Calanque de Cortiou, exemple du point situé à 300 m du rejet.

| Classe thérapeutique | Composés | Royaume-Uni | France | Danemark | Allemagne |
|--------------------------------------|---------------|-------------|--------|----------|-----------|
| Anti-inflammatoires, Analgésiques | Paracétamol | 390 | 2294 | 248 | |
| | Aspirine | 18 | 880 | 213 | |
| | Ibuprofène | 162 | 166 | 34 | 105 |
| | Diclofénac | 26 | | | 75 |
| Hypolipémiant | Gemfibrozil | | | | 6 |
| Antidépresseurs | Fluoxétine | 2 | | | |
| | Carbamazépine | 40 | 38 | | 38 |

Tableau 1 : Consommation en substance pharmaceutiques, données en tonnes par an, selon Beausse [3].

| Composés | M g.mol ⁻¹ | m/z | Composés | M g.mol ⁻¹ | m/z |
|---|--------------------------|-----|------------------|--------------------------|---------|
| <u>Composés acides (dérivés)</u> | | | | | |
| Aspirine | 180 | | Diclofénac | 295 | |
| Ibuprofène | 206 | | Gemfibrozil | 250 | |
| Kétoprofène | 254 | | Salbutamol | 239 | |
| Naproxène | 230 | | Clenbutérol | 276 | |
| Paracétamol | 151 | | Terbutaline | 225 | |
| Etalon de contrôle : | | | 1-Hydroxy-pyrène | 218 | |
| <u>Composés neutres (non dérivés)</u> | | | | | |
| Caféine | 194 | 194 | Imipramine | 280 | 234, 58 |
| Diazépam | 284 | 256 | Doxépine | 279 | 58 |
| Carbamazépine | 236 | 193 | Nordiazépam | 270 | 242 |
| Amitriptyline | 277 | 58 | | | |
| Etalon de contrôle : | | | Pyrène | 202 | 202 |
| <u>Etalons internes de quantification</u> | | | | | |
| Diazépam d5 | 286 | 261 | Amitriptyline d6 | 287 | 64 |
| Nordiazépam d5 | 276 | 247 | | | |

Tableau 2 : substances pharmaceutiques étudiées : Structure chimique, masse molaire (MM) et ion de quantification (m/z) pour l'analyse par GC-MS.

| | GIRONDE | LOIRE | ADOUR | SEINE |
|---------------|---------|----------|---------|----------|
| Aspirine | ld - 0 | ld - 27 | 8 - 28 | 0 - 0 |
| Caféine | ld - 5 | ld - 73 | 0 - 2 | 40 - 860 |
| Diclofénac | ld - 1 | ld - 6 | 8 - 23 | 0 - 28 |
| Gemfibrozil | ld - 1 | ld - 2 | 1 - 9 | 0 - 15 |
| Ibuprofène | ld - 2 | ld - 9 | 14 - 37 | 0 - 45 |
| Kétoprofène | ld - 3 | ld - 9 | 0 - 0 | 0 - 12 |
| Naproxène | ld - 1 | ld - 8 | 1 - 6 | 0 - 103 |
| Carbamazépine | ld - 2 | ld - 228 | 0 - 8 | 9 - 132 |

Tableau 3 : Concentrations extrêmes (ng/L) mesurées dans les différents estuaires.

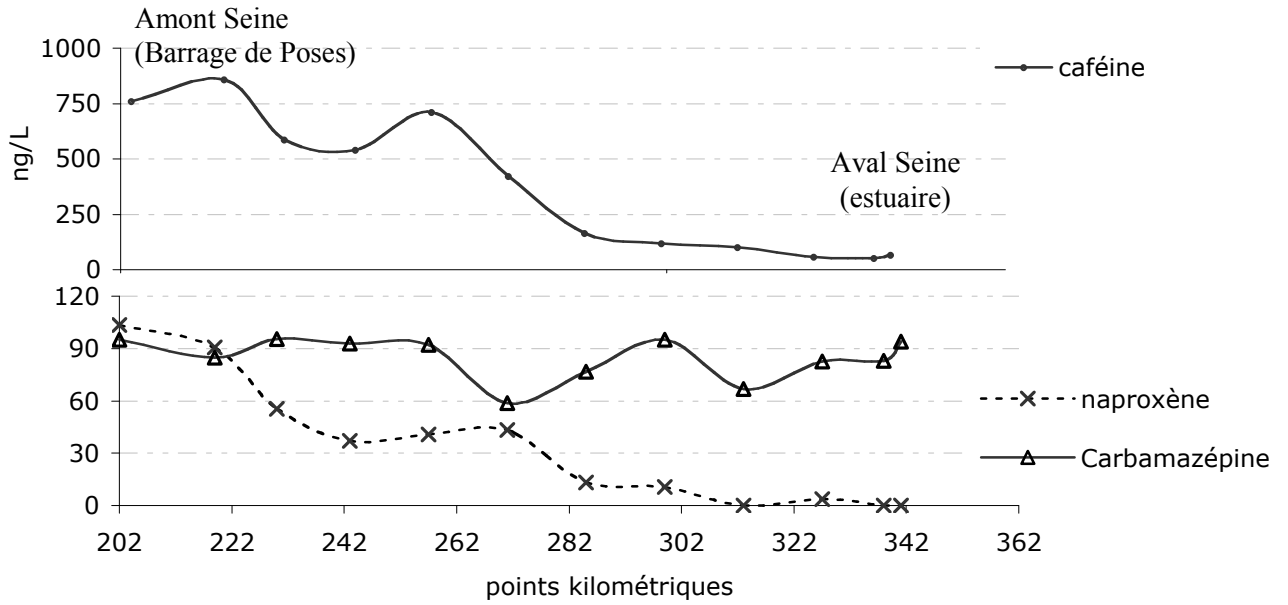


Figure 1 : Niveau de contamination de l'estuaire de Seine, octobre 2003 : exemple de 3 composés.

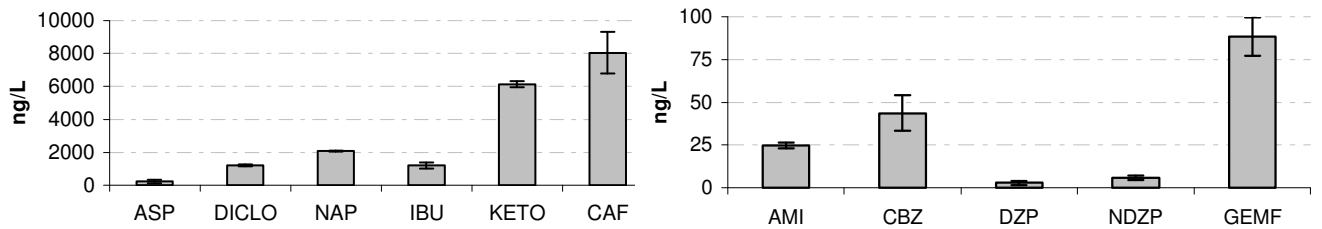


Figure 2 : Niveau de contamination dans la Calanque de Cortiou, exemple du point situé à 300 m du rejet.

PUBLICATION 5

Environmental Science and Technology (2006).40 (17) p5282-5288

Consequences of Treated Water Recycling as Regards Pharmaceuticals and Drugs in Surface and Ground Waters of a Medium-sized Mediterranean Catchment

Rabiet^{a,*}, M., Togola^b, A., Brissaud^a, F., Seidel^a, J. L., Pistre^a, S., Budzinski^b, H., Elbaz-Poulichet^a, F.

^a Laboratoire Hydrosociences Montpellier (HSM), UMR 5569, CC MSE, Université Montpellier II, 34095 Montpellier Cedex 5, France

^b Laboratoire de Physico et Toxico Chimie des systèmes naturels (LPTC), Université Bordeaux 1, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France

*Corresponding author. Tel.: +33 4 67 14 90 86, fax: +33 4 67 14 47 74.
E-mail address: Rabiet@msem.univ-montp2.fr

Abstract

Selected wastewater effluents, surface and drinking waters have been checked for the presence of 17 common pharmaceuticals (amitryptiline, aspirin, caffeine, carbamazepine, clenbuterol, diazepam, diclofenac, doxepine, gemfibrozil, ibuprofen, imipramine, ketoprofen, naproxen, nordiazepam, paracetamol, salbutamol, terbutaline and gadolinium) and excess boron, nitrate and chloride in the Hérault watershed (France).

Pharmaceuticals are present in several reservoirs including one well tapped for drinking water. At these sites, paracetamol, caffeine and diclofenac are the most frequently detected. In spite of its strong degradability in WWTP, caffeine is commonly encountered because of its very high consumption. Paracetamol is also present at rather high concentrations (up to 11 µg/l and 211 ng/l respectively in a wastewater effluent and in a drinking water sample). In spite of its large consumption in France, aspirin concentration is generally low. This is attributed to its very rapid degradation in environment. Doxepine, imipramine, salbutamol and terbutaline are never detected in drinking waters, surface waters and WWTP effluents. The monitoring of pharmaceuticals along the Lergue and the Hérault Rivers shows that dilution is sufficient to strongly decrease pharmaceutical values.

Keywords

Drinking water contamination, Pharmaceutical, Wastewater

Introduction

The presence of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in aquatic environment has become a subject of growing concern worldwide. First results dealing with environmental occurrence of pharmaceuticals were reported by Garrison et al. (1976) and Hignite and Azaznoff (1977) who revealed the presence of the clofibric acid, a pharmaceutical largely used to reduce cholesterol levels in blood, in wastewater effluents in the United States. Soon after, pharmaceuticals concentrations up to 1 µg/L in several UK water bodies were reported (Waggot, 1981; Watts et al., 1983; Richardson and Bowron, 1985). Later on PPCPs such as psychiatric drugs, analgesics, antibiotics, IRM contrast agent as well as boron used in detergent formulation were found in treated wastewater in Europe (Ternes, 1998; Heberer, 2002ab; Elbaz-Poulichet et al., 2002, Ferrari et al., 2003), in USA (Boyd et al., 2003) or in Asia (Nozaki et al., 2000). In 2002, more than 80 compounds, pharmaceuticals and several drug metabolites have been detected in the aquatic environment (Heberer, 2002a). These compounds or their metabolites mostly conjugated to polar molecules, are excreted via faeces and urine (Ternes, 1998). Pharmaceuticals are biologically active substances since they have been especially designed for having an effect on living organisms. Therefore, they present a potential risk for the ecosystem and eventually for human, due to water reuse especially when it is unplanned. Moreover, owing to their polar structure, several pharmaceuticals are not significantly adsorbed in the subsoil (Heberer, 1995; Heberer et al., 2001; Heberer and Stan, 1997), thus they may reach the groundwater which constitutes a major source of drinking water. Actually, the presence of pharmaceuticals in drinking water is well documented in the literature. Concentrations of pharmaceuticals in the range of several hundreds of ng/L have been reported in the drinking water of Berlin (Heberer and Stan, 1997; Heberer et al., 1998; Heberer, 2002b; Reddersen et al., 2002), Prague (Möller et al., 2002) or Italy (Zuccato et al., 2000). Although, these levels are much lower than those used in medical applications, the related potential toxic effects are still poorly known and cannot be discarded (Farré et al., 2001).

In Mediterranean regions where the population is rapidly growing, the risk of contamination of the water resource is likely to increase. This is the case of the Hérault watershed (Southern France), which is subjected to an intensive urbanization leading to the increase of drinking water consumption and wastewater discharge. In this basin, we carried out a study in 2003 in order to evaluate the impact of wastewater discharge in streams and aquifers tapped for drinking water supply (Rabiet et al., 2005). Using a battery of wastewater tracers including nitrate, chloride, boron and the gadolinium anomaly, the presence of treated wastewater was detected in two tributaries of the Hérault River and in few wells supplying drinking water. For two of them, it was estimated that recycled wastewater constitutes between 20 and 30% of the drinking water supplied.

The aim of the present study is to validate the multitracer approach and assess the consequences of this unplanned water recycling as regards pharmaceuticals. A better understanding of the behaviour of pharmaceuticals in aquatic environment was also expected.

Boron (used in detergents formulation), nitrate, chloride, gadolinium (a rare earth element used as a contrast agent in Magnetic Resonance Imagery) and pharmaceuticals (amitryptilin, aspirin, caffeine, carbamazepine, clenbuterol, diazepam, diclofenac, doxepin, gemfibrozil, ibuprofen, imipramine, ketoprofen, naproxen, nordiaz, paracetamol, salbutamol and terbutalin) have been determined in wells and tributaries which were found to be contaminated by wastewater in our previous study (Rabiet et al, 2005). In addition, a monitoring was achieved along the Lergue River, the main tributary of the Hérault River to assess pharmaceuticals behaviour.

Materials and methods

The Hérault River basin

The Hérault watershed is located in the south of France (Fig. 1). The River is 150 km long and drains a medium-sized basin of 2500 km² at its outlet in the Mediterranean Sea. The Hérault watershed has two main aquifers, one is alluvial and the other karstic. The alluvial aquifer, in the south of the watershed, is extensively exploited for drinking water. It supplies 24.2 Mm³ of drinking water per year. The semi-confined Astian sand aquifer located under the alluvial plain in the South of the basin is also an important water resource but it is overexploited and presents a risk of seawater intrusion.

Intensive urbanization of the alluvial valley leads to a tremendous increase of the demand for domestic water and of the anthropogenic pressure. The Hérault River and its tributaries (9) receive the effluents of 96 Waste Water Treatment Plants (WWTP) corresponding to 194,000 population equivalents. The basin comprises very few industries and hospitals or clinics. It is mainly dedicated to agriculture, notably vineyards.

Sampling and analysis

Sampling

Sampling was carried out at the beginning of April 2004 during the winter high water stage, the Hérault River flow rate at the outlet of the basin being 80 m³/s. The location of sampling station is given in Fig.1. Water samples have been collected in :

- 7 wells supplying drinking water, W1 to W7, where clues to contamination have been detected previously,
- 2 WWTP effluents, WWTP1 and WWTP2,
- 7 surface water samples taken from the Hérault (H1 and H2), Lergue (T2a to T2d) and Thongue (T1) Rivers. In the Lergue River, samples were collected upstream and downstream WWTP2 discharge, along the river and upstream and downstream the confluence with the Hérault River.

The well W1 (St Thibéry-Astian) is located in the South of the Hérault watershed in the alluvial plain near the confluence between the Hérault River and the Thongue River. It taps the Astian semi-confined aquifer. Wells W2 (St Thibéry-Alluvial) and W4 (Nézignan l'Evêque) tap directly the alluvial aquifer of the Hérault River whereas the well W3 (Servian) is located in the alluvial plain of the Thongue River. The well W5 (Paulhan) is located in Tertiary aquifer, in Miocene molasse (sandstones, marls and clay minerals). The well W6 (Le Pouget) is located in the Hérault River alluvial plain at a few meters from the river bank. It is mainly supplied by the Hérault River and by side contributions from the old alluvial terraces which border the river. The well W7 (Brignac) taps the Lergue River alluvial aquifer. The only treatment applied to the water pumped from wells prior supply to the potable water network is chlorination. All wells are situated in region where the vine culture is the dominant agricultural activity.

The Thongue River (T1) is the Southeast tributary of the Hérault River. It is 32 km long and drains a basin of 156 km². Its discharge is comprised between 0.1 and 1 m³/s. The lowest part of the watershed is strongly affected by human activity. Eight WWTPs with an overall capacity of 10,000 p.e., discharge their effluents in the river or at close distance.

The Lergue River (T2) is 40 km long and drains a watershed of 410 km². It is located in the western part of the Hérault watershed. When sampling was carried out, the Lergue River discharge was 14 m³/s. The wastewater treatment plant (WWTP2) of Lodève (6900 inhabitants) discharges in the north of the basin. The plant which has a capacity of 13,300 p.e., is an activated sludge plant with nitrification and denitrification. Before being released into the Hérault River, the effluents pass through a small reed area. Samples were taken at station T2a, just before WWTP2 discharge, and at T2b in the side of the effluent discharge plume before its complete mixing with the main flow (Fig. 2). The

activated sludge WWTP1, serves the village supplied by the wells W1 or W2. It is designed for 3600 p.e. and discharges also in the Hérault River.

Sample pretreatment and analysis

For Cl⁻ and NO₃⁻ analysis, 50 ml of water were collected in a polyethylene bottle and then filtered through 0.45 µm-pore size PVDF Millipore filters. Samples for nitrate analysis were deep frozen. Samples for chloride determination were acidified at pH 2 with Merck Suprapur HNO₃ and then stored at 4°C. Chloride and nitrate concentrations were determined by capillary ion electrophoresis.

Samples for Rare Earth Elements (REE) and boron analysis were collected in acid-cleaned polyethylene bottles. Then they were filtered through previously acid-washed 0.22 µm-pore size PVDF Millipore membranes fitted on polycarbonate Nalgene filtration units. The filtration was carried out less than 10 hours after collection under a class 100 laminar flow hood providing a clean environment. The filtered samples acidified (pH 2) with Merck Suprapur HNO₃ were stored in acid pre-cleaned polyethylene bottles until analysis.

Boron and REE were determined using Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). For REE, a preconcentration procedure was used (Elbaz-Poulichet et al., 2002). This technique, similar but slightly modified to that reported by Shabani et al. (1992), allows major ion removal, decreases the matrix effects and improves the sensitivity. The relative error is less than 10%. To delineate REE distribution, it is conventional to normalize REE abundance against a reference standard, representing the average REE composition of the earth's upper crust. The reference standard used in this study is the North American Shale Composite (NASC) (Haskin et al., 1968). The Gd anomaly has been interpolated from the shale-normalized concentrations of its two neighboring REE (Sm et Tb) using the following equation :

$$Gd^* = GdN / (0.33 \times SmN + 0.67 \times TbN) \quad (1)$$

Samples for pharmaceuticals were sampled in a dark glass bottle of 2 liters. Seventeen pharmaceutical substances (Tab. 1) were analysed by GC-MS with both extraction and purification procedure. Limit of detection for each pharmaceutical is presented in Table 1.

Results

Chloride, boron, nitrate and pharmaceuticals concentrations as well as Gd anomalies are reported in Table 2.

In wells, chloride concentrations are comprised between 9.7 mg/L and 105.1 mg/L. In the same way, nitrate concentrations vary between 4.6 mg/L in W2 and 44.2 mg/L in W3. Boron concentrations range from 19.5 µg/L to 125.4 µg/L.

Compared to wells, the two WWTP effluents display higher boron concentrations (112.3 and 143.3 µg/L respectively). Boron is widely used as a bleaching agent in a variety of cleaning products under the form of sodium perborate (Barth, 1997). However, in addition to its anthropogenic origin, boron can be brought by Triassic evaporite dissolution present in the western part of the basin. Rabiet et al. (2005) have shown that in the Hérault basin, boron is mainly derived from WWTP except in the Lergue sub-basin where the natural boron concentration can reach 50 µg/L. The higher concentrations observed in the wells W6 and W7 which are located in a part of the basin devoid of Triassic evaporite, strongly suggests an anthropogenic input.

The use of Gd organic complexes as contrast medium in MRI generates positive Gd anomalies (Gd*) in water (Bau and Dulski, 1996; Kummerer, 2001). The water is considered as being contaminated when its Gd* is higher than 2 which is just above the maximum value reported in not contaminated water (Lee and Byrne, 1992; De Baar et al., 1985).

In our samples, this occurs only in the well W6. The corresponding Gd excess concentration (Gdanth) is 10 pmol/l. This represents 56 % of total dissolved Gd.

The abundance of pharmaceuticals in wells, tributaries and WWTP effluents is reported in Fig. 3, 4, and 6. Doxepin, imipramine, salbutamol and terbutalin are never detected. Clenbuterol, diazepam and nordiaz are present only in wastewater. Whereas aspirin is the most consumed pharmaceutical worldwide (880 tons/year in France, Janex et al., 2002), it is present at only 2 sites (W2 and W3) with one value very close to the detection limit (0.2 ng/L). Ibuprofen, a non steroidal anti-inflammatory (NSAI) analgesic, is an important nonprescription drug (166 tons/yr in France, Janex et al., 2002) and has a relatively high therapeutic dose (600-1200 mg/day) (Buser et al. 1999). However, it is efficiently degraded during treatment in WWTPs (Buser et al., 1999) in agreement with the very low-levels (ranging between 0.2 and 4.5 ng/l) found in surface and groundwaters.

Caffeine, diclofenac and paracetamol are detected most frequently in wells, as well as in tributaries and WWTP effluents.

Paracetamol and caffeine are found at high concentrations in WWTP effluents (11,300 ng/L and 2200 ng/L respectively in WWTP1) probably in relation to their large consumption in France where 2294 tons/year of paracetamol are sold, prescribed or used (Janex et al., 2002). To our knowledge, this is the higher paracetamol concentration ever reported in WWTP effluents. In surface waters, caffeine and diclofenac are ubiquitously found. Caffeine, which is readily biodegradable (Buerge et al., 2003), is ranked number one drug worldwide. It is a stimulant found in coffee, tea, and soft drinks. It is also used in numerous prescription and non-prescription pharmaceutical preparations (Seiler et al., 1999). The high daily consumption of caffeine explains why it is generally present in drinking water in spite of its low stability (Ternes et al., 2001). Diclofenac is a NSAI agent largely used for anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activity.

In wells, diclofenac and paracetamol are the most frequently detected compounds. Carbamazepine and paracetamol display their highest concentrations respectively in the well W6 (43 ng/L carbamazepine) and in the well W7 (210 ng/L paracetamol). Carbamazepine is an important drug for the treatment of common neuron system disease (epilepsy, pediatric seizure disorders, schizophrenia, bipolar disorder and so on) (Miao and Metcalfe, 2003). It is detected in only two groundwater samples (wells W6 and W7) although it is known to be very persistent in the environment since it is not degraded or retained in wastewater treatment plants and not removed during soil passage and subsurface flow (Clara et al., 2004).

Discussion

Wastewater effluents (WWTP1 and WWTP2)

Total pharmaceutical concentrations in WWTP1 effluent are 10 times higher than in WWTP2 effluent (Fig. 5). This difference is reflected by all drug concentrations except for carbamazepine. This suggests different efficiencies in pharmaceutical removal. In conventional wastewater treatment plants, pharmaceuticals can be removed by sorption to particles followed by settling and removal or by biotransformation (Sedlak and Pinkston, 2001). These processes are strongly dependent on the physical-chemical properties of drugs but also on the biological processes. Sludge age, which equals the average time that microorganisms remain in the biological system, is an important parameter in biological processes since it determines the adaptation time for microorganisms to a substrate. Clara et al. (2005) showed that increasing sludge age allows better pharmaceuticals removal. In WWTP1 effluent, sludge age is between 2 and

8 days whereas it is higher than 15 days in WWTP2 which performs nitrification and denitrification. Thus, the conditions are more favorable in WWTP2 than in WWTP1 for the removal of pharmaceuticals.

The similarity of carbamazepine concentrations in both WWTP effluents is consistent with the chemical properties of carbamazepine which is not easily degraded or retained in wastewater treatment plant whatever the sludge age as shown by Clara et al. (2004) and Clara et al. (2005).

The Thongue River (T1) and wells (W1 to W7)

The upper part of the Thongue River basin which is an intensive agricultural area, is also densely populated. The presence of a positive Gd^* ($Gd^*=3.0$) associated with high boron and chloride concentrations in February 2003 indicated a wastewater contamination of the river (Rabiet et al., 2005). This is corroborated by the present study, which demonstrates the presence of caffeine, carbamazepine, diclofenac, ibuprofen and paracetamol in the river.

The well W1 (St Thibéry-Astian) taps the Astian aquifer semi-confined beneath the alluvial aquifer. In the north, the Hérault River alluvial aquifer and the Astian are joined. Towards the south, the Astian aquifer dips steeply under the alluvial aquifer, from which it is separated by Pliocene marls. It is vulnerable to anthropogenic pollution in its north outcrops and when recharged from the alluvial aquifer. In February 2003, we concluded to a slight contamination of the well W1 on the basis of nitrate, chloride and boron concentrations (Rabiet et al., 2005).

Pharmaceutical data show only the presence of paracetamol at a value of 8.3 ng/L, confirming a small contamination by domestic wastewater. The residual high nitrate concentration (12.6 mg/L) suggests a diffuse pollution source, probably originating from agriculture rather than domestic inputs. The W2 (St Thibéry-Alluvial) taps the alluvial aquifer of the Hérault River at only a few meters of the river. In July 2003, the well water was marked by a gadolinium anomaly of 2.3 (unpublished data). As in well W1, the pharmaceutical concentrations in well W2 are close to the LOD values except for paracetamol. In addition, nitrate, chloride and boron concentrations do not reflect a noticeable wastewater contamination. These data are consistent with a slight contamination of the well W2 by wastewater.

The well W3 (Servian) is located in the alluvial aquifer of the Thongue River (T1) in an agricultural area (vine and cereal culture). In the previous study (Rabiet et al., 2005), we noticed the different chemistry of the well W3 and the Thongue River. The later has higher B concentrations, a significant Gd^* and a high pharmaceutical concentration whereas the well W3 is devoid of Gd^* and pharmaceuticals. This confirms that the important occurrence of nitrate (45.9 mg/L), chloride (97.5 mg/L) and sulfate (208 mg/L) in the well W3 is mainly derived from agricultural activities.

The well W4 (Nézignan l'Evêque) is located in an exclusively vineyards area and taps the alluvial aquifer of the Hérault River. It shows moderate nitrate, chloride and boron concentration and is devoid of Gd^* . Only paracetamol (9.9 ng/L) indicates a very slight wastewater contamination.

W5 (Paulhan) is located in Tertiary aquifer, which seems to be in hydraulic continuity with the alluvial aquifer. High nitrate and chloride concentrations and generally low boron concentrations are generally registered in this well (Rabiet et al., 2005 and unpublished data) suggesting an agricultural contamination. This is further attested by the presence of sulfates and simazin, a pesticide, at values comprised between 0.1 and 0.4 $\mu\text{g/L}$ (Geo prospect, 1998). The high paracetamol concentration (42.5 ng/L) determined in the present study shows in addition an intrusion of wastewater from

probably an on site wastewater treatment facilities since there is no WWTP in the vicinity of the well.

The well W6 (Le Pouget) is located in the alluvial plain of the Hérault River. The WWTP serving the village is located at 1.5 km from the well but its effluent is discharged in a small creek which flows at only 150 m upstream the well just before reaching the Hérault River. In February 2003, W6 exhibited high nitrate, chloride and boron concentrations as well as a positive gadolinium anomaly ($Gd^*=2.4$) which indicated a noticeable wastewater contamination (Rabiet et al., 2005). The pharmaceutical content reported in this study backs this assertion as W6 exhibits high carbamazepine concentration (43.2 ng/l) and significant ketoprofen (3 ng/l) and paracetamol (9.6 ng/l) contents. Moreover, a significant Gd anomaly ($Gd^*=2.3$) remains in time as well as high nitrate, boron and chloride concentrations. It appears that this is a case of wastewater recycling within the same village all the year long.

The well W7 (Brignac) is located in the alluvial plain of the Lergue River at only 280 m in the North of the WWTP discharge of Brignac. Water pumped from the well W7 is characterized by very high nitrate, chloride and boron concentrations as well as high pharmaceutical contents with paracetamol concentration reaching 210 ng/L. These values confirm the important wastewater contamination of the well by the WWTP effluent.

In spite of their presence indicating a wastewater contamination, the concentrations of drugs measured in wells are very low in comparison to those required for pharmacological effects in man. For example, the therapeutic dose for paracetamol is about 1200 mg/day. Considering the highest concentration of paracetamol (211 ng/L found in the well W7), it would be necessary to drink 5,687 cubic meters of water to produce a pharmacological effect.

The Lergue River

The discharge of WWTP2 effluent in the Lergue River results in an increase of total pharmaceutical concentrations from 61.3 to 302 ng/L (Fig. 7). In spite of their presence in WWTP2 effluent, aspirin and amitriptylin are not detected in the river at T2b site. Comparing concentrations observed at T2a, T2b and in WWTP2 effluent (Fig. 8) allows the highlight of different pharmaceutical behaviours. Assuming that paracetamol is conservative, at least over a short distance, it can be estimated that water sampled at T2b is composed of 64% of WWTP2 effluent and 36 % of river water as sampled at T2a. This high proportion of wastewater indicates that complete mixing between the WWTP2 effluent and the Lergue water is not achieved at station T2b. Using these proportions to calculate theoretical pharmaceutical concentrations at T2b site leads to values higher than observed (Tab. 3). Thus, removal rate between WWTP2 and T2b vary between 0 % for paracetamol and ketoprofen and 94 % for aspirin. The absence of aspirin at T2b site is probably due to its very rapid degradation. Dilution is sufficient to lower amytriptilin concentration under detection limit. Caffeine seems to be persistent with a removal of only 42 % between WWTP2 effluent and T2b.

Between stations T2b and T2c, 17 km apart, the total pharmaceutical concentration in the Lergue River decreases by a factor of 10. Only paracetamol, caffeine and diclofenac remain detected at the T2c site. Considering a discharge of 400 litres of wastewater per inhabitant – which includes groundwater leakages -, the WWTP2 discharge can be estimated at about 0.032 m³/s. With a Lergue River flow at T2a site of about 14 m³/s and a Lergue River flow at T2c site at about 35 m³/s, dilution accounts for the strong decrease observed in pharmaceuticals concentration at T2c site. It is not the case for Cl⁻ and B concentrations since the Lergue River flows on Triassic evaporites which can contribute to B and to a lesser extent Cl⁻ concentration all along the river (Rabiet et al., 2005).

Only caffeine remain detectable in the Lergue River at T2d site just before the confluence with the Hérault River. In spite of its very biodegradability during sewage treatment plant processes (Richardson and Bowron, 1985; Buser et al., 1998, Buerge et al., 2003), caffeine seems to be the more persistent in aquatic environment as it is found from T2a site to T2d site and in the Hérault River. It can be ascribed in one hand to the continuous consumption of caffeine which lead to its systematic presence at high concentration in wastewater and on the other hand to a persistent behaviour in river as it is found at T2a site, far from a WWTP discharge.

At the exception of caffeine, pharmaceuticals were not detected in the Hérault River (H1). Moreover, the contribution of the Lergue River resulted in a slight decrease of caffeine content (H2).

Conclusion

The study validates the multitracer approach of Rabiet et al. (2005) and confirms the presence of wastewater contamination in a few wells supplying drinking water. In some of these wells, the total pharmaceutical concentrations may reach 249 ng/L (W7). At these sites, paracetamol, caffeine and diclofenac are the compounds most frequently detected. Paracetamol was found at a very high value in treated wastewater (11 µg/l) and in drinking water (211 ng/l). To our knowledge, these are the highest values reported in water so far. In spite of its large consumption in France, aspirin concentrations are very low indicating its very rapid degradation in the environment. Doxepin, imipramine, salbutamol and terbutalin are never detected in drinking waters, surface waters and WWTP effluents.

In spite of the strong wastewater contamination identified in W6 and W7, pharmaceuticals concentration remains low and it would be necessary to drink huge amounts of water to reach the therapeutic dose. These relatively low concentrations found in aquatic environment can be ascribed to an efficient removal of pharmaceuticals in aquifer and to dilution. However, these pharmaceutical may have deleterious effects on aquatic organisms.

The Thongue River exhibits strong pharmaceuticals contamination due to the disposal of highly overloaded wastewater treatment plant.

The monitoring of pharmaceuticals along the Lergue and the Hérault Rivers shows that dilution is sufficient to strongly decrease pharmaceutical values. However, we have shown that caffeine seems to be the more persistent in the environment as it is found in the Hérault River and in the Lergue River at sites located far from a WWTP discharge.

Acknowledgements

This study has benefited from a financial support of the "Conseil Général de l'Hérault", the "Institut Languedocien de l'Eau et de l'Environnement (IFR ILEE)" and the French Ministry of Ecology (Programme PNETOXII, ENIMED project). Marion Rabiet has benefited from a Ph-D grant of the French Ministry of Research. Thanks are due to S. Van-exte and M.-A. Cordier for their analytical assistance.

References

- Barth S. Boron isotopic analysis of natural fresh and saline waters by negative thermal ionization mass spectrometry. *Chem Geol* 1997; 143:255-261.
- Bau M, Dulski P. Anthropogenic origin of positive gadolinium anomalies in river waters. *Earth and Planet. Sci Lett* 1996;143:245-255.

- Boyd GR, Reemtsma H, Grimm DA, Mitra S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada *Sci Total Environ* 2003;311:135-149.
- Buerge IJ, Poiger T, Müller MD, Buser HR. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environ Sci Technol* 2003;37:691-700.
- Buser H-R, Poiger T, Müller MD. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ Sci Technol* 1998;32:3449-3456.
- Buser H-R, Poiger T, Müller MD. Occurrence and environmental behaviour of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewaters. *Environ Sci Technol* 1999;33:2539-2535.
- Clara M, Strenn B, Kreuzinger N. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment : investigation on the behavior of carbamazepine in wastewater treatment during groundwater infiltration. *Wat Res* 2004;38:947-954.
- Clara M, Kreuzinger N, Strenn B, Gans O, Kroiss H. The solids retention time-a suitable design parameters to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Wat Res* 2005;39:97-106.
- De Baar HJW, Brewer PG, Bacon MP. Anomalies in rare earth distributions in seawater : Gd and Tb*. *Geochim Cosmochim Acta* 1985;49:1961-1969.
- Elbaz-Poulichet F, Seidel JL, Othoniel C. Occurrence of an anthropogenic gadolinium anomaly in river and coastal waters of Southern France. *Wat Res* 2002; 36:1102-1105.
- Farré M, Ferrer I, Ginebreda A, Figueras M, Olivella L, Tirapu L, Vilanova M, Barceló. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry : methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J Chromatogr A* 2001;938:187-197.
- Ferrari B, Paxéus N, Giudice, RL, Pollio A, Garric J. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters : study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotox Env Safety* 2003;55:359-370.
- Garrison AW, Pope JD, Allen FR. GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters. In:Keith, C.H. (Ed.), *Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water*. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, 1976;30:517-556.
- GEO PROSPECT G98005. Alimentation en eau potable de la commune de Paulhan – Etude de l'origine de la contamination du captage de Rieu. Conseil Général de l'Hérault, 1998, 12pp.
- Haskin LA, Haskin MA, Frey FA, Wideman TR. Relative and Absolute Terrestrial Abundances of the Rare Earths. Origin and Distribution of the Elements. *Int Ser Mon Earth Sci* 1968;30:889-912.
- Heberer T. Identification and Quantification of Pesticide Residues and Environmental Contaminants in Ground and Surface Water Applying Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry, (in german), Wissenschaft & Technic, Berlin, 1995, 437 pp.
- Heberer T, Stan H-J. Determination of clofibric acid and N-(phenylsulfonyl)-sarcosine in sewage, river and drinking water. *Int J Environ Anal Chem* 1997;67:113-124.
- Heberer T, Schmidt-Baümler K, Stan H-J. Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Part I: drug residues and other polar contaminants in Berlin surface and ground water. *Acta Hydrochim Hydrobiol* 1998;26:272-278.
- Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letter* 2002a;131:5-17.
- Heberer T. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J Hydrol* 2002b;266:175-189.

- Heberer T, Verstraeten IM, Meyer MT, Mechlinski A, Reddersen K. Occurrence and fate of pharmaceuticals during bank filtration – preliminary results from investigations in Germany and the United States. *Water Resources Update* 2001;120:4-17.
- Hignite C, Azaznoff DL. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci* 1977;20:337-342.
- Janex ML, Bruchet A, Levi Y, Ternes T. Pharmaceutical compounds : occurrence in the environment and fate in drinking water treatment, submitted for the WQTC, Seattle, 2002.
- Kümmerer K. Drugs in the environment : emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere* 2001;45:957-969.
- Lee JH, Byrne RH. Complexation of trivalent rare earth element (Ce, Eu, Gd, Tb, Yb) by carbonates ions. *Geochim Cosmochim Acta* 1992;57:295-302.
- Miao X-S, Metcalfe C D. Determination of carbamazepine and its metabolites in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2003;75:3731-3738.
- Möller P, Paces T, Dulsky P, Morteani G. Anthropogenic Gd in surface water, drainage system, and the water supply of the city of Prague, Czech Republic. *Environ Sci Technol* 2002;36:2387-2394.
- Nozaki Y, Lerche D, Alibo DS, Tsutsumi M. Dissolved indium and rare earth elements in three Japanese rivers and Tokyo bay: evidence for anthropogenic Gd and In. *Geochim Cosmochim Acta* 2000;64:975-992.
- Rabiet M, Brissaud F, Seidel J-L, Pistre S, Elbaz-Poulichet F. Deciphering the presence of wastewater in a medium-sized Mediterranean catchment using a multitracer approach. *Applied Geochem* 2005;20:1587-1596.
- Reddersen K, Heberer TH, Dünnebier U. Occurrence and identification of phenazone drugs and their metabolites in ground- and drinking water. *Chemosphere* 2002;49:539-545.
- Richardson ML, Bowron J.M. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J Pharm Pharmacol* 1985;37:1-12.
- Sedlak DL, Pinkston KE. Factors affecting the concentrations of pharmaceuticals released to the aquatic environment. *Water Resources Update* 2001;120:56-64.
- Seiler RL, Zaugg SD, Thomas J.M, Howcroft DL. Caffeine and pharmaceuticals as indicators of wastewater contamination in wells. *GroundWater* 1999;37:405-10.
- Shabani BM, Akagi T, Masuda A. Preconcentration of trace rare-earth elements in seawater by complexation with bis(2-ethylhexyl) hydrogen phosphate and 2-ethylhexyl dihydrogen phosphate adsorbed on a C18 cartridge and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem*.1992;64:737-743.
- Ternes TA. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Wat Res* 1998;32:3245-3260.
- Ternes TA, Bonerz M, Schmidt T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and Rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromato A* 2001;938:175-185.
- Waggot A. Trace Organic Substances in the River Lee (Great Britain). In: W J Cooper, editor. *Chem Water Reuse*, 2, Ann Arbor Sci An Arbor MI, 1981, pp. 55-99.
- Watts CD, Craythorne M, Fielding M, Steel CP. Identification of non-volatile organics in water using field desorption mass spectrometry and high performance liquid chromatography. In: Angelletti G et al., editors. *Analysis of Organic Micropollutants in Water*. Dordrecht: Reidel, 1983, pp.120-131.
- Zuccato E, Calamari D, Natangelo M, Fanelli R. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 2000;355:1789-1790.

Figure Captions

Fig. 1. Location of sampling stations in the Hérault watershed.

Fig. 2. Sample location in the Lergue River.

Fig. 3. Pharmaceuticals in wells and T1 tributary.

Fig. 4. Pharmaceuticals in wells.

Fig. 5. Pharmaceuticals in WWTP1 and WWTP2.

Fig. 6. Pharmaceuticals (ng/L) in the Lergue River.

Fig. 7. Total pharmaceuticals concentration in the Lergue and Hérault Rivers.

Fig. 8. Pharmaceuticals in T2a, WWTP2 and T2b site – Calculation of theoretical T2b values.

Table Captions

Tab. 1. Detection limits for pharmaceuticals in waters.

Tab. 2. Gadolinium anomalies, boron ($\mu\text{g/L}$), chloride (mg/L) and pharmaceuticals concentrations (ng/L) in samples collected in April 2004. < means inferior to the limit of detection (LOD).

Tab.3. Removal of pharmaceuticals at station T2b.

| Pharmaceuticals | Therapeutic class | Ground waters | Surface waters | Waste waters |
|--------------------------------------|------------------------|---------------------------|----------------|--------------|
| Nonsteroidal Antiinflammatory (NSAI) | | Limit of detection (ng/l) | | |
| Aspirin | | 0.2 | 2.1 | 7.8 |
| Diclofenac | | 0.9 | 0.7 | 4.5 |
| Ibuprofen | | 0.0 | 0.1 | 2.4 |
| Ketoprofen | | 0.3 | 0.7 | 5.8 |
| Naproxen | | 0.3 | 1.0 | 3.1 |
| Paracetamol | | 5.3 | 8.5 | 17.5 |
| Antidepressant | | | | |
| Amitryptilin | | 0.7 | 2.2 | 3.4 |
| Doxepin | | 0.7 | 2.1 | 8.3 |
| Imipramin | | 0.7 | 1.2 | 6.9 |
| Sympatomimetic agent | | | | |
| Clenbuterol | | 0.6 | 0.3 | 2.0 |
| Salbutamol | | 0.6 | 0.5 | 3.9 |
| Terbutalin | | 0.6 | 0.3 | 3.5 |
| Psychiatric drug | | | | |
| Diazepam | | 0.4 | 1.4 | 6.9 |
| Carbamazepine | | 0.8 | 1.4 | 11.6 |
| Nordiaz | | 0.4 | 1.4 | 6.9 |
| Caffeine | Psychomotor stimulant | 1.5 | 2.5 | 14.3 |
| Gemfibrozil | Lipid regulating agent | 0.1 | 0.3 | 1.6 |

Tab. 1. Detection limits for pharmaceuticals in waters.

| Parameters | Units | Wells supplying drinking water | | | | | | | Tributaries | | | | | Hérault River | | WWTP effluents | |
|---------------|-------|--------------------------------|------|-------|------|------|-------|-------|-------------|------|-------|------|------|---------------|------|----------------|-------|
| | | W1 | W2 | W3 | W4 | W5 | W6 | W7 | T1 | T2a | T2b | T2c | T2d | H1 | H2 | WWTP1 | WWTP2 |
| Chloride | mg/L | 73.8 | 9.7 | 105.1 | 37.9 | 47.2 | 58.3 | 25.8 | 77.0 | 7.8 | 26.9 | 11.2 | 11.3 | 5.8 | 6.9 | 52.6 | 28.0 |
| Nitrate | mg/L | 16.6 | 4.6 | 44.2 | 6.6 | 27.2 | 19.2 | 20.3 | 9.4 | 3.8 | 18.4 | 3.0 | 2.8 | 2.4 | 2.0 | 4.0 | 28.9 |
| Boron | µg/L | 68.9 | 19.5 | 72.3 | 49.5 | 26.3 | 121.5 | 125.4 | 57.1 | 17.7 | 42.3 | 39.7 | 37.1 | 6.6 | 12.9 | 112.3 | 143.3 |
| Gd* | - | 1.1 | 1.4 | 1.2 | 1.1 | 1.1 | 2.3 | 1.5 | 1.4 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 0.9 | 1.1 | 0.9 | 1.5 |
| Amitryptilin | ng/L | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | 6.0 |
| Aspirin | ng/L | < | 1.4 | 0.3 | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | 23 | 51 |
| Caffeine | ng/L | 1.5 | < | 5.1 | < | < | 4.1 | 22.9 | 103.1 | 58.2 | 107.2 | 17.9 | 13.0 | 25.3 | 24.6 | 2213 | 255 |
| Carbamazepine | ng/L | < | < | < | < | < | 43.2 | 13.9 | 23.6 | < | 56.3 | < | < | < | < | 157 | 293 |
| Clenbuterol | ng/L | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | 6 | < |
| Diazepam | ng/L | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < |
| Diclofenac | ng/L | 2.1 | 2.4 | 2.3 | 1.4 | 2.5 | < | 2.1 | 10.5 | 1.9 | 33.2 | 1.7 | 2.2 | 1.4 | 1.7 | 486 | 211 |
| Doxepin | ng/L | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < |
| Gemfibrozil | ng/L | < | < | < | < | < | < | < | 1.0 | < | 2.3 | < | < | < | < | 17 | 13 |
| Ibuprofen | ng/L | < | < | < | < | 0.2 | 0.6 | 0.2 | 3.5 | 1.2 | 4.5 | < | < | 0.3 | < | 219 | 18 |
| Imipramine | ng/L | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < |
| Ketoprofen | ng/L | < | 0.6 | < | < | < | 3.0 | 0.31 | 2.8 | < | 14.5 | < | < | 3.3 | < | 1081 | 22 |
| Naproxen | ng/L | 0.15 | < | < | < | 0.1 | 0.2 | < | 7.2 | < | 9.1 | < | < | < | < | 289 | 42 |
| Nordiaz | ng/L | < | < | < | < | < | < | < | < | < | 2.4 | < | < | < | < | < | 8 |
| Paracetamol | ng/L | 8.3 | 11.2 | < | 9.9 | 42.5 | 9.6 | 211 | 68.1 | < | 72.3 | 10.6 | < | < | < | 11310 | 108 |
| Salbutamol | ng/L | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < |
| Terbutalin | ng/L | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < | < |
| Sum of drugs | ng/L | 12 | 15.6 | 7.7 | 11.3 | 45.3 | 60.7 | 249 | 219.8 | 61.3 | 302 | 30.2 | 15.2 | 30.3 | 26.3 | 15800 | 1028 |

Tab. 2. Gadolinium anomalies, boron (µg/L), chloride (mg/L) and pharmaceuticals concentrations (ng/L) in samples collected in April 2004. < means inferior to the limit of detection (LOD).

| Pharmaceutical | T2a | WWTP2 | T2b | T2b theoretical | removal (%) |
|----------------|-------|-------|-------|--------------------|-------------|
| Amitryptilin | < 2.2 | 6 | < 2.2 | < 4.6 | - |
| Aspirin | < 2.1 | 51 | < 2.1 | 33.4 | 94 |
| Caffeine | 58 | 255 | 107.2 | 184.1 | 42 |
| Carbamazepine | < 1.4 | 293 | 56.3 | 188.0 | 70 |
| Diclofenac | 1.9 | 211 | 33.2 | 135.7 | 76 |
| Gemfibrozil | < 0.3 | 13 | 2.3 | 8.4 | 73 |
| Ibuprofen | 1.2 | 18 | 4.5 | 12.0 | 62 |
| Ketoprofen | < 0.7 | 22 | 14.5 | 14.3 | 0 |
| Naproxen | < 1 | 42 | 9.1 | 27.2 | 67 |
| Nordiaz | <1.4 | 8 | 2.4 | 5.6 | 57 |
| Paracetamol | < 8.5 | 108 | 72.3 | 72.2 | 0 |

Tab.3. Removal of pharmaceuticals at station T2b.

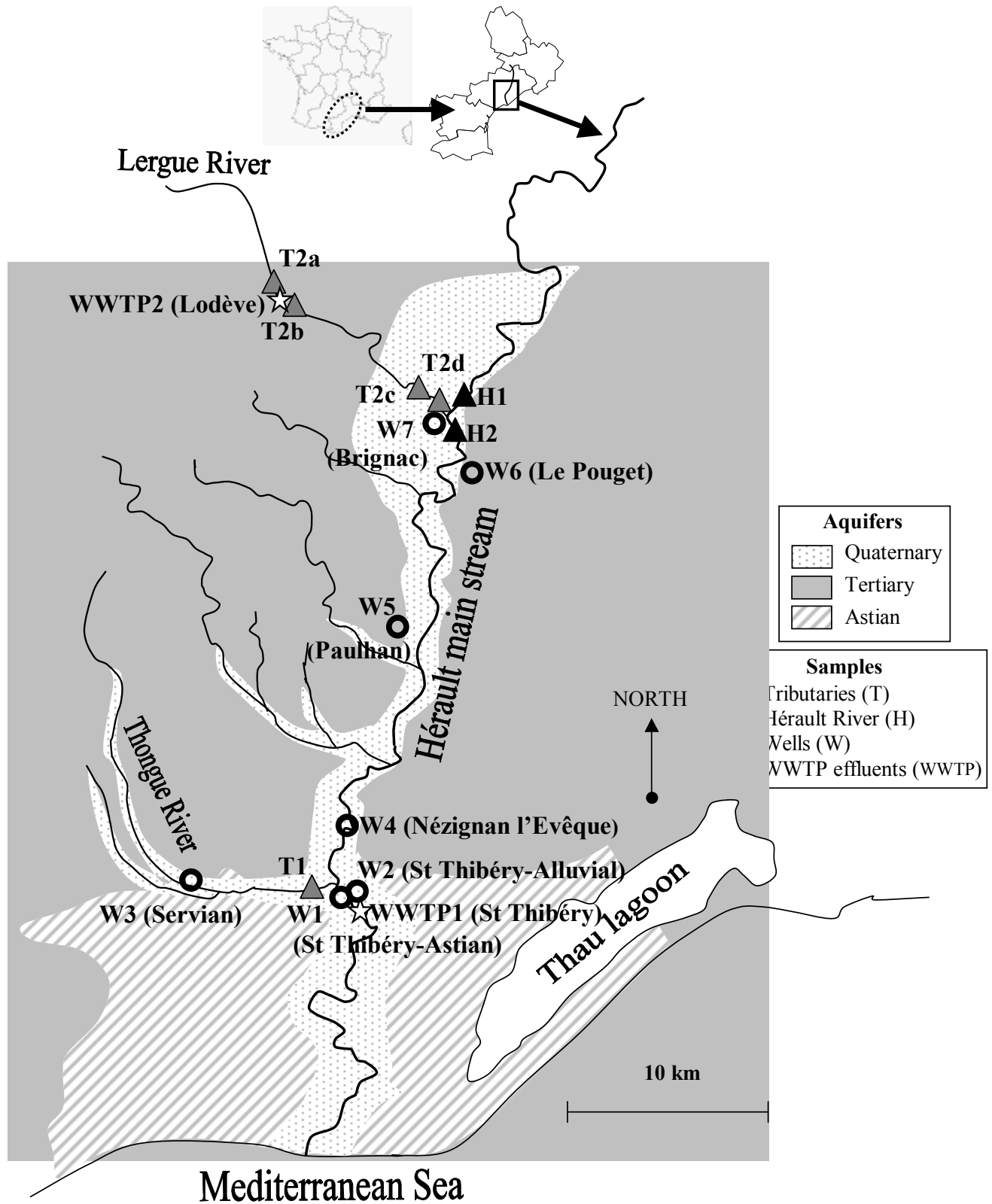


Fig. 1.

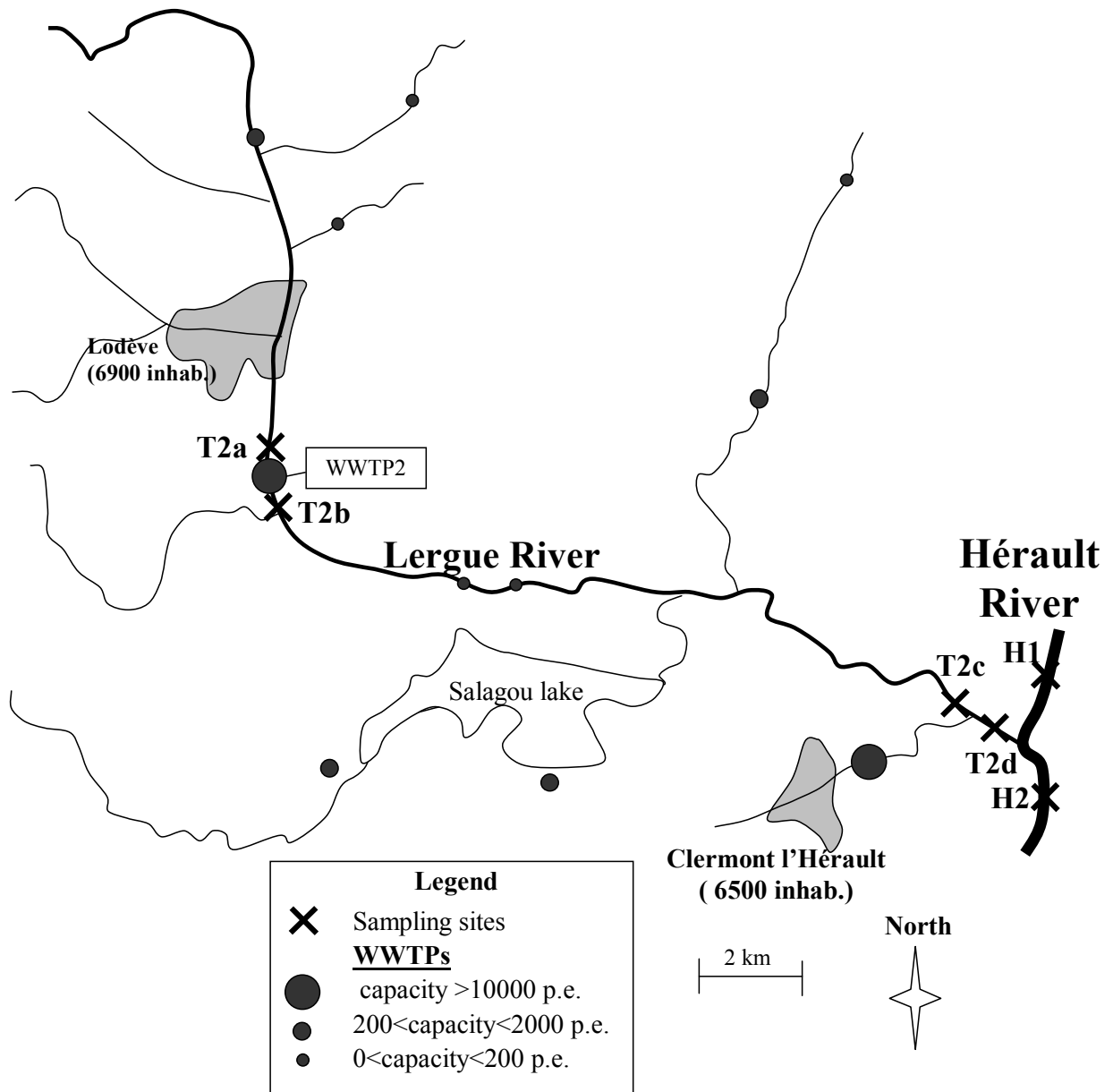


Fig. 2.

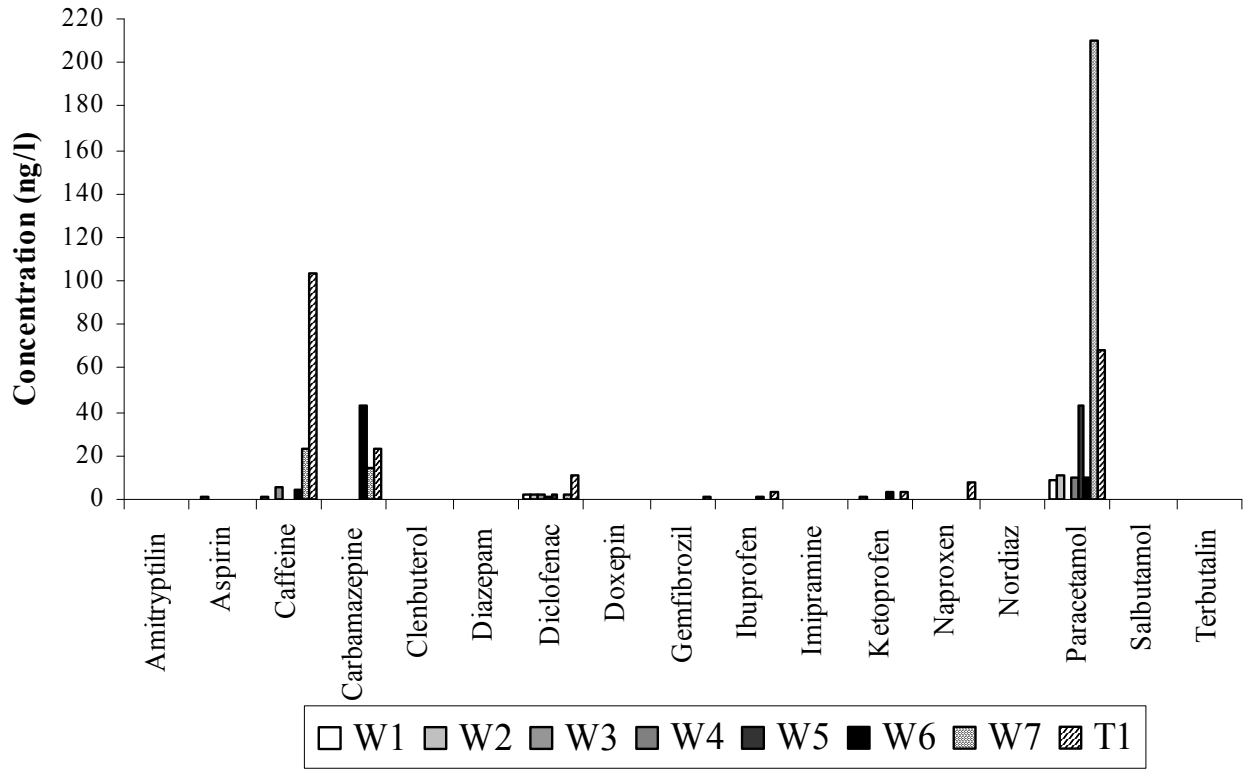


Fig. 3.

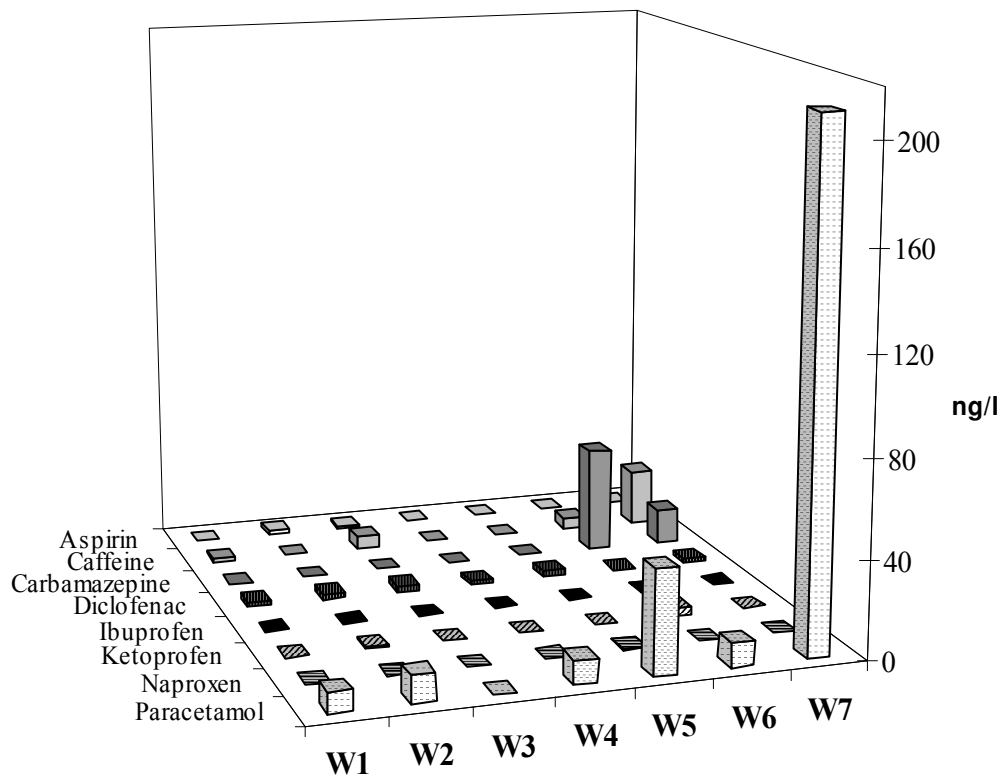


Fig. 4.

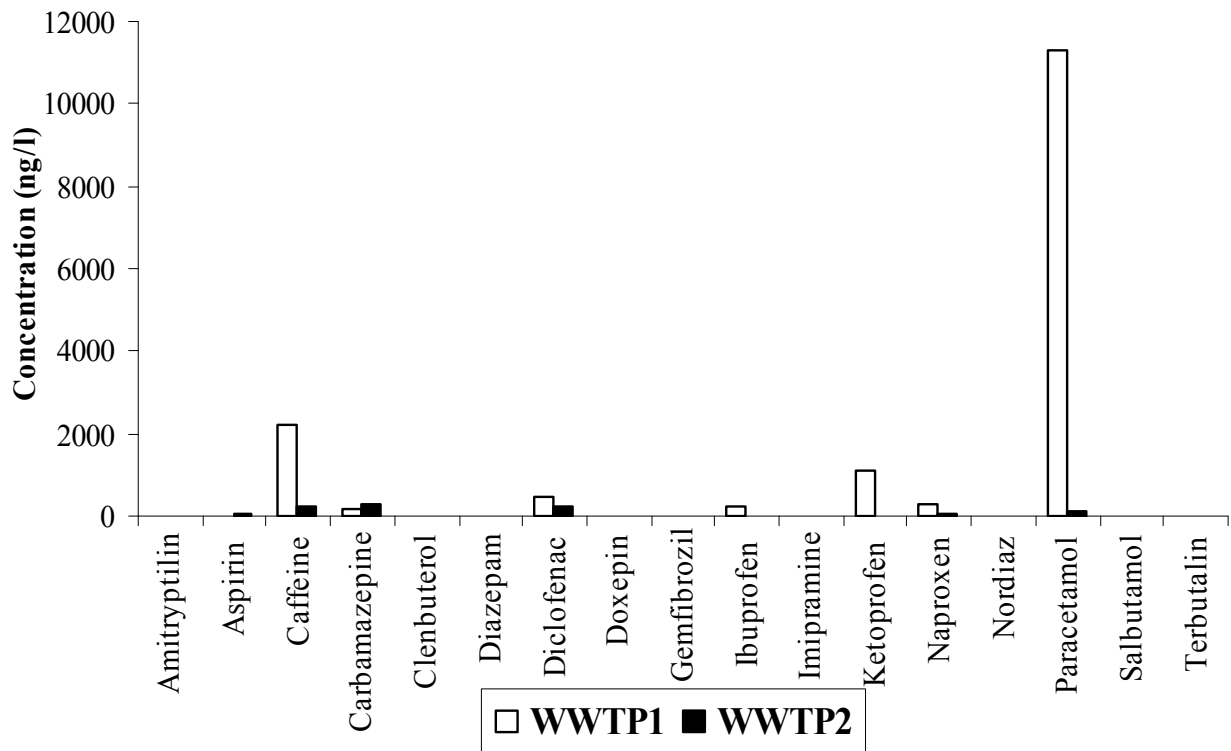


Fig. 5.

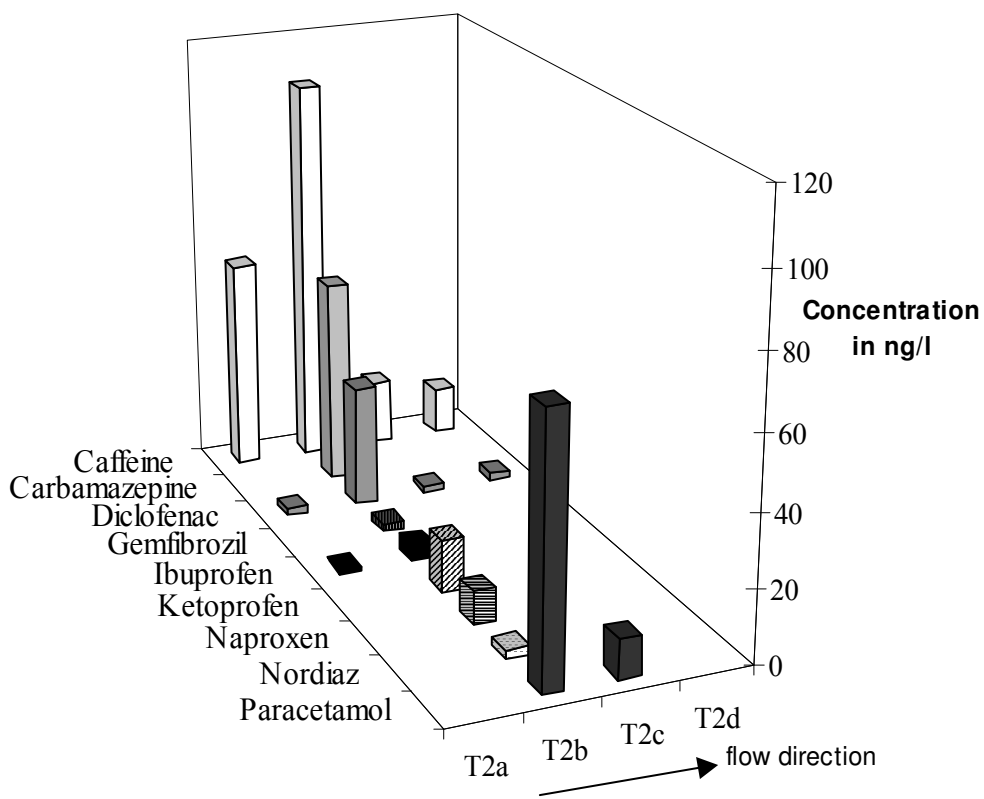


Fig. 6.

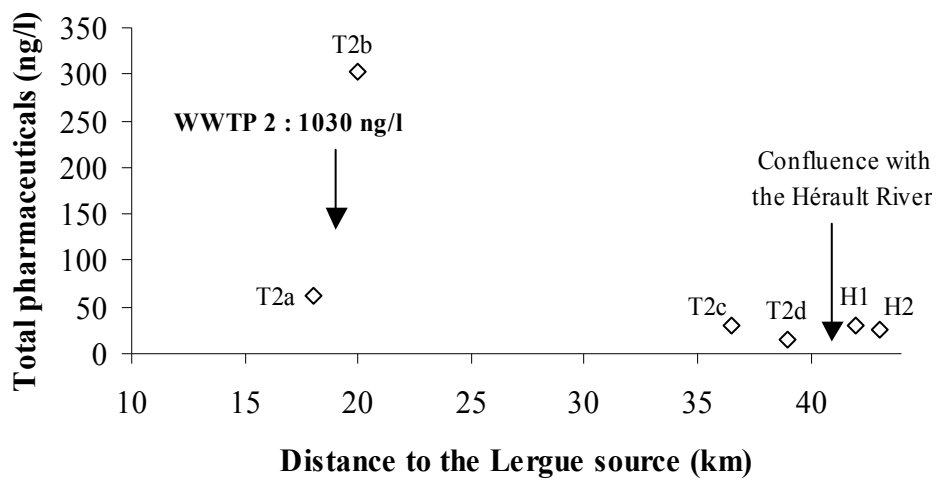


Fig. 7.

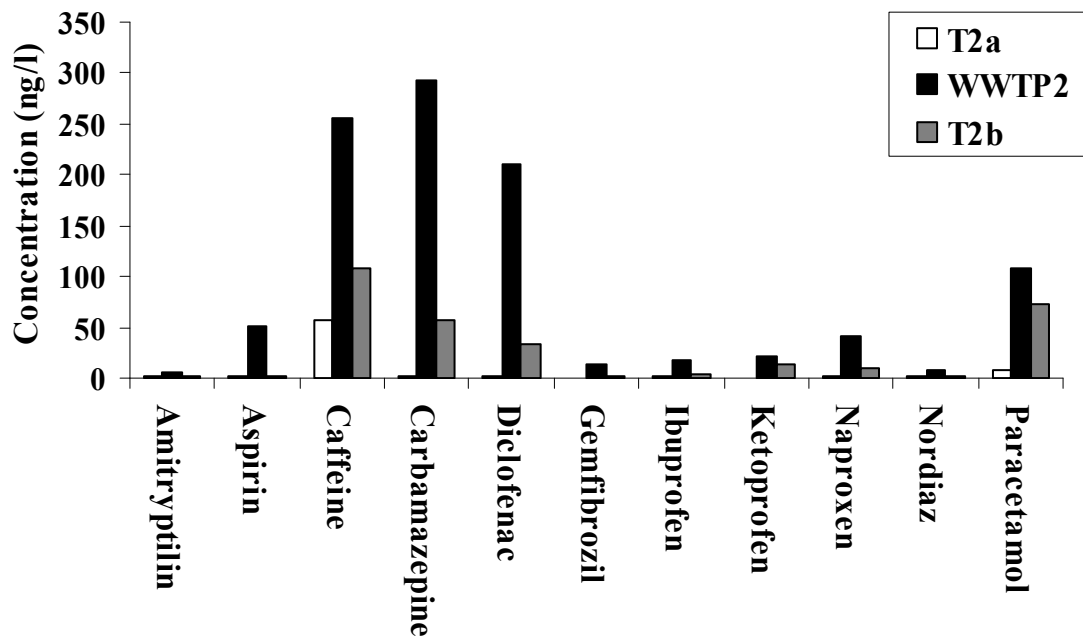


Fig. 8.

PUBLICATION 6
Soumise à Environmental Science and Technology

Behaviour of pharmaceuticals after their introduction in surface waters: Case of Jalles d'Eysines river (FRANCE).

Anne Togola, Sylvie Augagneur, Karyn LeMenach and *Hélène Budzinski
LPTC, UMR 5472 CNRS, University of Bordeaux 1, 351 crs de la Libération,

33405 TALENCE, FRANCE

* corresponding author : h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

Abstract

Due to incomplete elimination in waste water treatment plants, some residues of pharmaceutical substances and of their metabolites are found in the waste waters and surface waters of various countries. There is actually a need for data dealing with the fate of those compounds in the aquatic environment. This study examines the behaviour of several compounds belonging to several chemical and therapeutic groups. These compounds have been measured in a little river highly impacted by a waste water treatment plant effluent both in dissolved and particulate phases. Monitoring studies, using boron as waste water tracer gave information concerning seasonal variations of degradation phenomena in natural waters and partition phenomena occurring between dissolved and solid phases.

Keywords

Pharmaceuticals; particles; wastewater; sewage treatment plant; degradation; surface water

Introduction

During the 1990s, pharmaceutical compounds, such as analgesics, lipid-lowering drugs and hormones were detected in waste waters across Europe (1, 2) and the USA (3, 4). Several reviews dealing with the occurrence, fate and effects of pharmaceuticals in the environment are available (5, 6) and show the main influence of sewage treatment plant discharges on the contamination of aquatic systems. A great deal of work has been done recently to identify and quantify organic contaminant traces in waste water treatment plant (WWTP) effluents. The main objective of these studies was to characterize the fate of pharmaceuticals during the crude waste water treatment (7). The proportion of a drug that is retained in sewage treatment either due to transformation or by adsorption to sludge depends on its chemical structure and physico-chemical properties. But it depends also on the specific conditions within the respective plants (8, 9), as developed on the specific European programme Poseidon ("Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse", <http://www.eu-poseidon.com/>).

These compounds, more or less degraded in the waste water treatment plants (8), enter the environment through the discharge of effluents into receiving waters. If many chemical, physical and biological factors may affect the fate of drugs in WWTP, the same phenomena could occur in surface waters. Several studies try to understand the fate of pharmaceuticals after their introduction and to characterize their degradation in environmental systems, such as photodegradation of fluoxetine (10), carbamazepine (11) and non-steroidal anti-inflammatory drugs (12).

This study examines the behaviour of compounds belonging to several chemical and therapeutic groups: aspirin, caffeine (present for non-therapeutic use too), gemfibrozil, carbamazepine, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, paracetamol, diazepam, nordiazepam, doxepine, amitriptyline and imipramine. These compounds have been measured in a little river, the "Jalles d'Eysines" river, highly impacted by a wastewater treatment plant effluent. Monitoring studies have been made all along the river from the effluent introduction into the system as far as the confluence with the Garonne River, one of the biggest French rivers (French Atlantic Coast). This 10 km long study area has been monitored under different seasonal conditions. Furthermore particulate matter has also been collected and analysed to assess the role played by solid material in aquatic system contamination.

Material and methods

Chemicals :

Pharmaceutical products, pyrene and 1-hydroxypyrene were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France; purity > 98%). Deuterated products (diazepam d5, amitriptyline d6 and nordiazepam d5) have been purchased from Euriso-Top (St Aubin, France). All compounds are presented with their chemical structures in Table 1. Stock solutions were prepared in methanol at $10 \mu\text{g.g}^{-1}$ and stored at 4 °C.

Acetone, ethyl acetate and methanol (HPLC reagent grade, Scharlau) were purchased from ICS (Belin-Beliet, France). Nitric acid 70% (Baker Instra-Analysed for trace metal analysis), hydrochloric acid 37% (reagent grade) and phosphoric acid 85% (reagent grade) have been obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Deionised water has been obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). 60 mg Oasis MCX cartridges were purchased from Waters (St Quentin en Yvelines, France). MSTFA (n-methyl-n(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, purity > 97%; Acros Organics, Noisy-le-Grand, France) was used as the silylation agent for GC-MS analysis. Whatman

GFF glass fibre filters (pore size 0.7 μm) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France).

Sampling location and procedure:

Water samples were collected in amber glass bottles, previously detergent washed, acid rinsed and heated at 450 $^{\circ}\text{C}$ for 6h. The water samples were filtered immediately after collection and pharmaceutical extraction was performed within 24h to 48h after sampling. The Eysines WWTP has a capacity of 57,000 population equivalents and is equipped with biological treatment (activated sludge).

Three sampling campaigns have been organized. Previously, in May 2003, a preliminary measurement concerning only the crude wastewater was done, in order to assess the level of pharmaceutical concentrations in the wastewater effluent.

Monitoring campaigns (July 2003, September 2003 and February 2004) concerned the same sampling points in different seasonal conditions: dryness in July with very low water level, high flood in February and a situation in between in September.

One reference station was chosen about 2 km upstream from the WWTP emissary and five stations selected up to 10 km downstream from the effluent discharge, respectively 30 m, 1 km, 2 km, 4 km and 10 km from the effluent (Figure 1). Crude effluent was quantified for all sampling campaigns.

Boron dissolved organic carbon (DOC) and particulate organic carbon (POC) measurements:

For all campaigns, water samples were taken for boron determination. They were collected in Teflon bottles, filtered on 0.7 μm glass fibre filters, acidified with 1% of nitric acid (v/v) immediately after sampling and stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ prior to analysis (no more than 4 months).

Analysis was performed with an ICP-MS analyzer (HP 4500, Agilent Technologies) equipped with a cross flow nebuliser and with nickel cones. Operating parameters were set as follows: power 1250 V, plasma gas flow rate 1 ml.min $^{-1}$, nebuliser gas flow rate 0.98 min $^{-1}$, auxiliary gas flow rate 0.8 min $^{-1}$, sample flow rate 1 ml.min $^{-1}$, pulse counting as detection mode and dwell time 200 μs . The external calibration range was 5-100 $\mu\text{g l}^{-1}$. Results were drift corrected using Rhodium (25 $\mu\text{g.l}^{-1}$) as internal standard and blank corrected. The analytical procedure was validated using a sample with a certified value for boron level (NIST SRM 1640, [B] = 301.1 \pm 6.1 $\mu\text{g.l}^{-1}$). Results (expressed as mean values \pm standard deviation) were within 10% of the certified level: 308.6 \pm 22.4 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (7 July 2003), 273.8 \pm 1.8 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (23 September 2003) and 287.5 \pm 12.0 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (2 February 2004).

Samples for DOC were filtered on 0.7 μm glass fibre filters and acidified with straight phosphoric acid (0.15%, v/v) to be analyzed by high temperature catalytic oxidation with Shimadzu TOC 5000 equipment.

Samples for particulate organic carbon (POC) were filtered on pre-weighted 0.7 μm glass fibre filters and measured by dry combustion of the filters in a LECO CS 125 carbon analyzer. All samples for these three measurements were stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ immediately after collection until analysis.

Pharmaceutical extraction:

500 ml water samples (300 ml for wastewater) were filtered through heated (450 $^{\circ}\text{C}$, 6h) GFF glass fibre filters. Dissolved phase and particulate matter were treated independently.

Concerning the dissolved phase, water adjustment to pH2 was done just before the extraction processes with HCl (3.5M) using a pH-526 WTW $^{\circ}$ pH-meter (VWR

International, Strasbourg, France). Samples were also spiked with internal standards (diazepam d5, amitryptiline d6 and nordiazepam d5).

SPE MCX cartridges were conditioned subsequently with 3 ml of ethyl acetate and 3 ml of milliQ-water at adjusted pH 2. Water was carried out under vacuum at a flow rate of 12 to 15 ml.min⁻¹. After sample loading, the cartridges were washed with a mixture of methanol/water (40/60; v/v) and were dried under vacuum for 1h. After successive elutions with 3 ml of ethyl acetate, 3 ml of ethyl acetate/acetone (50/50; v/v), and 3 ml of ethyl acetate/acetone/NH₄OH (49/49/2; v/v/v), the samples were evaporated to dryness under a nitrogen stream and transferred into GC injection vials in 50 to 100 µl of ethyl acetate. Pyrene and 1-hydroxypyrene were added to extracts before injection in order to control the extraction process quality.

For the particulate phase, samples were first freeze-dried, weighed and spiked with internal standards. Then filters were extracted by focused microwave assisted extraction (Microdigest 301, Prolabo, Fontenay sous Bois, France): 30 W, 10 min, in 30 ml of acetonitrile/pH2 water mixture (70/30; v/v). The extracts were filtered on glass fibre cotton and the solvent was evaporated using evaporation assisted by heating and under vacuum (RapidVap, Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France). Aqueous residues were then dissolved in 30 ml of pH 2 water and treated as aqueous samples, as described above for the dissolved phase.

Pharmaceutical analysis

Two consecutive injections have been made: first to quantify neutral and basic compounds and secondly, after a derivatization step by adding 30 µl of MSTFA before incubation for 35 min. at 65 °C, on a different GC-MS system, conditioned for silylated products.

GC-MS analyses were carried out using an HP 6890 gas chromatograph from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Capillary columns were HP5/MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness; phase: 5% diphenyl, 95% dimethylsiloxane) from Bios Analytique (L' Union, France). The samples were injected (2 µl) into the GC in splitless mode at 250°C using HP 6890 series injectors. The carrier gas was ultrapure helium (99.99990 %, Linde Gas, Bassens, France) set at constant flow mode (1.3 ml.min⁻¹). For GC separation, the temperature program started at 70 °C (held for 2 min.), set at 10 °C per min. to 250 °C and was held isothermally for 5 min. The gas chromatograph was coupled to an HP 5973N mass selective detector (LMSD, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), operated under electronic impact (EI) mode at 70 eV using single ion monitoring mode (see Table 1) at 0.92 scan.s⁻¹ (dwell time: 70 ms). The electron multiplier voltage (EMV) sensitivity was set at 1976 V. The transfer line, source and quadrupole temperatures were 280, 230 and 150 °C, respectively. The same chromatographic methods were used for the two analyses, only the selected ions were different. The chemical structures and selected ions for GC-MS analyses are presented in Table 1.

A mixture made up of standard pharmaceuticals and deuterated compounds was injected at the beginning and at the end of each GC-MS sequence for response factor determination. This extraction process has been optimized and validated on different kinds of waters (surface waters, wastewaters, marine waters), showing good extraction efficiency (between 54 ± 12% for terbutaline and 120 ± 6% for carbamazepine, with an average of 88% for spiked waters) and RSDS below 15 %, that allow the single determination for each sampling point (13). Spiked water samples and manipulation blanks are associated with all natural sample extractions, ensuring result validity and absence of interfering compounds or contamination of the samples during extraction procedures.

Results and discussion:

Raw discharge contamination levels:

All the studied compounds, except antidepressant drugs, have been found in the four effluent samples (see Table 2) with various concentrations, depending on compounds and seasons. Concerning antidepressants, only diazepam has been quantified in the February sampling but it was not looked for in the previous samplings.

In February, NSAID concentrations were higher than in other campaigns: naproxen, ibuprofen, ketoprofen and diclofenac were predominant, while aspirin and naproxen presented their higher measured concentrations (respectively 1000 ng.l⁻¹ and 7355 ng.l⁻¹). These levels are comparable to those measured in Germany (14), in France and in Italy (15).

The phenomenon of effluent dilution in the sewage treatment plant can explain intermediate concentrations in September. During flood periods, high volumes of waters get into the WWTP (both urban wastewater and runoff) and need to be treated, which reduces water residence time and then affects treatment efficiency. On the other hand, the dilution factor reduces contaminant concentration in the treated wastewater (16). These two adverse effects are more or less important depending on compounds. Persistent compound concentration is only influenced by the dilution factor, while degradable compounds are affected by both phenomena (17).

Effects on river contamination levels :

Contamination levels in the "Jalles d'Eysines" river vary depending on sampling campaigns. The values measured are presented in Figure 2 a, b and c, corresponding to the three seasonal conditions from the introduction of WWTP effluent into the river to ten kilometres downstream.

The use of boron as conservative tracer of sewage pollution as inert species borate allowed calculations of theoretical concentrations of pharmaceuticals, assuming the dilution factor only. Originating from both domestic and industrial detergents, changes of its concentrations downstream of a sewage discharge are directly related to the dilution of the effluent (18).

Elevated boron concentrations, ranging from 289 to 511 µg.l⁻¹, were measured in the WWTP effluent, but detection of boron upstream of the reference station (55 to 100 µg.l⁻¹) suggests occurrence of other wastewater inputs.

Boron measurements can be used up to station 7, where boron level exhibited a concentration even higher than in the Eysines WWTP effluent itself (For July and September), indicating a lateral inflow from other emissaries, that corresponds to an industrial area. Boron data showed that downstream of the discharge, Eysines WWTP effluent accounted for 9-33% of the river flow depending on seasonal flow fluctuations.

Theoretical pharmaceutical concentrations were compared with measured ones for the three campaigns in July, September and February and showed important variability. The results are shown on Figures 3a and 3b for the July and September campaigns. For some compounds there was no variation depending on seasons. Diclofenac concentration was the same for calculated and measured values, indicating that dilution itself could explain the evolution of concentration between station 3 and station 7. Nevertheless, for other compounds, significant seasonal effects could be observed.

Concerning ibuprofen, aspirin and ketoprofen in July, the decrease was more important than theoretical values, showing the existence of degradation processes (biodegradation, photodegradation) already reported in surface waters (12, 19) for most labile compounds. An increase in decay rate during the summer campaign can be due to several phenomena such as an increase in biological activity, an increase in solar

radiation but also an increase of transit time between discharge and downstream stations due to lower river flows.

An inverse situation was observed in September, with high river flow and autumnal seasonal conditions. Comparisons between theoretical and measured values indicated that concentration decreases were only due to the dilution factor without any kind of degradation. Weather conditions did not favour photodegradation and biodegradation and shorter transit time decreased decay rates all along the studied area.

Considering the dissolved organic carbon content, the influence of the WWTP discharge decreased all along the river with dilution and degradation phenomena. The increase for the last samples corresponds to the influence of the Garonne River, which gets into the "Jalles" at high tide. The Garonne is under the influence of dynamic tides and contains high suspended particulate matter concentrations (20).

Pharmaceutical occurrence in particulate matter

Some measurements have been made in particulate phase. For raw discharge samples, filtration difficulties have stopped pharmaceutical quantification. Pharmaceutical particle content has been measured in surface water samples as shown in Figure 4 for July campaign.

Various concentrations have been noted, depending on compounds, seasons and distance from the discharge. Even if the concentrations measured in September 2003 and February 2004 were lower than in July (between 13 and 1,330 ng.g⁻¹ (aspirin, ketoprofen) in September and ranging from 0 to 380 ng.g⁻¹ (ketoprofen) in February), they show the same trends. Among the most frequent and significant compounds, there is ketoprofen, diclofenac, aspirin and caffeine and gemfibrozil exceptionally in July.

Ketoprofen, diclofenac and gemfibrozil are among the less polar pharmaceuticals (log Kow respectively around 3.12, 4.51 et 4.77), which can explain their occurrence in the particulate phase. Nevertheless, this is not the case for caffeine and aspirin (log Kow of 0 and 1.19 respectively). Other previous results have already highlighted this phenomenon, showing occurrence of the paracetamol (log Kow 0.46) in WWTP sludges (21). The part played by other phenomena, such as electrostatic interactions need for more investigation focused on this point. The first step seemed to be an enrichment of suspended particulate matter (SPM) followed by a continuous decrease in the concentration levels. Increase of SPM content on the last sample has been observed related with the influence of the Garonne river, bringing dilution phenomena below detection limits (Figure 5). Adsorption phenomena between dissolved and particulate phases have been rarely studied, especially in surface waters. One study dealt with concentration decline between 100 and 1000 m after the discharge, but only with qualitative results (7). Quantitative studies dealing with pharmaceutical partition concern only WWTP sludge (21-23). Desorption phenomenon has been already highlighted for introduction of WWTP effluent in natural system (). Most of the published data have considered that particulate adsorption was negligible for pharmaceuticals. Nevertheless, the main difficulty is to characterize this particulate fraction by distinguishing particulate and colloidal fractions. Actually colloidal fraction is capable of interacting with polar compounds as pharmaceuticals (22-24). High content in organic matter, as in WWTP effluent can increased adsorption (24). Changes in physico-chemical properties between natural water and wastewater can potentially explain this desorption but need further investigations.

Partitioning phenomena between dissolved and particulate phases are already under investigation. Considering pharmaceutical contents between both phases all along the river, an important variability depending on compounds has been highlighted.

Figure 6 shows this partition for two compounds: carbamazepine and gemfibrozil. For carbamazepine, as persistent compound, the content in the dissolved phase remains

constant all along the river, but the concentration in particles decreases quickly. Particle concentration decreases, linked to desorption phenomena and dilution of polluted particles with natural particles from the Garonne River, as shown in figure 5. For gemfibrozil, this degradability leads to disappearance in the dissolved phase, while particle content remains more or less constant, showing only the particle dilution phenomenon on station 10. This result seems to show there is no desorption of gemfibrozil.

Conclusion:

This study has allowed better understanding of the behaviour of drugs after their introduction in the aquatic system. Pharmaceuticals have been quantified both in dissolved and particulate phases at high concentration levels, that allow to obtain new data concerning pharmaceutical partition. The monitoring of these compounds all along a river in different climatic conditions has given us many information concerning the fate of pharmaceuticals in aquatic systems after their introduction. Thus, the main part played by photodegradation and biodegradation during degradation phenomena has been highlighted. This study has used boron as an anthropic effluent marker and has proved that it is a strong tool, when WWTP discharges have been correctly identified and if no natural introduction of boron in the aquatic system occurs. Most of the published data have considered that particulate adsorption was negligible for pharmaceuticals. Nevertheless, the main difficulty is to characterize this particulate fraction by distinguishing particulate and colloidal fractions. Actually the colloidal fraction is capable of interacting with polar compounds such as pharmaceuticals (22-24). High content in organic matter, as in WWTP effluent, can increase adsorption (24). Changes in physico-chemical properties between natural water and wastewater can potentially explain this desorption but need further investigations.

In spite of important variability depending on human consumption, crude effluent dilution and degradation phenomena, the “Jalles d’Eysines” River is all the time with pharmaceutical substances. During the same sampling campaigns, steroids have been also studied (25) showing the contamination of the raw effluent. Estrone was the dominant compound (detected in all effluent samples, $17.1-71.0 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$), while estradiol and its metabolite estriol were detected only once, at much lower levels (4.4 and $2.9 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, respectively). Nevertheless, the low concentration levels measured for these compounds decreased quickly by dilution and degradation phenomena and steroids can be detected at very low levels for estrone ($1.9-1.8 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$) and were below detection limits in surface waters.

Risk assessment of this chronic exposure for aquatic organisms, for pharmaceuticals as well as to all other compounds contained in WWTP effluent are difficult to study in a natural environment. There is also a need for more data dealing with the toxicity of chronic exposition, at low levels of concentration and for mixture effects.

Acknowledgments:

The authors wish to thank the “Région Aquitaine” and the “GIS ECOBAG” programs for research funding. They want also to acknowledge the ORQUE (Environmental Quality Research Observatory) program, the “Région Aquitaine” and the NFS (National Funding for Science) for providing a PhD grant (A. Togola), Dr Sylvie Augagneur, for carrying out boron measurements and Dr Henri Etcheber for carrying out organic carbon measurements.

References

- (1) Heberer, T. Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment : a review of the recent research data. *Toxicol. Lett.* **2002**, *131*, 5-17.
- (2) Ternes, T. A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *TrAC* **2001**, *20*, 419-434.
- (3) Boyd, G. R.; Reemtsma, H.; Grimm, D. A.; Mitra, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.* **2003**, *311*, 135-149.
- (4) Kolpin, D. W.; Skopec, M.; Meyer, M. T.; Furlong, E. T.; Zaugg, S. D. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Sci. Total Environ.* **2004**, *328*, 119-130.
- (5) Hernando, M. D.; Mezcua, M.; Fernandez-Alba, A. R.; Barcelo, D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* **2006**, *69*, 334-342.
- (6) Halling-Sorensen, B.; Nielsen, S. N.; Lanzky, P. F.; Ingerslev, F.; Holten Lützhoff, H. C.; Jorgensen, S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment : a review. *Chemosphere* **1998**, *36*, 357-393.
- (7) Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Fanelli, R.; Pomati, F.; Calamari, D.; Zuccato, E. Removal of Pharmaceuticals in Sewage Treatment Plants in Italy. *Environ. Sci. Tech.* **2006**, *40*, 357-363.
- (8) Joss, A.; Keller, E.; Alder, A. C.; Gobel, A.; Mc Ardell, C. S.; Ternes T.; Siegrist H. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Res.* **2005**, *39*, 3139-3152.
- (9) Ternes, T. A.; Janex, M. L.; Knacker, T.; Kreuzinger, N.; Siegrist, H. "Detailed report of POSEIDON project," 2004.
- (10) Lam, M. W.; Mabury, S. A. Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquat. Sci.* **2005**, *67*, 177-188.
- (11) Andreatti, R.; Raffaele, M.; Nicklas, P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* **2003**, *50*, 1319-1330.
- (12) Packer, J. L.; Werner, J. J.; Latch, D. E.; McNeill, K.; Arnold, W. A. Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibric acid, and ibuprofen. *Aquat. Sci.* **2003**, *65*, 342-351.
- (13) Togola, A.; Budzinski, H. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *submitted to Anal. Chim. Acta* **2006**.
- (14) Ternes, T. A.; Bonerz, M.; Schmidt, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by LC-ESI-tandem MS. *J. Chrom. A* **2001**, *938*, 175-185.
- (15) Ferrari, B.; Paxeus, N.; Giudice, R. L.; Pollio A.; Garric J. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotox. Environ. Safe.* **2003**, *55*, 359-370.
- (16) Tauxe-Wuersch, A.; De Alencastro, L. F.; Grandjean, D.; Tarradellas, J. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Res.* **2005**, *39*, 1761-1772.
- (17) Tauxe-Wuersch, A. "Wastewaters : occurrence of pharmaceutical substances and genotoxicity". PhD thesis. Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, 2005.
- (18) Neal, C.; Fox, K.; Harrow, M.; Neal M. Boron in the major UK rivers entering the North Sea. *Sci. Total Environ.* **1998**, *210*, 41-52.
- (19) Lin, A. Y.-C.; Reinhard, M. Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environ. Toxicol. Chem.* **2005**, *24*, 1303-1309.

- (20) Abril, G.; Commarieu, M. V.; Maro, D.; Fontugne, M.; Guérin, F.; Etcheber, H. A massive dissolved inorganic carbon release at spring tide in a highly turbid estuary. *Geophys. Res. Lett.* **2004**, *31*.
- (21) Khan, S. J.; Ongerth, J. E. Estimation of pharmaceuticals residues in primary and secondary sewage sludge based on quantities of use and fugacity modelling. *Water Sci. Technol.* **2002**, *46*, 105-113.
- (22) Beausse, J. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *TrAC* **2004**, *23*, 753-761.
- (23) Tolls, J. Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 3397-3406.
- (24) Stamatelatou, K.; Frouda, C.; Fountoulakis, M. S.; Drillia, P.; Kornaros M.; Lyberatos G. Pharmaceuticals and health care products in wastewater effluent : the example of carbamazepine. *Water Sci. Technol.* **2003**, *3*, 131-137.
- (25) Labadie, P.; Budzinski, H. Determination of Steroidal Hormone Profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 5113-5120.

Table captions:

Table 1 : Investigated compounds and deuterated compounds used for quantification.
Molecular weights (MW) are expressed in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Table 2: Measured concentrations for the 4 crude wastewater effluent samplings.
Results expressed in $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ only for dissolved phase.
N.A. corresponding to Not Analyzed and N.D. to Not Detected

Figure captions:

Figure 1: Sampling stations on “Jalles d'Eysines” river.

Figure 2: Evolution of contamination levels after the discharge of WWTP in the river.
(a): sampling of July 2003 $n=1$; (b), sampling of September 2003, $n=3$ and (c): sampling of February 2004, $n=3$.

Figure 3: Comparison measured values versus theoretical values for several compounds. Campaigns of July (a) and September 2003 (b).

Figure 4: Particulate matter contamination expressed in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, campaign of July 2003.

Figure 5: Measurements of dissolved organic carbon and suspended particulate matter on the different sampling points (campaign of July 2003).

Figure 6: Measurements of pharmaceutical concentrations in dissolved in particulate phases all along the river in July 2003, for carbamazepine and gemfibrozil.

Table 1 : Investigated compounds and deuterated compounds used for quantification. Molecular weights (MW) are expressed in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

| Compounds | Chemical Structure | MW | m/z | Compounds | Chemical Structure | MW | m/z |
|--|--------------------|-----|-----|---|--------------------|-----|------------|
| <u>acidic compounds</u> | | | | | | | |
| Aspirin (ASP) | | 180 | 195 | Diclofenac (DICLO) | | 295 | <u>214</u> |
| Ibuprofen (IBU) | | 206 | 160 | Gemfibrozil (GEMF) | | 250 | <u>201</u> |
| Ketoprofen (KETO) | | 254 | 282 | Paracetamol (PARA) | | 151 | <u>206</u> |
| Naproxen (NAP) | | 230 | 185 | | | | |
| <u>Neutral and basic compounds</u> | | | | | | | |
| Caffeine (CAF) | | 194 | 194 | Imipramine (IMIP) | | 280 | <u>234</u> |
| Diazepam (DZP) | | 284 | 256 | Doxepine (DOX) | | 279 | <u>58</u> |
| Carbamazepine (CBZ) | | 236 | 193 | Nordiazepam (NDZP) | | 270 | <u>242</u> |
| Amitriptyline (AMI) | | 277 | 58 | | | | |
| <u>Deuterated standards for drugs quantification</u> | | | | <u>Deuterated standards for recovery validation</u> | | | |
| Diazepam d ₅ | | 286 | 261 | 1-hydroxypyrene | | 218 | 290 |
| Amitriptyline d ₆ | | 287 | 64 | Pyrene | | 202 | 202 |
| Nordiazepam d ₅ | | 276 | 247 | | | | |

Table 2: Measured concentrations for the 4 crude wastewater effluent samplings. Results expressed in ng.l⁻¹ only for dissolved phase. N.A. corresponding to Not Analyzed and N.D. to Not Detected

| | May | July | September | February |
|---------------|------|-------|-----------|----------|
| Aspirin | 57 | 81 | 654 | 1010 |
| Gemfibrozil | 100 | 1372 | 365 | 485 |
| Naproxen | 1249 | 2071 | 1005 | 7355 |
| Ibuprofen | 108 | 166 | 67 | 1768 |
| Ketoprofen | 432 | 139 | 3120 | 3341 |
| Diclofenac | 323 | 81 | 845 | 3243 |
| Caffeine | 150 | 259 | 857 | 94 |
| Carbamazepine | 1506 | 194 | 208 | 357 |
| Paracetamol | N.A. | N.A. | 424,99 | 16667 |
| Diazepam | N.A. | N.A. | N.D. | 20 |
| Bore | N.A. | 289.0 | 510.7 | 462.7 |

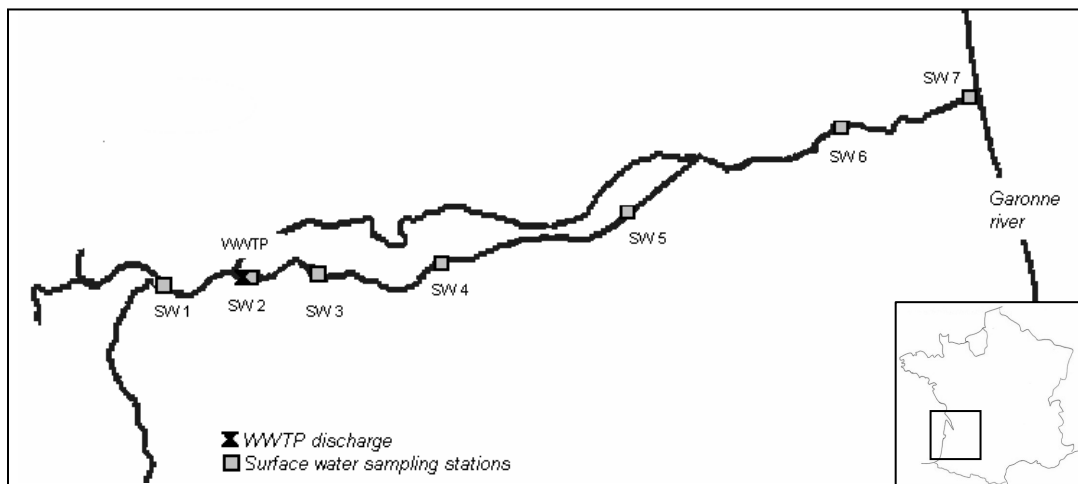


Figure 1: Sampling stations on “Jalles d’Eysines” river.

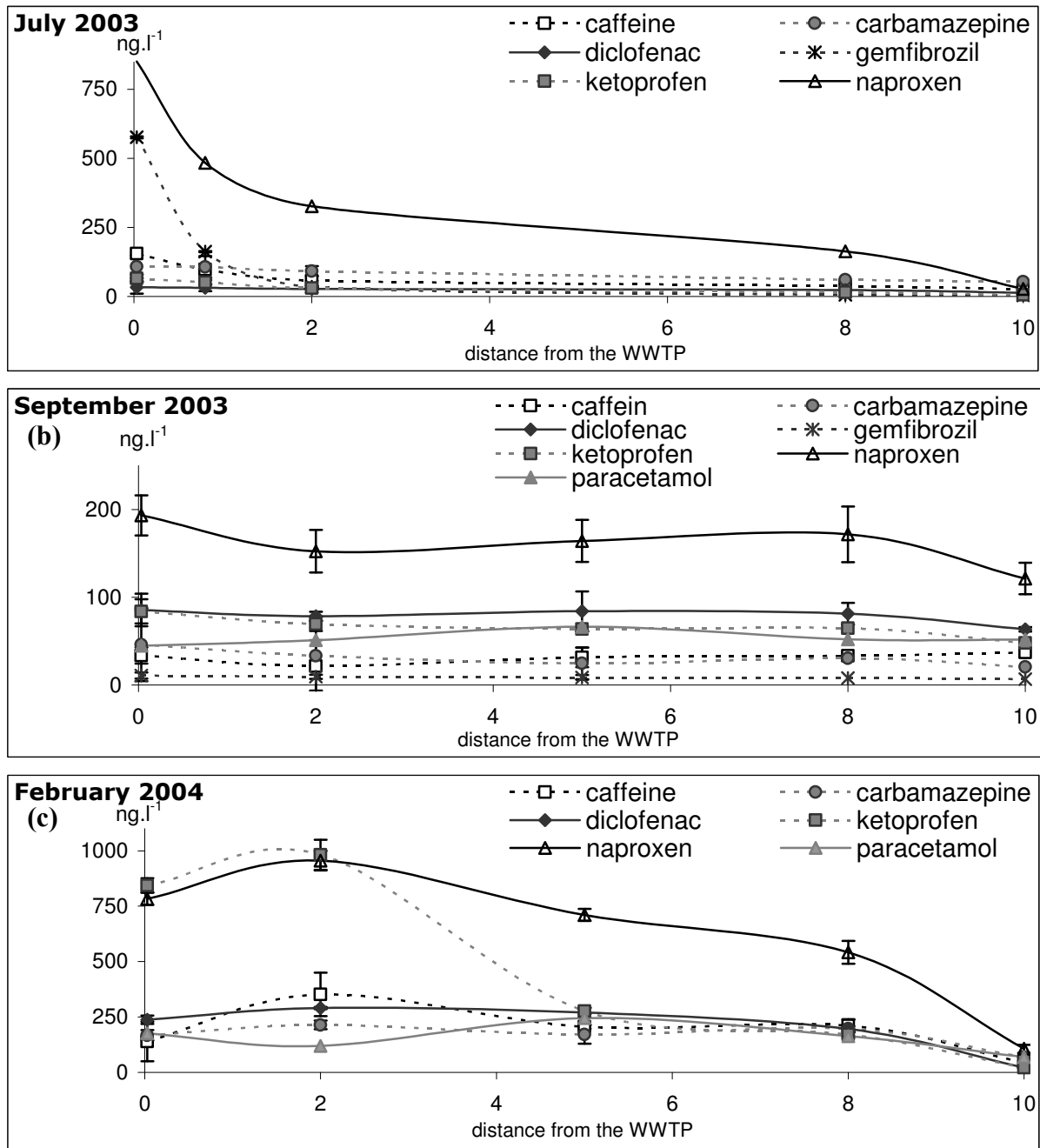


Figure 2: Evolution of contamination levels after the discharge of WWTP in the river. (a): sampling of July 2003 n=1; (b), sampling of September 2003, n=3 and (c): sampling of February 2004, n=3.

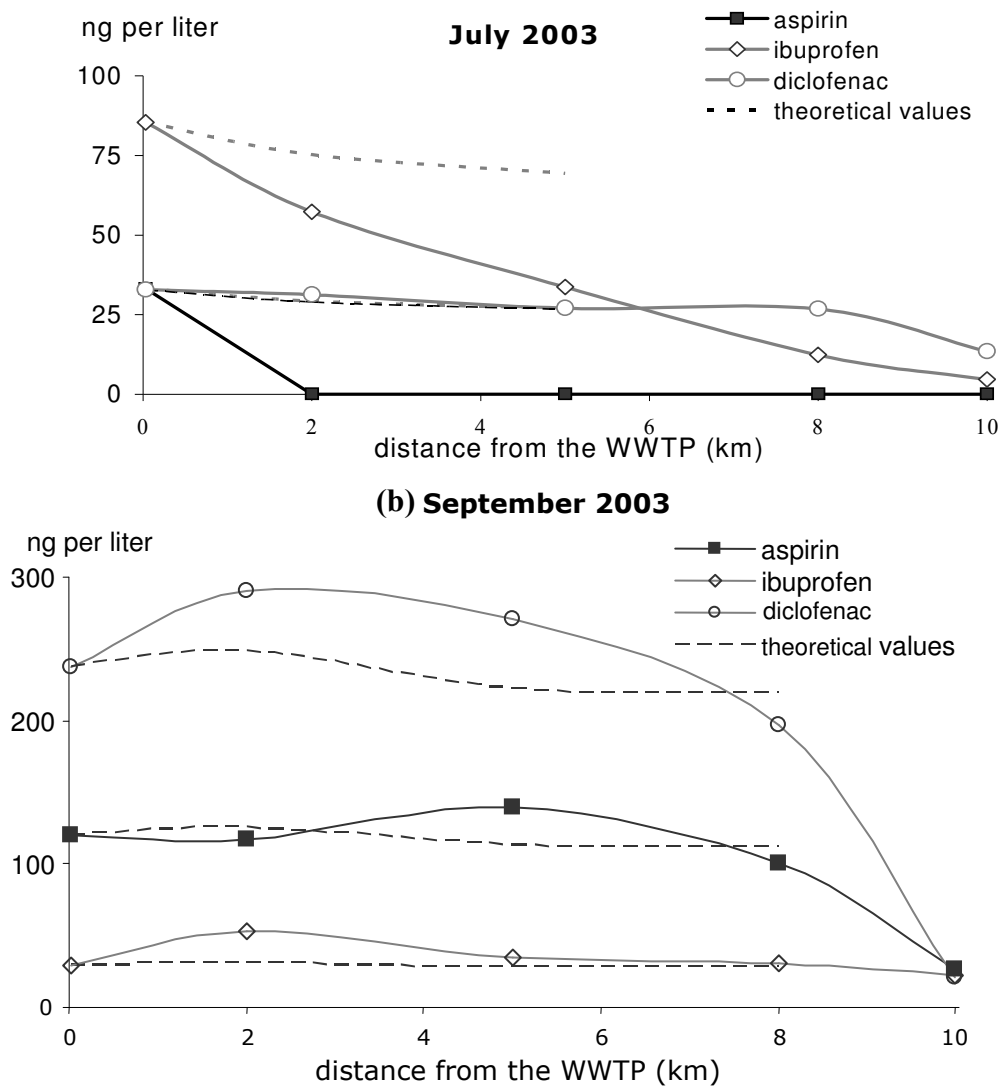


Figure 3: Comparison measured values versus theoretical values for several compounds. Campaigns of July (a) and September 2003 (b).

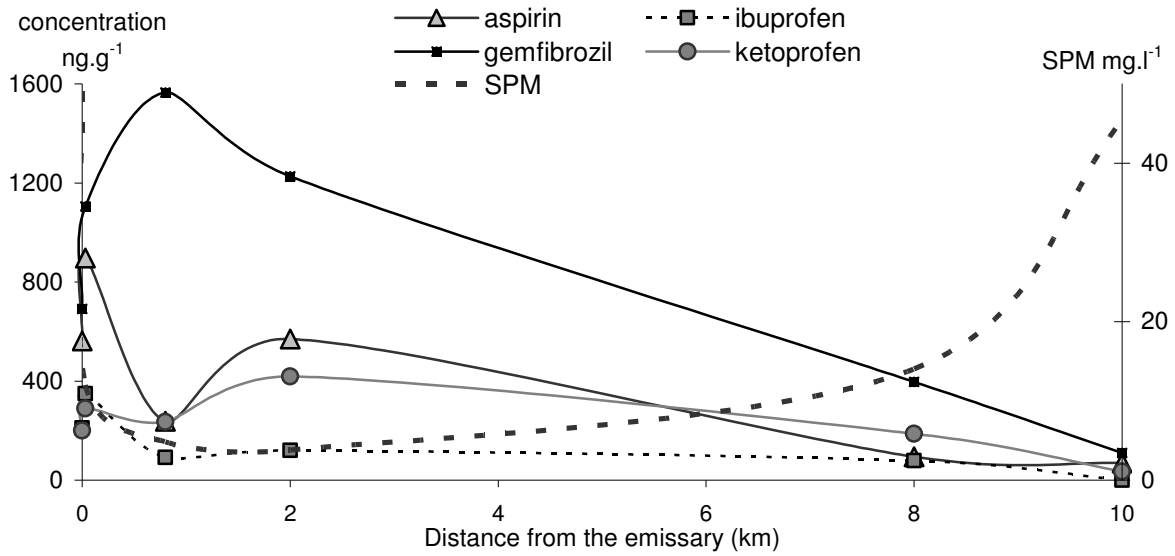


Figure 4: Particulate matter contamination expressed in ng.g^{-1} , campaign of July 2003.

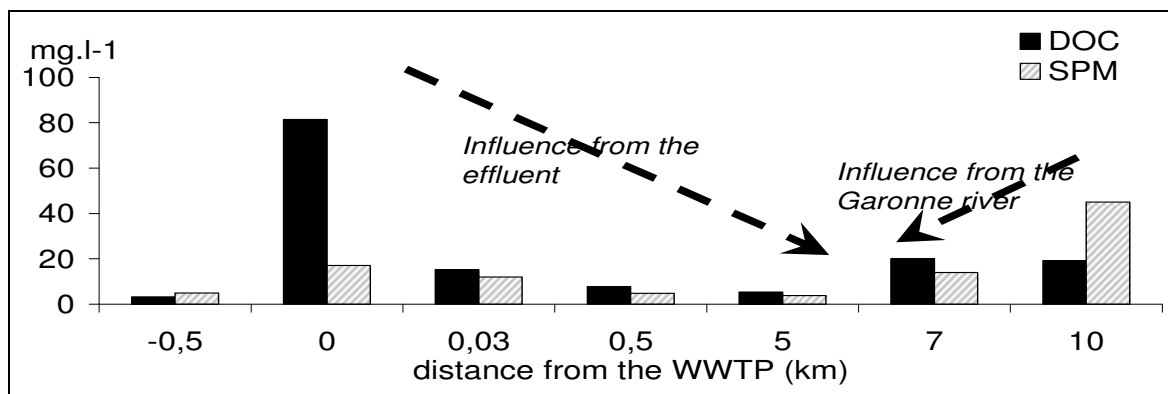


Figure 5: Measurements of dissolved organic carbon and suspended particular matter on the different sampling points (campaign of July 2003).

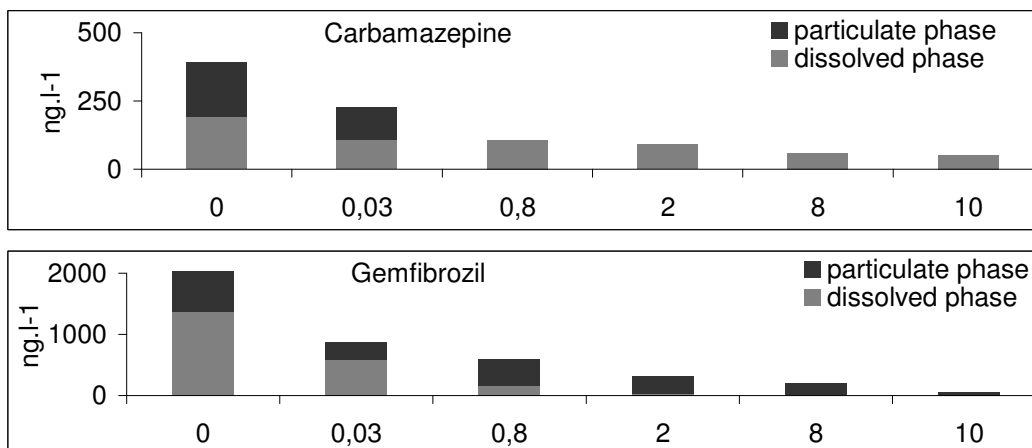


Figure 6: Measurements of pharmaceutical concentrations in dissolved in particulate phases all along the river in July 2003, for carbamazepine and gemfibrozil.

PUBLICATION 7
Soumise à

**Occurrence of pharmaceuticals in aquatic systems:
4 year monitoring of the Seine estuary**

Anne Togola and *Hélène Budzinski
LPTC, UMR 5472 CNRS, University of Bordeaux 1, 351 crs de la Libération,

33405 TALENCE, FRANCE

* corresponding author : h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

KEYWORDS: Pharmaceuticals, Wastewaters, Surface waters, Seine Estuary

ABSTRACT :

The report describes a large scope study conducted in order to establish to what extent pharmaceutical compounds may be present in a French Atlantic estuary, the Seine estuary. A 4-year study of pharmaceutical contamination has been undertaken, to assess the levels of contamination of this highly anthropised system. Surface waters have been sampled on different estuarine localisations to take into account and to understand degradation phenomena. Important concentration variability has been highlighted, in surface waters as well as in wastewater treatment plant effluents. For surface waters, the average range of concentration was between the limits of detection of the method used and 760 ng.l⁻¹ for caffeine, 611 ng.l⁻¹ for ibuprofen and up to 100 ng.l⁻¹ for the others. Partition between dissolved and particulate phases has been monitored, confirming the predominance of the aqueous phase for these polar compounds. For waste waters, pharmaceutical concentrations have been measured up to 3.9 µg.l⁻¹ for ketoprofen and 2.5 µg.l⁻¹ for carbamazepine. The emission of pharmaceutical pollutants into marine waters has also been monitored, showing no significant impact of estuarine pollution in the Seine Bay.

INTRODUCTION:

Occurrence of pharmaceutical compounds are receiving a growing attention from scientific community, regulatory agencies, as there is a continuous widespread of anthropogenic substances into the environment. Several reviews of the occurrence, fate and effects of pharmaceuticals in the environment are available [1-3] and show the main influence of sewage treatment plant discharges on the contamination of aquatic environments.

The occurrence of pharmaceutical compounds is receiving growing attention from scientific community, regulatory agencies, as there is a continuous inflow of anthropogenic substances into the environment. Several reviews of the occurrence, fate and effects of pharmaceuticals in the environment are available [1-3] and show the main influence of sewage treatment plant discharges on the contamination of aquatic environments.

More than 60 pharmaceuticals have been found in systems including analgesics, antibiotics, antiepileptics, β -blockers, β 2-sympathomimetics, and blood-lipid regulators. These compounds have been detected in wastewaters across Europe [4, 5] and the USA [4, 5]. Data concerning surface waters have also been obtained in several countries, with concentrations ranging from a few ng.l^{-1} [4, 6] to a few $\mu\text{g.l}^{-1}$ [7] and for all therapeutic groups. Their potential to cause a variety of physiological responses has raised concern in their effects on organisms in the aquatic environment [8-12].

In recent years, the levels of contaminants in estuaries and coastal zones increased as a consequence of anthropogenic activities [13-15]. Estuaries are productive natural habitats, where large phytoplankton populations support a variety of other organisms, including many commercially important marine fish and crustacean species that use them as nursery grounds [16, 17].

Moreover, estuaries are under the influence of anthropic pressures coming from rivers, industrial catchment basins. There is also the way of access of surface waters to marine ecosystems. The occurrence of pollutants, such as PBDEs, PCBs, PAHs [13-15] has been investigated for a long time, but in this critical area pharmaceuticals can also present an important environmental risk. The influx of antibiotics into estuarine environments is of particular concern because virulent bacteria can develop resistance to antibiotics at continuous low level exposure [18-21]. For this reason, evaluations of contamination levels are needed. Chronic exposure of non-target aquatic organisms to pharmaceuticals may cause numerous subtle effects, in addition to lethal impacts, such as metabolic or reproductive changes. Few data exist on the occurrence and impact of pharmaceuticals in estuarine and marine waters. In the UK estuaries, pharmaceuticals, especially non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been measured, ranging from 4 to 930 ng.l^{-1} [22] while clofibric acid, diclofenac and ibuprofen have been reported to be found in the Elbe estuary at concentrations between 1 and 20 ng.l^{-1} [23]. For the purpose of this study, 13 compounds were selected and studied in the most anthropised Atlantic French coast estuary: the Seine river estuary. This research is part of the Seine aval II Research program, which aims to assess the water quality of the Seine river estuary and to better understand the working of estuarine systems. Although the Seine has already been studied for chemical contamination by PAHs, PCBs and heavy metals [24], there was a serious lack of data concerning emerging contaminants such as pharmaceuticals. Hormonal steroids have also been measured and were never detected in surface waters and concentrations in wastewaters were ranged from 1.8 to 8.3 ng.l^{-1} [25]. In this paper, we describe for the first time the determination of 8 pharmaceuticals (aspirin, caffeine, carbamazepine, diclofenac, gemfibrozil, ibuprofen, ketoprofen and naproxen) in the Seine estuary waters collected for 4 years (10 sampling campaigns). Both surface waters and wastewater effluents were studied. Their occurrence in the

Seine Bay has been measured and seasonal variation has been evaluated showing variability depending on compounds.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Pharmaceutical products such as pyrene and 1-hydroxypyrene, used for recovery determination standards, were of analytical grade and purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Deuterated products (amitryptiline d6, diazepam d5 and nordiazepam d5) were purchased from Euriso-Top (St Aubin, France). Acetone, methanol and ethyl acetate (HPLC reagent grade, Scharlau) were purchased from ICS (Belin-Beliet, France). Hydrochloric acid 37% (reagent grade) was obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Ultrapure water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). 60 mg Oasis MCX cartridges were purchased from Waters (St Quentin en Yvelines, France). MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, purity >97%) was purchased from Acros Organics (Noisy-le-Grand, France) and was used as the derivatizing reagent for GC-MS analysis. Whatman GFF glass fibre filters (pore size 0.7 μm) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). The chemical structures of selected pharmaceuticals are presented in Table 7.

Pharmaceutical analysis

For natural waters, 1 l was filtered, while 500 ml were used for waste water effluent samples. The pH adjustment was made just before extraction processes at pH 2 with HCl (3.5 M) and internal standard mixture (25 μl to 50 μl of a 1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ methanolic mixture) were added to the samples.

SPE cartridges were conditioned subsequently with 3 ml of ethyl acetate and 3 ml of milliQ-water at adjusted pH 2. The water was carried out under vacuum at a flow rate of 12 to 15 ml.min^{-1} . The cartridges were dried under vacuum for 1h. After elution with three successive elutions, respectively 3 ml of ethyl acetate, 3 ml of ethyl acetate/acetone (49/49/2; v/v/v) and 3 ml of ethyl acetate/acetone/ammonium hydroxide (50/50; 2% v/v), the samples were completely evaporated under nitrogen and transferred into GC injection vials in 50 to 100 μl of ethyl acetate. For recovery control, pyrene was added to the final extracts for neutral compounds before GC-MS analysis and 1-hydroxypyrene was added to the final extracts for acidic compounds before the derivatisation step, consisting in adding 30 μl of MSTFA before incubation at 65 $^{\circ}\text{C}$ for 35 min.

For the particulate phase, samples were first lyophilized until entire dryness, spiked with internal standards and then extracted by focused microwave assisted extraction (Microdigest 301, Prolabo, Fontenay sous Bois, France): 30 W, 10 min, in 30 ml of acetonitrile/pH2 water (70/30; v/v). The extracts were filtered on glass fibre cotton and the solvent was evaporated under evaporation assisted by heating and under vacuum (RapidVap, Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France). The aqueous residues were then dissolved in 30 ml of pH 2 water and treated as aqueous samples, as described above (dissolved phase).

All additions of matrix, standards, solvents or reagents were gravimetrically controlled. Blanks were performed for each batch experiment in order to prevent any contamination. No compounds have been found in blank samples.

GC-MS analyses were carried out using an HP 6890 gas chromatograph from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). The capillary column was an HP5/MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm film thickness; phase: 5% diphenyl, 95% dimethylsiloxane) from Bios Analytique (L'Union, France). The samples were injected (1 μl) into the GC in splitless mode at 250 $^{\circ}\text{C}$ using an HP 6890 series injector. The carrier gas was ultrapure helium (99.99990%, Linde Gas, Bassens, France) set at constant flow mode (1.3 ml.min^{-1}

¹). For GC separation, the temperature program started at 70 °C (held for 2 min.), set at 10 °C per min. to 250 °C and was held isothermally for 5 min. The gas chromatograph was coupled to an HP 5973N mass selective detector (LMSD, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), operated in electronic impact (EI) mode at 70 eV (EMV: 1976 V) using single ion monitoring mode at 1.67 scan.s⁻¹ (dwell time 70 ms) The m/z ratios chosen for SIM analyses are presented on Table 7. The transfer line, source and quadrupole temperatures were 280, 230 and 150 °C, respectively.

Environmental studies

The Seine River Basin is a typical example of a fluvial system affected by multiple and extensive anthropogenic activities. The Seine River drains most of north-western France (65,000 km²), with Paris as the biggest city and is 900 km long at Poses, the last lock before the estuarine section of the system. The estuarine section drains an additional 7,500 km², with other important cities: Rouen and le Havre, but all the banks of the Seine are also built up.

From March 2002 to November 2003, surface water and WWTP effluent samples were collected every two months at six stations located in the Seine River Estuary. Three stations Poses, Caudebec and Honfleur, with kilometric points downstream of Paris (kp) respectively of 200, 313 and 355 represent surface waters, while three others are wastewater effluents: Elbeuf wastewater treatment plant effluent (WWTP) (kp 220; 110,000 population equivalents), Rouen WWTP effluent (kp 245; 450,000 population equivalents) and Tancarville WWTP effluent (kp 330; 1,800 population equivalents). All three WWTPs included secondary biological treatments.

The Poses station has been monitored until May 2005 to obtain an overview of contamination evolution on a large time scale.

Besides those monitoring studies, more detailed campaigns were organized to study the variability of contamination levels all along the estuary from the upstream (Poses station) to the downstream one (Honfleur station) in March and July 2002 (10 sampling stations). In October 2004, 22 sampling stations waters were collected, from Poses to the Seine Bay. For this last study both dissolved and particulate phases were collected. All the sampling stations monitored for those studies are presented in Figure 1.

In order to investigate the fate of pharmaceuticals in the Seine Bay, a sampling campaign has been undertaken at the mouth of the Seine, from Honfleur (kp 355) to the entrance of the Bay, as shown in Figure 2. Water samples have been collected both on the surface and bottom, using a Niskin bottle (Maritech, Grimaud, France). Salinity has been measured for all surface samples. Bottom samples have been collected at 3 meters at the top of the bottom to avoid the collection of silt, very abundant in this lower part of the estuary in the maximal turbidity zone [26].

RESULTS

Pharmaceutical concentrations in wastewater treatment plant effluents

As major sources of pharmaceuticals in aquatic systems, waste water effluents have been particularly studied. The most important plants in the estuary, Rouen (kp 245; 450,000 population equivalents) and Elbeuf (kp 220; 110,000 population equivalents) have been monitored. In comparison with these big ones, the Tancarville station (kp 330; 1,800 population equivalents) has been sampled to investigate the impact of an obsolete treatment plant.

Figure 3 presents pharmaceutical ranges measured in the three stations, expressed in ng per liter (Figure 3a).

Surprisingly, there was no significant difference between the three stations, more or less depending on compounds. For ketoprofen for example, the concentration measured was 25 ng.l⁻¹, 16 ng.l⁻¹ and 24 ng.l⁻¹, respectively for Elbeuf, Rouen and

Tancarville WWTP effluents. In this campaign, carbamazepine was higher in Tancarville effluent (397 ng.l^{-1}) than in the bigger plants (184 ng.l^{-1} for Elbeuf and 256 ng.l^{-1} for Rouen). But when considering WWTP flows all measurements were readjusted related to WWTP capacities. With only 970 m^3 per day, Tancarville WWTP effluent represented a very weak input, compared with Elbeuf ($10,000 \text{ m}^3$ per day) or Rouen ($85,000 \text{ m}^3$ per day). This way, the quantity of pharmaceuticals introduced into the environment was in fact negligible for the Tancarville station compared with Elbeuf and Rouen WWTPs. (Figure 3b).

Carbamazepine and ketoprofen were measured at their highest levels with average concentrations ranging from 324 to 813 ng l^{-1} for carbamazepine and from 71 to 988 ng l^{-1} for ketoprofen. Aspirin, gemfibrozil and ibuprofen always presented the lowest concentrations, not exceeding respectively 55 , 121 and 100 ng l^{-1} for the 3 WWTPs. Table 2 presents the average pharmaceutical concentrations in the three stations with minimal and maximal values measured.

Seasonal variability in pharmaceutical concentrations in waste water treatment plant effluents

Figure 4 presents pharmaceutical concentrations measured in the WWTP of Rouen, the most important effluent sampled in the Seine Estuary.

Considering carbamazepine, concentrations fluctuated between 145 ng.l^{-1} (July 2002) and 600 ng.l^{-1} (March 2002). As it is an antidepressant drug, there is no seasonal variation of carbamazepine consumption. Therefore, the ranges of variation were not very important during the 7 campaigns.

On the contrary, even if the major source of caffeine is beverage consumption, constant through the year, other phenomena linked to WWTP efficiency can occur. Variability in environmental conditions influences residence time in WWTP, and so pharmaceutical degradation efficiency. Caffeine is a highly degradable compound but too short residence time can affect its degradation. The three campaigns that show the highest concentration levels (March 2002: 323 ng.l^{-1} , May 2002: 120 ng.l^{-1} and September 2003: 130 ng.l^{-1}) correspond to times of flood. During these flood periods, high volumes of water get into WWTPs (both urban waste water and runoff water) and need to be treated, which reduces water residence time and then affects treatment efficiency. Carbamazepine is a very persistent compound and cannot be affected by this phenomenon.

For other compounds, several phenomena occur at the same time. Inputs that fluctuate considerably related to consumption variations and treatment efficiency related partly to climatic conditions determine concentration levels in the effluent.

Consequently, one important piece of information to consider when interpreting data such as these is to take into account the variation in concentrations of the pharmaceuticals in the final effluent discharge. In order to fully estimate the environmental discharge of these chemicals, the levels would have to be monitored for a more significant period of time, by using composite samples or integrative sampler, such as POCIS (Polar Organic Compounds Integrative Sampler) [27-29].

Pharmaceuticals occurrence in the Seine Estuary surface waters

Table 3 presents the range of pharmaceutical concentrations measured for all sampling campaigns between March 2002 and February 2006 in three stations corresponding to the three estuarine parts: Poses (kp 202) corresponds to the upper part, Caudebec (kp 313) corresponds to the intermediate part and Honfleur (kp 355) corresponds to the lower part of the Seine Estuary. The measured values were comparable with previously reported data for surface water samples [30-34]. In the upper part, ibuprofen was detected most frequently in all the samples and also at its highest

levels with concentrations ranging between 6 and 611 ng l⁻¹ and with a median of 151 ng l⁻¹. Caffeine occurrence was also very high with concentrations ranged between 0 to 762 ng l⁻¹ and a median at 138 ng.l⁻¹. Carbamazepine, gemfibrozil and ketoprofen always presented the lowest concentrations, not exceeding 83, 86 and 54 ng l⁻¹, respectively.

In the lower part, caffeine, carbamazepine, diclofenac and ketoprofen were the most frequently detected compounds (9 out of 11 samplings). The highest level was measured for diclofenac with concentrations ranging from 0 to 128 ng l⁻¹ and with a median of 39 ng l⁻¹. Aspirin was detected only 4 times and presented the lowest concentrations with caffeine and naproxen, not exceeding 14, 15 and 15 ng l⁻¹, respectively. The Caudebec station measurements presented intermediate values with concentrations ranging from 15 ng.l⁻¹ (ketoprofen) to 76 ng.l⁻¹ (caffeine and ibuprofen).

Pharmaceutical degradation in the Seine Estuary surface waters

Considering pharmaceutical average concentrations, some phenomena seemed to occur all along the river. Figure 5 presents a monitoring campaign of the whole estuary, from Poses to Honfleur with a sampling station every 14 km (corresponding to 22 samples).

Inr this campaign, a high concentration has been found for caffeine, especially at Poses (kp 202, 762 ng.l⁻¹). Caffeine, as readily degradable compound showed a rapid decrease all along the estuary, down to a concentration below 40 ng.l⁻¹ in the Seine Bay. For diclofenac, direct phototransformation has already been described as an elimination process in surface waters [35]. For ibuprofen, direct phototransformation can be neglected because this compound does not absorb sunlight [36]. For naproxen, concentrations decreased from 103 ng.l⁻¹ to below detection limits and direct phototransformation must be considered as a possible elimination process [37], while for ibuprofen, biodegradation may be responsible for its removal from the environment [38]. For carbamazepine, no degradation phenomena have been identified in natural systems as previously described [39, 40]. For other compounds, ketoprofen and gemfibrozil, degradation phenomena were observed, but, to date, no further information on the processes is available.

Variability in the Poses station pharmaceutical measurements

Considering the 7 samplings done on the dam of Poses (kp 202) between July 2002 and May 2005, the range of variation is very important, more or less depending on compounds, as shown on Figure 6. During rain events, the increase in water flow was accompanied either by a parallel increase of the concentrations (see diclofenac concentrations at S2 and S3 or at S9 and S10) or by a decrease of the concentrations (see carbamazepine for all samplings).

Persistent compounds, not under the influence of degradation phenomena, varied with the Seine flow (carbamazepine). The variability observed for persistent compounds was mainly due to modification in WWTP influent (due to changes in consumption), and changes in the Seine and its tributaries flow. On the other hand, compounds that need a long residence time in WWTPs to be degraded, such as diclofenac, show their concentration in the effluent increase during weak flood events. However, in high flood events, dilution is too strong and masks this phenomenon (S1 and S5) and so, degradable compounds were more variable than persistent ones. Residence times in the upstream part, modified by flow, were an important factor for degradation phenomena. High flow reduced residence time and then degradation phenomena. But the relative part played by each phenomenon with opposite effects was very hard to identify.

Furthermore, there was an important pharmaceutical product source in the upstream part with Acheres waste water treatment plant (6 million population equivalents, 2,080,000 m³ per day). Pharmaceutical degradation in the upstream part,

between the Acheres waste water treatment plant outfall sewer (kp 63) and the dam of Poses (kp 202), can occur as observed in the downstream part (between Poses and Honfleur, kp 355). Changes in the Acheres effluent contents are probably of the same order as changes observed for other WWTPs (Rouen, Figure) that have strongly influenced concentrations measured at Poses and then make it difficult to see the relationship and the relative influences between the different occurring phenomena.

Pharmaceuticals in solid phase

Figure 7 shows pharmaceutical measurements in the particles carried out in the October 2004 campaign all along the Seine estuary. Pharmaceutical contents were very low, with maximum values obtained for ketoprofen at the Poses station (11 ng.l^{-1}).

Considering the partition between dissolved and solid phases, those results have shown that the main part of contamination comes from the dissolved phase, as the compounds polarity allow us to suppose. High polarity compounds, such as caffeine were not present in the solid phase, whereas more hydrophobic compounds (carbamazepine, diclofenac and ketoprofen) were present in both phases. This partition is the same as previously described for WWTP effluents or sludge [41-43].

When pharmaceutical occurrence in the solid phase is more precisely observed and expressed in ng.g^{-1} , some phenomena can be highlighted (Figure 8). High contents have been measured in the upper part of the system (Poses), with concentrations up to $1,220 \text{ ng.g}^{-1}$ for ketoprofen or 260 ng.g^{-1} for naproxen. The phenomena occurring in the central part of the estuary (between kp 220 and kp 260) have not yet been elucidated and need to be related to WWTP effluents introduced in this area (Elbeuf kp 220, Rouen kp 245). The increase in ketoprofen particle content at kp 285 cannot be explained yet.

To date, there is no specific investigation dealing with pharmaceutical occurrence in particles in natural systems. This partitioning behaviour can often be predicted by using the octanol-water partition coefficient ($\log K_{ow}$). Nevertheless, the use of this method with regard to pharmaceuticals seems to be uncompleted and other interaction phenomena seem to occur [44].

One of the determining factors for analysis validity is the quantity of particles, related to the contents of the matter in suspension. Indeed, the total collected sample volume was limited to 4 litres for pharmaceutical analysis. Since the content of particles is too weak, especially in the upper part of the estuary (less than 10 mg.l^{-1}), the mass of matrix was insufficient to allow the analysis for all the campaigns. There is a need of completing these first results with new campaigns focused on particulate matter by collecting high amount of particles, ensuring analyses validity, concerning ketoprofen measurement for example. The case of WWTP effluents need to be particularly studied concerning pharmaceutical quantification in the particulate phase. Another work, focused on WWTP effluent flow into a small river [45] has shown that pharmaceutical input by WWTP particles was not negligible. For a station with a capacity of 57,000 population equivalents, the ketoprofen content was 290 ng.g^{-1} 100 m after effluent introduction into the river that corresponds to 76 ng.l^{-1} . But it is also difficult to analyse WWTP particles, due to the occurrence of colloidal fraction, that can prevent the water sample filtration step.

Pharmaceuticals in the mouth of the Seine estuary: input to the Bay of Seine

Measurements have been made in the transition area between the Seine Estuary and the Bay of Seine. This area corresponds also to the maximum turbidity zone and the mixture between river and marine water zones. It is interesting to investigate the potential input of pollutants in these productive natural habitats, used as nursery grounds by a lot of species.

Figure 9 presents concentrations measured in surface water and bottom waters to investigate differences between the two. For this campaign, if concentrations ranged between 5 and 40 ng.l⁻¹ in the mouth of the river (Honfleur, kp 355), there was a quick decrease of analyte levels when salinity and then mixture between freshwater and marine waters increased. At station 44, corresponding to the Seine Bay entrance, pharmaceutical concentrations were below the limits of detection, showing no major compound input into the Atlantic Ocean.

Concentrations in surface waters were twice higher than in bottom waters. Unfortunately, no salinity measurements have been made in bottom samplings that could perhaps highlight the occurrence of a salt-water wedge phenomenon. Since saline water intrusion is easier at the bottom than in the surface (due to wind and surface current influences), marine waters enter the estuary earlier at the bottom than in the surface, which creates a time-lag and shift between bodies of water. The predominance of marine waters (not highly polluted) at the bottom can explain concentration differences, all the more so concentrations were on the whole weak, which adds up with data previously published measuring clofibrac acid and caffeine, but at low levels [46], below 10 ng.l⁻¹.

CONCLUSIONS

This study allows a real assessment of the level of pharmaceutical contamination in one of the biggest European estuaries, that is subjected to hard anthropic pressures. For 4 years, high variability has been measured in WWTPs and may result from a lower efficiency of the WWTPs during rain events or from a higher inflow into the WWTPs coming from an increase in the consumption of these pharmaceuticals, depending on compounds. Concerning estuarine contamination, measured levels were between 0 and 760 ng.l⁻¹, depending on compounds, localisation in the estuary and season.

Even if these pharmaceutical concentrations seem to be low in comparison with other kind of contamination, such as metallic one for example, ranging up to few µg.l⁻¹ in surface waters, there are no negligible. Considering a river flow around 410 m³.s⁻¹ (corresponding to mean annual flow), when we calculate the quantity of compounds introduced per day in the estuarine system, the values are very significant of the environmental problem that can occur (Table 4). Depending on compounds,, there is up to 108,000 pills containing ibuprofen (considering active substance content of 200 mg per pill) that enter the estuary each day at the dam of Poses station and up to 81,000 pills containing diclofenac for the same conditions. All these substances are active ones and can have environmental, health or economic impacts not clearly already defined.

Degradation in the aquatic system, after WWTP effluent introduction, has been observed for some of the studied compounds. Nevertheless, an important variability of inputs before the upper sampling station makes it difficult to understand degradation phenomena. This work is at as far as we know the first one showing long term monitoring of a pharmaceutical polluted estuarine medium and presents the first appraisal of the Seine estuary concerning pharmaceuticals. The impact on the Seine Bay has been also monitored and seems to show no risk assessment for marine species. But the impact on the estuarine part, known as an important nursery area for commercialized fish, such as juvenile flat fish (sole, plaice...) has not yet been studied and needs further ecotoxicological investigations, for which the data of pharmaceutical concentration levels observed in this work can be successfully used.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Seine Aval program for research funding. The authors are indebted to the Seine Service of Navigation (Service de la Navigation de la

Seine, île Lacroix, Rouen, France) for his technical support during sampling work in the Seine estuary.

They want also to acknowledge the Région Aquitaine and the NFS (National Funding for Science) for providing a PhD grant (A. Togola).

REFERENCES

- [1] Halling-Sorensen B, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhof HC, Jorgensen SE. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment : a review. *Chemosphere* 36:357-393.
- [2] Hernando MD, Mezcua M, Fernandez-Alba AR, Barcelo D. 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69:334-342.
- [3] Niessen WMA. 1998. Analysis of antibiotics by liquid chromatography- mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 812:53-75.
- [4] Boyd GR, Reemtsma H, Grimm DA, Mitra S. 2003. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *The Science of The Total Environment* 311:135-149.
- [5] Kolpin DW, Skopec M, Meyer MT, Furlong ET, Zaugg SD. 2004. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Science of The Total Environment* 328:119-130.
- [6] Stumpf M, Ternes TA, Haberer K, Seel P, Baumann W. 1996. Determination of pharmaceuticals in sewage plants and river water. *Vom Wasser* 86:291-303.
- [7] Ternes TA. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* 32:3245-3260.
- [8] Lanzky, Halling-Sorensen. 1997. The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. *Chemosphere* 35:2553-2561.
- [9] Crane M, Watts C, Boucard T. 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of The Total Environment* 367:23-41.
- [10] Brain RA, Johnson DJ, Richards SM, Hanson ML, Sanderson H, Lam MW, Young C, Mabury SA, Sibley PK, Solomon KR. 2004. Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquatic Toxicology* 70:23-40.
- [11] Brooks BW, Foran CM, Richards SM, Weston J, Turner PK, Stanley JK, Solomon KR, Slattery M, La Point TW. 2003. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicology Letters* 142:169-183.
- [12] Cleuvers M. 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters* 142:185-194.
- [13] Amado LL, Rosa CE, Leite AM, Moraes L, Pires WV, Pinho GLL, Martins CMG, Robaldo RB, Nery LEM, Monserrat JM. 2006. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. *Marine Pollution Bulletin* 52:199-206.
- [14] Veltman K, Huijbregts MAJ, van den Heuvel-Greve MJ, Vethaak AD, Hendriks AJ. 2006. Organotin accumulation in an estuarine food chain: Comparing field measurements with model estimations. *Marine Environmental Research* 61:511-530.
- [15] Fu C-T, Wu S-C. 2006. Seasonal variation of the distribution of PCBs in sediments and biota in a PCB-contaminated estuary. *Chemosphere* 62:1786-1794.
- [16] Cattrijsse A, Dankwa HR, Mees J. 1997. Nursery function of an estuarine tidal marsh for the brown shrimp *Crangon crangon*. *Journal of Sea Research* 38:109-121.
- [17] Lobry J, Mourand L, Rochard E, Elie P. 2003. Structure of the Gironde estuarine fish assemblages: a comparison of European estuaries perspective. *Aquatic Living Resources* 16:47-58.

- [18] Pomati F, Netting AG, Calamari D, Neilan BA. 2004. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology* 67:387-396.
- [19] Sanderson H, Brain RA, Johnson DJ, Wilson CJ, Solomon KR. 2004. Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones. *Toxicology* 203:27-40.
- [20] Golet EM, Alder AC, Giger W. 2002. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environmental Science and Technology* 36:3645-3651.
- [21] Batt AL, Bruce IB, Aga DS. 2006. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. *Environmental Pollution* 142:295-302.
- [22] Thomas KV, Hilton MJ. 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 49:436-444.
- [23] Weigel S, Kuhlmann J, Huhnerfuss H. 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibrac acid, caffeine and DEET in the North Sea. *The Science of The Total Environment* 295:131-141.
- [24] Tronczynsky J, Munsch C, Moisan K. 1999. Seine Aval programme, vol 12. IFREMER, Plouzane, France.
- [25] Labadie P, Budzinski H. 2005. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381:1199-1205.
- [26] Servais P, Garnier J. 2006. Organic carbon and bacterial heterotrophic activity in the maximum turbidity zone of the Seine estuary (France). *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 68:78-85.
- [27] Alvarez D, Cranor WL, Huckins J, Clark RC, Perkins SD. 2004. Assessment of organic contaminant in integrative samplers from Chesapeake Bay tributaries. *USGS Final Report*.
- [28] Petty JD, Huckins JN, Alvarez D, Brumbaugh WG, Cranor W.L., Gale R.W., Rastall A.C., Jones-Lepp T.L., Leiker T.J., Rostad C.E., Furlong E.T. 2004. A holistic passive integrative sampling approach for assessing the presence and potential impact of waterborne environmental contaminants. *Chemosphere* 54:695-705.
- [29] Togola A, Budzinski H. 2006. Development of Polar Organic Compounds Integrative Samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems. *submitted to Analytical Chemistry*.
- [30] Anderson P, D'Aco V, Shanahan P, Chapra P., Buzby M., Cunningham V. 2004. Screening analysis of human pharmaceuticals compounds in U.S. surface water. *Environmental Science and Technology* 38:838-849.
- [31] Bendz D, Paxeus NA, Ginn TR, Loge FJ. 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials* 122:195-204.
- [32] Bound JP, Voulvoulis N. 2006. Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. *Water Research* 40:2885-2892.
- [33] Farré M, Ferrer I, Ginebreda A, Figueras M, Olivella Lourdes, Tirapu Iluis, Vilanova Manel, Damia B. 2001. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography A* 938:187-197.
- [34] Ternes TA, Stumpf M, Schuppert B, Haberer K. 1998. Simultaneous determination of antiseptics and acidic drugs in sewage and river water. *Vom Wasser* 90:295-309.

- [35] Buser HR, Poiger T, Müller MD. 1998. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters : rapid photodegradation in a Lake. *Environmental Science and Technology* 32:3449-3456.
- [36] Tixier C, Singer HP, Oellers S, Muller SR. 2003. Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters. *Environmental Science and Technology* 37:1061-1068.
- [37] Packer JL, Werner JJ, Latch DE, McNeill K, Arnold WA. 2003. Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibric acid, and ibuprofen. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 65:342-351.
- [38] Winkler M, Lawrence J, Neu T. 2001. Selective degradation of ibuprofen and clofibric acid in two model river biofilm systems. *Water Research* 35:3197-3205.
- [39] Andreatozzi R, Marotta R, Pinto G, Pollio A. 2002. Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Research* 36:2869-2877.
- [40] Lam MW, Young CJ, Brain RA, Johnson DJ, Hanson MA, Wilson CJ, Richards SM, Solomon KR, Mabury SA. 2004. Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:1431-1440.
- [41] Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R, Pomati F, Calamari D, Zuccato E. 2006. Removal of Pharmaceuticals in Sewage Treatment Plants in Italy. *Environmental Science and Technology* 40:357-363.
- [42] Khan SJ, Ongerth JE. 2002. Estimation of pharmaceuticals residues in primary and secondary sewage sludge based on quantities of use and fugacity modelling. *Water Science and Technology* 46:105-113.
- [43] Matamoros V, Garcia J, Bayona JM. 2005. Behavior of Selected Pharmaceuticals in Subsurface Flow Constructed Wetlands: A Pilot-Scale Study. *Environmental Science and Technology* 39:5449-5454.
- [44] Tolls J. 2001. Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. *Environmental Science and Technology* 35:3397-3406.
- [45] Togola A, Budzinski H. 2006. Study of the impact of a WWTP on a small river, case of the Eysines river (France). *submitted to Environmental Science and Technology*.
- [46] Weigel S, Kuhlmann J, Hühnerfuss H. 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants : occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *The Science of the Total Environment* 295:131-141.

Figure Captions

Figure 1: Map of the Seine Estuary indicating kilometric points, from Poses to Honfleur.

Figure 2: Sampling stations in the Seine Bay.

Figure 3: Comparison between the three studied WWTPs, campaign of July 2003.
a) Concentrations expressed in ng.l^{-1} ; b) Total emission in mg per day.

Figure 4: Pharmaceutical concentrations in Rouen WWTP effluents, comparison of 7 sampling campaigns, from March 2002 to September 2003.

Figure 5: Pharmaceutical concentrations in surface waters all along the Seine Estuary, from Poses (kp 202) to the Seine Bay (October 2004, 22 sampling stations, in triplicates).

Figure 6: Pharmaceutical concentrations in Poses compared with the Seine flow.
a) caffeine; b) carbamazepine ; c) diclofenac

Figure 7: Pharmaceutical partition between dissolved and particulate phases.
a) caffeine; b) diclofenac; c) carbamazepine and d) ketoprofen

Figure 8: Pharmaceutical concentrations measured in the particulate phase in the Seine River, expressed in ng.g^{-1} (dry weight).

Figure 9: Pharmaceutical concentrations measured from the Seine Estuary mouth to the Seine Bay ;
a) Bottom water sampling; b) surface water sampling.

Table captions

Table 1 : Investigated compounds and deuterated compounds used for quantification.

Table 2 : Occurrence of pharmaceuticals in wastewaters, expressed in ng.l^{-1} .
Average, [Minimal value-Maximal value]

Table 3 : Occurrence of pharmaceuticals in surface waters, expressed in ng.l^{-1} .
Average, [Minimal value-Maximal value]

Table 4 : Pharmaceutical input to the Seine Estuary, expressed in number of pills per day (at the dam of Poses, considering an average flow ($410 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$) and the mean content of active compound per pill).

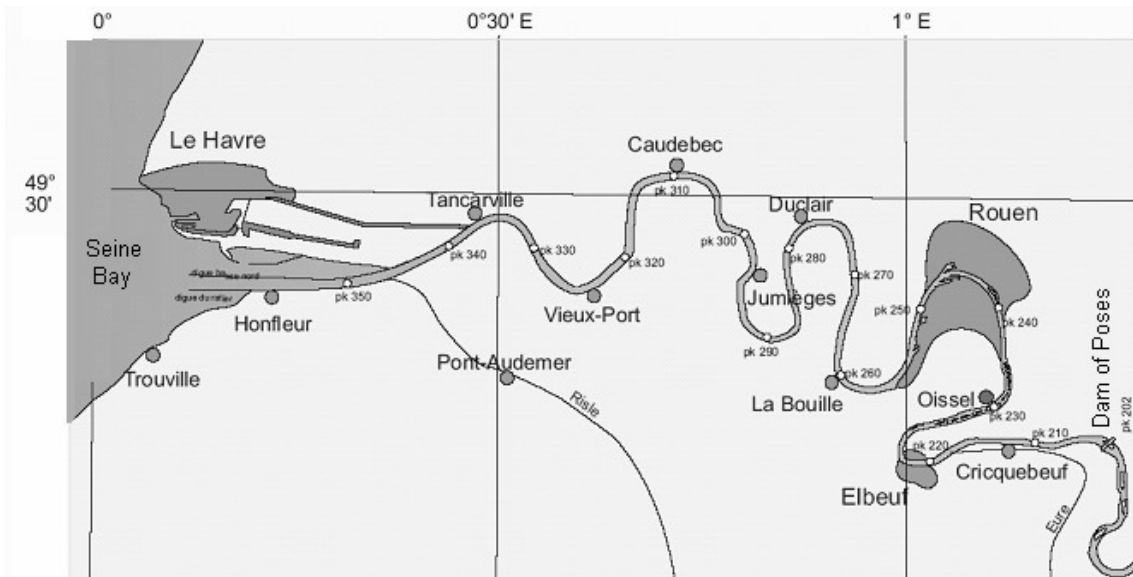


Figure 1: Map of the Seine Estuary indicating kilometric points, from Poses to Honfleur.

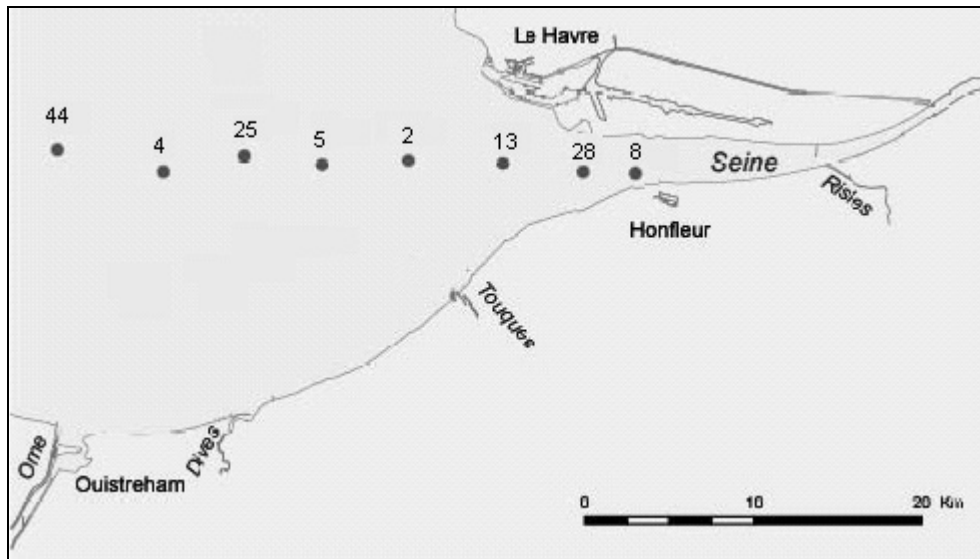


Figure 2: Sampling stations in the Seine Bay.

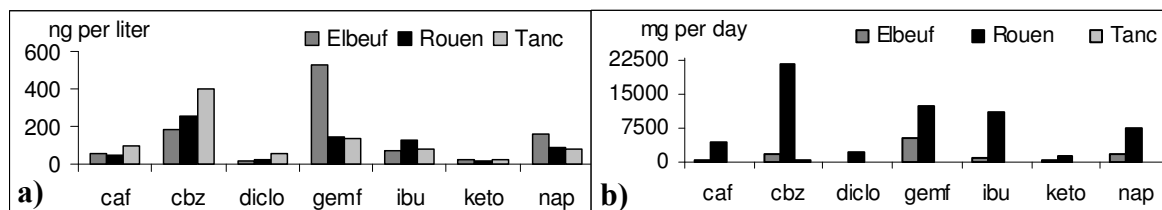


Figure 3: Comparison between the three studied WWTPs, campaign of July 2003. a) Concentrations expressed in ng.l^{-1} ; b) Total emission in mg per day.

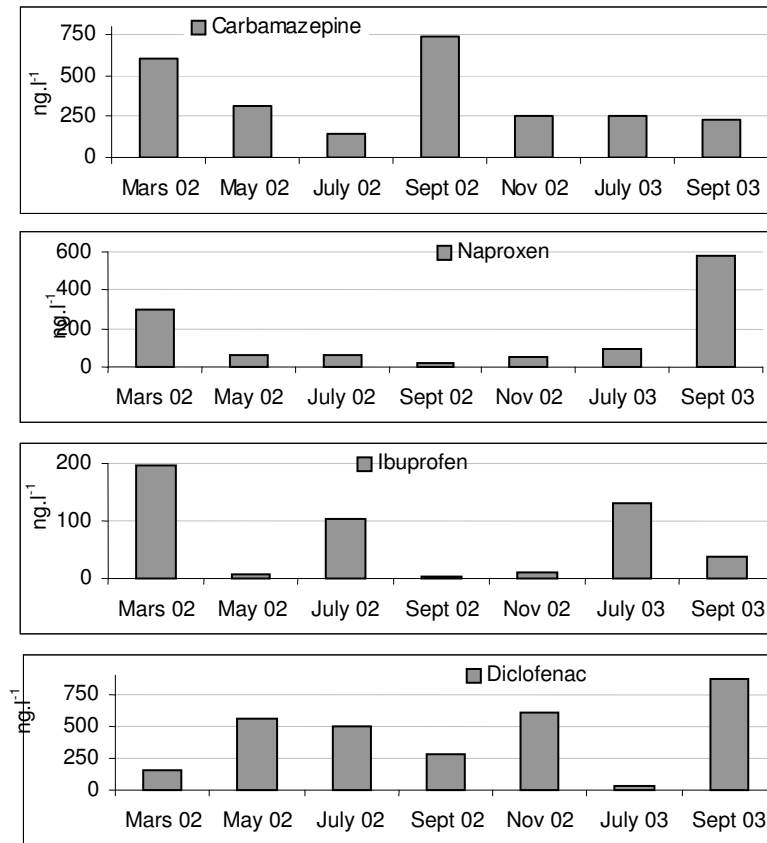


Figure 4: Pharmaceutical concentrations in Rouen WWTP effluents, comparison of 7 sampling campaigns, from March 2002 to September 2003.

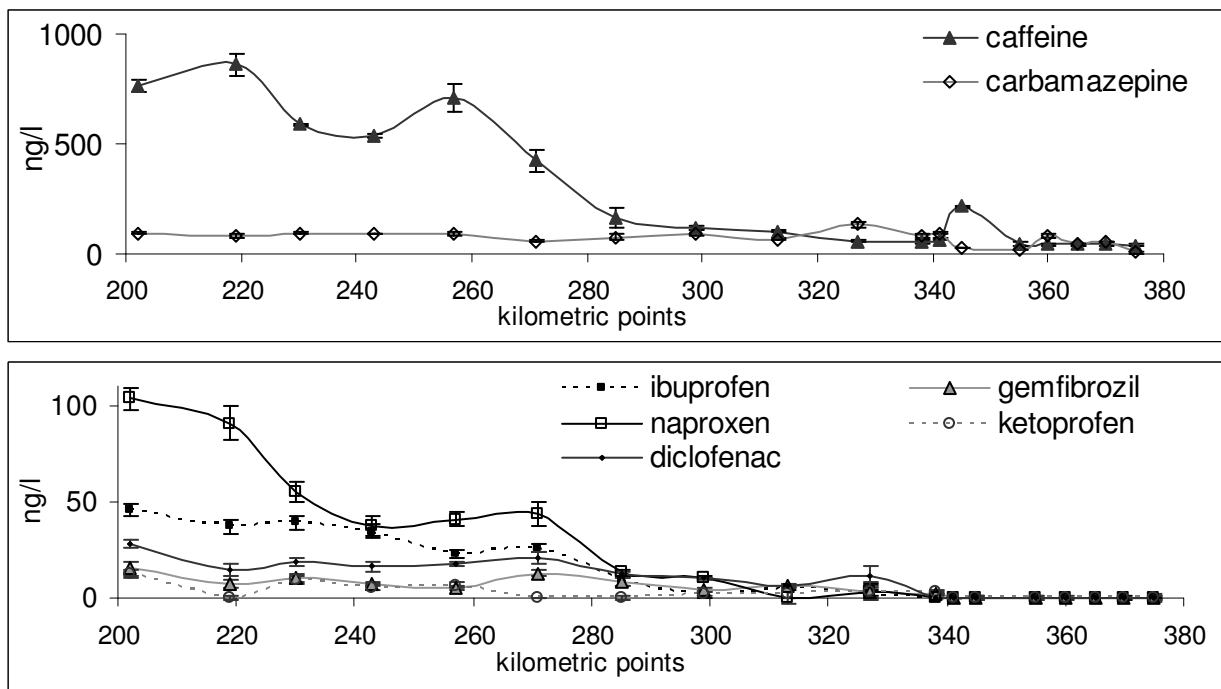


Figure 5: Pharmaceutical concentrations in surface waters all along the Seine Estuary, from Poses (kp 202) to the Seine Bay (October 2004, 22 sampling stations, in triplicates).

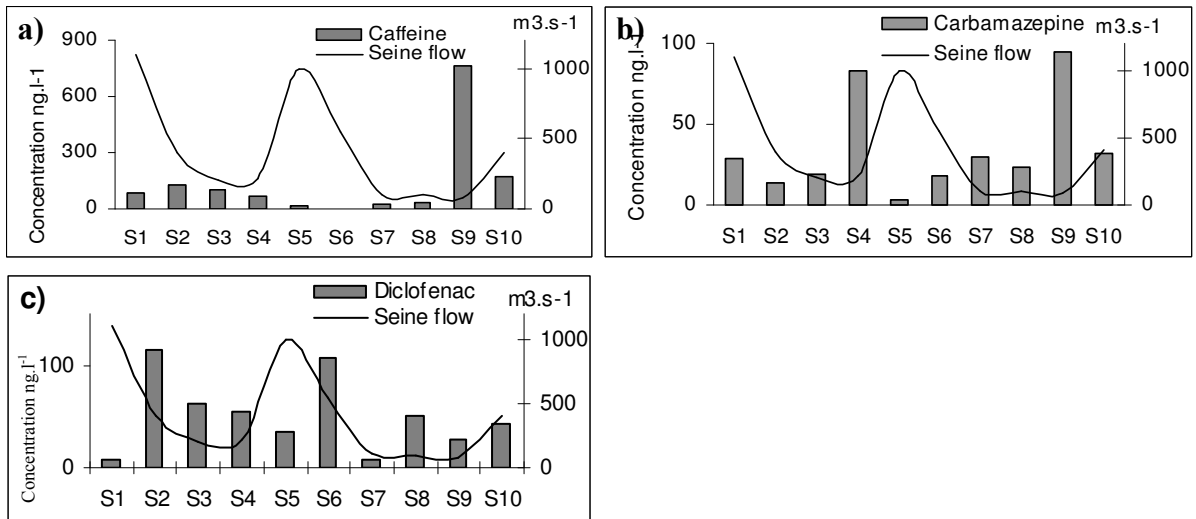


Figure 6: Pharmaceutical concentrations in Poses compared with the Seine flow. a) caffeine ; b) carbamazepine ; c) diclofenac

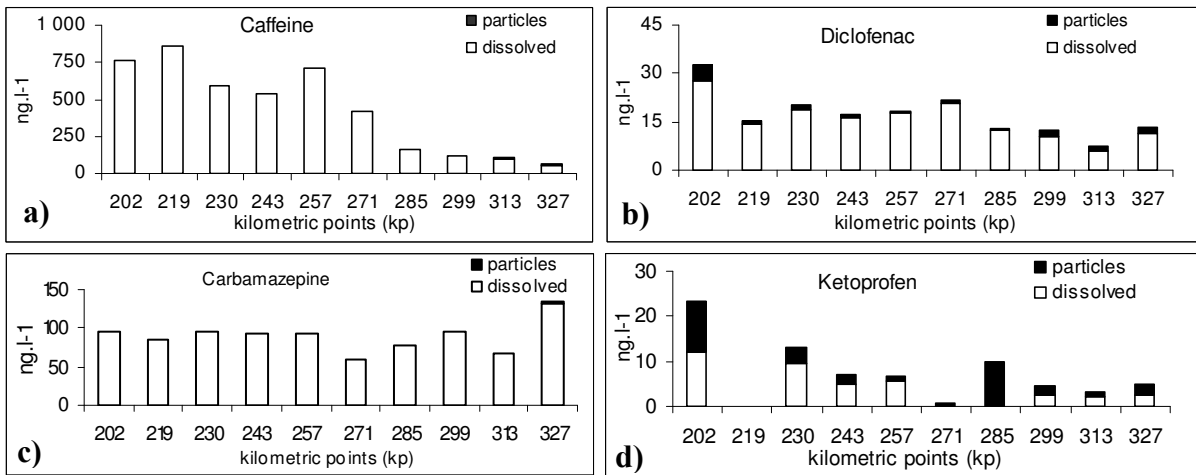


Figure 7: Pharmaceutical partition between dissolved and particulate phases. a) caffeine; b) diclofenac; c) carbamazepine and d) ketoprofen

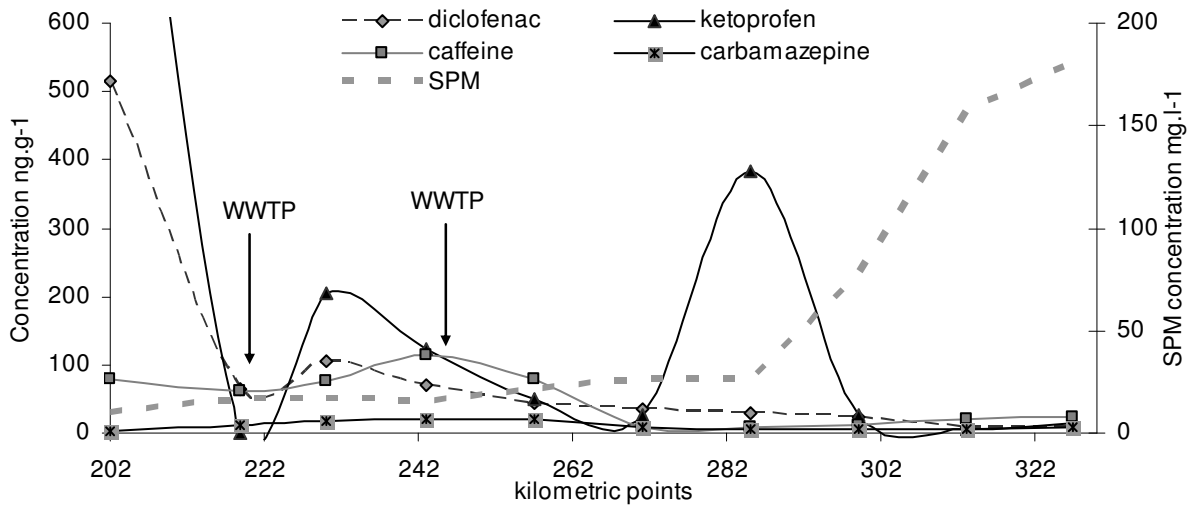


Figure 8: Pharmaceutical concentrations measured in the particulate phase in the Seine River, expressed in ng.g^{-1} (dry weight).

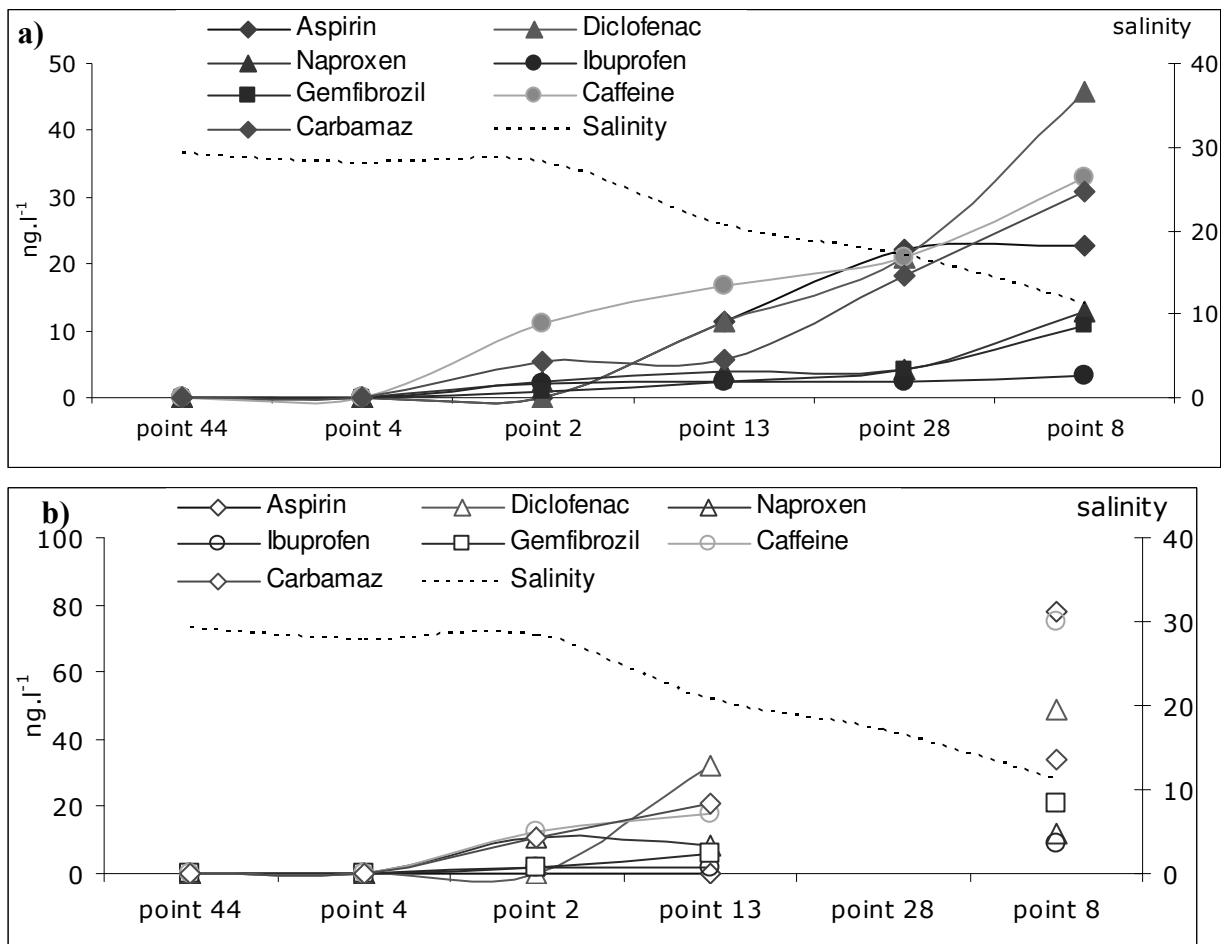


Figure 9: Pharmaceutical concentrations measured from the Seine Estuary mouth to the Seine Bay ;
 a) Bottom water sampling; b) surface water sampling.

Table 1 : Investigated compounds and deuterated compounds used for quantification.

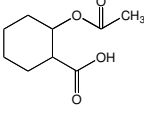
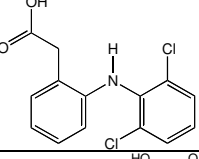
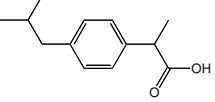
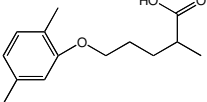
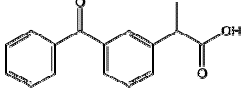
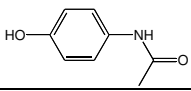
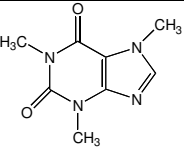
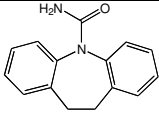
| Compounds | Chemical Structure | MW | m/z | Compounds | Chemical Structure | MW | m/z |
|---|---|-----|-----|--|---|-----|-----|
| acidic compounds | | | | | | | |
| Aspirin |  | 180 | 195 | Diclofenac |  | 295 | 214 |
| Ibuprofen |  | 206 | 160 | Gemfibrozil |  | 250 | 201 |
| Ketoprofen |  | 254 | 282 | Naproxen |  | 230 | 185 |
| Neutral and basic compounds | | | | | | | |
| Caffeine |  | 194 | 194 | Carbamazepine |  | 236 | 193 |
| Deuterated standards for drugs quantification | | | | Deuterated standards for recovery validation | | | |
| Diazepam d ₅ | | 286 | 261 | 1-Hydroxypyrene | | 218 | 290 |
| Amitryptiline d ₆ | | 287 | 64 | Pyrene | | 202 | 202 |
| Nordiazepam d ₅ | | 276 | 247 | | | | |

Table 2 : Occurrence of pharmaceuticals in wastewaters, expressed in ng.l⁻¹. Average, [Minimal value-Maximal value]

| | ELBEUF WWTP | ROUEN WWTP | TANC. WWTP |
|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Aspirin | 21 [nd-41] | 12 [nd-24] | 55 [nd-204] |
| Caffeine | 54 [nd-115] | 59 [16-130] | 221 [3-815] |
| Carbamazepine | 367 [nd-858] | 324 [145-742] | 813 [113-2519] |
| Diclofenac | 96 [14-282] | 470 [25-863] | 464 [26-1014] |
| Gemfibrozil | 121 [6-525] | 69 [9-164] | 62 [nd-135] |
| Ibuprofen | 100 [nd-342] | 48 [2-132] | 44 [7-95] |
| Ketoprofen | 217 [21-1136] | 71 [15-157] | 988 [nd-3903] |
| Naproxen | 140 [nd-267] | 146 [18-584] | 160 [14-620] |

Table 3 : Occurrence of pharmaceuticals in surface waters, expressed in ng.l⁻¹. Average, [Minimal value-Maximal value]

| | POSES SW | CAUDEBEC SW | HONFLEUR SW |
|---------------|--------------|-------------|-------------|
| Aspirin | 65 [nd-332] | 26 [nd-112] | 14 [nd-94] |
| Caffeine | 138 [nd-762] | 76 [3-160] | 15 [nd-62] |
| Carbamazepine | 34 [3-95] | 28 [7-63] | 16 [nd-41] |
| Diclofenac | 55 [7-116] | 55 [5-173] | 39 [nd-128] |
| Gemfibrozil | 31 [5-86] | 29 [3-84] | 18 [nd-46] |
| Ibuprofen | 151 [6-611] | 68 [nd-220] | 18 [nd-73] |
| Ketoprofen | 20 [nd-54] | 12 [nd-27] | 24 [nd-73] |
| Naproxen | 110 [12-275] | 63 [nd-183] | 15 [nd-42] |

| | Average | min. value | max. value |
|---------------|----------------|-------------------|-------------------|
| ASP (1g) | 2,307 | 0 | 11,762 |
| CBZ (200 mg) | 6,105 | 584 | 16,816 |
| DICLO (50 mg) | 39,154 | 5,030 | 81,900 |
| GEMF (450 mg) | 498 | 76 | 1,368 |
| IBU (200 mg) | 24,932 | 1,031 | 108,149 |
| KETO (200 mg) | 3,466 | 0 | 9 527 |
| NAP (500 mg) | 1,941 | 214 | 4,864 |

Table 4 : Pharmaceutical input to the Seine Estuary, expressed in number of pills per day (at the dam of Poses, considering an average flow ($410 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) and the mean content of active compound per pill).

PUBLICATION 8
soumise à Analytical Chemistry

Development of Polar Organic Integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems

Anne Togola and H el ene Budzinski*
University of Bordeaux 1 ; CNRS ; LPTC, UMR 5472, 351 crs de la Lib eration,
33405 Talence, FRANCE

* corresponding author

h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

KEYWORDS: Integrative sampler; POCIS; Pharmaceuticals; surface waters; polar compounds

ABSTRACT ::

Integrative passive sampling is a new approach developed for environmental monitoring. An alternative way to achieve a time weighted average concentration is to use passive samplers. The use of Polar Organic Chemical Integrative Sampling (POCIS) has been recently documented for the detection of pharmaceuticals in the environment (1-3). There is a need for laboratory data to extend the use of this type of tool to new compounds. The aim of this study was to determine the sampling rates (Rs; expressed as effective volumes of water extracted daily) of POCIS devices for 14 pharmaceuticals in several conditions of temperature, salinity and analyte concentration. These values are influenced by significant changes in water temperature, salinity. Overall POCIS Rs values were independent from aqueous concentrations. After laboratory experiments, an environmental field study has been performed, implementing POCIS devices in the Seine Estuary (North Atlantic coast of France) and testing the qualitative and quantitative application of POCIS devices on the contaminated system. The suitability of the devices for monitoring multiple media under a wide range of environmental conditions has also been discussed. The uniformity or reproducibility of the sampling matrix and on the other hand, the ability to detect compounds at low concentration levels below detection limits of discrete sampling have been highlighted.

INTRODUCTION:

The monitoring of environmental pollutants represents an ongoing challenge for environmental chemists. To establish the quality of the different compartments of an aquatic environment, there is a need for a large number of samples considering the large extent of aquatic systems and the system evolution through time.

Most conventional environmental pollutant screening techniques for aqueous matrices use discrete samplings (4, 5). However, a limitation to discrete sampling is that it gives an incomplete picture of overall concentrations of pollutants over a temporal basis.

Concerning pharmaceuticals, diversity in the chemical structure that requires several extraction procedures (6-9) limits the number of screened compounds. This type of approach is indeed time consuming and can be very costly. On the other hand, because small volumes are typically sampled (< 5 l), the approach is often inadequate for detecting compounds at trace levels.

The use of continuous samplers can give access to time weighted average water contamination that allows to obtain a global overview of environmental risk assessment. This new approach is worth considering and needs to be investigated. Limited research involving the passive sampling of polar organic compounds has been performed (10). These samplers have advantages over traditional methods of sampling; however, they have limitations in their performance and range of chemicals sampled.

Scientists at the USGS Columbia Environmental Research Center have developed a variety of passive integrative sampling devices (11-13), for polar and non polar compounds. One of those devices is the Polar Organic Integrative Sampler (POCIS), which is applicable for trapping hydrophilic compounds.

POCIS devices have the capacity to handle large volumes of water over a period of several days or weeks, thereby giving time weighted average (TWA) concentrations and have the ability to integrate episodic changes in environmental contaminant concentrations, which are often misinterpreted with conventional discrete samples. POCIS is capable of concentrating polar analytes and the membrane design allows for the selective sampling of the residues from the dissolved phase, allowing POCIS to be deployed in nearly all aqueous environments regardless of water quality. Among organic pollutants, pharmaceuticals belong to emerging contaminants and present a growing interest for researchers considering their occurrence (14-17) and potential toxicity for aquatic organisms (18-20). Passive samplers begin to be used for pharmaceuticals (1, 3, 11, 21) but only as qualitative tools (2, 22).

Actually one drawback of this approach is accurate concentration calculations. For that, calibration studies need to be conducted on the analytes of interest in laboratory experiments using set levels of environmental conditions (temperature, salinity...) (1).

The aim of this work is to obtain sampling rate values, specific for each compound. In order to evaluate the applicability of POCIS for pharmaceutical monitoring, several laboratory studies have been implemented for pharmaceutical compounds belonging to different therapeutic and chemical groups. Experiments deal with sampling rate evaluation in various environmental conditions for salinity, temperature, pollutant concentrations...

After these validation steps, laboratory calculated sampling rates have been used during an environmental field study in the Seine estuary, already studied for pharmaceutical contamination (23, 24), to evaluate the relevance of POCIS for TWA concentration measurements.

MATERIAL AND METHODS:

Chemicals and reagent:

POCIS Pharmaceuticals ® were purchased from Exposmeter (Tavelsjö, Sweden). Pharmaceutical compounds, pyrene and 1-hydroxypyrene used for recovery determination were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France; purity > 98%). Deuterated products (diazepam d5, amitryptiline d6, nordiazepam d5) used for pharmaceutical quantification were purchased from Euriso-Top (St Aubin, France; purity > 98%). All compounds are presented with their chemical structure in Table 1.

Acetone, dichloromethane, ethyl acetate and methanol (HPLC reagent grade, Scharlau) were purchased from ICS (Belin-Beliet, France). Hydrochloric acid 37% (reagent grade) was obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Ultrapure deionised water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). 60 mg Oasis MCX and 60 mg Oasis HLB cartridges were purchased from Waters (St Quentin en Yvelines, France). MSTFA (n-methyl-n(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, purity > 97%; Acros Organics, Noisy-le-Grand, France) was used as the silylation agent for GC-MS analysis. Whatman GFF glass fibre filters (pore size 0.7 µm) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France).

Extraction procedures:

POCIS extraction:

After environmental exposition, each POCIS sampler was rinsed with ultrapure water to remove any material adhering to the surface membrane (particles, biofilm...).

The disc array was disassembled and the membranes were detached from the stainless steel collars and rinsed with ultrapure water. The adsorbent powder was also carefully transferred into a glass chromatography microcolumn, previously blocked by glass fibre cotton (previously cleaned by ultrasonication three times in dichloromethane). The sorbent was dried under vacuum for 1 h and eluted using 18 ml of ethyl acetate/acetone mixture (50/50; v/v), after being spiked with internal standards (diazepam d5, amitryptilin d6, nordiazepam d5).

When the membranes were used, they were extracted using ultrasonication bath with methanol three times (3 x 20 ml for 10 min).

The extracts obtained from sorbent and membrane extraction were finally evaporated to dryness using nitrogen stream and transferred into injection vials in 50 to 100 µl of ethyl acetate. After the extraction step, the mass of sorbent has been measured by gravimetry for each POCIS after a freeze-drying step.

Water extraction:

For natural waters, 500 ml water samples were filtered through heated (450 °C, 6h) GFF glass fibre filters and spiked with internal standards (diazepam d5, amitryptiline d6, nordiazepam d5). pH adjustment at pH 2 was done just before the extraction processes with HCl (3.5 M) using pH-526 WTW® pH-meter (VWR International, Strasbourg, France). 25 to 50 µl of the internal standard mixture (containing 1 µg.g⁻¹ of each compound) was added to the samples. All the glassware was carefully cleaned by washing with detergent, then by rinsing with pure water and finally by heating at 450 °C overnight.

MCX cartridges (25) were conditioned subsequently with 3 ml ethyl acetate and 3 ml of milliQ-water at adjusted pH 2. The water samples were loaded under vacuum at a flow rate of 12 to 15 ml.min⁻¹. After sample loading, the cartridges were dried under vacuum for 1 h. The cartridges were successively eluted with 3 ml of ethyl acetate, 3 ml

of ethyl acetate/acetone mixture (50/50; v/v) and 3 ml of ethyl acetate/acetone/NH₄OH mixture (49/49/2; v/v/v). The extracts were evaporated under nitrogen stream to dryness and transferred into GC injection vials in 50 to 100 µl of ethyl acetate. Pyrene and 1-hydroxypyrene were added to the extracts before injection in order to control the extraction process quality.

Pharmaceutical analysis:

Two consecutive injections were performed: the first one to quantify neutral and basic compounds and the second one, after a derivatization step by adding 30 µl of MSTFA before incubation for 35 min. at 65 °C, on two different GC-MS systems.

GC-MS analyses were carried out using two identical systems, one dedicated to silylated compounds, the other to non-silylated compounds; the chromatographs were HP 6890 from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) GC models. The capillary columns were HP5/MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness; phase: 5% diphenyl, 95% dimethylsiloxane) from Agilent Technologies (Massy, France). Samples were injected (2 µl) into the GC in splitless mode at 250 °C using HP 6890 series injector automatic sampler. The carrier gas was ultrapure helium (99.99990 %, Linde Gas, Bassens, France) set at constant flow mode (1.3 ml.min⁻¹). For GC separation, the temperature program started at 70 °C (held for 2 min.), set at 10 °C per min. to 250 °C and was held isothermally for 5 min. The gas chromatographs were coupled to HP 5973N mass selective detectors (LMSD, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), operated under electronic impact (EI) mode at 70 eV using single ion monitoring mode (see Table 1) at 0.92 scan.s⁻¹ (dwell time 70 ms). The electron multiplier voltage (EMV) sensitivity was set to 1976 V. The transfer line, source and quadrupole temperatures were 280, 230 and 150 °C, respectively. The same chromatographic methods have been used for the two analyses, only the selected ions were different. The chemical structures and selected ions for GC-MS analyses are presented in Table 1.

A mixture made up of standard pharmaceuticals and deuterated compounds was injected at the beginning and at the end of each GC-MS sequence for response factor determination and procedural blanks were performed together with samples to control potential contamination. All the addition of standards and all volume manipulations were gravimetrically controlled.

Laboratory experiments:

Validation of pharmaceutical extraction:

The extraction procedure has been first evaluated on HLB cartridges constituted by the same sorbent as the POCIS sampler. Pharmaceutical standards have been loaded on cartridges in 1 ml of ultra pure water with internal standards (concentrations of 1 µg.ml⁻¹ for each compound, gravimetrically measured). Cartridges were dried then eluted with 18 ml of ethyl acetate/acetone mixture (50/50; v/v).

Experimental design:

Calibrations were set up to measure the uptake of pharmaceuticals at different combinations of temperature, salinity, concentration and time of exposure, presented in Table 2. For sampling rate calculations, POCIS have been exposed individually in 2 l tanks, containing ultrapure water fortified with target analytes, renewed each day and stirred by a magnetic stirring bar.

For experiments 1 and 2 (effects of time, temperature and salinity), both water and sorbent have been analysed. For the third experiment, water samples have been

analysed at $t = 0$ h, $t = 1$ h and $t = 48$ h for the three experimental units. A fourth tank containing only fortified water without the POCIS device has been used as a control unit, in order to follow compound degradation during exposure. In this experiment, both sorbent and membranes have been quantified at the end of the experiment.

The analyte sampling rate (R_s) is determined from laboratory exposures. Alvarez (1999) calculated this value from the analyte concentration remaining in the water following each exposure (11). The measured analyte water concentration remaining is subtracted from the original concentration, divided by the original water concentration, multiplied by the volume of water in litres and then divided by the number of days the device was exposed, which provides the sampling rate in units of litres per day.

By using the first results of degradation kinetics, presented in Figure 1 it has been chosen to use the mass of analytes trapped in the sorbent instead of the loss of compounds in water. Actually, compound loss in water is not only due to trapping in the sorbent, but also due to a degradation phenomenon, that should not be taken into account in the calculation. The sampling rate was also calculated as shown in Equation (1). Using calculated sampling rates the water pharmaceutical concentration can be calculated using Equation (2).

$$(1) \quad R_s = \frac{Q_s - Q_0}{d} \times V$$

Where Q_0 and Q_s are the analyte concentrations in the sorbent respectively at the beginning and at the end of exposure, V is the volume of water in litres, and d is the exposure time in days.

$$(2) \quad C_w = \frac{C_s \times M_s}{R_s \times d}$$

Where C_s is the analyte concentration in the sorbent, M_s is the mass of sorbent and d the time of POCIS exposure in the environmental field

The sampling campaign has been performed in the Seine Estuary, on the dam of Poses (kilometric point 202). The pharmaceutical contamination of the Seine estuary has been previously studied (24). Concentrations ranging from a few ng.l⁻¹ to a few µg.l⁻¹ have been measured. The choice of this already known area allows a comparative study between discrete sampling and passive sampling and allows to look at the results objectively. Figure 2 shows the study area and the sampling point. 6 POCIS devices have been deployed in the bed of the river ensuring the sampling of the water stream (stirred condition). The POCIS holder containing the 6 devices has been hung on the dam. 3 devices were removed after 3 days of exposure and the other 3 after 34 days. In parallel, discrete samples were taken during the first 3 days.

The objectives of this experimentation were to determine the behaviour of POCIS devices in natural conditions (flow, suspended matter, organic matter deposit...) and their ability to give time weighted average pharmaceutical concentrations.

RESULTS AND DISCUSSION

Laboratory experiment

Validation of extraction methods:

The average recoveries of pharmaceutical residues, using HLB cartridges ranged from 66% to 111% (Figure 3) and standard deviations ($n=3$) varied between 1 and 12%. The objective of the use of Oasis® cartridges was to mimic the elution of compounds

sorbed to POCIS sorbent. It has been difficult to estimate the volume of solvent required to desorb compounds from the POCIS sorbent. Nevertheless, the volume of solvent mixture (18 ml) chosen as a compromise between efficiency and saving of solvent, has led to good recoveries in the case of cartridges, which makes it possible to consider that analytes will be totally desorbed from the sorbent in the case of the POCIS phase.

Effects of pharmaceutical water concentration:

It is important to document the analyte water concentration influence on sampling rates: the relationship between water concentration and sampling rates could be very harmful for quantitative use of POCIS devices.

The results obtained under 2 different conditions (5 and 0.5 $\mu\text{g.l}^{-1}$) after a 7 day exposure are shown in Figure 4. For all compounds, there is a linear uptake rate directly proportional to exposure concentrations.

No significant variability of the accumulation rate has been observed between those two conditions, showing that the sampling rate is not dependent on analyte concentration in water. Thus, time weighted average concentration can be calculated from laboratory obtained uptake rate and from the mass of analytes sorbed into the POCIS device without any previous knowledge of the system.

Effects of the temperature and salinity factors

Another experiment has concerned the effects of water temperature on the uptake rate. Depending on seasons, the water temperature can show a large range of variations. For seasonal samplings in the Seine estuary temperatures ranging from 10 °C to 27 °C have been measured. For laboratory studies 2 temperatures have been retained, corresponding to a more conventional range of values (5 °C and 21 °C). As shown in Figure 5, the increase in water temperature has enhanced sampling rate for all pharmaceuticals but more or less depending on analytes, except for carbamazepine for which R_s seems to stay constant (the variation of 6% is below the RSD of the concentration measurement). The highest increase has been obtained for the ketoprofen (100%).

This tendency can be explained by the capacity of temperature increase to facilitate analyte transfer from sampled water to sorbent by modifying the compound solubility and the octanol-water partition coefficient (26).

One aim of this study was to develop the use of new tools dealing with environmental monitoring in various aquatic systems, such as river waters, STP effluents, but also, estuarine systems and marine waters. For that, there is a need for a better knowledge of sampling rate behaviour depending on the salinity. Two tested conditions have been chosen in order to have a first approach of naturally occurring conditions, covering the classical range of salinity: 0 and 35 PSU. The results are shown in Figure 6.

Results fluctuate according to compounds and particularly chemical groups. Most of compounds have shown no significant effect of the salinity, but others fluctuate significantly. Fluoxetine has shown a decrease up to 40% and tricyclic antidepressant compound (amitriptyline, doxepine and imipramine) sampling rates have been reduced respectively by 52%, 53% and 64%, when salinity has increased.

This variability has not yet been totally elucidated and needs more investigations. This phenomenon could perhaps be explained by changes in analyte physico-chemical properties in relation to salinity. Indeed, salinity enhances water ionic strength and thus

decreases compound hydrophily. This effect is more important for the less polar compounds, such as tricyclic antidepressants.

On the one hand, the variations observed highlight the need for more investigations in order to be able to predict sampling rates to use depending on water temperature or salinity range measured during environmental exposure duration. On the other hand, high R_s increase has been obtained for 6 °C of variation in water temperature or for very different salinity range, which represent an important variation for environmental conditions during exposure duration. These variations are very unlikely to occur for exposure over 1 month, which is the target of such tools. The sampling rates need to be determined for a global temperature scale, but without any continuous adjustment if the range of temperatures is not too important. Table 3 compares the calculation of pharmaceutical water concentrations using the three values for R_s (15°C/ 0 PSU; 21°C/ 0 PSU and 21°C/ 35 PSU) and the same theoretical value for M_s (mass of compound trapped in the sorbent). This way, the three calculated pharmaceutical concentrations are in the same range of values, with variability depending on the selected conditions ranging from 17% for naproxen to 57% for caffeine with an average at 35% that allows a first assessment of environmental contamination. Depending on the aims of the study, this kind of results is often sufficient for environmental monitoring.

Relationship between sampling rates and compounds:

The uptake rates depend on compounds, related to their chemical structures. For neutral compounds, bigger sampling rates have been obtained for analytes with high octanol-water partition coefficients, such as doxepine, imipramine or amitriptyline with log K_{ow} values of 4.3, 4.8 and 4.9 respectively. Figure 7 shows the measured sampling rates depending on compound K_{ow} values. A positive correlation can be highlighted under freshwater conditions (entire line, $R^2 = 0.6944$). In this case, K_{ow} values seem to play an important part in pharmaceutical accumulation. The few data already published (11) for other compounds for freshwater (ethinyloestradiol, diazinon and atrazine) respect the same relationship. Nevertheless, considering salty water (dotted line) the relationship between K_{ow} and R_s is no more valid ($R^2 = 0.1748$). As seen before, some other phenomena occur in salty water and disturb this correlation.

Concerning acidic compounds (data not shown), there is no relationship between K_{ow} and sampling rates, in saline waters as well as in fresh waters, showing the part played by other phenomena in the compound uptake rates. The effects of ionic strength and pH on acidic compounds can perhaps influence the sampling rate more than compound hydrophobicity (low K_{ow} values for those very polar compounds), but need further investigation to be elucidated.

Environmental field

Figure 8 shows analyte concentration (in ng.g⁻¹ of sorbent) obtained after 3 days of exposure at the dam of Poses in the Seine estuary. These results show good reproducibility for analyte accumulation, with variability below 20% between the three devices that have been implemented in the aquatic medium, despite variable environmental conditions.

The use of sampling rates obtained in laboratory has led to calculate the concentrations for 4 analytes that are shown in Figure 9. They are compared to averages of measured concentrations during the same time by classical methodology (3 days, one sample per day). During a short time of exposure, POCIS gives relative good quantifications for pharmaceuticals: for carbamazepine, the measured concentrations are 35 ± 3 ng.l⁻¹ versus 41 ± 5 ng.l⁻¹ for TWA calculated concentration; for caffeine and

diazepam, similar results have been obtained, with a bigger difference for diazepam due to quantification near the detection limits for the classical methodology. For amitriptyline, the measured values are under the limits of detection for the classical methodology, while POCIS sorbent analysis allows analyte identification and quantification, showing the accumulative property of POCIS tools. By increasing the quantity of extracted compounds, it should be possible to detect not easily detectable compounds by discrete sampling.

Considering the 34 day exposure experiment, the results are rather inconclusive. When comparing analyte masses adsorbed on POCIS sorbent between 3 days and 34 days, that is an exposure time 11 times longer, the mass of each analyte sorbed to the device should be 11 times bigger. Nevertheless, for this environmental field study, the content is not proportional to exposure time, except for diazepam (10 times bigger) (See Figure 10).

Several explanations can be put forward concerning the differences between 3 and 34 day measured water concentrations. First, R_s have been determined in experimental units stirred under a magnetic stirring bar, which cannot mimic in a realistic way a natural river flow rate. Second, analyte degradation phenomena can occur in sorbent during the trapping stage. This hypothesis can explain the loss of caffeine between the mass of compound in the sorbent after 3 days (334 ng.g⁻¹) and 34 days (1394 ng.g⁻¹) showing an accumulation factor of 4 instead of 11, considering the time of exposure. Caffeine is known to be easily degradable in aquatic systems (27). Nevertheless, this hypothesis cannot explain the loss of carbamazepine, more persistent in the water.

On the other hand, a deficit in the uptake rate can occur due to biofouling development on POCIS membranes, shown to be very important after 34 days of POCIS immersion in the Seine water.

The qualitative interest of POCIS devices has been highlighted by the analysis of POCIS 34 day exposure extract using GC-MS in scan mode. Some compounds have been identified, such as pesticides but especially iminostilbene (Figure 11), a degradation product of carbamazepine, already identified as a photodegradation product (28). This compound, never studied in natural systems can perhaps be interesting in order to assess the environmental risk that pharmaceutical products can represent for aquatic organisms such as other biodegradation or photodegradation by-products. The POCIS tool gives access to a real screening study, allowing to precise the typology of pollution. The use of POCIS can be developed for a TIE (Toxicity Identification and Evaluation) approach that needs a whole sample to characterize the compounds responsible for toxicity (29).

CONCLUSION

Very few sampling rate data are available for the estimation of ambient contaminant concentrations from analyte levels in exposed POCIS. This work gives new R_s data for emerging compounds and has proved that POCIS technology has great advantages besides its passive mode of operation: on the one hand the uniformity or reproducibility of the sampling matrix and on the other hand, the ability to detect compounds at low concentration levels below detection limits of discrete sampling. Indeed, the ability to compare data from global, regional, local, and contiguous sites is dependent on sampling methods that are uniform, reproducible and usable in variable media.

The quantitative use of POCIS needs to have suitable sampling rate values for each compound of interest. Laboratory experiments developed in this work show the part played by numerous environmental factors on sampling rates. Moreover, the application

to the environmental field confirms that laboratory experiments cannot mimic all natural condition, giving approximate calculated time weighted average concentrations. To suppress this limitation, the Performance Reference Compound (PRC) approach has been used with first promising results for semipermeable membrane devices (SPMDs) (12, 13, 30, 31). PRC is a compound that is added to the sampling device during the device production and is lost into the surrounding water during experiment. The determination of the amount of lost PRC provides an environmental adjustment factor to correct laboratory-derived sampling rates for the site-specific environmental factors. This approach is under investigation but needs costly and time consuming laboratory developments that limit scientific advances in this way. The interest of the qualitative use of POCIS is not negligible and this tool should be more and more generalized, especially for toxicity characterization (TIE on effluent...) related to advances in technological development of new analytical instruments (GC-MS-MS, GC-TOF-MS, LC-MS-MS...) that allow quantification and identification of compounds at very low concentration levels.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge financial support from the European Union's Sixth Framework Programme (SSPI-CT-2003-502492) SWIFT-WFD (Screening methods for Water data InFormaTion in support of the implementation of the Water Framework Directive), the "Région Aquitaine", the Seine Aval and the "GIS ECOBAG" programs for research funding. The authors wish to thank the NFS (National Funding for Science) for providing the PhD grant of A. Togola.

REFERENCES

- (1) Alvarez, D.; Petty, J. D.; Huckins, J. N.; Jones-Lepp, T. L.; Getting, D. T.; Goddard, J. P.; Manahan, S. E. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23*, 1640-1648.
- (2) Jones-Lepp, T. L.; Alvarez, D.; Petty, J. D.; Huckins, J. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *47*, 427-739.
- (3) Petty, J. D.; Huckins, J. N.; Alvarez, D.; Brumbaugh, W. G.; Cranor W.L.; Gale R.W.; Rastall A.C.; Jones-Lepp T.L.; Leiker T.J.; Rostad C.E.; Furlong E.T. *Chemosphere* **2004**, *54*, 695-705.
- (4) Martin, H.; Patterson, B. M.; Davis, G. B.; Grathwohl, P. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 1360-1364.
- (5) Martin, G. R.; Smoot, J. L.; White, K. D. *Water Environ Res* **1992**, *64*, 866-876.
- (6) Stolker, A. A. M.; Niesing, W.; Hogendoorn, E.; Versteegh, J. M.; Fuchs, R.; Brinkman, U. T. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 955-963.
- (7) Ternes, T. A.; Bonerz, M.; Schmidt, T. *J. Chrom. A* **2001**, *938*, 175-185.
- (8) Vanderford, B. J.; Pearson, R. A.; Rexing, D. J.; Snyder, S. A. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6265-6274.
- (9) Verenitch, S. S.; Lowe, C. J.; Mazumder, A. *J. Chrom. A* **2006**, *1116*, 193-203.
- (10) Namiesacutenik, J.; Bozdotena, Z.; Kot-Wasik, A.; Partyka, M.; Wasik, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 279-301.
- (11) Alvarez, D. *PhD thesis*, Missouri-Columbia, Columbia, **1999**.
- (12) Petty, J. D.; Huckins, J. N.; Martin, D. B.; Adornato, T. G. *Chemosphere* **1995**, *30*, 1891-1903.
- (13) Huckins, J.; Manuweera, G. K.; Petty, J. D.; Mackay Donald ; A., L. J. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 2489-2496.
- (14) Barcelo, D. *TrAC* **2003**, *22*, editorial.
- (15) Halling-Sorensen, B.; Nielsen, S. N.; Lanzky, P. F.; Ingerslev, F.; Holten Lützhoff, H. C.; Jorgensen, S. E. *Chemosphere* **1998**, *36*, 357-393.

-
- (16) Henschel, K. P.; Wenzel, A.; Diedrich M.; Fliedner A. *Regul. Toxicol. Pharm.* **1997**, *25*, 220-225.
- (17) Kümmerer, K. *Chemosphere* **2001**, *45*, 957-969.
- (18) Brain, R. A.; Johnson, D. J.; Richards, S. M.; Hanson, M. L.; Sanderson, H.; Lam, M. W.; Young, C.; Mabury, S. A.; Sibley, P. K.; Solomon, K. R. *Aquatic Toxicol.* **2004**, *70*, 23-40.
- (19) Cleuvers, M. *Toxicol. Lett.* **2003**, *142*, 185-194.
- (20) Fent, K.; Weston, A.; Caminada, D. *Aquat Toxicol* **2006**, *76*, 122-159.
- (21) Alvarez, D.; Cranor, W. L.; Huckins, J.; Clark, R. C.; Perkins, S. D. *USGS Final Report* **2004**.
- (22) Stuer-Lauridsen, F.; Djolholt, J. *Water Res.* **2000**, *34*, 3478-3482.
- (23) Labadie, P.; Budzinski, H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 1199-1205.
- (24) Togola, A.; Budzinski, H. *submitted to Anal. Bioanal. Chem.* **2006**.
- (25) Togola, A.; Budzinski, H. *submitted to Anal. Chim. Acta* **2006**.
- (26) Van Wezel, A. P. *Environ. Rev.* **1998**, *6*, 123-137.
- (27) Joss, A.; Keller, E.; Alder, A. C.; Gobel, A.; Mc Ardell, C. S.; Ternes T.; Siegrist H. *Water Res.* **2005**, *39*, 3139-3152.
- (28) Lam, M. W.; Young, C. J.; Brain, R. A.; Johnson, D. J.; Hanson, M. A.; Wilson, C. J.; Richards, S. M.; Solomon, K. R.; Mabury, S. A. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23*, 1431-1440.
- (29) Burnison, B. K.; Hartmann, A.; Lister, A.; Servos, M. R.; Ternes, T.; Van Der Kraak, G. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, *22*, 2243-2250.
- (30) Booij, K.; Smedes, F.; Van Weerlee, E. *Chemosphere* **2002**, *46*, 1157-1161.
- (31) Vrana, B.; Allan, I. J.; Greenwood, R.; Mills, G. A.; Dominiak, E.; Svensson, K.; Knutsson, J.; Morrison, G. *TrAC* **2005**, *24*, 845-868.

Table captions:

Table 1 : Molecular structures, molecular weight ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) and m/z ratio used for selected ion monitoring mode analysis by GC-MS. Underline m/z ratio correspond to derivatized compounds.

Table 2 : Experimental conditions for sampling rate evaluation.

Table 3 : Pharmaceutical water concentrations calculated from different Rs calculated in three different conditions ($Q_s = 5,000 \text{ ng}$ and 10 day of device exposure). Results are expressed in $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$. For abbreviations, see Table 1.

Figure captions:

Figure 1 : Degradation kinetics of some analytes during POCIS exposure ($n=3$, except for sampling after 1 h, $n=1$).

Figure 2 : Study area : the Seine Estuary.

Figure 3 : Yields of extraction for SPE on HLB cartridges ($n=3$). For abbreviations, see Table 1.

Figure 4 : Variability of sampling rate depending on the analyte concentration ($n=3$). For abbreviations, see Table 1.

Figure 5 : Temperature effects on uptake rates, no replicates. For abbreviations, see Table 1.

Figure 6 : Salinity effects on uptake rates ($n=3$). For abbreviations, see Table 1.

Figure 7 : Relationship between octanol-water partition coefficients ($\log K_{ow}$) and sampling rates obtained for the two conditions of salinity (this study) and from an other publication for atrazine (atraz), diazinon (diaz) and ethinylestradiol (EE2) obtained at 0 PSU (Alvarez, 1999). Dotted line corresponds to correlation at 35 PSU and full one to correlation at 0 PSU. For abbreviations, see Table 1.

Figure 8 : Accumulation for three days of exposure in the case of the Seine Estuary experiment. For abbreviations, see Table 1.

Figure 9 : Comparison of calculated and measured concentrations for three days POCIS exposure in the Seine Estuary ($n=3$). For abbreviations, see Table 1.

Figure 10: Comparison of accumulation rate between 3 and 34 days POCIS exposure in the Seine Estuary ($n=3$). For abbreviations, see Table 1.

Figure 11: Comparison of GC-MS chromatograms obtained for 1 liter sample (with classical extraction on MCX cartridge) and the extract for 34 day exposed POCIS (analysis in SCAN mode) and structure of identified compound (iminostilbene) with mass spectrum (NIST 98).

Table 1 : Molecular structures, molecular weight ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) and m/z ratio used for selected ion monitoring mode analysis by GC-MS. Underline m/z ratio correspond to derivatized compounds.

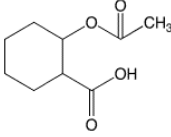
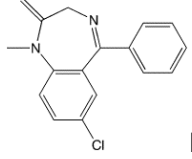
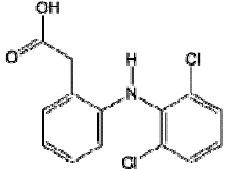
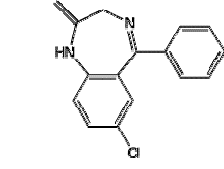
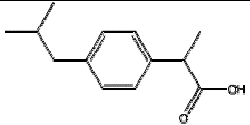
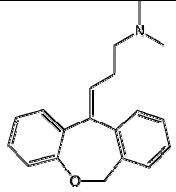
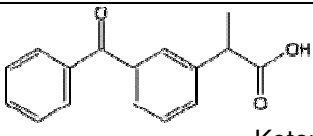
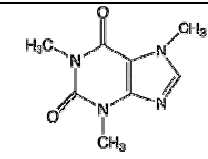
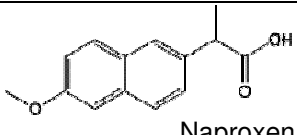
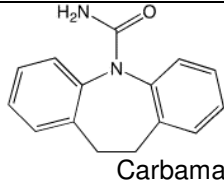
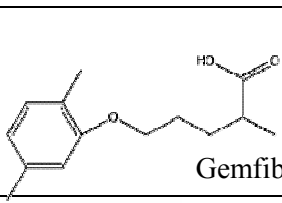
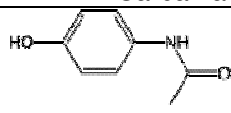
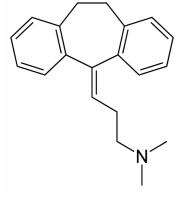
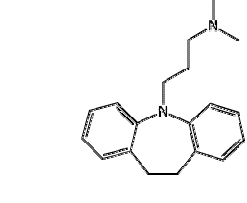
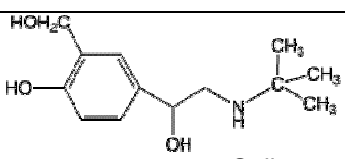
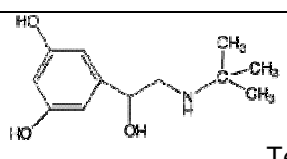
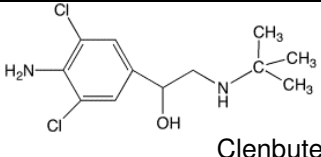
| Chemical structure | MW | m/z | Chemical structure | MW | m/z |
|--|-----|-----|---|-----|-----|
|  Aspirin (ASP) | 180 | 195 |  Diazepam (DZP) | 284 | 256 |
|  Diclofenac (DICLO) | 295 | 214 |  Nordiazepam (NDZP) | 270 | 242 |
|  Ibuprofen (IBU) | 206 | 160 |  Doxepine (DOX) | 279 | 58 |
|  Ketoprofen (KETO) | 254 | 282 |  Caffeine (CAF) | 194 | 194 |
|  Naproxen (NAP) | 230 | 185 |  Carbamazepine (CBZ) | 236 | 193 |
|  Gemfibrozil (GEMF) | 250 | 201 |  Paracetamol (PARA) | 151 | 206 |
|  Amitriptyline (AMI) | 277 | 58 |  Imipramine (IMIP) | 280 | 234 |
|  Salbutamol (SALB) | 239 | 369 |  Terbutalin (TERB) | 225 | 356 |
|  Clenbuterol (CLENB) | 276 | 335 | | | |

Table 2 : Experimental conditions for sampling rate evaluation.

| Experimentation n° | Nb POCIS | Concentration | Temperature | Salinity (PSU) | Exposure time (day) |
|--------------------|----------|------------------------|-------------|----------------|---------------------|
| 1 | 1 | 5 µg.l ⁻¹ | 15 °C | 0 | 7,14 and 21 |
| | 1 | 5 µg.l ⁻¹ | 27 °C | 0 | 7,14 and 21 |
| 2 | 3 | 0.5 µg.l ⁻¹ | 21 °C | 0 | 7 |
| | 3 | 5 µg.l ⁻¹ | 21 °C | 0 | 7 |
| | 3 | 5 µg.l ⁻¹ | 21 °C | 35 | 7 |
| 3 | 3 | 10 µg.l ⁻¹ | 21 °C | 0 | 2 |

Table 3 : Pharmaceutical water concentrations calculated from different Rs calculated in three different conditions (Qs = 5,000 ng and 10 day of device exposure). Results are expressed in ng.l⁻¹. For abbreviations, see Table 1.

| | Rs 0 PSU / 21 °C | Rs 35 PSU / 21 °C | Rs 0 PSU / 15 °C | Average | RSDs | RSDs % |
|-------|---------------------|----------------------|---------------------|---------|------|--------|
| Caf | 1160 | 1012 | 2692 | 1622 | 930 | 57% |
| Ami | 198 | 406 | 461 | 355 | 138 | 39% |
| Dox | 166 | 357 | 236 | 253 | 97 | 38% |
| Imi | 221 | 614 | 297 | 377 | 209 | 55% |
| Cbz | 223 | 309 | 146 | 226 | 81 | 36% |
| Dzp | 317 | 442 | 547 | 435 | 115 | 26% |
| Ndzp | 488 | 749 | 648 | 629 | 132 | 21% |
| Ibu | 930 | 994 | 1458 | 1128 | 288 | 26% |
| Gem | 1676 | 1251 | 2303 | 1744 | 529 | 30% |
| Nap | 623 | 590 | 806 | 673 | 117 | 17% |
| Diclo | 537 | 487 | 795 | 606 | 166 | 27% |
| Keto | 312 | 269 | 583 | 388 | 170 | 44% |

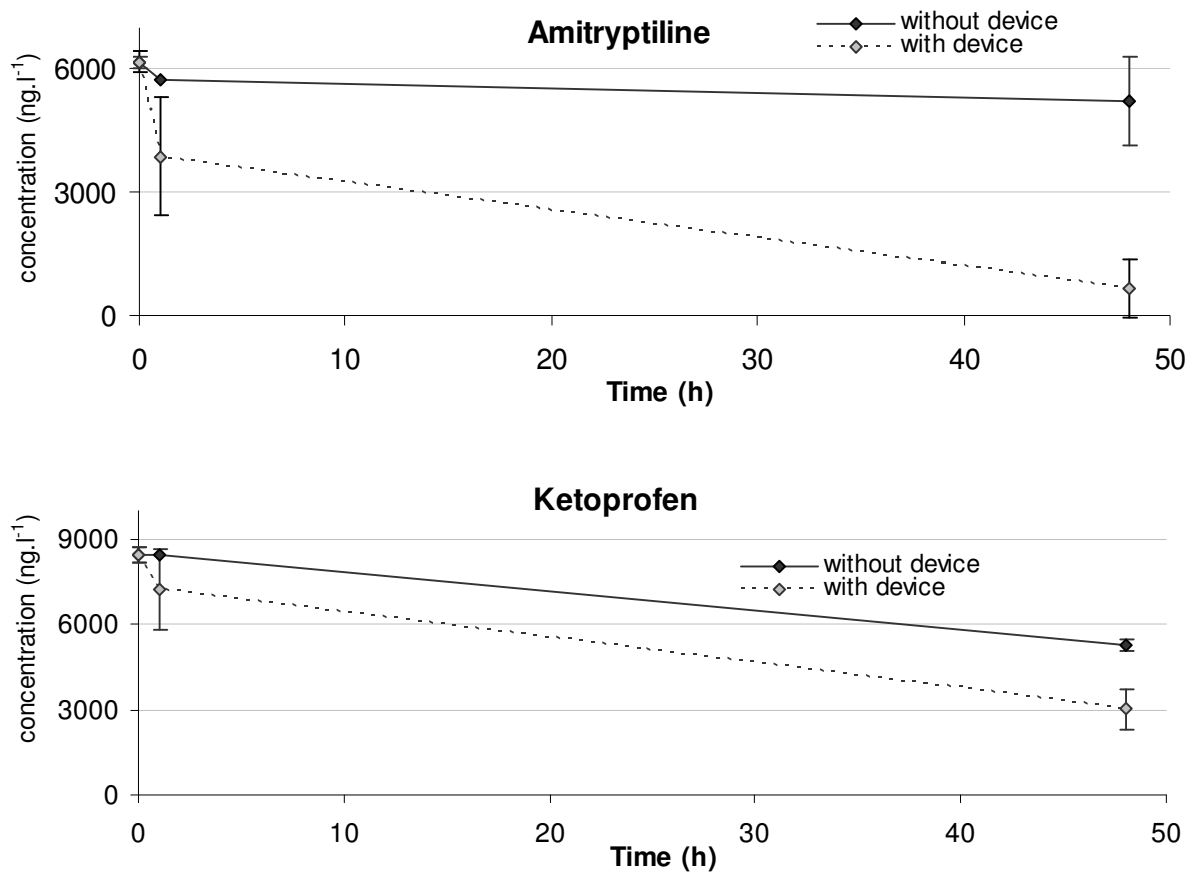


Figure 1 : Degradation kinetics of some analytes during POCIS exposure (n=3, except for sampling after 1 h, n=1).

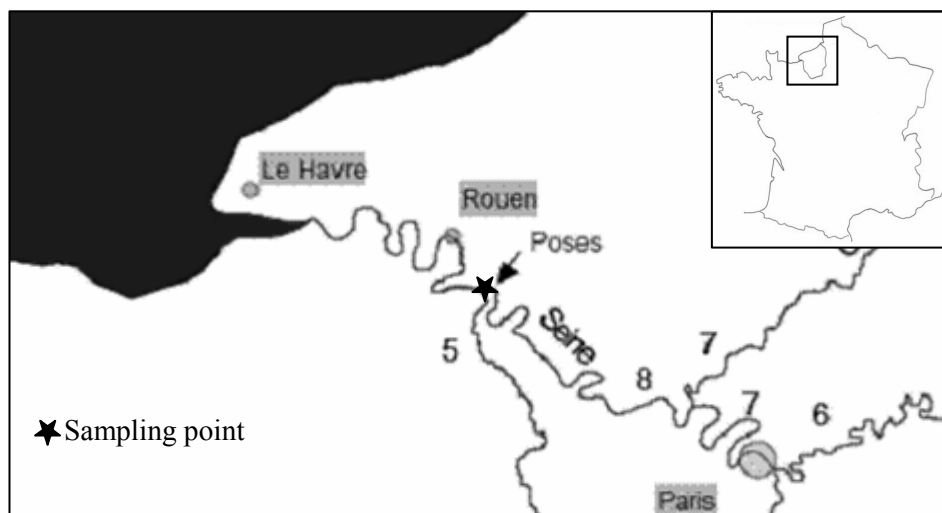


Figure 2 : Study area : the Seine Estuary.

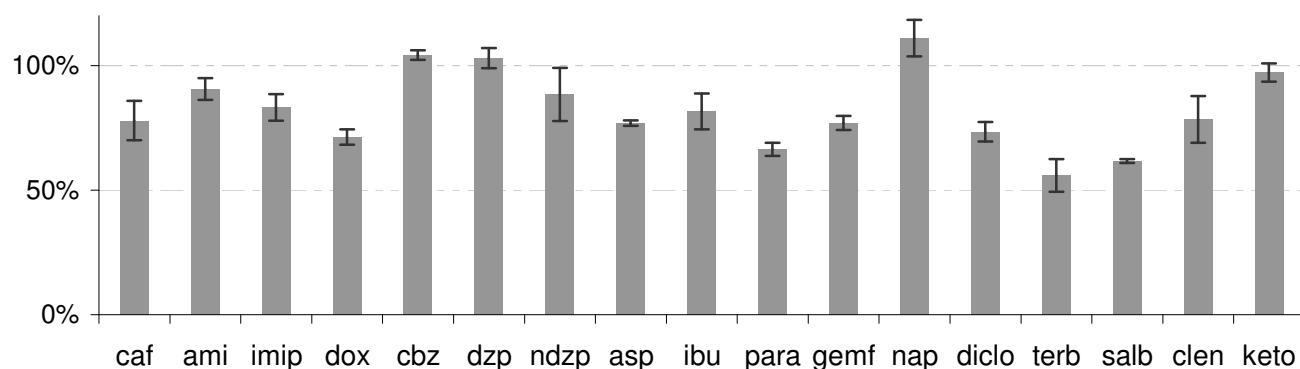


Figure 3 : Yields of extraction for SPE on HLB cartridges (n=3). For abbreviations, see Table 1.

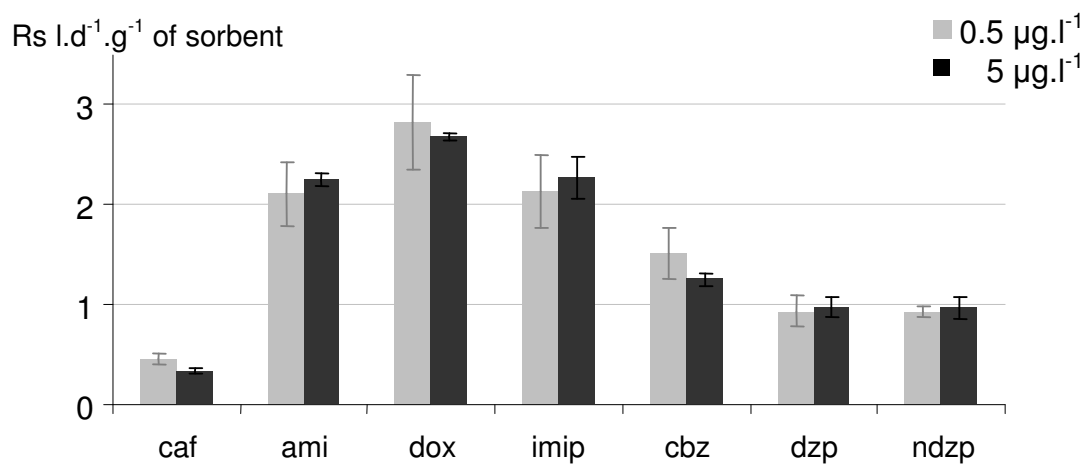


Figure 4 : Variability of sampling rate depending on the analyte concentration (n=3). For abbreviations, see Table 1.

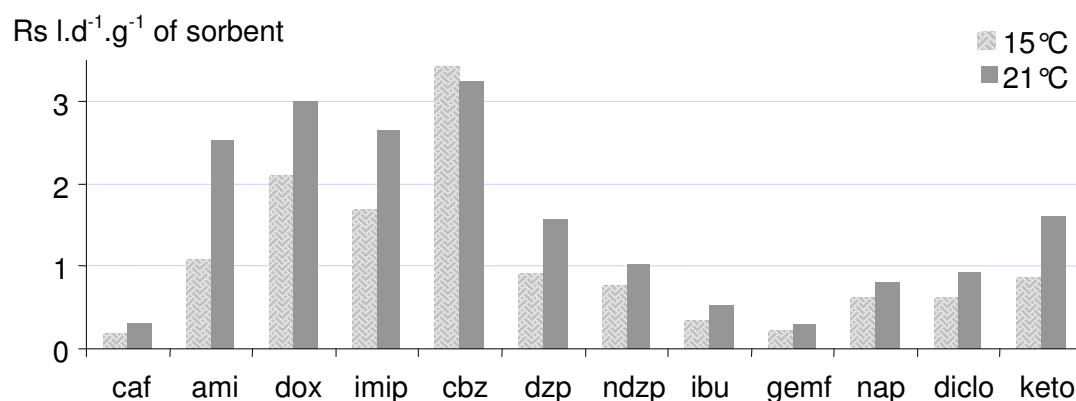


Figure 5 : Temperature effects on uptake rates, no replicates. For abbreviations, see Table 1.

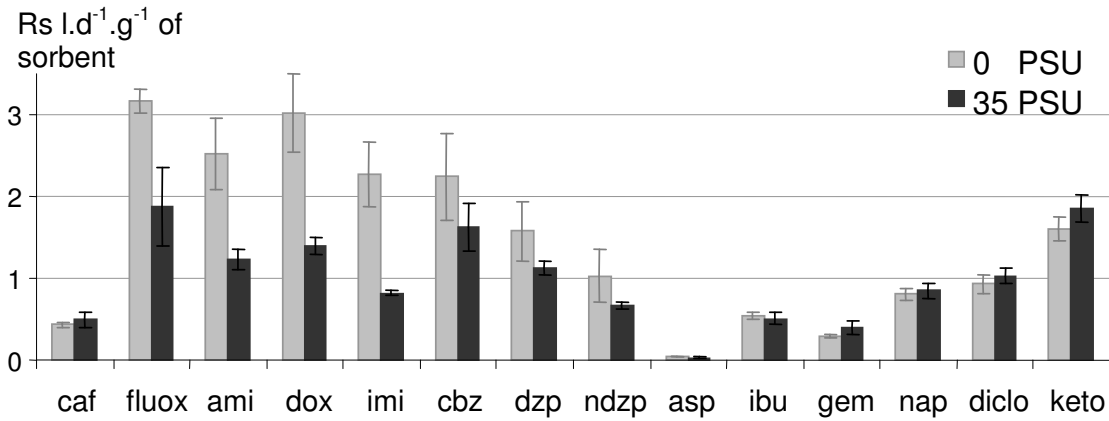


Figure 6 : Salinity effects on uptake rates (n=3). For abbreviations, see Table 1.

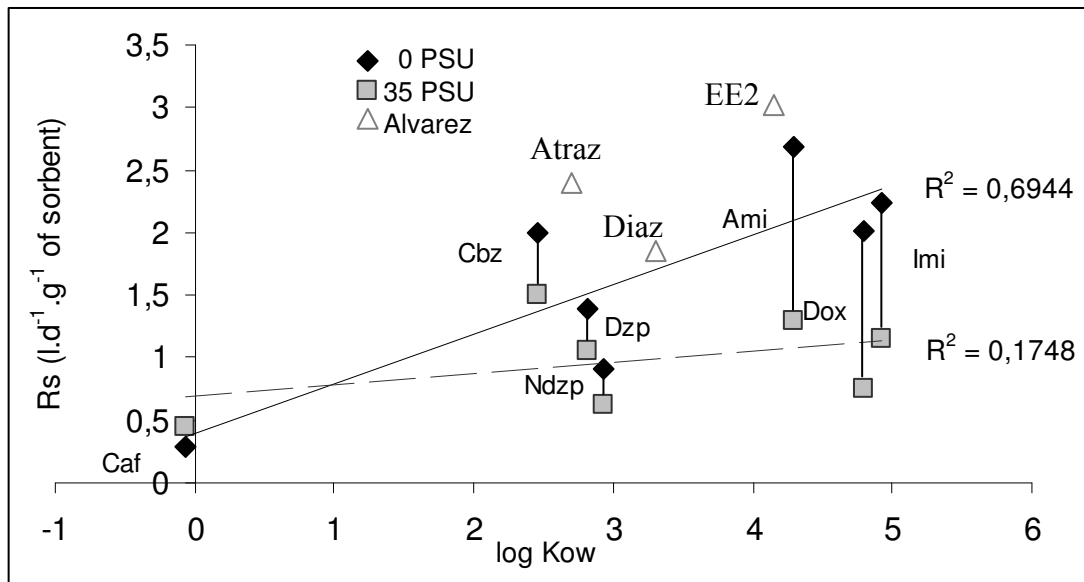


Figure 7 : Relationship between octanol-water partition coefficients (log Kow) and sampling rates obtained for the two conditions of salinity (this study) and from an other publication for atrazine (atraz), diazinon (diaz) and ethinylestradiol (EE2) obtained at 0 PSU (Alvarez, 1999). Dotted line corresponds to correlation at 35 PSU and full one to correlation at 0 PSU. For abbreviations, see Table 1.

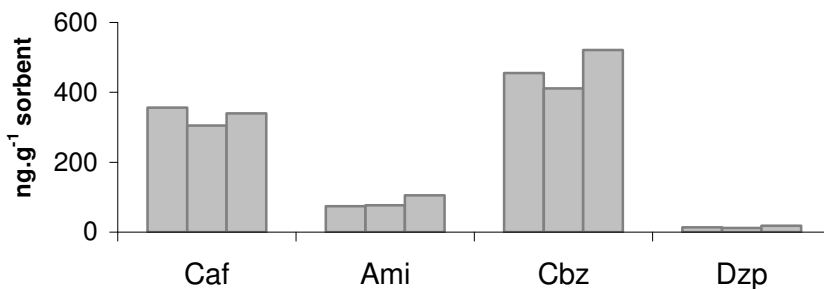


Figure 8 : Accumulation for three days of exposure in the case of the Seine Estuary experiment. For abbreviations, see Table 1.

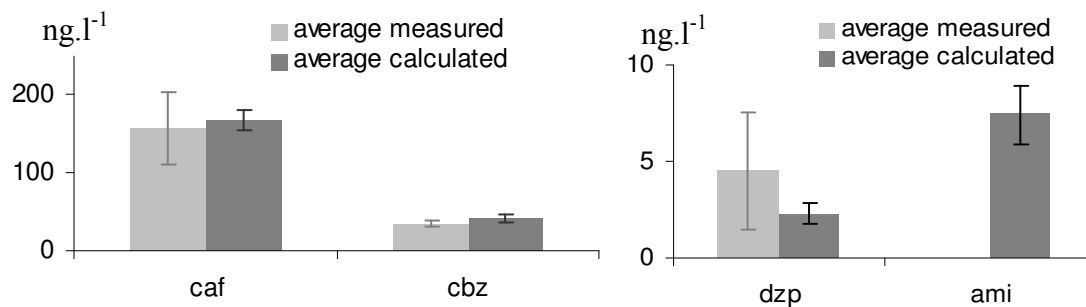


Figure 9 : Comparison of calculated and measured concentrations for three days POCIS exposure in the Seine Estuary (n=3). For abbreviations, see Table 1.

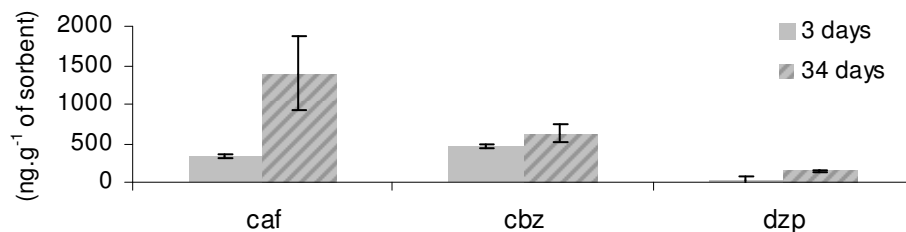


Figure 10: Comparison of accumulation rate between 3 and 34 days POCIS exposure in the Seine Estuary (n=3). For abbreviations, see Table 1.

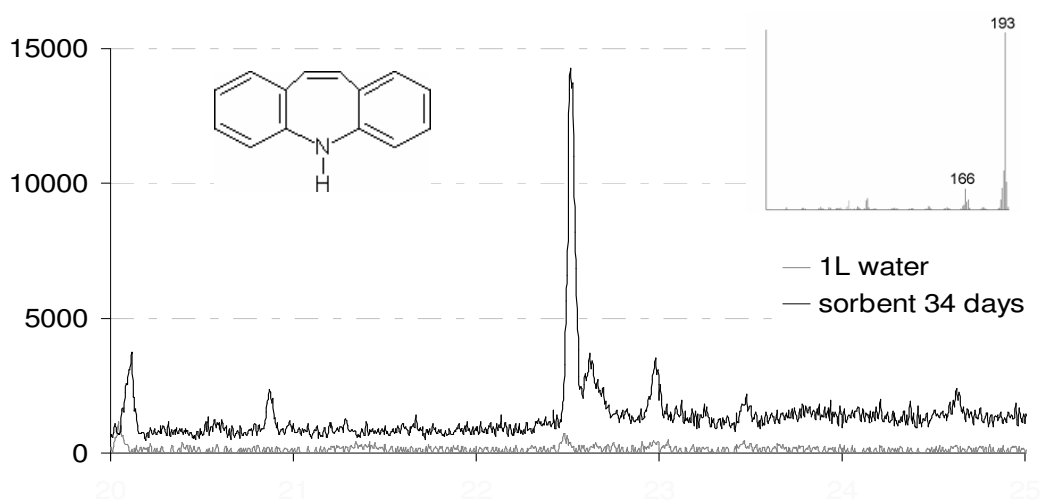


Figure 11: Comparison of GC-MS chromatograms obtained for 1 liter sample (with classical extraction on MCX cartridge) and the extract for 34 day exposed POCIS (analysis in SCAN mode) and structure of identified compound (iminostilbene) with mass spectrum (NIST 98).

RESUME :

Les substances pharmaceutiques appartiennent à la classe des contaminants émergents qui sont depuis peu étudiés dans les milieux naturels. Ces composés d'usage très répandu et consommés en quantités très importantes sont introduits dans le milieu aquatique via les stations d'épuration.

La première partie de ce travail de thèse a consisté en la mise au point et en la comparaison de différents protocoles d'échantillonnage (ponctuel et intégratif (POCIS)), d'extraction (SPE, SPME, extraction assistée par micro-ondes) et d'analyse (GC/MS), nécessaires pour le dosage des composés pharmaceutiques dans différents compartiments des systèmes aquatiques (phases dissoute, particulaire et sédimentaire, organismes biologiques). Ensuite, un premier bilan de la contamination de différents systèmes aquatiques (Seine, Gironde, Loire, Adour, milieu marin côtier) a été dressé. Une contamination du milieu aquatique par ces composés a été mise en évidence pour tous les systèmes étudiés. Les concentrations mesurées vont selon les composés, les stations et les saisons de quelques ng.l^{-1} à quelques dizaines de $\mu\text{g.l}^{-1}$. Ces études ont permis de documenter les origines (qualification et quantification des sources) et le devenir (phénomènes de dégradation) de ces composés. Elles ont aussi permis de mettre en évidence les phénomènes de partition entre les différentes phases et le potentiel de bioaccumulation de certaines substances.

MOTS-CLEFS :

Composés pharmaceutiques, effluents, eaux de surface, biogéochimie, polluants aquatiques

ABSTRACT :

Pharmaceutical substances belong to the class of the emerging contaminants which have started recently to be studied in natural environments. The widespread use and the large consumed quantities of these compounds can lead to important inputs into the aquatic environment through wastewater treatment plants.

The first part of this work consisted in the development and the comparison of various procedures concerning sampling (spot sampling and passive sampling), extraction step (Solid Phase Extraction, Microwave-assisted extraction) and analysis (Gas chromatography / mass spectrometry), needed for pharmaceutical analysis in various aquatic compartments (dissolved, particulate and sedimentary phases, biological organisms).

Thus a first assessment of pharmaceutical contamination of various aquatic systems (Seine, Loire, Adour and Garonne estuaries, Mediterranean coastal water...) has been undertaken. A contamination of aquatic compartments with pharmaceutical substances has been highlighted for all studied systems. Concentrations ranging from few ng.l^{-1} to several $\mu\text{g.l}^{-1}$ have been measured, depending on compounds, sampling stations and seasonal variations. This work has allowed to document the origins (quantification and qualification of inputs) and the fate (degradation phenomena) of those compounds. It has also highlighted partition phenomena between the different phases (ie particulate matter and dissolved phase) and the bioaccumulation capability of some of those substances.

KEYWORDS: Pharmaceuticals, Wastewater, Surface water, Biogeochemistry, Aquatic pollutants